

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

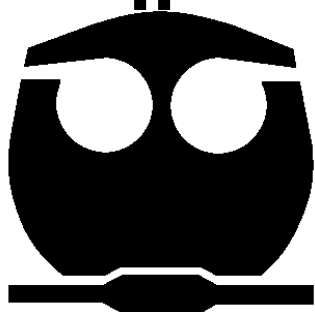
*Efecto de melatonina y análogos sobre
las propiedades electrofisiológicas de
rebanadas de hipocampo de rata.*

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

XÓCHITL PATRICIA VEGA ACEVEDO



MÉXICO, D. F.

2007



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: Profra. Ofelia Espejo González.

VOCAL: Profra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

SECRETARIO: Profr. Alejandro Ortiz Osornio.

1er. SUPLENTE: Profr. Alfonso Sebastián Lira Rocha.

2do. SUPLENTE: Profra. Ruth Bustamante García.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Química.
Departamento de Farmacia. Laboratorio de Neurofarmacología, Edificio
“A”, Anexo Laboratorio 1/ E.

ASESOR DEL TEMA

DRA. ELIA BROS LA NARANJO RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO

DR. ALFONSO SEBASTIAN LIRA ROCHA

SUSTENTANTE

XÓCHITL PATRICIA VEGA ACEVEDO

AGRADECIMIENTOS

Al programa de proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT-DGAPA-UNAM**) **Clave No. IN205905** (2005-2006) para el desarrollo de este trabajo como beca de tesis y beca de Investigación.

Al programa de Apoyo a Licenciatura y Posgrado (PAIP), de la Facultad de Química UNAM **Clave No. 639021** para el desarrollo de este trabajo. (2006)

A La Dra. Elia. B. Naranjo Rodríguez por haberme permitido realizar mi tesis con ella, quien siempre me mostró su confianza y su apoyo en los diferentes proyectos, quien me enseñó a ser un persona más crítica y sobre todo por la ayuda y dirección en la realización de este trabajo.

Al Ing. E. Jorge Zamorano-Velasco, por su asesoría en el manejo del software.

Al M.V. Z. Atonatiu E. Gómez por el apoyo en la donación de ratas para los estudios piloto de este proyecto.

Al Lic. en Diseño Efraín Mora Gallegos por su disposición y colaboración en la sesión fotográfica del equipo y procedimientos que se presentan en este trabajo.



AGRADECIMIENTOS*A Dios*

A ese ser supremo que muchos lo llamamos con cariño Dios, quien me dio la oportunidad de vivir, ver un amanecer, poder admirar su grandeza en todas las cosas que ha creado, que durante toda mi vida siempre estuvo conmigo, me demostró su cariño y presencia, que durante los momentos más difíciles, duros y amargos de mi corta existencia sentí su presencia y que por muy fuerte que estuviera la tempestad siempre encontró la manera para que no estuviera sola, enviándome a personas maravillosas que me dieron hermosos y acertados consejos, así como la sabiduría que tuvo de ponerme en mi camino a seres no tan gratos que sin embargo me enseñaron, si ellos saberlo, lecciones de la vida y porque siempre me ha colmado de bendiciones como el tener una familia, salud amigos y por darme la oportunidad de terminar un ciclo en mi vida que aquel primer día de clases lo vi tan lejano...

A mis padres y a mis hermanos

Que son un pilar fundamental en mi existir, quienes me han conocido durante las diferentes etapas de mi vida, han vistos mis mejores momentos al igual que mis enojos y que a pesar de conocerme perfectamente me quieren. En especial a Fuyín, que en estos últimos meses ha sido mi compañero de desvelos y desesperaciones.

A mi Universidad

Quien me ha formado como profesionista, donde permanecí una hermosa etapa de mi vida y por ser en los años de Carrera como mi segunda casa, por que durante mucho tiempo fue el lugar donde veía amanecer y anochecer.

A mis Maestros

Desde la guardería hasta la Universidad porque pusieron un granito de arena, pero que su trabajo, esfuerzo y dedicación tuvo un gran impacto en mi formación

A mis Amigos

Por darme la oportunidad de conocerlos, por compartir alegrías e infortunios, por darme la oportunidad de recordar anécdotas agradables en mi vida.

A mis compañeros de banca

Con los que compartí muchos momentos agradables y angustiantes durante toda mi formación académica

A Bonami

Por estar siempre ahí, por que fue el que más sufrió durante mi estancia en la Facultad

A todo animal de laboratorio

Porque con su existencia permiten que haya avances en la ciencia y la salud y muy particular por que con su vida me permitieron realizar este trabajo.

A toda aquella persona que se ha cruzado en mi camino, por que sus acciones han participado en formar a la persona que hoy soy.

*En la vida, el conocimiento es semejante a piedras que recolectas en una bolsa por la mañana en el camino y en la tarde descubres que se convierten en piedras preciosas, teniendo así dos sentimientos: felicidad y tristeza
Felicidad por haber recolectado conocimiento que te hizo rico y triste por no haber recogido más*



INDICE

TEMA	Pag. No.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	
2.1 GLÁNDULA PINEAL	2
Un Poco de Historia.....	3
Anatomía.....	4
Fisiología.....	7
2.2 MELATONINA	11
Estructura.....	11
Propiedades Físicas.....	11
Descubrimiento de la Melatonina.....	12
Melatonina en Plantas.....	13
Biosíntesis de MEL.....	14
Regulación de la síntesis y liberación de Melatonina.....	17
Receptores.....	23
Mt ₁	26
Mt ₂	27
Mt ₃	28
Regulación de Receptores.....	29
Metabolismo.....	31
Cambios fisiológicos que produce MEL.....	31
Seguridad de la MEL.....	36
Hipocampo y Melatonina.....	36
2.3 ANÁLOGOS DE MEL	37
2.4 HIPOCAMPO	41
Historia.....	41
Anatomía.....	42
Región CA1.....	45
Región CA2.....	45
Región CA3.....	45
Giro dentado.....	45
Colaterales de Schaffer.....	45
Fisiología.....	46
Hipocampo y electrofisiología.....	47
2.5 ELECTROFISIOLOGÍA	49
Utilización de rebanadas.....	50
Potenciación a largo plazo.....	52
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
IV. HIPÓTESIS	58
V. OBJETIVOS	58
VI. METODOLOGÍA	59
VII. RESULTADOS	68
VIII. DISCUSIÓN	80
IX. CONCLUSIONES	88
X. REFERENCIAS	89
XI. ANEXOS	10



Lista de figuras

No. de figura	Pág.
Fig. 1. Ubicación de la glándula pineal (GP) como tercer ojo.....	2
Fig. 2. Ubicación de la glándula pineal en un cerebro humano.....	4
Fig. 3. Imágenes de las diferentes células gliales.....	5
Fig. 4. Imagen que muestra a un astrocito.....	5
Fig. 5. Representación esquemática de inervaciones neuronales, endocrinas y paracrinas de la GP en mamíferos.....	6
Fig. 6. Ubicación de la GP en rata.....	7
Fig. 7. La vía nerviosa por la cual el efecto de la luz sobre la retina se transmite al ganglio simpático cervical superior (GSCS).....	9
Fig. 8. Estructura de Melatonina (MEL).....	11
Fig. 9. Axelrod y las extracciones pineales.....	13
Fig. 10. Ruta biosintética y cascadas bioquímicas de la biosíntesis de MEL en un pinealocito humano.....	14
Fig. 11. Ruta biosintética de las indolaminas en la GP de mamíferos.....	16
Fig. 12. Sistema Neural regulador de la N-acetil transferasa (NAT) en rata.....	18
Fig. 13. Representación esquemática de los diferentes papeles de la NAT y Hidroxiindol-O-metil transferasa (HIOMT).....	19
Fig. 14. Características del ritmo obtenida a través de perfiles de MEL.....	20
Fig. 15. Relación de la melatonina y el rango de temperatura corporal.....	20
Fig. 16. La supresión de MEL es dosis dependiente.....	21
Fig. 17. Duración de la secreción de MEL en respuesta a cambios en el fotoperíodo de ovejas y humanos.....	21
Fig. 18. Estructura del receptor MT ₂	28
Fig. 19. Los niveles de MEL y de Receptor de melatonina (MEL-R) en los períodos de luz y de oscuridad.....	30
Fig. 20. Las rutas comunes metabólicas de MEL.....	31
Fig. 21. Parte “norte” y parte “sur” de la molécula de Melatonina.....	38
Fig. 22. Estructuras de MEL y compuestos M3C y M2B.....	39
Fig. 23. MEL y los Análogos de MEL con su densidad electrónica.....	40
Fig. 24. Similitud del hipocampo (HIPO) humano y de rata con un cuerno de Carnero.....	41
Fig. 25. Localización del HIPO en el cerebro de mamíferos.....	42
Fig. 26. El hipocampo de rata es una estructura cilíndrica que forma un semicírculo alrededor del tálamo.....	43
Fig. 27. Forma C del HIPO y la estructura en S.....	43
Fig. 28. Elementos neurales presentes en una rebanada de HIPO.....	44
Fig. 29. Diferentes regiones hipocampales.....	46



No. de figura	Pág.
Fig. 30 Propiedades de las descargas entre las neuronas piramidales CA1 Y CA3.....	48
Fig. 31. Principales rutas de las redes neuronales hipocampales.....	49
Fig. 32. Rebanada de cerebro de rata corte coronal con ubicación del hipocampo.....	50
Fig. 33. Estimulación directa de las Colaterales de Schaffer.....	53
Fig. 34. Registro extracelular, el efecto de la estimulación eléctrica en el Potencial postsináptico excitador (PPSE)	53
Fig. 35. Interacción de las sinapsis colinérgica y glutamatérgica en la Potenciación a largo plazo (LTP)	54
Fig. 36. Modelo de inducción de LTP.....	55
Fig. 37. Secuencia de imágenes de extracción de cerebro.....	60
Fig. 38. Secuencia de colocación de cerebro.....	61
Fig. 39. Secuencia obtención de rebanadas de cerebro.....	61
Fig. 40. Secuencia de fotos de la cámara de registro con la rebanada.....	63

Lista de esquemas

No. de esquema	Pág.
Esquema 1. Orientación de la molécula 2-I ¹²⁵ MEL con respecto a las hélices transmembranales del receptor MT ₂	24
Esquema 2. Diferentes sitios de unión a MEL, nivel periférico y central.....	26
Esquema 3. Posibles sitios de acción de MEL en la membrana plasmática, citosol y núcleo.....	29

Lista de diagramas

No. de diagrama	Pág.
Diagrama 1. Principal mecanismo controlador de la síntesis de MEL.....	17
Diagrama 2. Perfiles de las concentraciones séricas de MEL a diferentes edades.....	22
Diagrama 3. Disminución de la concentración de MEL respecto a la edad...	23
Diagrama 4. Proceso de una sinapsis.....	52
Diagrama 5. Diagrama del equipo utilizado para el registro, captura y análisis de los potenciales de campo de rebanadas de rata.....	64
Diagrama 6. Protocolo experimental utilizado para determinar la actividad de las sustancias aplicadas sobre la transmisión sináptica.....	65
Diagrama 7. Potencial de campo típico en el registro del <i>stratum pyramidale</i> del área hipocampal CA1	67



Lista de tablas

No. de Tabla	Pág.
Tabla 1. Protocolo experimental utilizado.....	66
Tabla 2. Promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de MEL a 15, 30, 45 y 90 μ M.....	68
Tabla 3. Promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de MEL, M3C y M2B a 30 μ M.....	75
Tabla 4. Promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de M3C, M2B a 30 μ M y MEL 45 μ M.....	78

Lista de gráficas

No. de Gráfica	Pág.
Gráfica 1. Comparación del efecto de MEL a 15, 30, 45 y 90 μ M.....	70
Gráfica 2. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de las concentraciones de MEL aplicadas 15, 30, 45 y 90 μ M.....	70
Gráfica 3. Efecto de MEL a 30 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	72
Gráfica 4. Efecto de M3C a 30 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	73
Gráfica 5. Efecto de M2B a 30 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	74
Gráfica 6. Se observa el efecto en el promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de las sustancias: MEL, M3C y M2B a 30 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	75
Gráfica 7. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de MEL, M3C y M2B a 30 μ M (a los 25min).....	76
Gráfica 8. Efecto de MEL a 45 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	77
Gráfica 9. Se observa el efecto en el promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de M3C, M2B a 30 μ M y MEL 45 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal.....	78
Gráfica 10. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de MEL a 45 μ M, M3C y M2B a 30 μ M (a los 25min).....	79



Lista de abreviaturas

μm	Micras
2-I ¹²⁵ MEL	2- [I ¹²⁵]iodomelatonina ;
5-HIAA	5-hidroxiindolacético
5-HIAL	5-hidroxiindol-acetaldehído
5HL	5-hidroxitriptofol
5-HT	Serotonina
5-MIAA	Acido 5 metoxiindolacético
5ML	5-Metoxitriptofol
5-MT	5-Metoxitriptamina
aa	Aminoácidos
Ach	Acetilcolina
AD por sus siglas en inglés	Alzheimer
AVT	Arginina-vasotocina
BHE	Barrera hemato encefálica
c3OHM	3-ciclo hidroximelatonina
Ca ²⁺	Calcio
CS	Colaterales de Schaffer
DAG	Diacilglicerol
GD	Giro dentado
GP	Glándula pineal
GSCS	Ganglio simpático cervical superior
HFS	Hormona folículo estimulante
HIOMT	Hidroxiindol-O-metil transferasa
HIPO	Hipocampo
HL	Hormona leutinizante
IML por sus siglas en inglés	Columna Intermedio lateral
IP ₃	Inositol trifosfato
K _D	Constante disociación
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
LP por sus siglas en inglés	Fotoperiodo largo
LTD por sus siglas en inglés	Depresión a largo plazo
LTP por sus siglas en inglés	Potenciación a largo plazo
MEL	Melatonina
MEL6S	6-sulfatoximelatonina
MEL-R	Receptor de melatonina
NA	Noradrenalina
NAT	N- acetiltransferasa
NHPV	Núcleo Hipotalámico Para Ventricular
NSQ	Núcleo supraquiasmático
POMC	Propiomelanocorticoïdes
PPSE	Potencial postsináptico excitador
PT	Pars tuberalis
Px	Pinealectomía
SNC	Sistema nervioso central
SP por sus siglas en inglés	Fotoperiodo corto
TGI	Tracto gastrointestinal
TM por sus siglas en inglés	Dominio Transmembranal
TRP	Triptófano
Uma	Unidades de masa atómica
VIP por sus siglas en inglés	Péptido intestinal vasoactivo



I. INTRODUCCIÓN

En la vida diaria los seres humanos están sujetos a muchos cambios del Medio Ambiente que pueden afectar o disminuir nuestras funciones fisiológicas, sin embargo, el organismo tiene mecanismos y moléculas endógenas para contrarrestar este daño, una de estas moléculas endógenas es la Melatonina (MEL). La MEL es una hormona secretada por la Glándula Pineal (GP) en un ritmo circadiano y estacional bajo el control del núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. Esta hormona es liberada en la noche con una duración inversamente proporcional a la duración del fotoperíodo por lo que es apropiado visualizar a MEL⁽³⁴⁾ como un temporizador estable evolutivo en el que cada especie lo adapta en sus procesos fisiológicos. Debido a que MEL tiene un espectro de actividad muy amplio ha sido objeto de gran interés para biólogos, médicos y químicos⁽⁹⁰⁾. La información acumulada en el ámbito de la salud en las pasadas dos décadas, indica que ésta es la mejor hormona candidata a ser investigada para poder ser una panacea universal,⁽⁸⁹⁾ como consecuencia de muchos estudios que se han realizado para entender el papel fisiológico, sitios y mecanismos de acción de MEL⁽¹⁴³⁾. Por estas razones se realizan síntesis de compuestos con una estructura similar a la MEL, esperando tengan efectos similares a esta, más específicos, potentes y con un tiempo de vida media mayor. En el presente trabajo se estudian los análogos M3C y M2B (claves propuestas por los Investigadores Químicos que las sintetizaron Facultad de Química). En los análogos utilizados se incorporaron sustituyentes en la posición 1 de la MEL con el fin de que se alteraran las propiedades electrónicas sobre el anillo indólico y que esto tuviera repercusión sobre la actividad biológica^(100,101). Estos compuestos se probaron en rebanadas hipocampales de rata. El modelo de rebanadas de cerebro de rata tiene la ventaja de utilizar un menor número de animales teniendo varios cortes de una misma rata permitiendo que no haya variabilidad biológica o genética⁽⁵⁾. La investigación sobre análogos de MEL nos permitirá en un futuro tratar enfermedades humanas tales como las relacionadas con el ciclo circadiano, observadas en trabajadores nocturnos y personas ciegas o como consecuencia del jet-lag⁽³³⁾, en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o ser utilizados como inmunomoduladores o antioxidantes.



2.1 GLÁNDULA PINEAL.

Durante muchos años la función de esta glándula en los mamíferos fue un verdadero misterio. Como ocurre con otros órganos y estructuras anatómicas la glándula pineal (GP) o epífisis ha recibido varios nombres, los cuales son reflejo de los conocimientos contemporáneos de estructuras y funciones dependientes del desarrollo de nuevas tecnologías⁽¹⁰³⁾, por ejemplo, el hombre de las culturas orientales la consideraba como el órgano de la clarividencia y meditación que permitía conocer su propia existencia, recordar sus vidas pasadas y las sucesivas reencarnaciones; era el “ojo místico”, el centro de la visión cósmica o astral, el chacra superior (Fig. 1) y hoy gracias a las nuevas técnicas microscópicas e histológicas permiten la observación de similitudes entre la GP y los ojos laterales de vertebrados inferiores, además de especular que la pineal de los mamíferos evolucionó a un órgano fotosensor^(5,104). Con los conocimientos actuales de neuroanatomía y biología molecular sabemos que la epífisis juega un papel importante como un transductor circadiano foto-neuroendocrino⁽³²⁾. Sin embargo, existen todavía muchas preguntas que no tienen respuestas relacionadas con melatonina, la hormona principal de la GP.

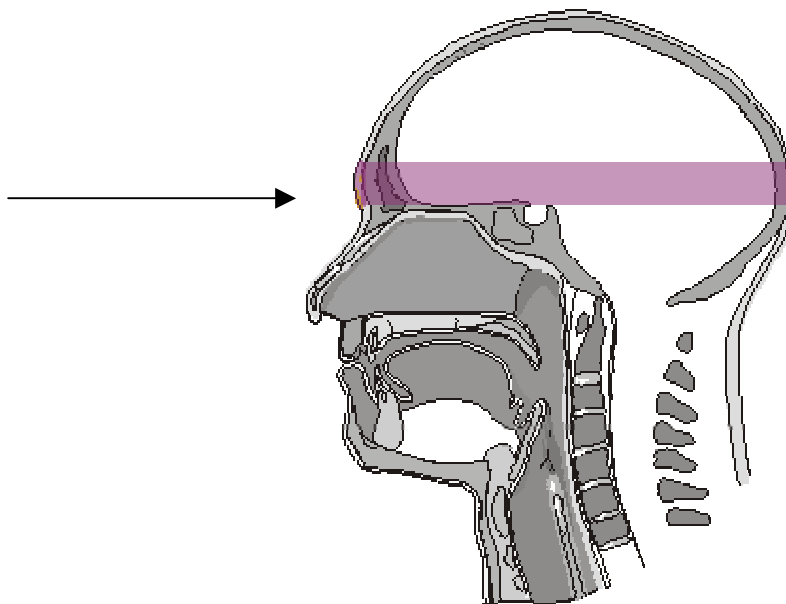


Fig. 1. Ubicación de la GP como tercer ojo. *El Ajana o Chakra del Tercer Ojo*, está localizado entre las dos cejas, en la hendidura de la frente (como indica la flecha). Su nombre significa comandar, percepción, conocimiento, autoridad^(5,104).

UN POCO DE HISTORIA

La GP fue descrita por primera vez por Herófilo anatomista Alejandrino en el siglo III a. de C. quien la consideró una válvula reguladora del “flujo” de la memoria^(32,41,143,170) concepto que perduró hasta el siglo XIX. Magendie la describió como un regulador de flujo del líquido cefalorraquídeo (LCRA). Galeno la nombró *konarium* (piña, en griego), el realiza la primera descripción, localización en el cerebro humano y la denomina glándula debido a su semejanza con otras glándulas y a su diferencias con el tejido nervioso^(32,104,143). Fue descrita de manera precisa en el Renacimiento por da Carpi, Vesalius y Vesal. Descartes la consideró como “el lugar donde residía el alma”^(41,104,134,170), consideraba que la GP participaba en la convección del espíritu desde la sangre hacia los ventrículos cerebrales. Ahlborn, Ruckhardt, posteriormente Graaf, Korschelt, y Spencer, describieron la anatomía, histología, inervación y embriología de la GP en mamíferos y notaron su semejanza con la epífisis de los vertebrados menores^(86,143). Thomas Gibbson le dio su nombre actual, epífisis. Studnicka establece que filogenéticamente la GP deriva de un órgano fotorreceptor pero su función continuaba siendo desconocida⁽¹⁴³⁾. Posteriormente Kitay y Altschule concluyeron que podrían atribuirle tres propiedades: control de la función gonadal en ambos sexos, respuesta a los cambios de luz ambiental en vertebrados inferiores y vinculación con la conducta^(41,143). Axerold y Wurtman acuñaron el término transductor neuroendocrino, para describir a la GP como un órgano que convierte el estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental, en una respuesta de tipo endocrina o neuroendocrina: la producción de melatonina⁽⁴¹⁾. El primer congreso internacional de “pinealogistas” fue celebrado en Ámsterdam en 1965, desde entonces el número de publicaciones acerca de la GP se incrementó marcadamente.



ANATOMÍA

La GP humana se origina en el desarrollo embrionario, en el segundo mes de gestación⁽¹⁰³⁾, es una estructura pequeña, impar y central, situada en el centro geométrico del encéfalo, entre ambos hemisferios cerebrales, por delante del cerebelo, por encima y detrás del tercer ventrículo^(32,41,78,104) (Fig. 2). Su peso oscila entre 100 y 150 mg y sus diámetros entre 7 y 8 mm de largo y 4-6 mm de ancho^(32,74,78,104) en el humano adulto, está constituida por células especializadas, denominadas pinealocitos 85%, células gliales 15% (Fig. 3)⁽³²⁾, que tienen una función de sostén, en su mayoría astrocitos fibrosos y terminaciones nerviosas⁽⁷⁴⁾ están alrededor de pinealocitos⁽¹⁰⁴⁾.

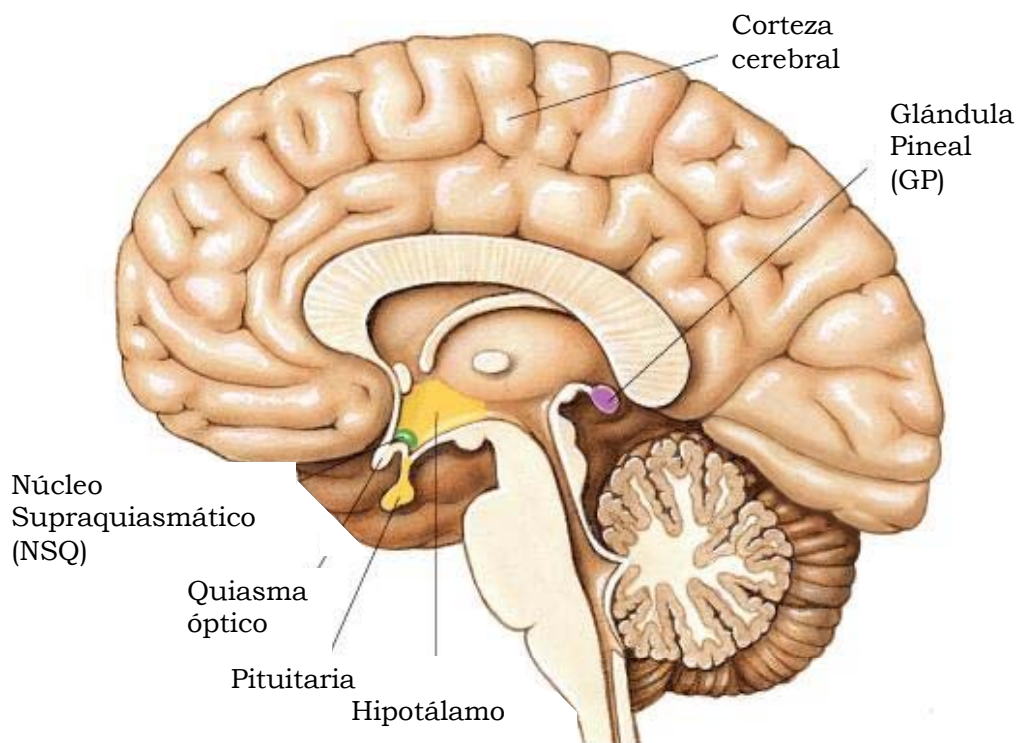


Fig. 2. Ubicación de la GP en un cerebro humano (Vista de la sección media del cerebro, superficie media del hemisferio derecho)⁽⁴¹⁾

Los pinealocitos son células polimorfas que contienen el cuerpo celular y un número variable de procesos celulares, dispuestos en torno a los espacios perivascuales. El citoplasma contiene gotas de grasa, vacuolas y vesículas con gránulos secretores⁽⁷⁸⁾. La GP está dividida en 2 lóbulos por un tejido conectivo ricamente vascularizado, estos lóbulos están compuesto por células gliales la mayoría de ellos astrocitos⁽³²⁾. (Fig. 3 y 4).

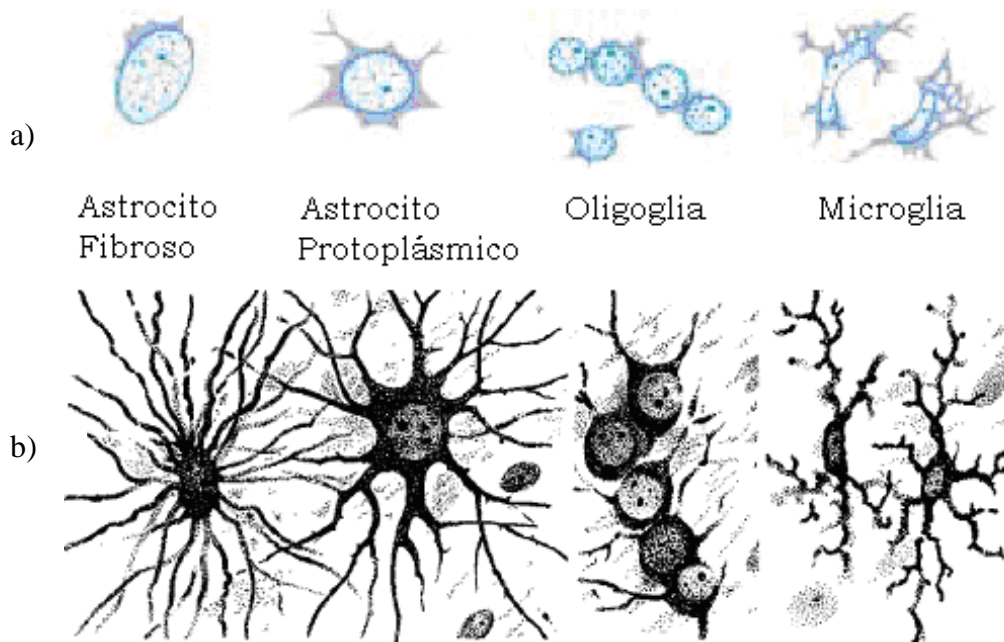


Fig. 3. Imágenes de las diferentes células gliales. a) Tinción Nissl b) Impregnación con plata⁽¹⁶⁹⁾.

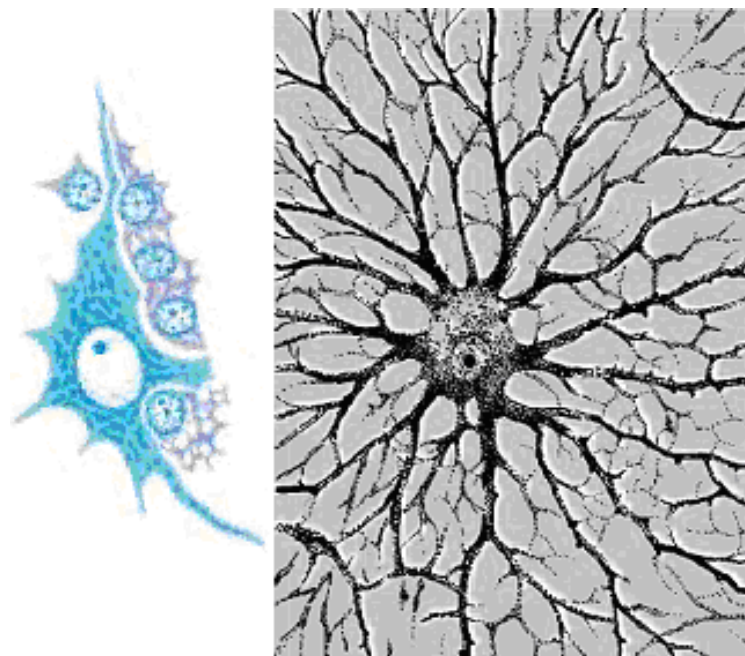


Fig. 4. Imagen que muestra a un astrocito⁽¹⁶⁹⁾.

La GP está ricamente vascularizada con un flujo sanguíneo de 4mL/min/g; recibe su inervación sobre todo del Sistema Simpático a partir del ganglio simpático cervical superior (GSCS), pero también de fibras parasimpáticas, comisurales y peptidérmicas^(32,41,74,78,104). Las fibras simpáticas alcanzan la glándula por dos vías. Un grupo sigue la distribución de los vasos sanguíneos y termina en el espacio perivascular, en las cercanías de los procesos de los pinealocitos. El otro penetra en la glándula por el

polo caudal para formar los nervios coronarios, cuya distribución es parenquimatosa y perivascular^(32,41,74,78). Su neurotransmisor es la noradrenalina (NA). Las terminaciones neuronales también tienen serotonina. Las fibras adrenérgicas terminan en su mayoría a nivel de los pinealocitos, pero otras lo hacen en los espacios perivasculares^(74,78,170).

Así la GP es inervada por fibras nerviosas de varios orígenes (Fig. 5). La ruta principal consiste en un complejo de ruta llamado ruta-retino-hipotalámica-pineal^(99,129,143,169), terminando en la parenquima simpática de la pineal. La pineal también recibe inervaciones de origen parasimpático. Estos nervios pineales finales contienen una gran variedad de neurotransmisores^(99,143).

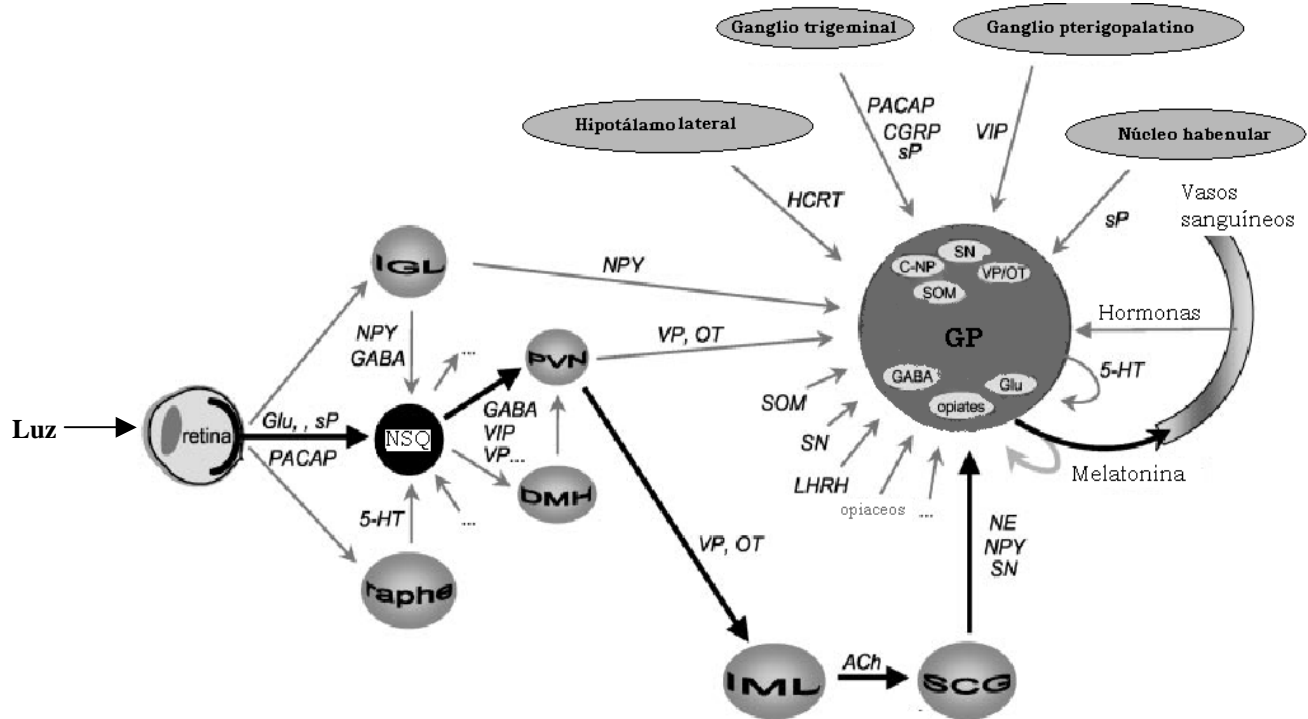


Fig. 5. Representación esquemática de *inervaciones* neuronales, endocrinas y paracrinas de la GP en mamíferos. La ruta neural principal es aquella que transmite la información luminosa a la GP. (flechas oscuras). Puede existir diferencias interespecies de este diagrama en la densidad y origen en las fibras nerviosas aferentes pineales y en la naturaleza de los diferentes transmisores pineales⁽¹⁴³⁾.

En roedores de laboratorio como ratas y hamsters la GP está situada de manera superficial en relación con los humanos (Fig. 6). En mamíferos nativos de regiones templadas y polares en el mundo la GP es larga, (liebres y focas) mientras que en mamíferos que viven cercanos al ecuador la GP es pequeña (elefantes y rinocerontes) o incluso puede estar ausente (perezosos y osos hormigueros). Así el tamaño de la GP puede reflejar el grado en que las especies son fotoperiódicas⁽³²⁾.

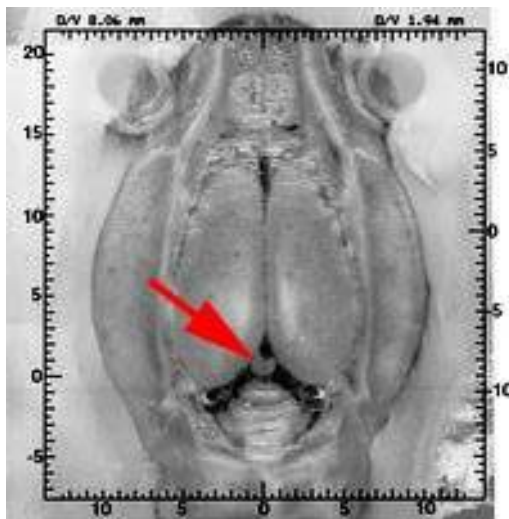


Fig. 6. Ubicación de la GP en rata⁽³²⁾.

FISIOLOGÍA

La GP influye en el cuerpo humano a través de una variedad de funciones, como glándula endocrina, como transductor⁽⁷⁸⁾, como regulador de hormonas y como un modulador circadiano⁽¹⁰⁴⁾ participa en los ciclos estacionales, ciclos circadianos, sueño, temperatura corporal, funciones reproductivas, sistema cardiovascular, etc. La GP de los mamíferos es uno de los órganos más ricos en serotonina, sustancia que se localiza en las terminaciones nerviosas y en los pinealocitos, que la transforman en melatonina⁽⁷⁴⁾.

La secreción de la MEL en los pinealocitos involucra el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas los cuales deben ser considerados como indicadores morfológicos de la actividad secretora de la GP⁽⁹⁹⁾. La estructura y actividad secretora de los pinealocitos puede ser alterada por varias hormonas como estrógenos, testosterona, progesterona, hormona foliculo estimulante (HFS), hormona leutinizante (HL) y prolactina. Estas hormonas pueden actuar directamente sobre los pinealocitos o alterar la inervación simpática de la GP, resultante en la disminución de impulsos nerviosos. La mayor evidencia de la actividad hormonal directa sobre la GP es la demostración de receptores hormonales en las fracciones subcelulares de GP.

La GP de mamíferos tiene varios receptores para estrógenos, testosterona, progesterona, prolactina, prostaglandinas y MEL. La GP de ratas tratadas con MEL reportan alteraciones morfológicas de los pinealocitos con un incremento en el número de ribosomas, microtúbulos, aparato de Golgi lo que sugiere un incremento en la actividad de este órgano.

Filogenéticamente la GP desarrolló distintas funciones. En algas unicelulares se produce MEL durante la fase de oscuridad, mientras que en peces, anfibios y reptiles funciona como receptor de luz debido a que la GP posee terminaciones fotorreceptoras semejantes a los conos de la retina excitadas por la luz y capaces de discriminar longitudes de onda, que dan así origen al estímulo nervioso^(41,74,170). En mamíferos es de estructura típicamente endocrina, no se hallan elementos fotorreceptores, pero se observan rudimentos de estos en serpientes y aves en las que predominan los elementos endocrinos^(5,74,86,143,170). Su principal función en todas las especies estudiadas es transformar la información concerniente a la duración de los ciclos de luz y oscuridad en mecanismos reguladores del organismo, más aún los denominados ritmos biológicos, los cuales pueden alcanzar una duración de hora (circahorarios), días (circadianos) o meses (circamensuales)^(41,86).

La GP de los mamíferos y de muchas aves muestra una variación rítmica en la producción de serotonina y MEL, dependientes de la iluminación diurna y de la oscuridad nocturna. Tanto en animales de mayor actividad nocturna como en aquellos con mayor actividad diurna, la mayor concentración de serotonina en la GP se observa al mediodía y es mínima a media noche, lo que permite que exista un ritmo inverso en cuanto a la producción de MEL⁽⁷⁴⁾.

Los ritmos circadianos en la producción de serotonina y MEL por la GP desaparecen por la iluminación continua, pero en cambio no son afectados por la oscuridad constante o por la extracción de los ojos. Son influidos por la iluminación externa, pero están regulados por un sincronizador interno, reloj biológico, el cual está situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Fig. 7).



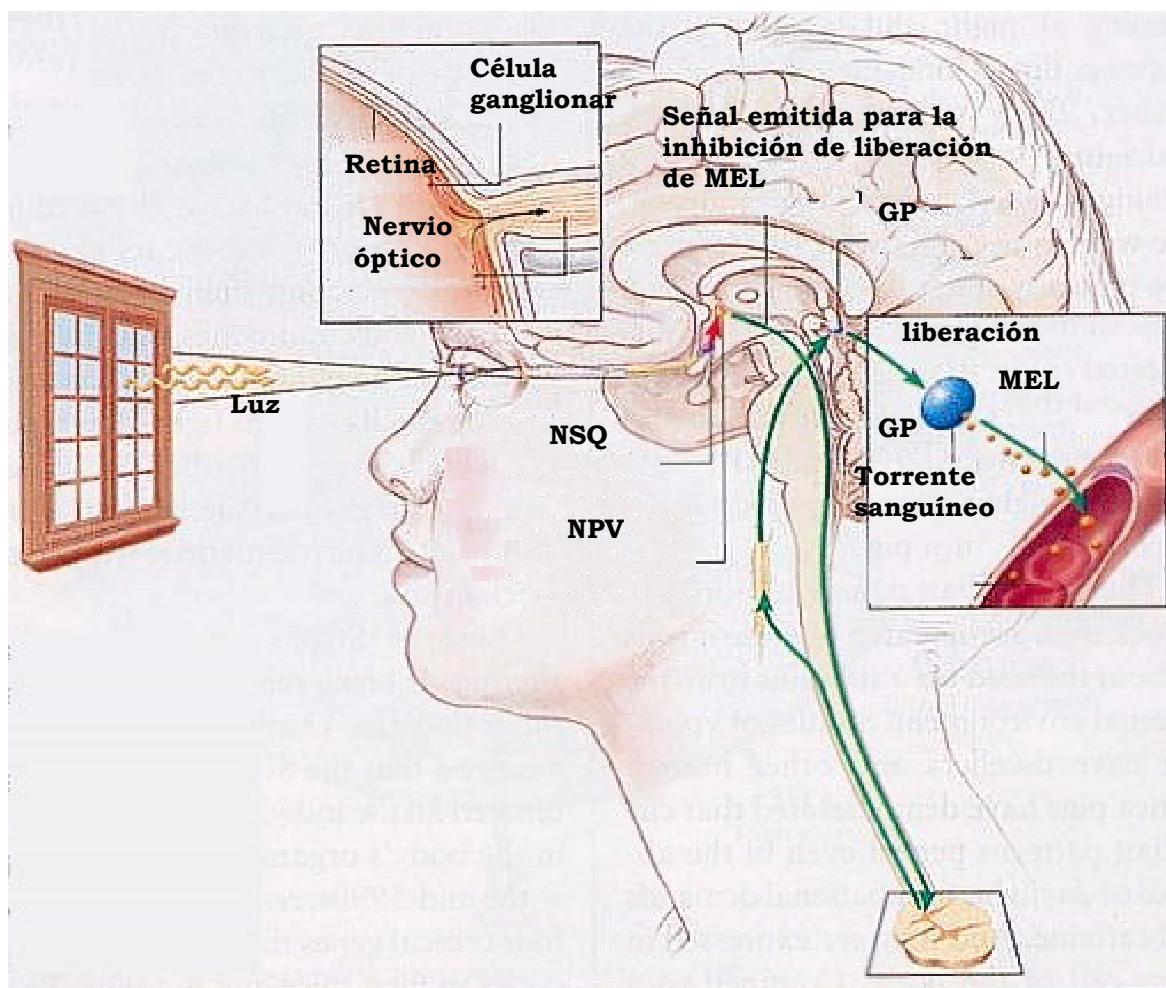


Fig. 7. La vía nerviosa por la cual el efecto de la luz sobre la retina se transmite al GSCS. El haz retinohipotalámico lleva la señal luminosa al NSQ del hipotálamo. De ahí surge una vía multisináptica que lleva dicha señal al Núcleo Hipotalámico Para Ventricular (NHPV), al hipotálamo lateral, donde se hallan las neuronas preganglionares que llegan al GSCS^(5,74,170).

La GP desempeña el papel de un transductor neuroendocrino que recibe la información luminosa a través de su inervación simpática o de conexiones centrales y transforma las señales nerviosas en señales hormonales mediante la secreción de melatonina en la sangre. Ésta modifica la función gonadal actuando sobre el hipotálamo, la hipófisis o la gónada⁽⁷⁴⁾. La conexión entre la GP y función humana reproductiva fue establecida en el siglo pasado a través de la observación de los efectos de tumores pineales en el desarrollo sexual humano⁽¹⁰⁴⁾. La GP en humanos influye en sistemas endocrinos/reproductivos (función de gónadas, tiroides y adrenales) y el sistema inmune (actividad leucocitaria)⁽¹³⁵⁾.

Si bien la luz ambiental constituye la señal más importante para el control neural de la GP, el aumento transitorio del flujo neural en el sistema simpático producido por el estrés hipoglucémico⁽⁴¹⁾, impulsos sensoriales (sonido, aumento de temperatura,) inmovilización, administración de L-Dopa causa estimulación de la GP^(41,170).

Por otro lado, la influencia de la GP en la homeostasis de los niveles de glucosa e insulina en sangre han sido sugeridas en varias investigaciones en las últimas décadas⁽¹³⁵⁾. Así la GP también modifica la actividad de otros órganos endocrinos como las glándulas adrenales⁽¹³⁵⁾.

En humanos la GP puede ser el sitio de tumores de células pineales (pinealomas) o tumores de células germinales (germinomas). Los signos y síntomas neurológicos son las manifestaciones clínicas predominantes, por ejemplo, hipertensión intracraneal, anomalías visuales y ataxia^(32,69).

Desde el punto de vista electrofisiológico, la pineal manifiesta una actividad eléctrica espontánea que varía por la acción de la luz. Esta actividad espontánea aumenta si se deshidratan los GSCS (es decir, la actividad simpática es inhibitoria); en cambio, se reduce intensamente ante la lesión bilateral de los núcleos habenules o por la sección del tallo pineal⁽⁷⁴⁾.

En cuanto a los productos de la epífisis, se han aislado a partir de extractos pineales, tres familias de compuestos con actividad endocrina y que revierten secuelas de la pinealectomía.

- *Metoxindoles del tipo melatonina*
- *Péptidos de bajo peso molecular* como la arginina-vasotocina (AVT), vasopresina, renina-angiotensina, somatostatina⁽⁶⁹⁾, péptidos relacionados con proopiomelanocorticoide (POMC)^(41,74).
- *Proteínas* del tipo de la sustancia inhibitoria de las gonadotropinas, con actividad neuraminidásica y por tanto, con capacidad para inactivar en la circulación a la hormona luteinizante⁽⁴¹⁾

Siendo su producto principal la MEL se considera que la pineal y la MEL tienen una acción inhibitoria sobre el sistema hipotálamo-hipófisis-tiroides⁽⁷⁴⁾.



2.2 MELATONINA

La melatonina (MEL) es conocida coloquialmente como la hormona de la oscuridad^(4,6,166). Está ampliamente distribuida en la naturaleza y se sabe que sus acciones representan uno de los mecanismos de señalización biológica filogenéticamente más viejos, puesto que MEL ha sido evolutivamente conservada^(129,135,143). La MEL está presente en la mayoría de los organismos^(89,129), incluyendo bacterias^(72,129), eucariontes unicelulares⁽¹²⁹⁾, protozoarios^(72,89), vertebrados e invertebrados^(72,129), hongos^(72,129), macroalgas⁽¹²⁹⁾, en semillas, raíz, flores y tallo^(5,24,89,129) y humanos⁽⁸⁹⁾, representando una de las primeras sustancias señalizadoras en la tierra⁽¹²⁹⁾.

En animales y humanos, la MEL se identifica como una con una gran diversidad de acciones fisiológicas^(24,129).

ESTRUCTURA

La MEL o *N*-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina (Fig. 8) cuyos dos grupos funcionales no solo son decisivos para la unión específica ligando-receptor, sino también a que estos dan un carácter anfipático de la molécula lo que permite entrar a cualquier célula, compartimiento o fluido biológico^(72,143).



Fig. 8. Estructura de MEL es el producto de GP más importante y más estudiado⁽¹⁰⁴⁾.

PROPIEDADES FÍSICAS

Masa molar 232 uma (unidades de masa atómica), punto de fusión de 116-118 °C. Fórmula Empírica $C_{13}H_{16}N_2O_2$ es un sólido cristalino. La presencia universal de MEL es debida a su propiedad altamente lipofílica así como sus propiedades

hidrofilicas^(24,83,89,104,129) que le permiten cruzar fácilmente las membranas lipídicas y difundirse en cada compartimiento celular^(24,83,89,129). La MEL puede penetrar la barrera hemato encefálica (BHE), placenta y es secretada en la leche materna^(127,135), así su capacidad de poder entrar en casi todo tipo de células, lo que explica su potente actividad antioxidante y de atrapador de radicales libres, debido a su capacidad de llegar a lugares que otros fármacos con actividades semejantes no pueden llegar.^(83,89,127)

DESCUBRIMIENTO DE LA MELATONINA

En la investigación básica y clínica habían sido usados “factores pineales” y extractos⁽¹⁰⁴⁾. En 1917 Carey Pratt McCord y Floyd Pierpont Allen demostraron que cuando la GP era macerada y adicionada al agua donde se encontraban renacuajos que cambiaban significativamente su color, aclarándose, fenómeno que necesitaba una explicación⁽⁴⁸⁾. Las investigaciones no dieron fruto hasta los años cincuentas, cuando Mark Altschule y Julian Kitay de Harvard Medical School correlacionaron la presencia o ausencia de los extractos pineales con el peso de los ovarios de la rata. Sin embargo no fue sino hasta 1958 que uno de estos factores fue aislado de la pineal bovina por Aaron Lerner de la Universidad de Yale e identificada a través de un proceso cromatográfico como una indolamina (N-acetil-5-metoxitriptamina)^(6,10,24,32,49,74,104,143,166,170). La sustancia fue llamada “melatonina” (“*mel*” de *melanina* y “*tonina*” de *contraer*) por su habilidad para blanquear los melanóforos de la piel de rana y pescados^(6,10,72,104), además de tener relación química con la serotonina (5-HT, 5 -hidroxitriptamina)^(24,32,104,143,170).

En 1959 Axelrod inicia una serie de investigaciones usando extractos de GP de ratas, Axelrod y Weissbach reportan que la MEL es un neurotransmisor cuyo precursor es la serotonina. Así esta bioconversión ayudó a explicar los experimentos de McCord identificando como la sustancia activa de los extractos pineales a la Melatonina. En 1961 Virginia Fiske del colegio de Wellesley argumenta que la luz tiene un efecto sobre el peso de las ratas y los cambios de luz también influyen sobre el deseo sexual de éstas. En 1962 Axerold y Richard J.Wurtman descubrieron que la MEL funcionaba como un poderoso neurotransmisor con la capacidad de actuar como un tipo de “reloj biológico”. Con estos descubrimientos Axelrod y Wurtman propusieron en 1965 “hipótesis melatonina”, en donde argumentaban que la MEL era secretada en respuesta a cambios de la luz ambiental y que estos cambios no solo afectaban la función pineal sino también funciones reproductivas en los mamíferos. Por esos mismos años Axelrod y col. identificaron las enzimas de los pinealocitos involucradas en la biosíntesis de MEL. (Fig. 9)^(32,104,129,170).





Fig. 9. Axelrod y las extracciones pineales. Fotografía perteneciente al grupo de “La Glándula pineal y la hipótesis Melatonina” 1959-1974.

MELATONINA EN PLANTAS

A la fecha la presencia de MEL ha sido demostrada en más de 20 familias de dicotiledóneas y monocotiledónea. Cerca de 60 plantas comúnmente usadas en la Medicina Tradicional China. La mayoría de estas hierbas son usadas para retardar los cambios relacionados con la edad y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la generación de radicales libres⁽¹²⁹⁾. La presencia de MEL en plantas puede ayudar a protegerlas del daño oxidativo y de las adversidades ambientales. La alta concentración de MEL en las semillas probablemente provee una defensa antioxidante y un sistema de frescura⁽¹²⁹⁾.

UBICACIÓN DE MELATONINA EN HUMANOS

La MEL ha sido detectada en sangre, saliva^(24,83), orina y LCR⁽¹⁰⁴⁾, glándulas adrenales, riñón, hígado, timo, tiroides, páncreas, leucocitos, células NK, plaquetas⁽⁹²⁾, tracto gastrointestinal (TGI), semen, fluido amniótico, placenta, endometrio, leche materna y folículos preovulatorios^(83,92,104).

NIVELES DE MELATONINA

Nivel máximo nocturno en sujetos jóvenes es 200pg/mL en plasma y una línea basal diurna de 10pg/mL en plasma⁽¹²⁹⁾.

DETECCIÓN

Las variaciones de las concentraciones de MEL pueden ser detectadas por radioinmunoensayo^(61,104,138), HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas^(57,104,138). Estas técnicas son capaces de medir en el día 10pg/nL y en la noche (12-30 pg/mL) de melatonina en plasma o suero^(9,57,138).

BIOSÍNTESIS

Independientemente del sitio de síntesis (órgano) y la naturaleza del organismo (diurna, nocturna o crepuscular)^(6,89,166), la MEL se secreta en la noche (escotofase)^(5,6,10,49,166) y su ruta biosintética es esencialmente la misma^(6,89).

En los vertebrados así como en los seres humanos la MEL es sintetizada principalmente en la GP^(1,5,10,49,72,77,104,129,143,170) (Fig. 10) aunque existen otros sitios extrapineales como la retina^(5,10,24,28,49,77,104,129,143,170), piel^(72,129), TGI^(10,24,49,72,77,104,129,143), glándula harderiana^(77,135,143,170), células de la médula ósea^(83,104,129), plaquetas⁽¹²⁹⁾ y linfocitos⁽¹²⁹⁾, leucocitos mononucleares⁽⁷²⁾, membrana coclear⁽⁷²⁾ y plexo coroideo⁽¹⁷⁰⁾ que pueden contribuir significativamente en los niveles plasmáticos de MEL. En vertebrados no mamíferos la GP es la única y más grande fuente de producción de MEL^(4,49,72,89), en invertebrados la GP esta ausente así que la producción de MEL es a través de otros órganos y células⁽⁸⁹⁾.

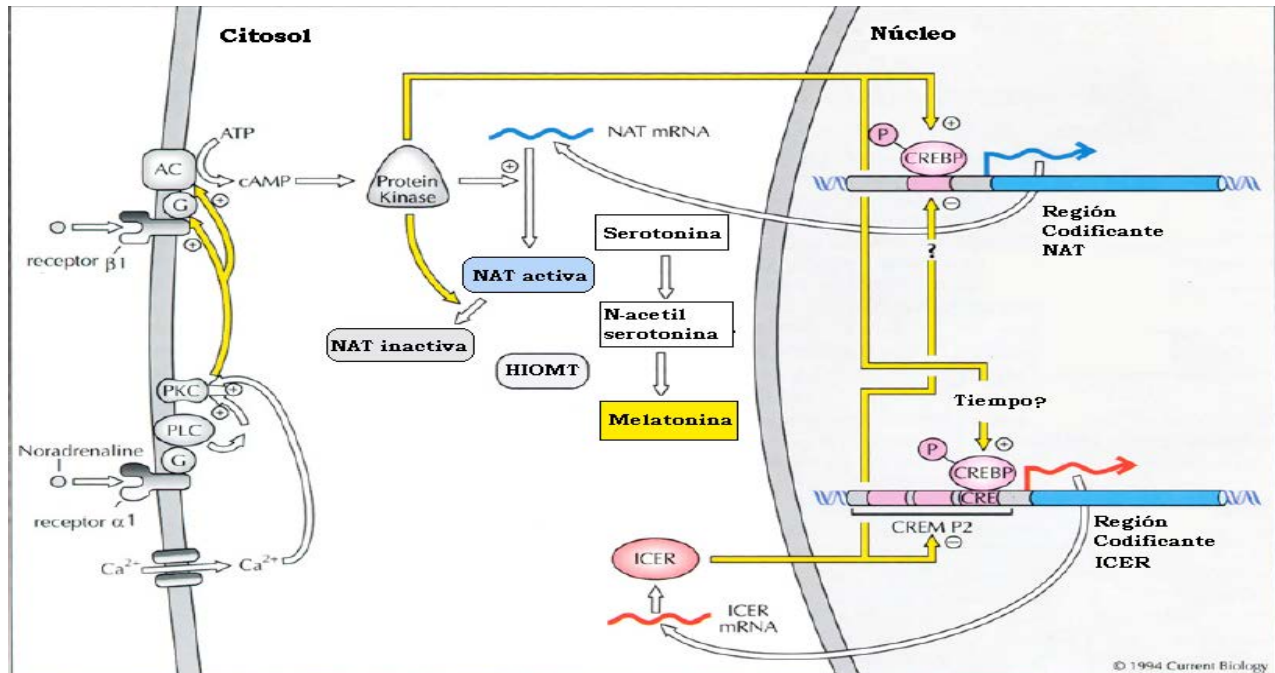


Fig. 10. Ruta biosintética y cascadas bioquímicas de la biosíntesis de MEL en un pinealocito humano. AC adenilato ciclasa; G proteína; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C; CRE, CRE-proteínas de unión, NAT; HIOMT ⁽¹⁰⁴⁾.



El triptófano (TRP) es el precursor sintético de los 5 metoxiindoles de la pineal⁽¹⁴³⁾. La entrada del triptófano al cerebro depende de los sistemas transportadores en la BHE, los cuales están influenciados por la presencia de otros aminoácidos (aa) neutros que compiten por el sistema de transporte⁽¹⁰⁾. Ya que el triptófano es un aa derivado de las fuentes de la dieta diaria⁽⁸⁹⁾ las condiciones alimenticias pueden afectar el transporte del triptófano al cerebro y consecuentemente afectar la síntesis de MEL^(10,86).

En la GP los pinealocitos toman el triptófano de la sangre y la convierten en serotonina (5-HT) a través de una hidroxilación por la triptófano-5-hidroxilasa y descarboxilación por la L-aminoácido aromático descarboxilasa^(5,10,49,104,129,143). 5HT es el sustrato inicial de tres diferentes rutas biosintéticas⁽¹⁴³⁾.

1) 5HT puede ser directamente O-metilada por la Hidroxiindol-Oximetil transferasa (HIOMT) para ser transformada en 5-Metoxitriptamina (5-MT)⁽¹⁴³⁾.

2) 5HT puede ser desaminada por la MAO en 5-hidroxiindol-acetaldehído (5-HIAL). Este compuesto es también oxidado en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por una aldehído deshidrogenasa^(74,143). Después 5-HIAA es O-metilada por la HIOMT a ácido 5 metoxiindolacético (5-MIAA). 5-HIAL puede ser reducido a 5 hidroxitriptofol (5HL) por una alcohol deshidrogenasa y posteriormente O-metilada por la HIOMT para formar la 5-Metoxitriptofol (5ML).

3) Cerca del 90% de serotonina (5 hidroxitriptamina o 5HT) es oxidada por la MAO^(74,143) y otra parte es captada por las terminaciones simpáticas en la GP⁽⁷⁴⁾ y el resto de la serotonina es convertida a N-acetilserotonina por la enzima limitante en la síntesis de MEL, N- acetiltransferasa (NAT)^(1,5,10,24,104,129,143); la N-acetilserotonina es metilada por la enzima HIOMT cuyo producto es MEL^(1,5,32,41,49,69,72,74,78,104,129,143,170) (Fig. 11). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de MEL se identificaron recientemente en linfocitos humanos por lo que es probable que la MEL este involucrada en la regulación del Sistema Inmune⁽¹²⁹⁾.



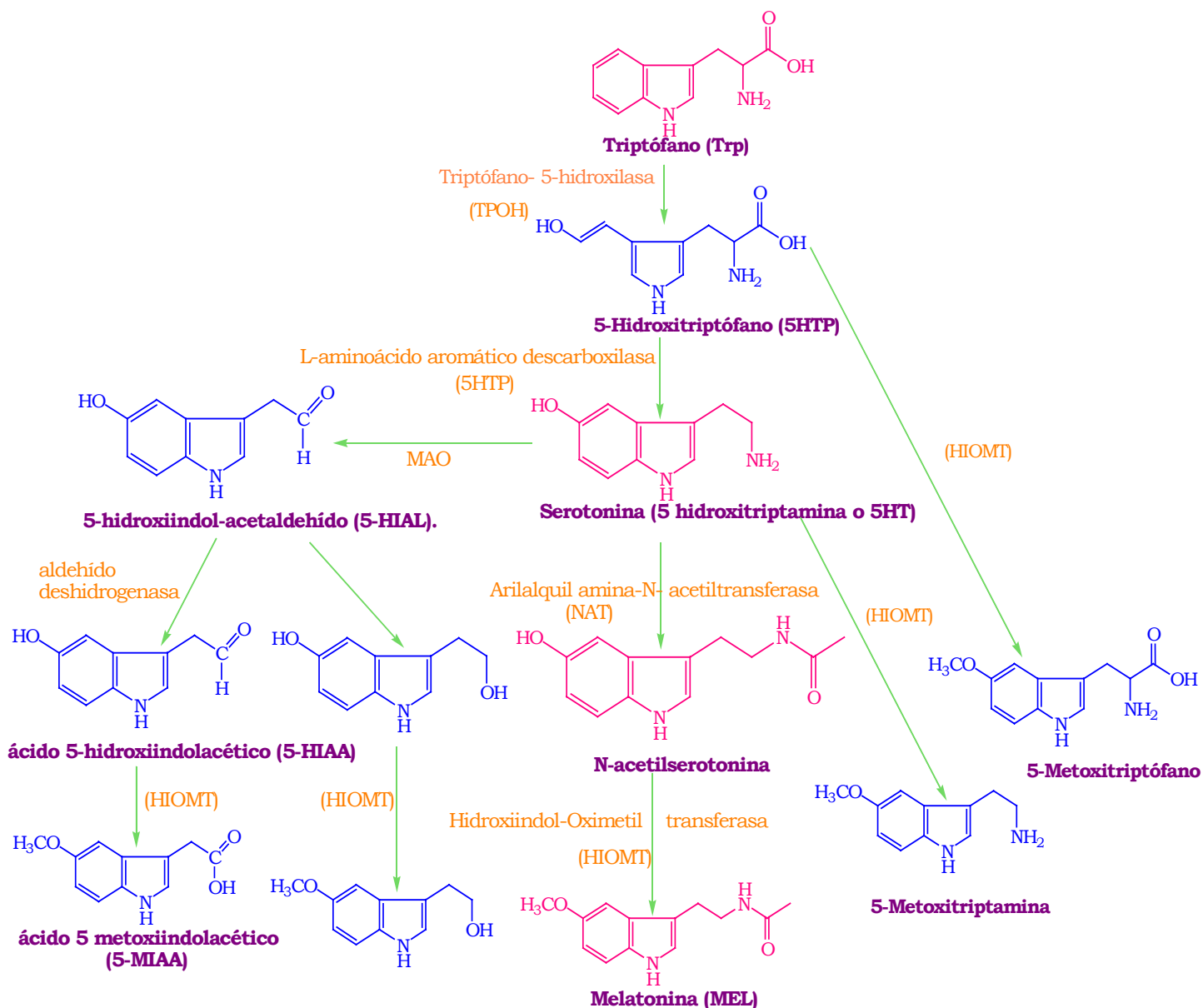


Fig. 11. Ruta biosintética de las indolaminas en la GP de mamíferos. El aminoácido TRP es sustrato esencial de 5 rutas biosintéticas, de las cuales la ruta de MEL (color rojo) es fisiológicamente la más importante. Nótese el papel central de la HIOMT en las 5 rutas⁽¹⁴³⁾.

El TGI es particularmente importante debido a que contiene cantidades de MEL excediéndose a los encontrados en la GP^(24,77,129). La MEL proveniente de TGI puede aumentar en la circulación especialmente bajo la influencia de una dieta alta en triptófano^(24,77,86,129). El mecanismo de síntesis y modo de secreción de la MEL en el TGI no ha sido completamente elucidado⁽²⁴⁾.



REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE MELATONINA.

El ritmo de la secreción de MEL es generado endógenamente por marcadores circadianos en el núcleo supraquiasmático (NSQ) y regulado por la los ciclos luz-oscuridad^(5,10,22,68,72,89,104,129,138,143,170) (Diagrama 1), es decir, la MEL es una hormona secretada durante la fase oscura en el ciclo luz-oscuridad. Así, a través de la sincronización con el NSQ regula una variedad de cambios diarios y estacionales en la fisiología y comportamiento de los mismos^(5,89,138,148)

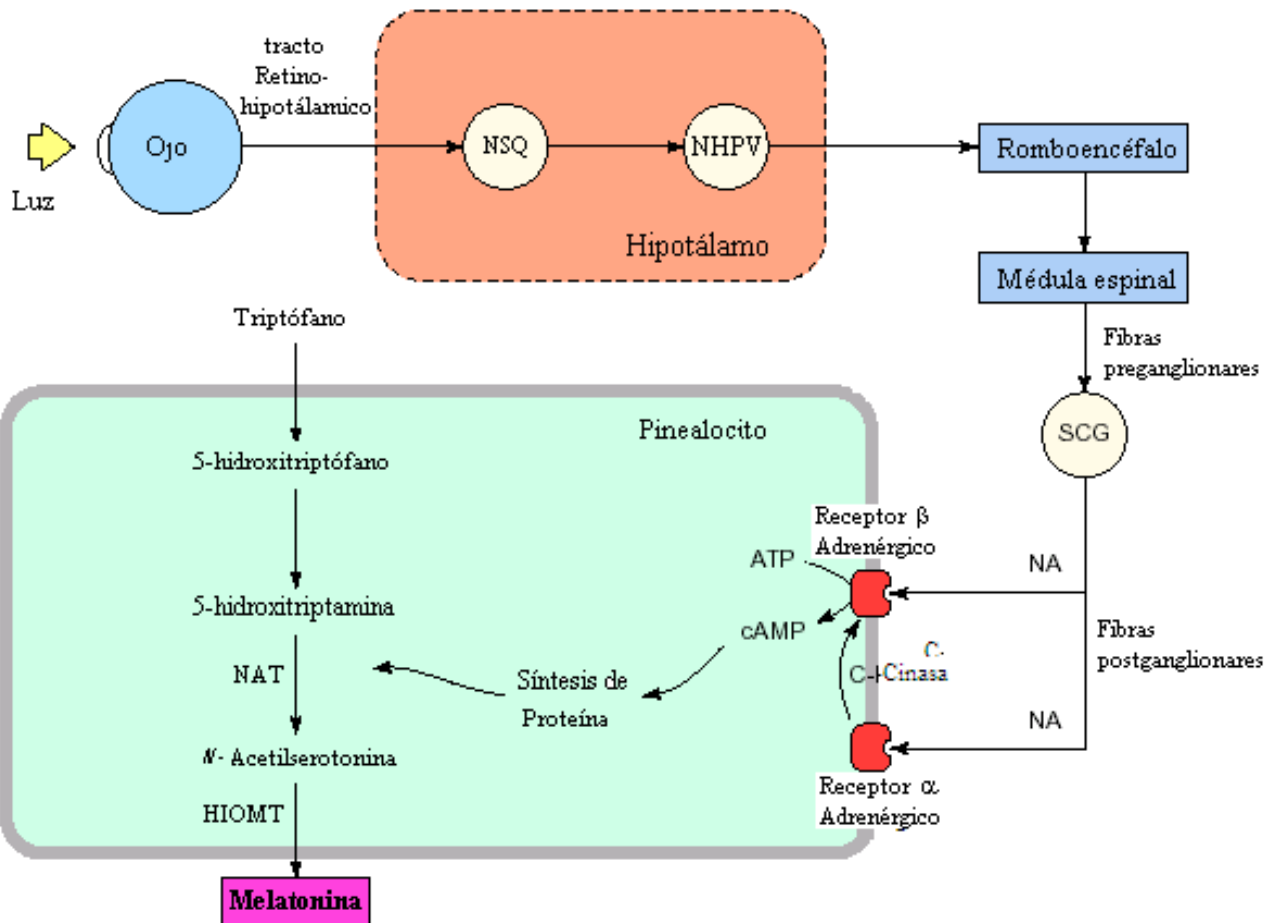


Diagrama 1. Principal mecanismo controlador de la síntesis de MEL. El ritmo es generado por el NSQ, por la entrada de la luz vía la ruta retino -hipotalámica. (RH). La señal pasa vía núcleo paraventricular, médula ósea, romboencéfalo ganglio simpático cervical superior(GSCS) a los receptores pineales noradrenérgicos^(5,129,148).

Por otro lado la estimulación eléctrica incrementa la liberación de acetilcolina (Ach)⁽¹⁴³⁾ que es el principal neurotransmisor del GSCS pero otros neurotransmisores, especialmente, noradrenalina (NA), somatosina, histidina, péptido isoleucina-histidina⁽¹⁴³⁾, péptido relacionado a Gen de calcitonina son candidatos potenciales en la transmisión de la información al GSCS⁽¹⁴³⁾.

Las fibras simpáticas post-ganglionares del GSCS terminan en los pinealocitos y regulan la síntesis de MEL por la liberación de NA^(5,10,72,129,143). La liberación de NA de estas terminales nerviosa ocurre durante la noche. La NA por unión a receptores α adrenérgicos^(5,72,104,129,143) y β adrenérgicos^(5,72,104) en los pinealocitos, activan la adenilato ciclasa vía la subunidad α de la proteína G_s . El incremento en AMPc promueve la síntesis de proteínas, entre ellas las enzimas involucradas en la síntesis de MEL, en particular la NAT^(5,72,104,129,143). Adicionalmente AMPc regula la fosforilación de NAT lo cual aumenta la actividad de la enzima y promueve la estabilización del complejo con la proteína⁽⁷²⁾. Durante la fase de luz el NSQ tiene una actividad eléctrica alta y bajo estas condiciones, la liberación pineal de NA es baja. Durante la escotofase la actividad del NSQ es inhibida y la síntesis pineal de MEL es estimulada por el incremento de NA^(5,72,129). La síntesis de MEL en la GP es también influenciada por neuropéptidos^(5,104,143), como el péptido intestinal vasoactivo (VIP)^(129,143), vasopresina^(104,143), oxitocina^(104,143), péptidos opiáceos⁽¹⁴³⁾, la activación de la pituitaria adenilato-ciclasa por el péptido y neuropéptido Y^(5,104,129,143), él cual está parcialmente correlacionado con la potenciación de la NA^(5,129). Existe evidencia que el control de la secreción de MEL en humanos es similar a las ratas. En ellas es claro que la estimulación de los receptores α potencian la actividad pineal junto con una estimulación del adrenoreceptor β ^(5,143) (Fig. 12).

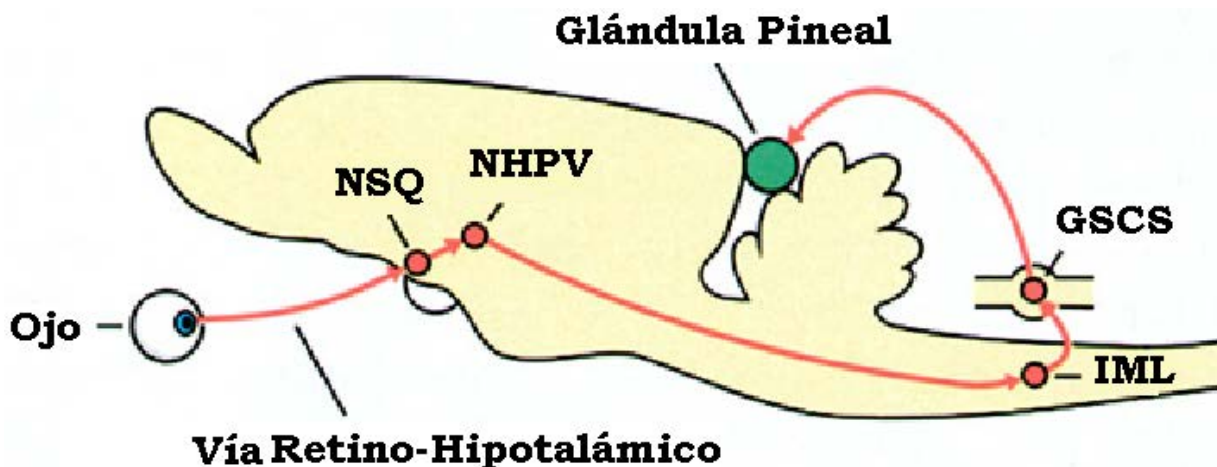


Fig. 12. Sistema Neural regulador de la N- acetil transferasa en rata. La luz es detectada por el ojo, generando una señal que es transmitida por la vía retino-Hipotalámica al NSQ El cual contiene el reloj biológico. Las rutas neurales incluidas son el núcleo para ventricular, GSCS y la GP⁽¹⁰⁴⁾.

El marcado inicio de la actividad de NAT al principio de la noche y durante la noche controla la duración del pico nocturno de MEL (Fig. 13). Mientras las variaciones fotoperiódicas de la actividad de HIOMT, con valores bajos durante fotoperíodo largo (LP por sus siglas en inglés) controla la amplitud del pico nocturno de MEL. Esta hipótesis funcional es especie dependiente^(49,143).

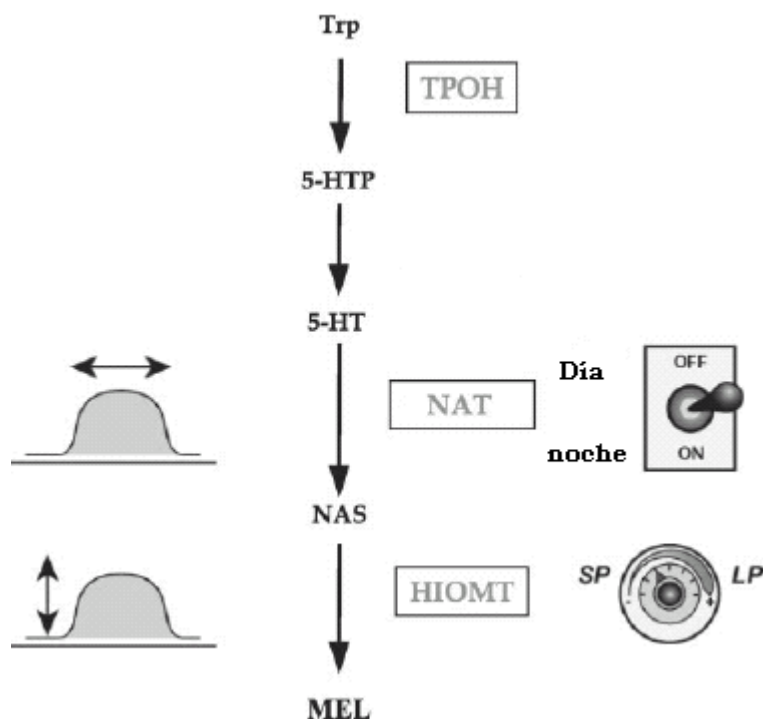


Fig. 13. Representación esquemática de los diferentes papeles de la NAT y HIOMT en la regulación diaria y fotoperiódica de la síntesis de MEL⁽¹⁴³⁾.

LIBERACIÓN

Una vez formada MEL no es almacenada en la GP sino que se difunde en forma pasiva hacia los capilares hasta llegar a la sangre (70% se une a proteínas⁽¹⁰⁴⁾) y LCR para ser distribuida rápidamente hacia todo el cuerpo^(129,143); así la MEL llega a todos los tejidos rápidamente. El tiempo de vida media de MEL es bi-exponencial el primero con una distribución de vida media de 2 minutos y el segundo de 20-45 minutos^(104,129). La liberación de MEL en el LCR a través de la GP alcanza concentraciones de 20-30 veces más altas que en la sangre^(104,129), estas concentraciones disminuyen rápidamente lo que sugiere que la MEL es utilizada por el cerebro⁽¹²⁹⁾.

En humanos, el ritmo de MEL tanto en sangre como en saliva, es un buen marcador para indicarnos la fase del reloj biológico endógeno^(5,6,57), principalmente porque se ha demostrado que el ritmo es controlado por el NSQ^(5,143) y porque pocos factores pueden influenciar en la producción⁽⁵⁾. Una supresión de la luz puede enmascarar el ritmo. La duración de la secreción esta relacionada con la prolongación de la oscuridad^(5,10,104,143,166), aunque la secreción y las características de la duración del pico nocturno de MEL son diferentes, la secreción es especie-dependiente^(5,143). En humanos sanos, las concentraciones de MEL empiezan a ser considerables en la tarde con niveles máximos a mitad de la noche y empiezan a disminuir antes de la hora habitual de despertar^(57,104), ya

que existe evidencia de buenas correlaciones (tiempo y amplitud) entre los ritmos de MEL en plasma y saliva y el metabolito urinario 6-sulfatoximelatonina (MEL6S)⁽⁶⁾. (Fig. 14). Además de que el ritmo de MEL esta acoplado con el ritmo de temperatura^(4,5,104). Así el pico de secreción de MEL debe corresponder cercanamente con la temperatura más baja en la noche^(5,104) (Figuras 15 y 16).

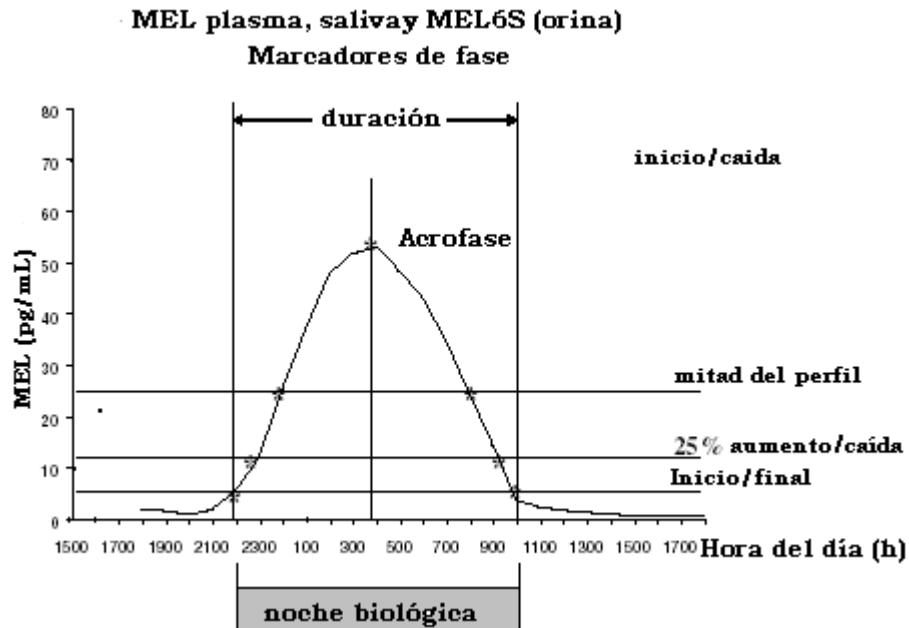


Fig. 14. Características del ritmo obtenida a través de perfiles de MEL de sangre y saliva (cada hora), junto con MEL6S (orina, cada 3 o 4 horas)^(6,10).

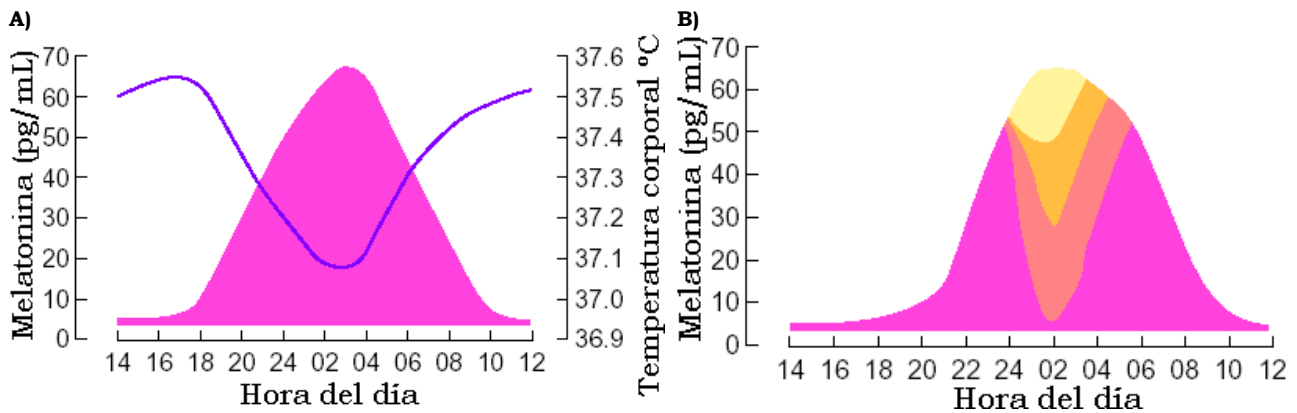


Fig. 15. A) La melatonina y el rango de temperatura (---) están cercanamente acopladas, la temperatura y el nadir están muy relacionados por alrededor de 1 h con el pico de MEL. B) La luz brillante es requerida para suprimir completamente la secreción de MEL durante la noche. Se muestra el efecto de tres intensidades de luz (, ,) sobre MEL en el plasma de 24:00h a 2:00h. La completa supresión es generalmente encontrada con luz blanca de 2500lux, supresiones parciales han sido observados con luces pequeñas como 100lux, con variaciones substanciales individuales debidas a la sensibilidad^(6,10,129).

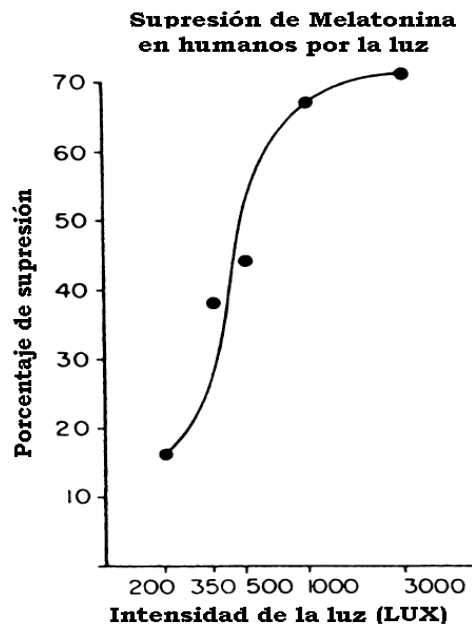


Fig. 16. La supresión de MEL es dosis dependiente y varía con las características espectrales del estímulo luminoso. Porcentaje de supresión de MEL por la luz a diferentes intensidades. Curva dosis- respuesta^(5,6,104).

En la mayoría de especies mamíferas estudiadas el aumento de la fase oscura resulta en el aumento de la duración del pico nocturno de MEL. La duración del pico nocturno de MEL es un factor importante para la transmisión de la información fotoperiódica del medio ambiente al organismo^(104,143). En ovejas la duración de la secreción de MEL es de aproximadamente 16 h en un ciclo de (8h:16h) luz-oscuridad, aunque en un ciclo noche:noche no aumenta la secreción de MEL y se reduce a 8h en un ciclo de 16h:8 h. (luz-oscuridad)^(4,5,143) (Fig. 17).

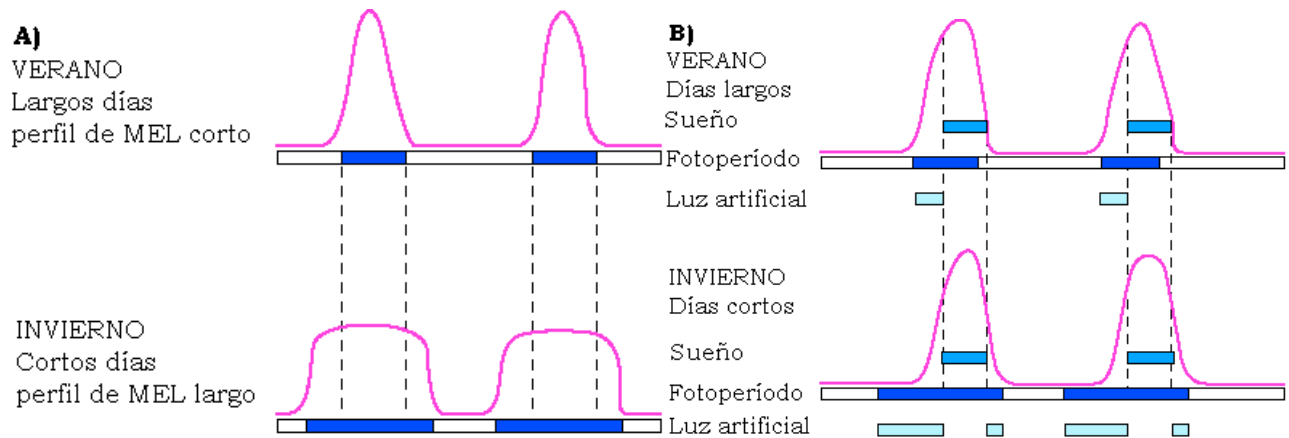


Fig. 17. Duración de la secreción de MEL en respuesta a cambios en el fotoperíodo de ovejas (A) y humanos (B) ■, oscuridad; ■, sueño; ■, luz artificial (humanos). Un pequeño retardo en la fase ocurre usualmente en invierno⁽⁵⁾

Los cambios en la duración de secreción de MEL como una función de la duración de la noche es encontrada en la mayoría de las especies^(4,5,143). En los humanos si son sometidos durante 2 meses en 8h:16h (luz:oscuridad), donde las 16 horas son de completa oscuridad, es posible mostrar un incremento en la duración de la secreción de MEL en comparación con los mismos individuos sometidos durante 2 meses en 14:10 (luz:oscuridad)⁽⁵⁾.

El perfil de secreción puede ser ampliamente reproducible de día a día y de semana a semana como una huella digital hormonal⁽⁶⁾. Una gran variedad del perfil de secreción entre individuos puede ser por el tamaño de la GP o variaciones en la actividad enzimática⁽⁶⁾. Además la secreción de MEL varía de acuerdo a las estaciones del año (incremento del nivel y duración de la secreción en invierno en altas latitudes)⁽⁶⁾.

PRODUCCIÓN DE MELATONINA CON RESPECTO A LA EDAD

Los pinealocitos fetales son capaces de llevar a cabo la síntesis de MEL en las primeras 26 semanas de gestación⁽¹⁰⁴⁾, sin embargo estos niveles no muestran variación circadiana durante los primeros 2-3 meses de nacimiento, una posible conexión ha sido propuesta con el inicio de la secreción circadiana, cambios en el control termorregulador y el síndrome de muerte infantil repentina con los altos niveles de prevalencia durante este momento^(4,104). El inicio del ritmo circadiano de la secreción de MEL con picos nocturnos se establece a los 9 meses de edad en humanos⁽⁵⁾. La mayor producción de MEL es en la infancia⁽⁵⁾ (de los 3 a 5 años⁽¹⁰⁴⁾) para subsecuentemente declinar en el inicio de la pubertad⁽⁵⁾ (entre los 10 y 15 años⁽¹⁰⁴⁾). La amplitud relativamente es estable hasta la vejez donde la producción declina⁽⁵⁾ (Diagramas 2 y 3). Así la producción diaria de MEL disminuye con la edad^(5,6,24,29,82,101,103,104,153) y en patologías severas como Alzheimer (AD) o relacionadas con el envejecimiento^(24,27,29,103), así los síntomas de envejecimiento se relacionan con la disminución de MEL⁽²⁴⁾.

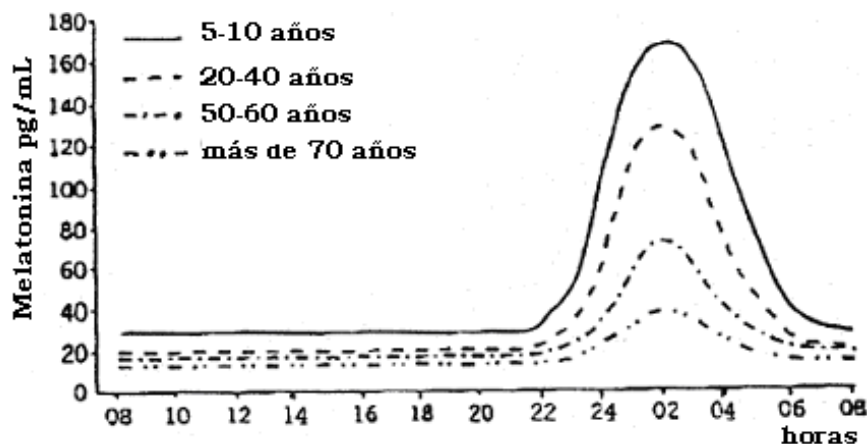


Diagrama 2. Perfiles de las concentraciones séricas de MEL adiferentes edades⁽¹⁵³⁾.



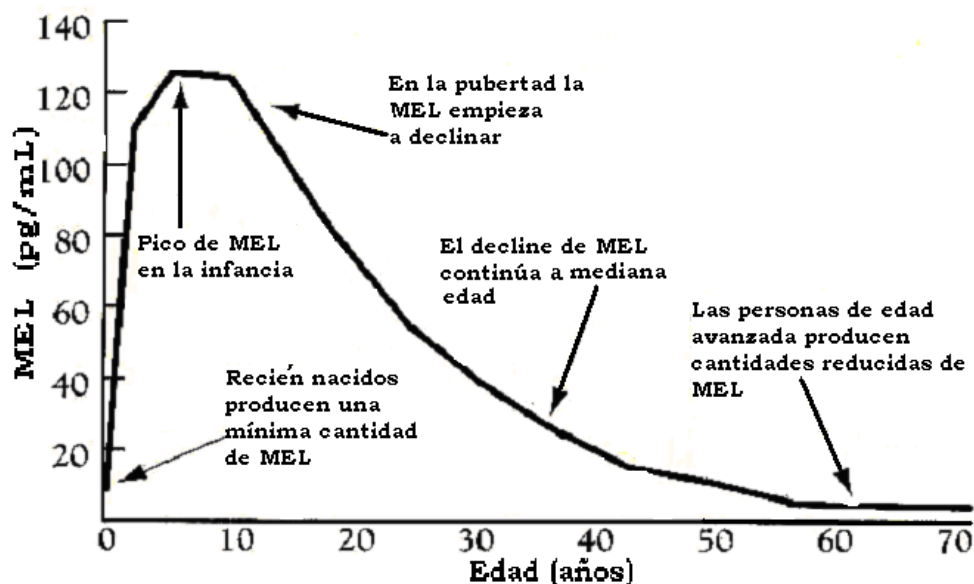


Diagrama 3. Disminución de la concentración de MEL respecto a la edad^(5,6,24).

OTROS FACTORES

Los niveles de MEL circulantes están afectados por ciertos factores fisiológicos y farmacológicos⁽¹⁰¹⁾. La producción de MEL se ve afectada por el ejercicio y cambios de posición, con disminuciones en las concentraciones nocturnas en plasma y saliva cuando se cambia de una posición vertical a una posición supina y viceversa⁽¹⁰⁴⁾. Se reporta que los niveles plasmáticos de MEL disminuyen en personas fumadoras⁽¹²⁸⁾.

Las anomalías más claras en la secreción de MEL son observadas en sujetos ciegos los cuales no tienen percepción a la luz y con una disritmia circadiana durante la adaptación al cambio de fase. Sin embargo se ha reportado que en algunos pacientes que carecen de percepción a la luz, la sincronía circadiana es posible debido a la habilidad de la luz a suprimir la MEL en estos sujetos^(5,104), las lesiones en núcleo hipotalámico para ventricular (NHPV) anulan el ritmo de la síntesis de MEL en la GP⁽¹⁴³⁾.

RECEPTORES

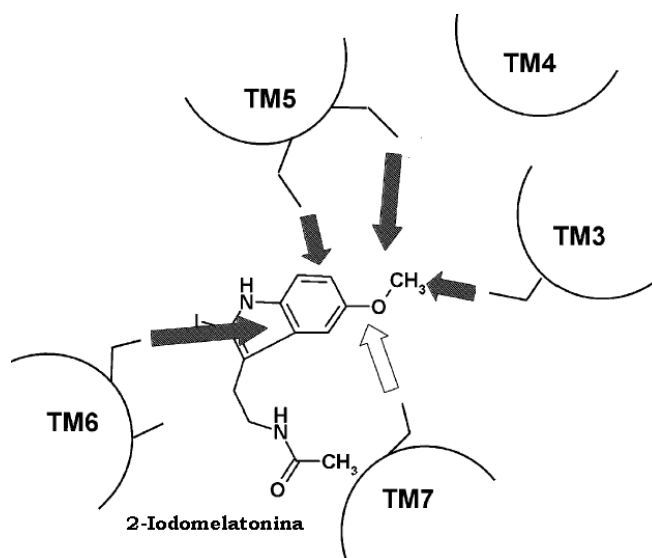
La localización y caracterización farmacológica de los sitios de unión a MEL fue posible en 1987 con el uso del radioligando 2- 125 I-iodomelatonina (2- 125 I-MEL)^(5,10,68,114,143,150,162,166) (Esquema 1), que fue el primer ligando para un inmunoensayo a MEL. La 2- 125 I-MEL empezó a ser ampliamente utilizada para estudiar las características de los receptores de MEL (MEL-R) debido a su alta afinidad^(166,113). El desarrollo de estos métodos permitieron la localización anatómica de MEL-R⁽¹⁶⁶⁾. El primer MEL-R de alta afinidad fue clonado usando DNAC a partir de melanóforos de *Xenopus*⁽¹⁶⁶⁾.



El primer receptor funcional en mamíferos fue encontrado en la retina de conejo, donde MEL inhibía la liberación de Ca^{2+} a través del subtipo MT1 y el efecto de MEL es antagonizado por luzindol^(51,166).

Dos tipos de sitios de unión a MEL se han caracterizado: los sitios con alta afinidad (constante de disociación (K_D) alta entre 20 y 200 pM) y los sitios de baja afinidad (con un valor K_D en rango 1-10 nM). Solo los sitios con alta afinidad han sido caracterizados como receptores MEL-R^(5,10,48,104,143,166) los cuales han sido clonados. Tres tipos de receptores de alta afinidad se han caracterizado; MT₁, anteriormente Mel_{1a}^(5,10,104,114,143,148,166,171), presente en todos los vertebrados, principalmente en el cerebro; MT₂^(5,10,104,114,143,148,171) anteriormente Mel_{1b}, presente en todos los vertebrados, principalmente en la retina y Mel_{1c} presente en vertebrados no mamíferos^(5,114,143,166). De esta familia los tres subtipos de alta afinidad se encuentran en vertebrados pero solo dos están presentes en mamíferos⁽¹⁶⁶⁾. Los sitios de unión de baja afinidad MT₃ fueron recientemente descritos como la enzima 2-quinona reductasa^(10,129,143,166,171). Existen especulaciones de que las propiedades oxido-reductoras de esta enzima están relacionadas con las propiedades antioxidantes de MEL⁽¹⁶⁶⁾.

Una característica de los sitios de unión a MEL es su baja densidad de expresión, de ahí su dificultad para clonarlos⁽¹⁰⁾. La expresión en rata es regulada por MEL de esta manera los receptores son “down-regulation” (disminución de la densidad de receptores) durante el período nocturno y “up-regulation” (aumento de la densidad de receptores) durante la luz, la administración de MEL endógena revierte este efecto⁽¹⁰⁾.



Esquema 1. Orientación de la molécula 2-I¹²⁵MEL con respecto a las hélices transmembranales del receptor MT₂. La flecha blanca indica un posible puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del residuo de aa de TM7 y el grupo 5-metoxi de la 2-I¹²⁵MEL. Las flechas negras indican posibles interacciones hidrofóbicas⁽²⁸⁾.

IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN

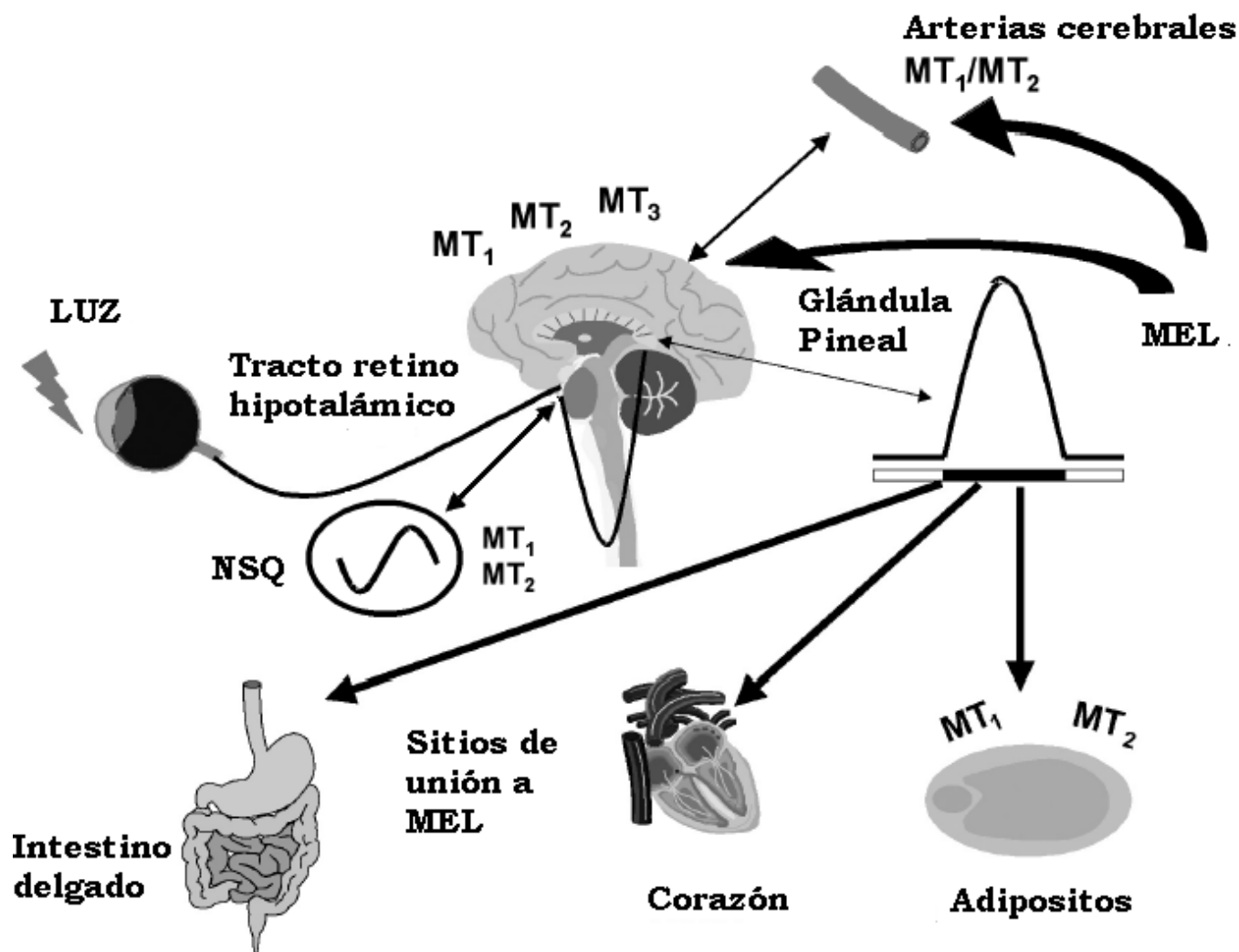
Cerca de 110 estructuras cerebrales expresan sitios de unión a MEL^(10,143). A pesar de que el patrón de distribución muestra marcadas variaciones interespecíficas⁽¹⁴³⁾ en número y naturaleza de estas estructuras, algunas condiciones de esta distribución son constantes⁽¹⁴³⁾. En mamíferos se ha encontrado una distribución discreta mientras que en invertebrados los MEL-R son más abundantes^(48,162,166). La mayoría de los mamíferos presentan MEL-R de alta afinidad en el Pars tuberalis (PT) de la adenohipófisis^(5,48,129,143,150,162,166), en el NSQ^(5,162,166), hipotálamo^(5,162,166). El PT de la adenohipofisis es una estructura endocrina caracterizada por una alta densidad de receptores MT₁ en todos los mamíferos excepto en los humanos^(48,143,150,166). La alta concentración relativa de MEL-R en los PT permite entender la habilidad de la MEL para influenciar en las señales de transducción⁽¹⁶⁶⁾.

Ambos receptores están ampliamente distribuidas a nivel cerebral^(10,48,166), NSQ^(5,10,48,162,166), en cerebelo^(10,104), bastones retinales^(5,104,166), células ganglionares⁽¹⁰⁴⁾, hipocampo^(10,148,166), hipotálamo^(5,10,148,162,166), arterias cerebrales⁽³⁴⁾, glándula pituitaria^(5,48,129,148,162,166), tejido adiposo⁽¹⁰⁾, riñón⁽¹⁰⁾, en segmentos del TGI^(10,24), tálamo^(48,148), neocorteza^(148,166), amígdala⁽¹⁶⁶⁾. Fuera del Sistema Nervioso Central (SNC) los receptores de MEL han sido localizados en algunas células del sistema inmune (linfocitos)^(104,143), células epiteliales prostáticas⁽¹⁰⁴⁾, células granulosas de folículos preovulatorios⁽¹⁰⁴⁾, en espermatozoides⁽¹⁰⁴⁾, en la capa mucosa/submucosa del colon⁽¹⁰⁴⁾, plaquetas⁽¹⁰⁴⁾, Glándula Harderiana⁽¹⁴³⁾, bazo⁽¹⁴³⁾, testículos⁽¹⁴³⁾, ovarios⁽¹⁴³⁾, sistema vascular⁽¹⁴³⁾ (Esquema 2).

Los MEL-R se encuentran en fetos y recién nacidos de vertebrados como peces, pájaros y humanos^(24,104). Los MEL-R están presentes en la GP de ratas recién nacidas, llegan a ser raros en ratas de 9 días de nacidas y no son detectados en ratas adultas^(5,143).

Ambos receptores desarrollan diferentes rutas de señalización y responden a diferentes agonistas⁽¹⁰⁾. Los receptores MT₁ y MT₂ poseen 7 dominios transmembranales, con tres dominios intracelulares y 3 extracelulares^(24,48,129,162,166,171) (Fig. 18). Ambos receptores son 60% iguales en la secuencia de aminoácidos^(10,48). Los MEL-R tipo 1 y 2 están acoplados a dos tipos de proteínas G^(5,10,48,62,68,72,129,143,148,166,171), una sensible a la toxina pertusis y la otra a la toxina del cólera⁽¹⁶⁶⁾





Esquema 2. Diferentes sitios de unión de MEL a nivel periférico y central.

MT₁

El receptor MT₁ está acoplado negativamente al sistema adenilato ciclasa. Una activación provoca disminución en la inducción de acumulación de AMPc este efecto es generalmente mediado por la sensibilidad de la proteína G (G_i/G₀) a la toxina pertusis^(10,129,143,150,166). Como se muestra en numerosos estudios MT₁ produce respuestas inhibitoras en la cascada de transducción de AMP_c resultando en la disminución de la actividad de PKA y en la disminución de fosforilación de CREB^(62,166,171).

En casi de todos los mamíferos, incluyendo al hombre, el NSQ expresa principalmente receptores MT₁^(10,104,143,171) con excepción del mink y la oveja⁽¹⁴³⁾, en el hipotálamo, en el tálamo⁽¹⁶⁶⁾, en arterias cardiacas involucradas en la modulación del ritmo circadiano⁽¹⁷¹⁾ y arterias constrictoras cardiacas^(48,171), retina^(10,48).

Los efectos reportados de la activación de los receptores MT_1 son: en las concentraciones de GMP_c ^(10,143), Diacilglicerol (DAG)⁽¹⁴³⁾, inositol trifosfato (IP_3)^(143,166) o Ca^{2+} ^(10,143,166); en la fosforilación de AMP_c por la unión a proteínas^(143,166); modula la formación de ácido araquidónico^(166,171), potencia el efecto de la prostaglandina F_2 ⁽¹⁶⁶⁾, tiene un efecto vasoconstrictor^(62,129), en la función neuroendocrina⁽⁶²⁾ y sobre el potencial de membrana disminuyéndolo⁽¹⁴³⁾. Receptores MT_1 presentes en el NSQ probablemente median la regulación fisiológica del sueño⁽¹²⁹⁾, la localización de MT_1 en sitios relacionados a las funciones reproductivas y circadianas permiten especular que MT_1 media esta respuesta⁽¹⁶⁶⁾, en los PT en rumiantes controla la secreción estacional de prolactina⁽⁶⁾, MT_1 puede ser importante en el comportamiento funcional de cerebros normales⁽¹²⁹⁾. La elucidación fisiológica del papel de los receptores MT_1 en todos los tejidos continúa bajo investigación⁽¹⁷¹⁾.

MT₂

A diferencia de los receptores MT_1 , la localización de estos receptores está más restringida e incluye el cerebelo⁽¹⁷¹⁾, el NSQ^(129,143,171), hipotálamo⁽¹⁷¹⁾, médula espinal⁽¹²³⁾, retina^(143,166,171), riñón⁽¹⁷¹⁾, ovario⁽¹⁷¹⁾, hipocampo⁽¹⁶⁶⁾, TGI⁽²⁴⁾, arterias cardiacas^(129,171), tejido adiposo⁽¹²⁹⁾ y varias líneas cancerosas celulares^(129,171).

La interacción de MEL con este receptor desencadena una serie de actividades bioquímicas donde la respuesta fisiológica depende del órgano blanco así como de los tejidos involucrados. Algunos efectos reportados de MT_2 son: la inhibición de la formación de AMP_c , por estar acoplado a proteínas G sensibles a la toxina pertussis⁽¹⁶⁶⁾, dilatación de arterias cardiacas⁽¹⁷¹⁾ (efecto vasodilatador⁽¹²⁹⁾), modulación del ritmo circadiano^(10,171), esta involucrado en la respuesta inflamatoria en la microcirculación⁽¹⁷¹⁾ y en la fisiología de la retina⁽¹⁷¹⁾, en el intestino MEL incrementa la secreción de bicarbonato en la mucosa duodenal, inhibe la contracción de músculo liso en íleo, estómago y colon^(24,129) a través de la acción con el receptor MT_2 ⁽¹²⁹⁾.

Sin embargo, en varios modelos la activación de receptores MT_2 resulta en la disminución de GMP_c ^(10,166). En el NSQ los receptores MT_1 podrían mediar el efecto inhibitorio en la actividad eléctrica, al mismo tiempo el receptor MT_2 podría intervenir en el efecto de MEL en el cambio de fase^(5,6,129,143,166).



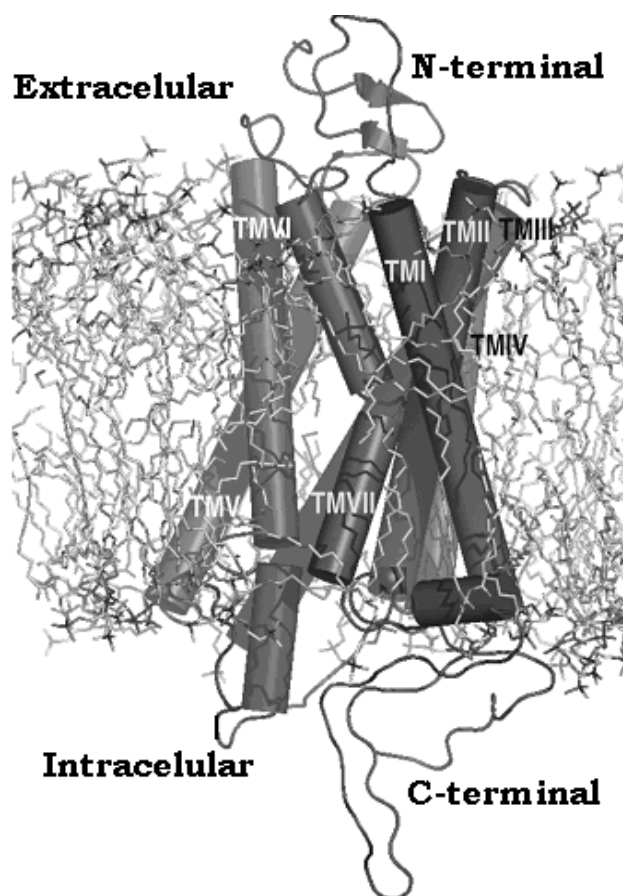


Fig. 18. Estructura del receptor MT₂ ⁽⁸²⁾.

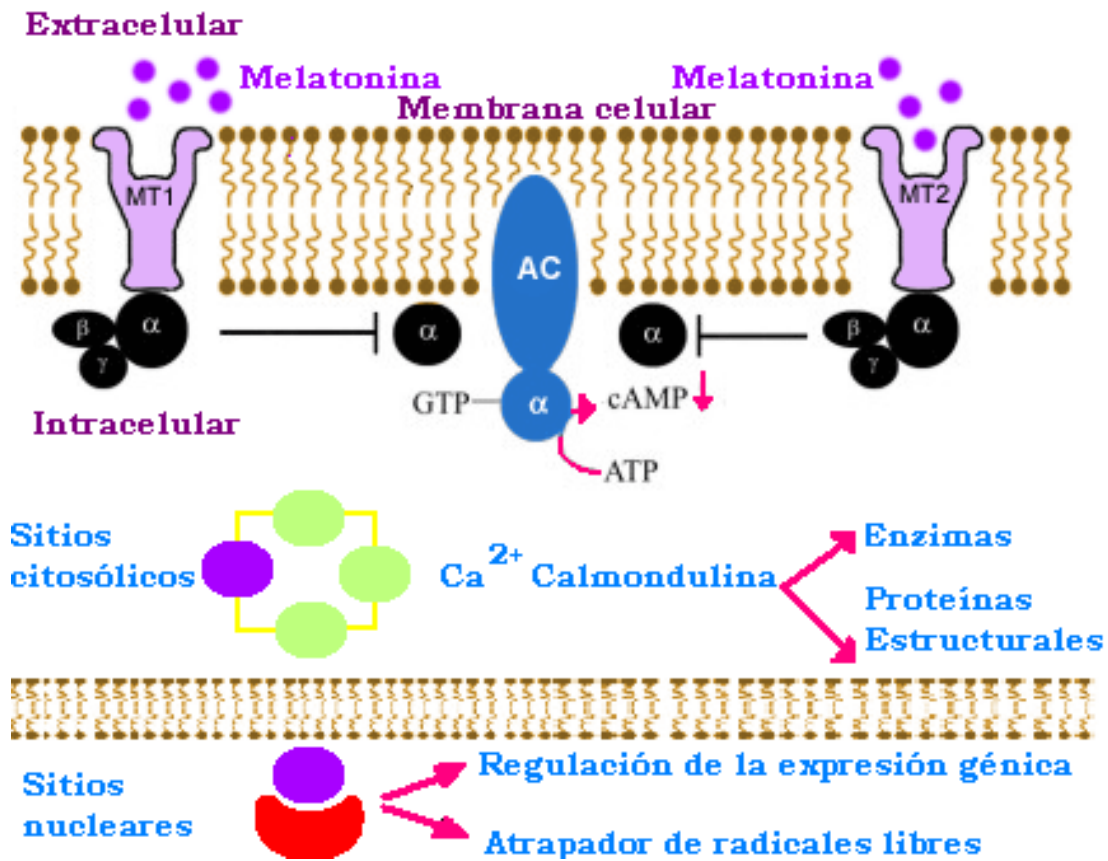
MT₃

MT₃ puede estar involucrado en la regulación de la presión ocular en conejos y en procesos inflamatorios de la microvasculatura⁽¹⁷¹⁾, además la quinona reductasa participa en la protección con el estrés oxidativo previniendo las reacciones de transferencia de electrones de quinonas.

MECANISMO DE ACCIÓN DE MEL

La MEL se distribuye rápidamente vía circulación sistémica a todas las estructuras periféricas y centrales donde MEL actúa vía unión a sitios específicos^(129,143,171).

Algunos efectos de MEL son mediados vía receptores en la membrana y en el núcleo celular^(48,83,129) pero incluso en la ausencia de receptores, la alta difusibilidad (debido a su tamaño pequeño y alta lipofilidad) MEL^(83,104,129,171), además de los mecanismos de entrada a la célula^(83,171), permite a la molécula ejercer efectos sistémicos al nivel más básico^(48,83,104,166,171), modulando el citoesqueleto y funciones mitóticas a través de la unión con calmodulina^(48,104,129), o actuando como atrapador de radicales libres en el núcleo^(39,83,104). La MEL también, se une con relevancia pero en bajas afinidades a receptores nucleares del ácido retinóico⁽¹²⁹⁾ (Esquema 3).



Esquema 3. Posibles sitios de acción de MEL en la membrana plasmática, citosol y núcleo.

Muchos factores contribuyen la diversidad de la respuesta de MEL en el cuerpo⁽¹⁷¹⁾. El primero de todos es que los niveles de MEL fluctúan durante el día y a través del año⁽¹⁷¹⁾ estas fluctuaciones de MEL “In Vivo” pueden y logran impactar ampliamente en la funcionalidad del receptor⁽¹⁷¹⁾. MEL puede activar o inhibir la cascada de transducción de receptores o independiente de receptores⁽¹⁷¹⁾. Otro factor es que los MEL-R están expresados en una amplia variedad de tejidos⁽¹⁷¹⁾.

REGULACIÓN DE RECEPTORES

Debido a que los MEL-R están expuestos diariamente por prolongados períodos de tiempo a la MEL, la desensibilización es un componente esencial para los efectos de MEL en el organismo. Una exposición prolongada de MEL a receptores MT₁ resulta en la desensibilización de receptores MT₁ tanto endógenos como recombinantes. Adicionalmente, en receptores MT₂ recombinantes resultan en una desensibilización. Sin embargo se ha encontrado en experimentos “In Vivo” después de una breve administración de (<1 hora) con niveles farmacológicos de MEL no ocurre ninguna desensibilización. Se reporta que la desensibilización a los MEL-R solo ocurre después de una exposición prolongada a MEL (>5 horas)^(62,171).

Los mecanismos por los que los MEL-R tienen un efecto refractario a sus agonistas es desconocido. MEL-R pueden ser regulados en una manera homóloga por MEL o en una manera heteróloga por estímulos tales como el fotoperíodo o estradiol^(166,171). Por ejemplo en el NSQ de ratas la densidad de MEL-R varía de acuerdo con el ciclo luz/oscuridad^(10,62,129,166,171). Niveles del receptor son menores durante la noche comparados con los niveles durante el día^(10,129,166,171) lo que sugiere que la hormona regula sus propios receptores⁽¹⁶⁶⁾. (Fig. 19) Aunque estas fluctuaciones ocurren incluso en ratas pinealectomizadas (Px) sugiriendo la intervención del ciclo luz/oscuridad⁽¹⁷¹⁾. Tal evidencia sugiere que la regulación de receptores MT₁ por MEL depende de tiempo, exposición y concentración⁽⁶²⁾. Por lo que numerosos estudios revelan la complejidad en los mecanismos de regulación de los MEL-R⁽¹⁶⁶⁾.

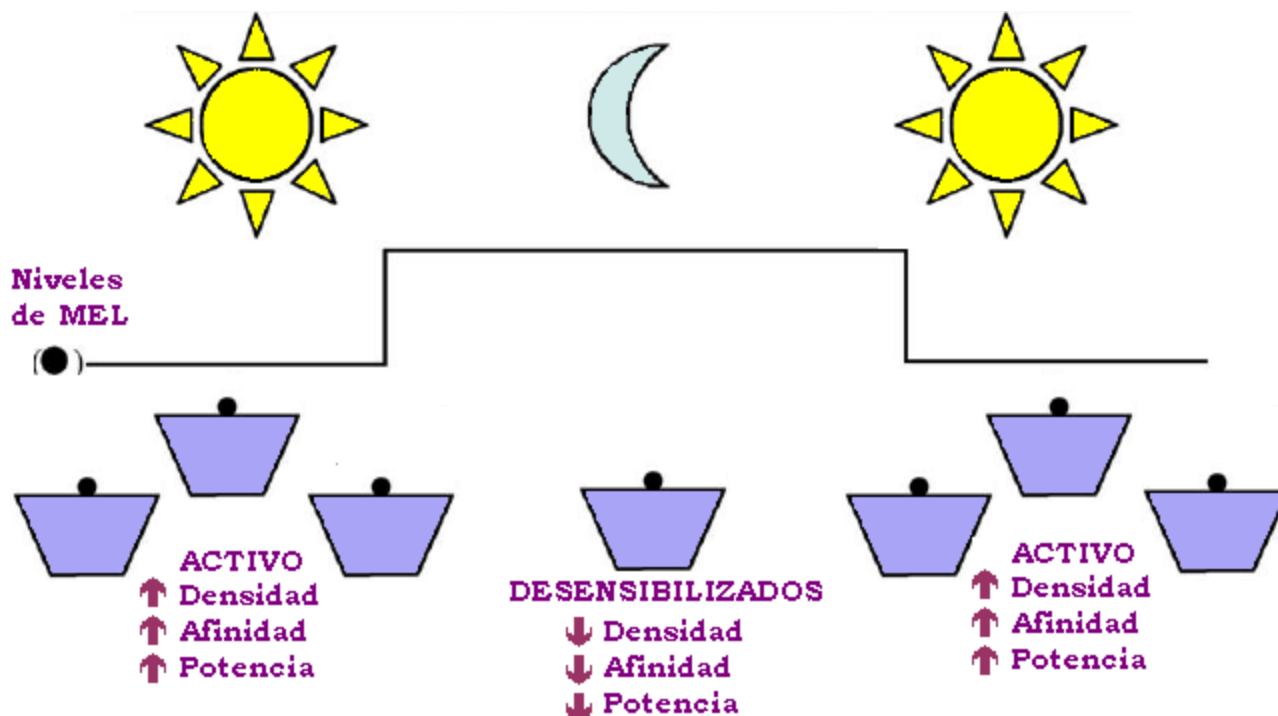


Fig 19. Los niveles de MEL son altos durante las horas de oscuridad pero la afinidad por los MEL-R es baja, en contraste durante la fase de luz la afinidad de los MEL-R es alta. Esto es debido a la desensibilización que sufren los receptores⁽¹⁷¹⁾.

Por tanto la habilidad de la MEL de unirse, activar y modular sus propios receptores depende de la interacción de la MEL con aa específicos y de los dominios. Esta interacción depende de cada tipo de receptor así como el tipo de respuesta depende del receptor⁽¹⁷¹⁾. Con esto se propuso un sitio de unión de MEL, en el que residuos de Alanina y Serina son críticos para la unión con el grupo N-acetil⁽¹⁷¹⁾.

METABOLISMO

La MEL circulante (92-97%) se metaboliza principalmente en el hígado^(24,104,129) pero también es metabolizada en el riñón. Inicialmente en el hígado se hidoxila^(104,105,129,166) en el C6 por el citocromo P₄₅₀ monooxigenasas^(72,105,129) (isoenzimas CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1), para posteriormente ser conjugada con sulfato^(104,105,129,166) y excretarse como 6-sulfatoximetatonina (MEL6S) principal metabolito (90% de la MEL administrada)^(5,10,86,104,105,129); la conjugación glucorónica es extremadamente limitada. CYP2C19 y CYP1A2 desmetilan a la MEL a N-acetilserotonina, uno de sus precursores (Fig. 20)

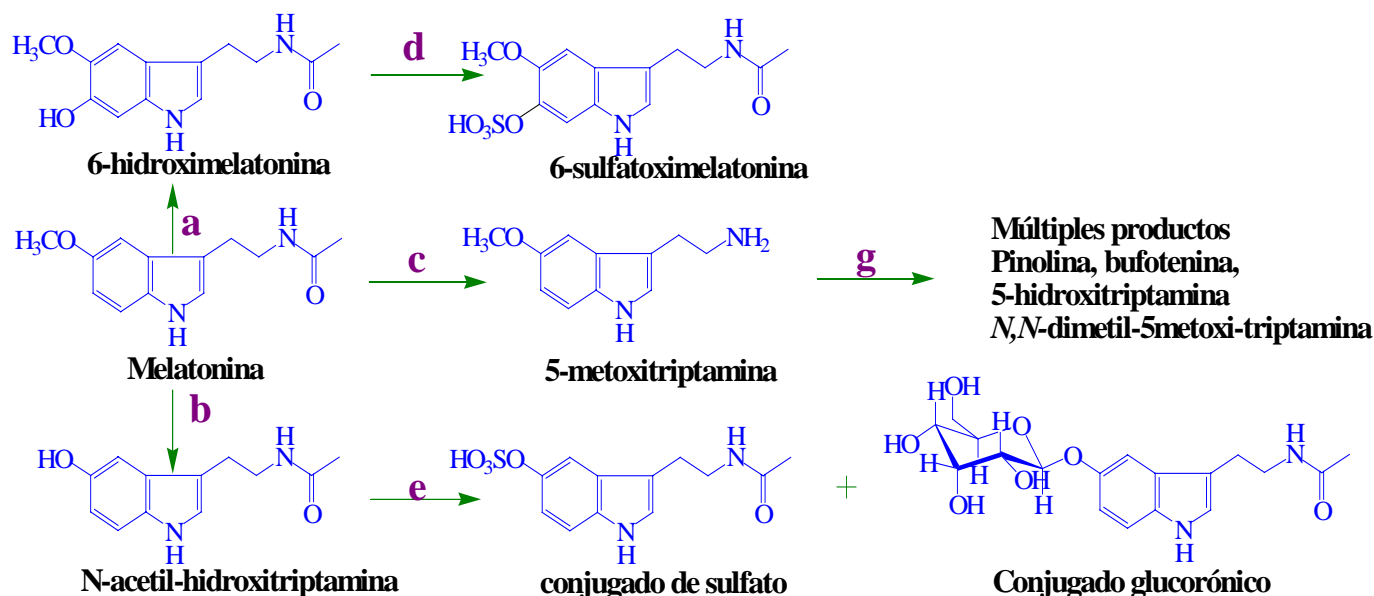


Fig. 20. Las rutas comunes metabólicas de MEL son de MEL a MEL6S (a-d) y MEL a sus conjugados con sulfato y ácido glucorónico (a-e). Una ruta menor es la deacetilación de 5-metoxitriptamina y esta es metabolizada a varios productos (a-g), incluso algunos de sus precursores^(105,129).

CAMBIOS FISIOLÓGICOS QUE PRODUCE LA MELATONINA

Nuestro organismo trabaja en armonía con el medio ambiente como en las estaciones del año, temperatura ambiental y el fotoperíodo. Cuando el reloj biológico no está en fase con el ambiente como en la alteración de los ciclos sueño-vigilia (jet-lag, trabajos nocturnos) los ritmos circadianos como la secreción de MEL, temperatura corporal pueden desincronizarse lo que favorece el desarrollo de patologías⁽¹⁰⁾.

En extensas investigaciones en animales y humanos la MEL ha sido identificada como una sustancia con diversas acciones fisiológicas^(10,24,104,129,153). Desde esta perspectiva la MEL aparece en el ser humano con dos categorías. La primera relacionada con la regulación del ciclo circadiano a través del complejo NSQ-GP^(5,34,68,104,129,153,166), siendo un cronobiótico señalando el tiempo durante el día o año^(24,129) en muchas



especies mamíferas. La segunda relacionada con la promoción de mecanismos endógenos involucrados en la reparación y protección de funciones esenciales para poder llevar a cabo procesos fisiológicos anabólicos^(34,101,153,166).

En los humanos los niveles elevados de MEL están asociados con la reducción de temperatura, incremento en la pérdida de calor corporal, disminución del gasto cardiovascular, reduce el estado de alerta, aumenta la capacidad de respuesta del sistema inmune^(34,129). Tomando todos estos cambios la MEL incrementa la susceptibilidad para promover procesos fisiológicos en sueños nocturnos o procesos que ocurren durante el período de sueño⁽³⁴⁾.

Por lo tanto, los efectos reportados incluyen modulación en el ciclo vigilia-noche^(34,68,104,129,158,178), regulación del sueño^(6,26,104,158), ciclo circadiano^(4,6,10,68,72,104,129,158,171,178), ciclos estacionales^(4,5,6,10,24,48,49,104,129,171), ciclos rítmicos^(5,48,104,171), mantiene sincronización de las principales funciones biológicas⁽¹⁴³⁾, como fisiología reproductiva^(5,10,49,68,104,129,166,171), reproducción estacional^(49,104,171), fisiología del ovario^(129,171), en el sistema inmunológico^(23,24,34,93,102,104,129,143,166), cognitivo⁽³⁴⁾ y cardiovascular^(5,10,23,48,104,129,143,148,166), previene la desintegración del oscilador circadiano en el transcurso de la edad⁽¹⁴³⁾; influencia en el peso corporal^(10,129), presión sanguínea^(129,166,170), balance de energía^(10,129), funciones retinales^(129,171), detoxificación de radicales libres^(83,129,159), control del crecimiento tumoral^(102,129,166), protección ósea⁽¹²⁹⁾, protección contra daño causado por radiación ionizante (radio protector)^(83,91,165), es un: termorregulador^(6,23,26,34,48,104,129,148), citoprotector⁽¹²⁹⁾, antioxidante^(5,10,22,24,38,72,83,102,104,128,129,143,159), inhibidor de la peroxidación lipídica^(38,107,159), neuroprotector^(61,107,127,159), modulador de la expresión de oncogenes⁽¹⁰²⁾, modulador de la neurotransmisión⁽¹⁴³⁾, tiene efectos anti envejecimiento^(5,143), antitumoral^(5,6,11,24,102,104,129,143,171), antiapoptótico^(72,83,129) y recientemente en la diferenciación de osteoblastomas^(49,129). En el TGI la MEL está involucrada con el transporte transmembranal de iones y electrolitos⁽²⁴⁾, incremento del agua en las heces fecales⁽²⁴⁾, relajación del músculo liso⁽²⁴⁾, controversialmente bajas concentraciones de MEL se han reportado aumenta la contractilidad del intestino⁽²⁴⁾ y en la regulación de la secreción de bicarbonato en el TGI^(5,24,129) por lo que se ha encontrado que MEL tiene un efecto protector en úlceras gástricas^(24,91). MEL se ha detectado en altas concentraciones en la bilis y se cree que en ella previene el daño oxidativo del epitelio intestinal causado por los ácidos biliares⁽¹²⁹⁾.



La MEL tiene efecto en numerosas rutas de señalización (inhibición de AMPc y GMPc, acumulación, supresión de diacilglicerol, síntesis y liberación de ácido araquidónico, disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} y aumento en el potencial de membrana). La MEL inhibe rápida y selectivamente la liberación de la hormona gonadotropina, induce “In Vitro” la liberación de dos hormonas pituitarias, la leutinizante y la foliculo estimulante⁽¹⁶⁶⁾, además de la regulación de prolactina⁽¹⁶⁶⁾.

Se ha propuesto a la MEL como un inhibidor natural de serotonina y como un balance natural entre las concentraciones en tejido de estos dos compuestos indólicos⁽²⁴⁾. Dos estudios muestran que MEL exógena puede modular la liberación de leptina y ghrelina, dos neuropéptidos secretados por los adipositos y el estómago y están involucrados en el control del balance de energía⁽¹⁰⁾. La MEL puede afectar el tejido adiposo blanco y café a través de inervaciones simpáticas del cerebro al adiposito⁽¹⁰⁾.

El papel de MEL en la regulación del reloj biológico en tejidos periféricos revela que debe haber mecanismos tejido-específicos para la regulación de la ritmicidad de la fase. Los tejidos que no están ligados al NSQ por las conexiones neuronales directas pueden recibir señales vía mecanismos humorales⁽¹⁶⁶⁾. La MEL promueve el sueño en animales diurnos, incluyendo humanos sanos. La cercana relación entre el incremento nocturno de MEL endógena y el tiempo de sueño en humanos sugiere que MEL está involucrada en la regulación fisiológica del sueño^(6,129). Muchas investigaciones proponen que la MEL facilita el sueño por la inhibición del despertar en el ritmo circadiano⁽¹²⁹⁾. En humanos la elevación postprandial de concentraciones plasmáticas de MEL puede ser la causa, en ocasiones, del sueño experimentado después de la comida de medio día comúnmente llamada la siesta. Además como la MEL disminuye la temperatura corporal puede explicar por que la siesta es más popular en regiones cálidas⁽²⁴⁾. Cambios en la amplitud y en el ritmo de secreción de MEL han sido descrito en pacientes con depresión, trastorno bipolar afectivo y desórdenes afectivos estacionales^(129,178).

Sin embargo la función más conocida de MEL en mamíferos es como un activo transductor neuroendocrino de la información del medio ambiente^(6,10,22,49,68).

MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN

Se ha propuesto que la MEL puede alterar la liberación de varios neurotransmisores, especialmente dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), y modular la respuesta postsináptica⁽¹⁴³⁾. La MEL, a través de la activación de sus diferentes subtipos de receptores, puede modular diferencialmente la función de los receptores GABA_A. Se ha propuesto que algunos efectos (sedante,



analgésico, anticonvulsivo, ansiolítico) de MEL exógena en humanos pueden relacionarse a su interacción con el sistema GABAérgico⁽¹⁴³⁾.

APLICACIONES

El hecho de que la MEL actúa a concentraciones fisiológicas o farmacológicas junto con la amplia expresión de sus receptores en el organismo la hace una hormona con varias posibilidades terapéuticas⁽¹⁰⁾.

En el tratamiento de los desórdenes del ritmo circadiano se ha desarrollado un nuevo tipo de agente denominado “cronobioticos”, de los cuales la MEL es un prototipo^(4,5,10,28,68,129). En las personas que padecen insomnio, el tratamiento con MEL disminuye la latencia del sueño e incrementa la eficiencia del sueño en especial^(4,28,68,72,129,160) el sueño de ondas cortas⁽²⁹⁾, esto es particularmente marcado en pacientes con Alzheimer^(28,129,153), es efectiva para reducir significativamente el uso de las benzodiazepinas⁽³⁷⁾. Además la administración de MEL sincroniza el ciclo sueño-vigilia en personas ciegas^(4,5,6,24,143), en individuos que sufren el síndrome Jet-Lag^(4,5,6,24,26,68,72,104,129,143), entre otras aplicaciones aromédicas^(4,129,138), en desórdenes del sueño relacionados con el ciclo circadiano^(5,6,24,25,26,68,72,129,158), en personas con trabajo nocturno(shiftwork)^(4,5,6,24,26,68,104,129,143), con desórdenes del sueño^(6,25,26,143), insomnio^(5,24,25,26,68,104,129), depresión^(18,68,102,108,129,178), en meditación⁽¹²⁹⁾, analgésico^(37,68,123), anticonvulsivo⁽⁶⁸⁾, ansiolítico^(68,102), mejora los síntomas en pacientes con síndrome de intestino o colon irritado⁽²⁴⁾. La MEL da una protección en el proceso anti-envejecimiento^(5,82,101), en enfermedades neurodegenerativas^(23,72,129) como Alzheimer^(23,37,72,104,129), Parkinson^(23,72,129) y Huntington^(72,129), esclerosis amiotrófica lateral^(72,129), eficiente para la hipertensión⁽¹²⁹⁾, como hipnótico^(10,48,68,94,129,166), aplicación en la agricultura⁽⁵⁾, desórdenes afectivos estacionales^(68,104) y juega un papel en la maduración sexual, reproducción, función inmune y puede ser utilizada en desórdenes psiquiátricos y neurológicos^(5,22,72,93,104,129,159,177).

Dentro de las aplicaciones aromédicas de MEL esta el tratamiento de los efectos de Jet-lag, en los pasajeros de avión la administración de MEL a la hora de dormir mejora la calidad del sueño, y disminuye el tiempo requerido para reestablecer el ciclo circadiano normal^(4,68,129,138). Para la tripulación internacional que viaja a través de múltiples husos horarios, sin tiempo para adaptarse al nuevo entorno, tomando MEL antes de llegar a casa puede perjudicar su ya alterado ritmo circadiano^(4,138), por eso estudios sugieren que la administración de MEL a la tripulación debe de ser bajo condiciones controladas ya que si es tomada en un tiempo inadecuado puede perjudicar en el desempeño laboral



debido a sus posible interacción con ciertos medicamentos y cambios en las concentraciones^(4,138). El uso combinado de MEL y la luz son estrategias que pueden ayudar en el cambio de fase, ya que tanto MEL como la luz actúan en la sincronización del ciclo circadiano⁽⁴⁾. Además se pueden encontrar algunos consejos para viajeros en la literatura científica⁽⁴⁾.

El efecto de MEL en el sueño es consecuencia del incremento a la sensibilidad a él^(10,129), por aumento de la amplitud en la oscilación del reloj circadiano vía receptores MT1 presentes en el NSQ⁽¹²⁹⁾, lo que induce una caída en la temperatura corporal y por la sincronización del reloj circadiano vía receptores MT2^(5,28,29). MEL mejora la calidad del sueño con la estabilización de parámetros conductuales y cognitivos. El tratamiento de MEL se muestran como una terapia constitutiva para disminuir el insomnio y alentar la evolución de la degeneración cognitiva en pacientes con AD^(27,104,129). A pesar del origen de las enfermedades neurodegenerativas muchas de ellas están frecuentemente relacionadas a 3 procesos (excitotoxicidad del glutamato, daño neuronal mediado por radicales libres y disfunción mitocondrial) que han sido identificados como mecanismo patofisiológicos que llevan a la muerte neuronal. En el contexto de estrés oxidativo el cerebro es particularmente vulnerable a este daño debido a que esta enriquecido con fosfolípidos y proteínas que son sensibles al daño oxidativo y tienen un sistema de defensa antioxidante débil⁽¹²⁹⁾. La atenuación o prevención del estrés oxidativo puede ser una bases para el tratamiento de AD⁽¹²⁹⁾.

En cuanto al estres oxidativo se ha sido sugerido como la causa principal de muerte neuronal dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson. La MEL protege a las neuronas del daño causado por la neurotoxicidad inducida en una variedad de medios de cultivo que sirven como modelos experimentales para el estudio del Parkinson⁽¹²⁹⁾.

Además la MEL puede ayudar en desórdenes y condiciones en las que las condiciones ambientales son extremas, por ejemplo la exposición a la luz en inviernos de altas latitudes^(5,104). Varios estudios demuestran que MEL mimetiza los efectos de Diazepam⁽³⁷⁾, el efecto analgésico de MEL puede ser bloqueado por flumazenil indicando que el mecanismo de acción de MEL involucran al receptor de las benzodiazepinas⁽³⁷⁾. La cuantificación de MEL en cadáveres permite a los forenses usar la relación entre la concentración y la hora del día en la que ocurrió la muerte⁽¹³⁸⁾. Hay evidencia que la administración de MEL puede reducir la actividad epiléptica en pacientes bajos niveles endógenos de MEL⁽⁶⁸⁾.



Para aplicaciones clínicas es necesario una investigación para entender mejor las indicaciones, regímenes de dosificación y márgenes de seguridad de la hormona^(22,84,101).

SEGURIDAD DE LA MEL

En algunos países la MEL esta disponible sin prescripción en tiendas naturistas, como MEL es etiquetada como “suplemento alimenticio” no es controlada por la FDA. Se ha encontrado que algunas impurezas de estos productos están asociadas con el síndrome eosinofilia-mialgia debido a L-triptofano contaminado⁽²⁴⁾. La MEL exógena es relativamente una sustancia segura cuando se usa por períodos cortos (días o semanas) y es segura a altas dosis y en varias formulaciones^(24,25,26,83) pero se tiene poca información acerca de la dosis o formulación óptima⁽⁴⁾. Se debe de considerar que la farmacocinética de MEL varia entre cada individuo y aún no se ha investigado completamente de la sensibilidad individual⁽⁴⁾. La seguridad de MEL exógena cuando es usada por períodos prolongados, meses o años permanece incierta^(4,25,26) pero no se han reportado efectos dañinos a la salud⁽⁴⁾. Los efectos adversos más comúnmente reportados de MEL son náuseas (1.5%) dolor de cabeza (7.8%), vértigo(4%) y somnolencia (20%)^(4,25,26).

HIPOCAMPO Y MELATONINA

Hay hormonas que pueden actuar en receptores específicos hormonales, la MEL es una de ella y puede influir en la plasticidad neuronal implicada en mecanismos patológicos en desórdenes neuropsiquiátricos. Además, se sabe que MEL disminuye la actividad eléctrica del cerebro⁽⁶¹⁾. Sin embargo, no se sabe el mecanismo por el cual lo hace para explicar esto, recientemente, se ha estudiado “In Vitro” el papel funcional de receptores de MEL en el hipocampo. MEL incrementa la frecuencia espontánea de los potenciales de acción en las células piramidales CA1 y puede ser revertido mediante antagonistas a MT1 y MT2⁽¹⁴⁸⁾ estos resultados sugieren que los MEL-R pueden alterar la función inhibitoria y afectar la excitabilidad del hipocampo⁽¹⁴⁸⁾. El descubrimiento de MEL-R en el HIPO indican que MEL juega un papel importante en la modulación de la excitabilidad neuronal dentro del HIPO. Ya que se ha reportado que el HIPO es altamente epileptogénico con vista no solo a la inducción sino también la sincronización de la actividad epiléptica⁽¹²⁰⁾. Se reporta que los MEL-R en el hipocampo modulan la actividad locomotora y la latencia de las convulsiones de una manera tiempo-dependiente⁽¹⁴⁸⁾.



2.3 ANÁLOGOS DE MELATONINA

Los efectos y la caracterización farmacológica de los receptores a MEL en el sistema nervioso central (SNC) han estimulado la búsqueda de agonistas y antagonistas a los MEL-R con la finalidad de entender el mecanismo de acción y evaluar el efecto terapéutico de la hormona^(7,36,54,56,157,158,166,173). Con esta finalidad para caracterizar el papel fisiológico de cada subtipo de receptor^(7,10,43,44,46,55,93,108,166) numerosas nuevas moléculas han sido sintetizadas. Así, nuevos compuestos capaces de actuar específicamente como agonistas o antagonistas pueden ayudar a entender mejor la acción de la hormona en la regulación de diferentes funciones fisiológicas en animales de laboratorio para posteriormente, con las condiciones clínicas adecuadas, verificar las hipótesis en humanos^(10,36,56,173). El desarrollo de agonistas y antagonistas para los subtipos de MEL-R podrán ser de utilidad para tratar enfermedades humanas^(7,44,45,46,93,160,178) tales como las relacionadas con el ciclo circadiano^(158,160) (observadas en trabajadores nocturnos y personas ciegas) o como consecuencia del jet-lag⁽¹⁶⁶⁾ por lo que se hacen indispensables estudios adicionales para entender el mecanismo de acción de MEL^(45,166).

Las series de agonistas y antagonistas de MEL-R pueden ser utilizados para entender los mecanismos celulares, moleculares y de acción de MEL. En particular los antagonistas de MEL-R son útiles como herramientas farmacológicas para identificar subtipos de MEL-R^(7,44,45,46,54,55,56,93,157,160). La investigación en el campo de la mutagénesis revelará los dominios y aminoácidos presentes en los MEL-R que son esenciales para la unión de alta afinidad tanto de agonistas como de antagonistas. Esto facilitará el desarrollo de ligandos selectivos para los MEL-R los cuales pueden ser usados tanto en la investigación como en la clínica⁽⁶⁴⁾. Durante los últimos años varios modelos moleculares del sitio de unión han sido propuestos. Todos ellos coinciden en que el enlace de hidrógeno del grupo 5-metoxi de la MEL actúa como grupo donador, el carbonilo como grupo aceptor y el átomo de nitrógeno del acetamida como grupo donador^(54,100, 101).

Por otro lado se ha reportado que la actividad biológica de la melatonina depende de sus componentes farmacofóricos como son el grupo acetamida, el grupo 5 metoxilo y el anillo aromático de tipo indólico^(100,101,113). El reconocimiento melatonina-sitio receptor, se presenta, en primera instancia, por las fuerzas electrostáticas tanto del ligando como del sitios receptor, las cuales son el reflejo de sus propiedades electrónicas. Si se mantienen constantes los grupos 5-metoxilo y acetamido pero se incorporan



sustituyentes al núcleo indólico que modifiquen las propiedades electrónicas de este farmacóforo se podrán alterar las propiedades biológicas de la melatonina^(100, 101).

Así en la Facultad de Química en el Departamento de Farmacia, Edificio E, Laboratorio 121 hay un grupo de Investigadores Químicos que sintetizan análogos de MEL con el fin de que se alteren las propiedades electrónicas sobre el anillo indólico y que esto tenga repercusión sobre la actividad biológica, actividad que en el laboratorio de neurofarmacología evaluamos, en el presente trabajo nos enfocamos en la posible actividad neuronal de estos compuestos.

Las características estructurales para las sustancias análogas a MEL utilizadas fueron: mantener intacta la parte “norte” de la molécula o sea el grupo 5-metoxilo y la cadena de etilamido, modificando la parte “sur” con sustituyentes en el nitrógeno indólico que promuevan un incremento o decremento en la densidad electrónica en la parte norte. El tipo de sustituyentes incorporados fue benzoilo y fenilo sustituidos^(100, 101). (Fig. 21).

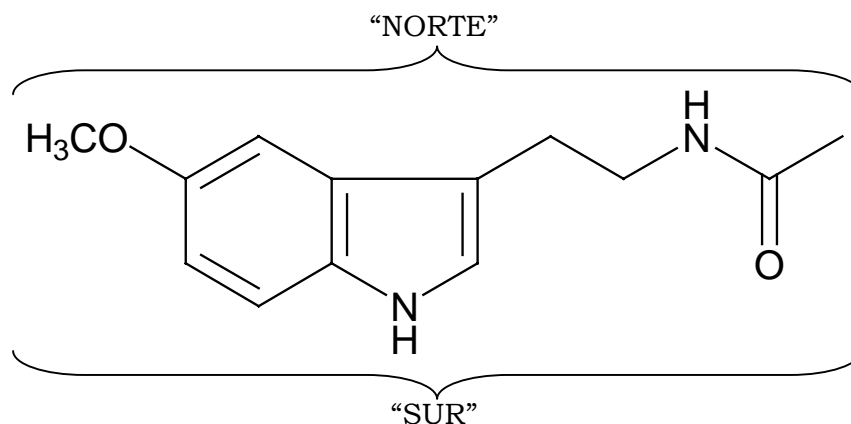


Fig. 21. Parte “norte” y parte “sur” de la molécula de Melatonina.

La adición de un grupo voluminoso en la posición 2 ha sido considerado como un sitio farmacofórico adicional. La síntesis de los análogos probados (M3C y M2B) se basa en la sustitución del átomo de nitrógeno en el anillo del indol con los siguientes argumentos. Primero, este átomo está lejos de la zona de unión ligando-receptor así la posible interacción estérica con los sustituyentes en este átomo es minimizada. Segundo el átomo de nitrógeno incrementa la densidad electrónica en la posición 3 del anillo indólico, por la deslocalización del par de electrones. Por lo tanto modificaciones en esta distribución electrónica pueden modificar las propiedades electrónicas de la molécula y como consecuencia su actividad biológica^(100, 101). (Fig. 22)

Se sabe que el átomo de nitrógeno del núcleo indólico incrementa la densidad electrónica, por efecto resonante, sobre el átomo de carbono de la posición 3 por lo que una manera de modificar esta contribución es con la incorporación de un sustituyente

del tipo electroatractor en la posición 1. El grupo benzoilo que ejerce un efecto del tipo electroatractor al igual que el grupo fenilo, pero, este es menos voluminoso que el grupo anterior además que sobre estos constituyentes se incorporaron grupos de tipo electrodonador y electroatractor^(100, 101).

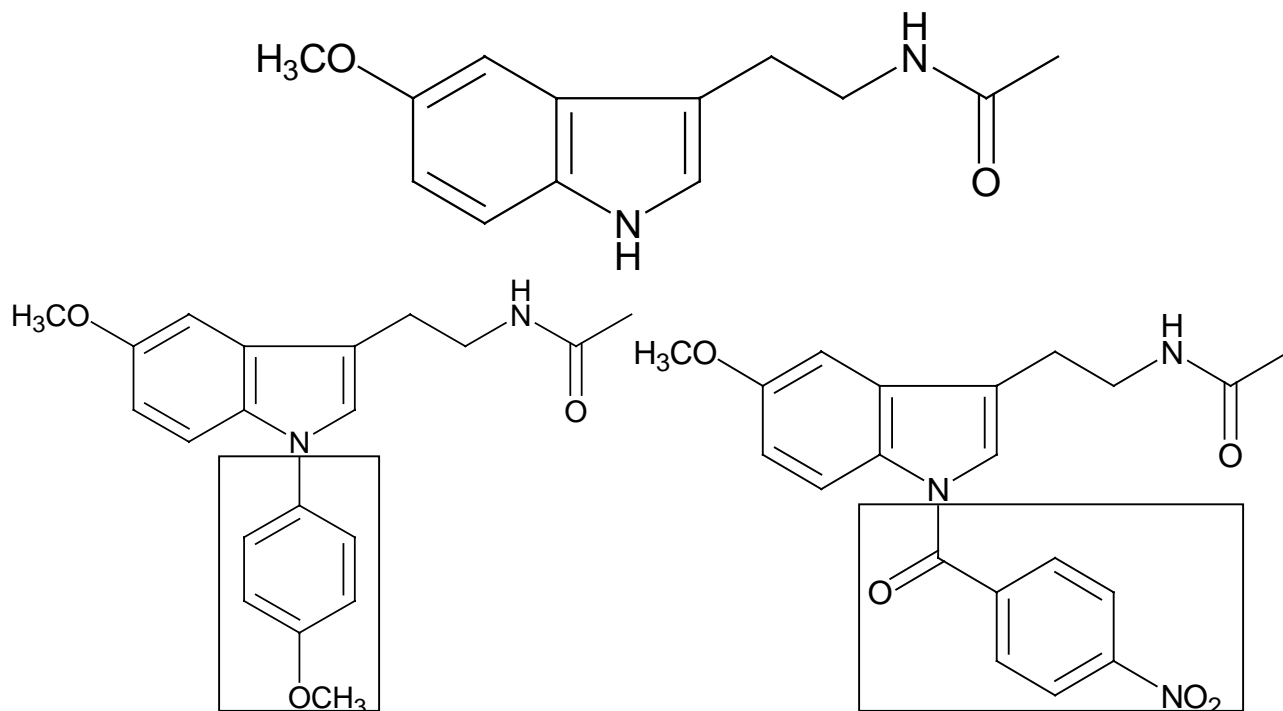


Fig. 22. Estructura de MEL, compuesto M3C (*N*-{2-[5-metoxi-1-(4-metoxifenil)-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida) y Estructura del compuesto M2B (*N*-{2-[5-metoxi-1-(4-nitrobenzoil)-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida). En la parte superior de la figura se muestra la MEL. En la parte inferior se encuentran los dos análogos utilizados. En un rectángulo se encierra los grupos químicos adicionados a la estructura base de MEL^(100, 101).

En la Fig. 23a MEL muestra un lóbulo superior (región A) y un lóbulo inferior (región B) de proporciones similares, arriba y abajo del anillo indólico, respectivamente. Estas regiones abarcan los átomos N₁, C₃, C_{3a}, C₄ y C_{7a}. Las restantes regiones corresponden al oxígeno del grupo carbonilo, al nitrógeno del grupo acetamido y al oxígeno del grupo metoxilo.

Al comparar las regiones A y B de la MEL con las mismas regiones de los compuestos M3C y M2B (Fig. 23b y 23c), se observa una disminución significativa en el caso de M2B, pero en el caso de M3C el grupo fenilo no disminuye sensiblemente la densidad de carga sobre el anillo indólico. Se puede observar que la incorporación de los sustituyentes afecta la densidad de carga sobre el anillo indólico. Si consideramos que el núcleo indólico de la melatonina presenta dos lóbulos de densidad de carga, se esperaría que aquellos compuestos que mantengan dichas zonas tendrán una actividad biológica similar a la de la MEL y aquellas que presenten una disminución de dichas zonas serán

menos activas o se unirán con menor afinidad a los sitios receptores de la melatonina, por lo que se esperaría una menor actividad con M2B que M3C^(100, 101).

Cabe señalar que el compuesto M2B cumple con dos criterios importantes que influyen en la afinidad, tiene en la posición 1 un grupo voluminoso y fuertemente electroatractor, ya un grupo voluminoso mejora la afinidad pero otro factor de tipo electrónico que coadyuva a la interacción ligando-receptor es el efecto electroatractor. En el caso del compuesto M3C se sabe que la presencia del grupo polar en el fenilo favorece la afinidad^(100, 101).

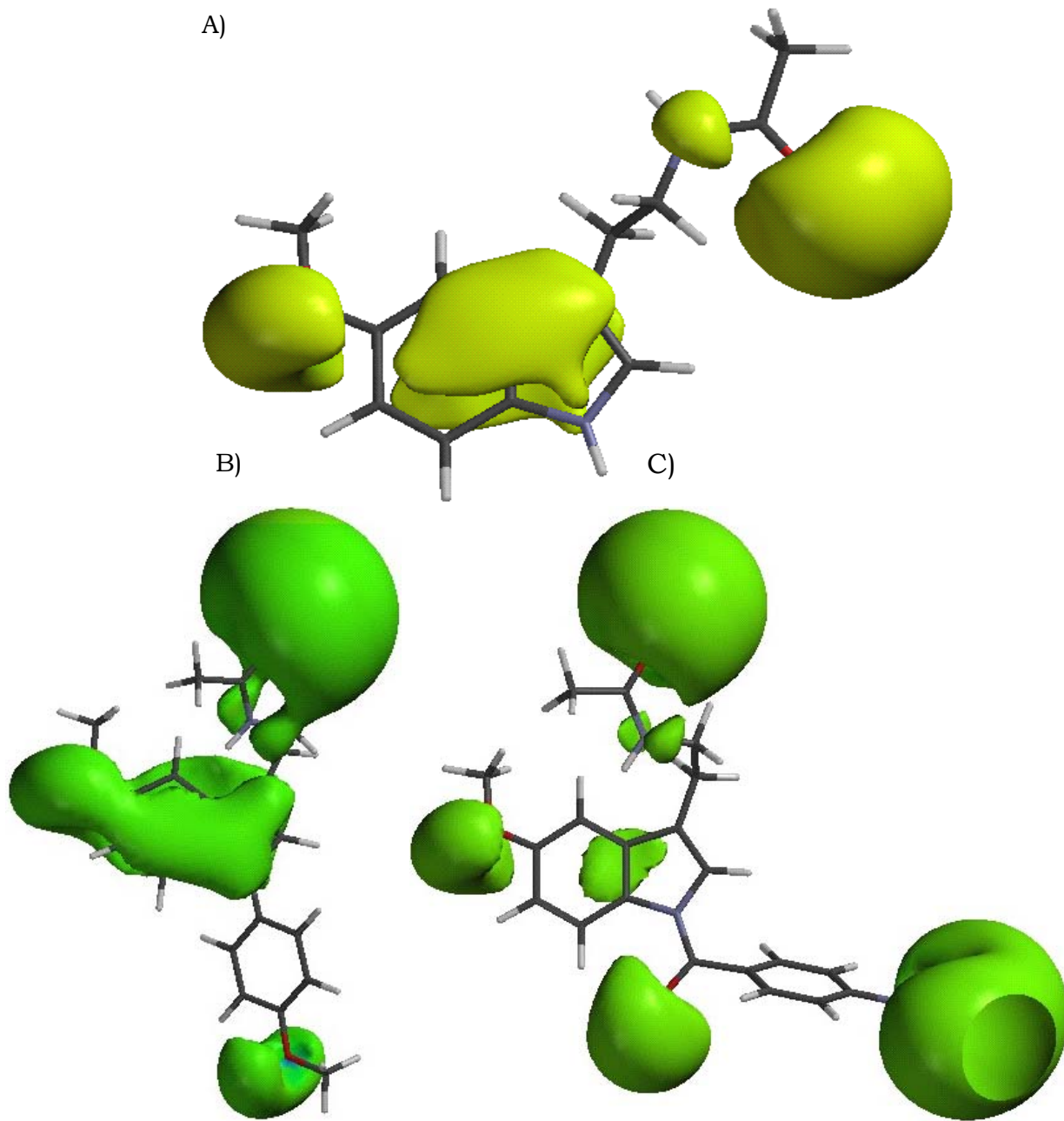


Fig. 23. a)MEL y los Análogos de MEL b)M3C y c)M2B con su densidad electrónica respectivamente^(100, 101).

2.4 HIPOCAMPO

El hipocampo (HIPO) es la estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria debido a las características de plasticidad que presentan sus neuronas. El HIPO está bien caracterizado como una estructura cortical⁽⁴²⁾. Su organización es regular lo que lo hace ideal para realizar investigaciones fisiológicas y anatómicas⁽⁴²⁾.

HISTORIA

El HIPO de mamíferos, es una de las estructuras filogenéticamente más antiguas del cerebro⁽³⁵⁾. La estructura la observó Achilline y a finales del siglo XVI el anatomista Arantio⁽²⁾ le asignó el nombre de hipocampo por asemejarse al caballo de mar (*hippo*= caballo, *campos*= mostruo en griego)⁽²⁾. El anatomista Giulio Cesare Aranzi fue el primero en usar el término hipocampo para describir ésta estructura cerebral. Dos siglos después los anatomistas la compararon con un cuerno de carnero o los cuernos de la antigua deidad egipcia Ammón, quien tenía la cabeza de carnero, de allí el término cuerno de Ammón⁽²⁾ (Fig. 24). Este órgano inicialmente fue relacionado con el sentido del olfato. El Ruso Vladimir Bekhterev notó el papel del hipocampo en la memoria alrededor de 1900, basados en las observaciones a un paciente con profundos problemas de memoria⁽⁴²⁾. Sin embargo, por muchos años se consideró al hipocampo responsable de las emociones como el resto del sistema límbico⁽⁴²⁾.

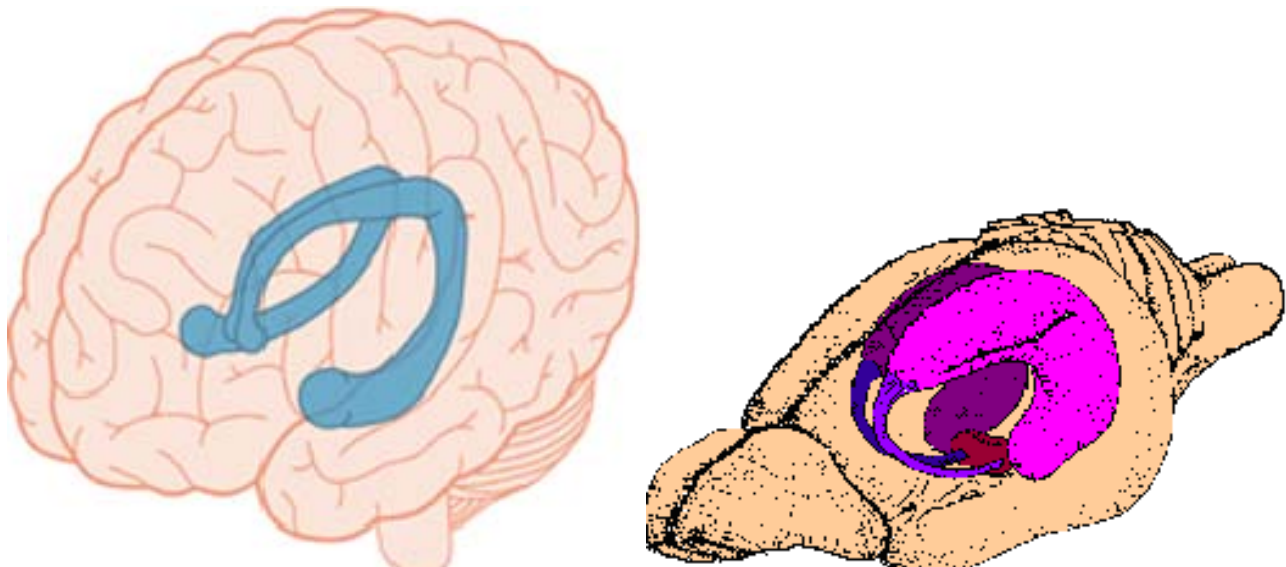


Fig. 24. Similitud del hipocampo humano y de rata con un cuerno de carnero⁽²⁾.

Estudios experimentales de hipocampo de rata permitieron su entendimiento en mamíferos y solo después de la introducción de técnicas no invasivas como las imágenes de resonancia magnética incrementaron el número de estudios en el HIPO humano. Anteriormente, estos estudios eran totalmente dependientes de casos patológicos⁽³⁵⁾.

Actualmente se han ampliado los estudios en humanos y ratas y se ha establecido el papel funcional de la formación del hipocampo y algunas formas de memoria y procesos de aprendizaje^(13,35,42). (Fig. 25).

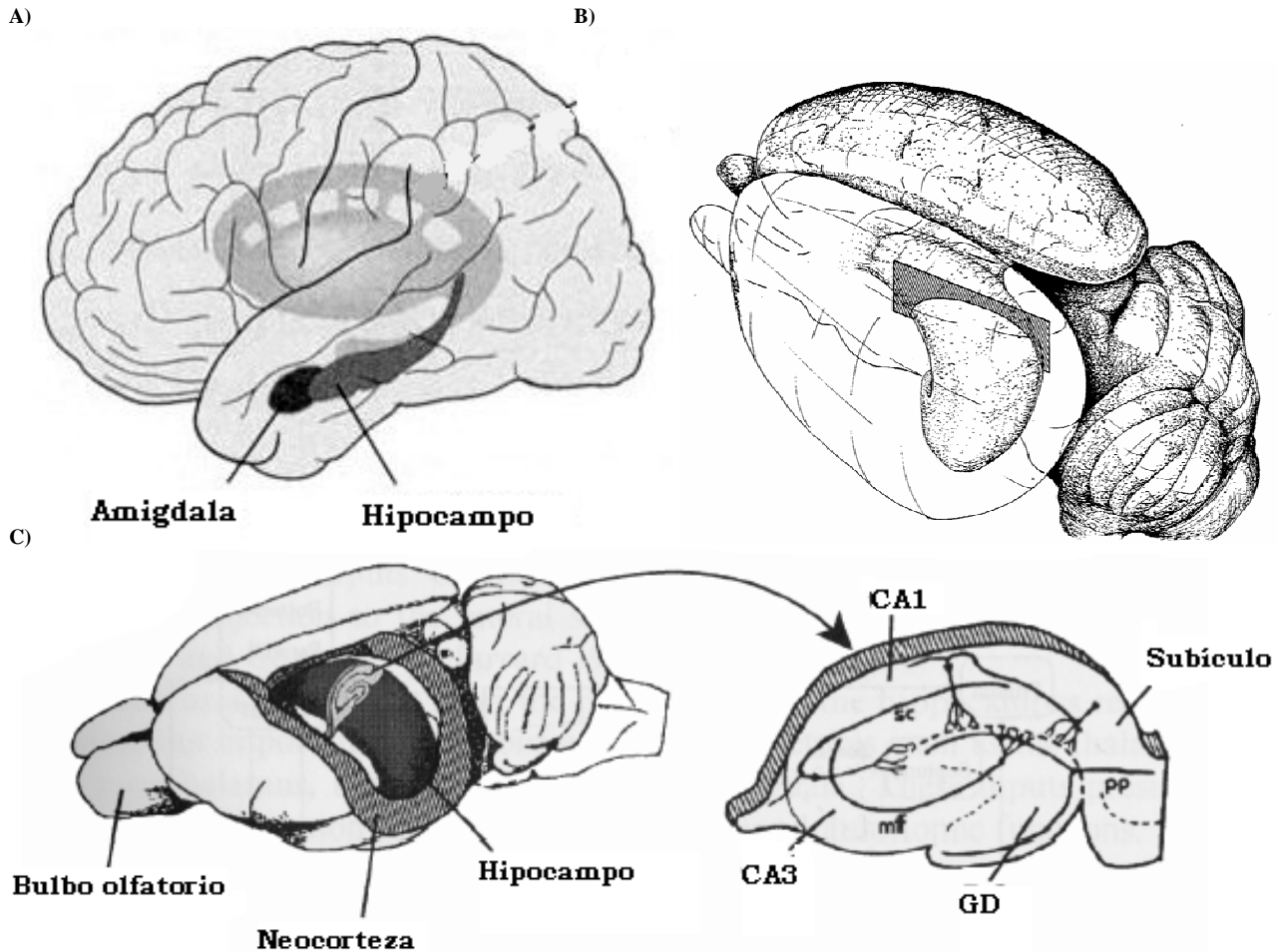


Fig. 25. Localización del hipocampo en el cerebro de mamíferos. A) Hipocampo humano, b y c) hipocampo de rata⁽³⁵⁾.

ANATOMÍA

El hipocampo es parte del sistema límbico⁽³⁵⁾ y está localizado en el lóbulo medio temporal^(20,35,175). El HIPO es una estructura compacta con varios componentes⁽¹⁷⁵⁾. Este puede ser dividido en dos regiones las áreas corticales cercanas a él⁽¹⁷⁵⁾. El hipocampo de rata es una estructura cilíndrica (Fig. 26) que forma un semicírculo alrededor del tálamo⁽⁴²⁾.

El HIPO humano aparece como una estructura en forma de C en cortes coronales y con el giro dentado adyacente determinan una estructura en forma de S⁽²⁾ (Fig. 27). La posición del hipocampo en relación a otras estructuras cerebrales y al grado de organización interna muestra variaciones significativas entre especies⁽³⁵⁾.

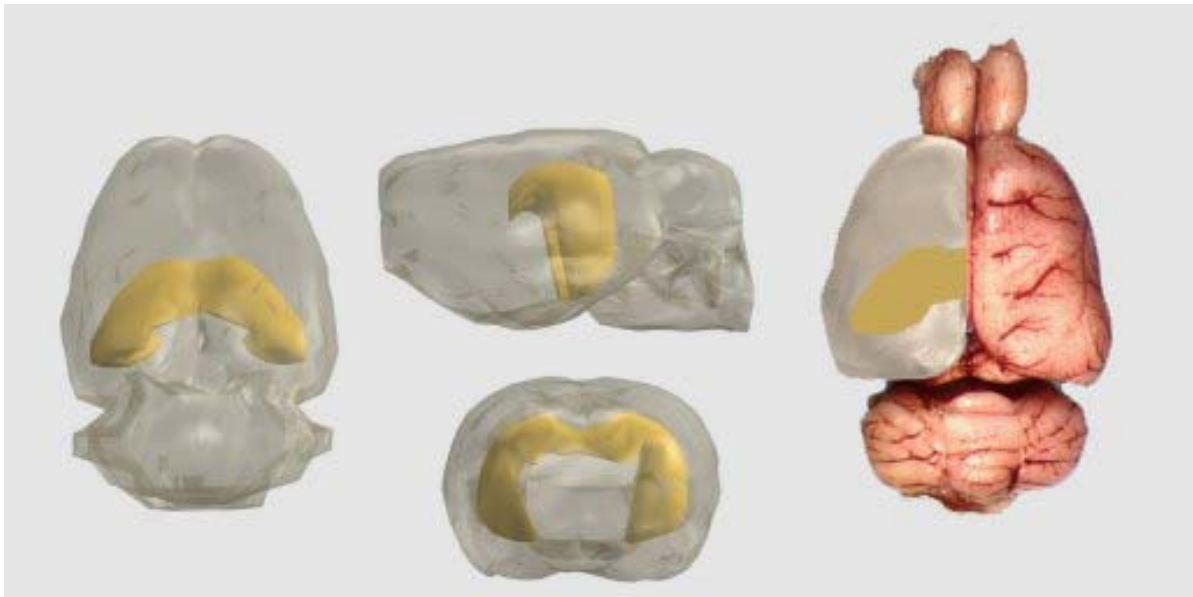


Fig. 26. El HIPO de rata es una estructura cilíndrica que forma un semicírculo alrededor del tálamo⁽⁴²⁾.

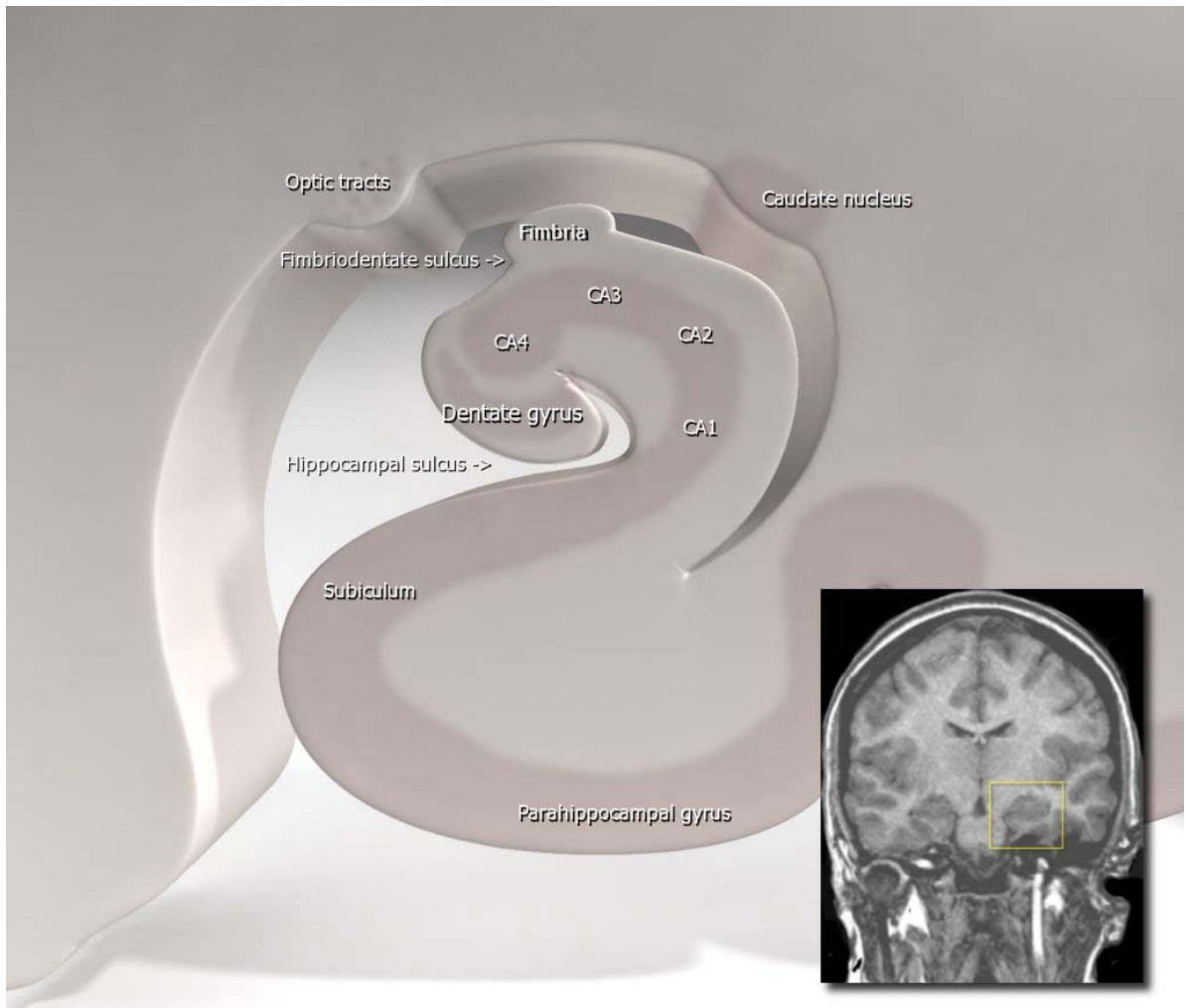


Fig. 27. Forma C del hipocampo y la estructura en S⁽²⁾.

El hipocampo pertenece a un grupo de estructuras llamadas formación hipocámpal la cual incluye el giro dentado (GD), el propio hipocampo, subículo, presubículo, parasubículo y la corteza entorrinal^(2,20,35). El HIPO propiamente comprende las regiones CA1, CA2 y CA3 (latin **Cornum Ammon**)⁽³⁵⁾. La palabra hipocampo es usada para referirse al Giro dentado (GD), CA1, CA2 y CA3^(35,127). Las regiones hipocámpales: GD, CA3 y CA1, reciben directamente inervaciones de las capas superficiales de la corteza entorrinal. La región CA1 es la última región del circuito tri-sináptico que lleva señales del hipocampo al subículo⁽³⁵⁾.

La región hipocámpal (CA, giro dentado y complejo subicular) es parte del sistema de estructuras anatómicamente relacionadas en el lóbulo medio temporal el cual es importante para la memoria de los mamíferos^(42,127). En humanos, monos y roedores el daño en esta región afecta a tareas relacionadas con la memoria y el aprendizaje⁽²⁰⁾.

Las regiones CA1 y CA3 constituyen propiamente la mayor parte del HIPO⁽⁸¹⁾. La región CA2 es pequeña y en algunas especies es indistinguible pero en ocasiones es ignorada. El área entre el GD y el estrato granuloso de la región CA3 es llamada región polimórfica o región hilar o simplemente hilus. Los axones de las células granulares llamadas fibras musgosas establecen conexiones dispersas con CA3. Cada fibra conecta con las células piramidales CA3. La sinapsis de las fibras musgosas, también llamadas botones, son estructuras muy especializadas que pueden tener más de 30 sitios de liberación. Esta eficacia se incrementa el hecho de establecer conexiones con el soma o las dendritas proximales de las neuronas piramidales CA3⁽³⁵⁾. (Fig. 28).

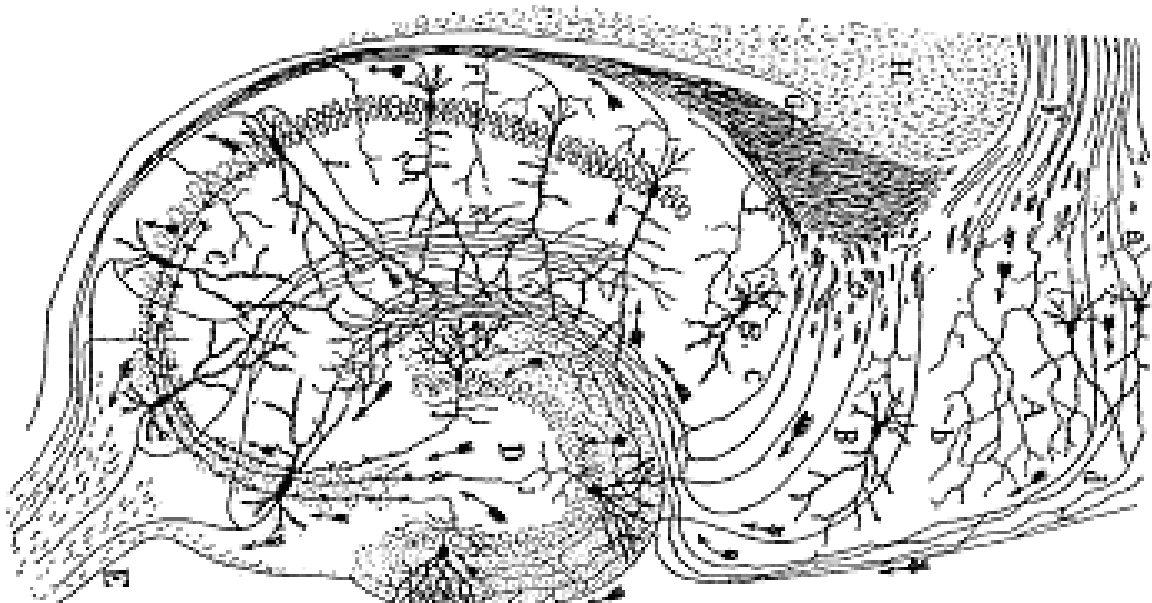


Fig. 28. Elementos neurales presentes en una rebanada de HIPO tomada longitudinalmente del eje transversal⁽⁴²⁾.

Las principales neuronas del HIPO son las neuronas piramidales. Los cuerpos celulares están organizados en una capa llamado estrato piramidal⁽²⁾. La morfología de las células piramidales varía gradualmente en el HIPO y emplean como neurotransmisor al glutamato⁽⁸¹⁾. En la región CA1, los cuerpos celulares llegan a ser pequeños y las dendritas apicales son largas. Las células en la región CA3 en ocasiones llamadas células piramidales son gigantes. Las principales neuronas del giro dentado son células granulares. El término granular es descriptivo y no implica la similitud funcional con otras células granulares de otras regiones (el cerebelo y bulbo olfatorio)⁽⁴²⁾.

A continuación se describen las regiones del hipocampo (Fig. 29).

REGIÓN CA1

Las principales células en la región CA1 son células piramidales con una cantidad de 250×10^3 en rata y 4600×10^3 en humanos. Las células piramidales CA1 reciben inervaciones de las Célula CA3 a través de las colaterales de Schaffer⁽³⁵⁾.

REGIÓN CA2

La región CA2 es muy reducida en tamaño y es considerada la zona de transición entre CA1 y CA3. Papeles no funcionales están asociadas a CA2 por lo que esta área es en ocasiones ignorada en estudios teóricos⁽³⁵⁾.

REGIÓN CA3

Las principales células en la región CA3 son neuronas piramidales, con una población de 160×10^3 en rata y 2300×10^3 en humano⁽³⁵⁾. Los potenciales de acción producidos en CA3 son propagados a través de las colaterales de Schaffer a CA1⁽³⁵⁾.

GIRO DENTADO

El giro dentado tiene una rica variedad de interneuronas que incluyen células musgosas (mossy), células polimórficas gabaérgicas, células canasta(basket)⁽³⁵⁾. El GD esta compuesto de células granulares que forman sinapsis con neuronas en la región CA3 vía fibras musgosas. Las células musgosas pertenecen a este tipo de interneuronas siendo una de las más abundantes; cada célula granular recibe alrededor de 100 inervaciones de las células musgosas⁽³⁵⁾.

COLATERALES DE SCHAFFER

Varios estudios han reportado la existencia de dinámicas de corto plazo en las CS. Estas fibras transfieren información sobre la región CA3 a la región CA1. Con una plasticidad de corto plazo las CS pueden producir los patrones de activación CA1⁽³⁵⁾.



Las sinapsis de las CS son adecuadas para estudios intracelulares y extracelulares de plasticidad sináptica⁽⁴²⁾. Las conexiones formadas por la CS se denominan sinapsis “*en passant*” porque los axones CA3 continúan a través de la capa radiada, haciendo contacto con las dendritas de otra células piramidales de CA1⁽⁸¹⁾.

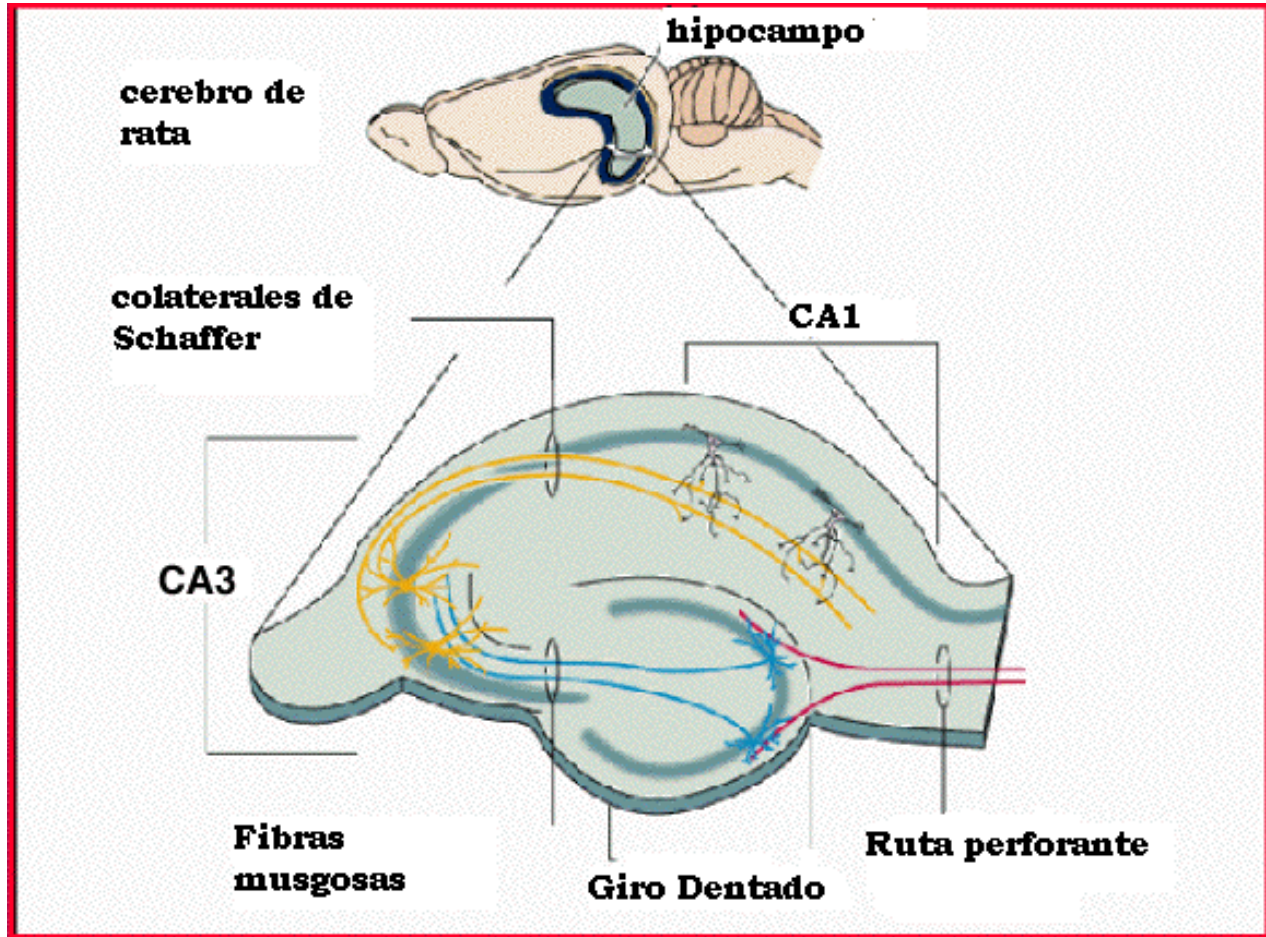


Fig. 29. Diferentes regiones hipocampales⁽²⁾.

FISIOLOGÍA

A través de la corteza entorrinal y el giro parahipocampal, el HIPO recibe inervaciones de todas las áreas asociadas en la neocorteza⁽³⁵⁾. Esto significa que el HIPO tiene acceso directo para procesar la información adquirida de canales sensoriales^{11hipo}. Las respuestas hipocampales ocurren después de la estimulación visual, acústica y somatosensorial, así como después de la estimulación de varias áreas corticales y subcorticales⁽⁸¹⁾.

El HIPO incluso recibe regulación de inervaciones colinérgicas del núcleo septal, vía el fornix⁽³⁵⁾. Las conexiones sinápticas en el hipocampo son generalmente axodendríticas y axosomáticas⁽⁴²⁾. La proyección a CA3 es bilateral y por lo menos algunas de sus neuronas proyectadas de la región CA3 a la región septal son

Gabaérgicas⁽³⁵⁾. Respecto a éstas Ramón y Cajal describió las diferencias morfológicas de las neuronas; actualmente, muchos estudios reportan la diversidad de las neuronas gabaérgicas^(2,80) en la corteza desde puntos de vista anatómico, neuroquímico y electrofisiológico⁽⁸⁰⁾ por lo que ahora se sabe que las neuronas gabaérgicas juegan papeles importantes en la actividad cerebral, incluyendo las oscilaciones sincronizadas y la plasticidad sináptica⁽⁸⁰⁾.

Estudios fisiológicos sugieren que el HIPO juega un papel en ciertos aspectos de aprendizaje y memoria⁽¹³⁾. Experimentos neurofisiológicos proporcionan un vistazo a la naturaleza de la información procesada que ocurre en el HIPO y algunos de los mecanismos celulares que pueden operar en esta región cerebral. Registros extracelulares de neuronas hipocampales sugieren un papel de procesamiento complejo en los patrones temporales y espaciales^(13,42).

Un papel importante del HIPO es facilitar la memoria espacial para la navegación^(13,106). El incremento del volumen del hipocampo relacionado con el tamaño del cerebro se ha reportado en pequeños mamíferos y aves como mejora la memoria espacial utilizada en su comportamiento (lugar de almacenamiento de comida)^(13,106). En algunas especies los volúmenes hipocampales aumentan específicamente durante ciertas estaciones del año cuando la demanda de la habilidad espacial aumenta⁽¹⁰⁶⁾. En humanos sanos las diferencias estructurales cerebrales en diferentes grupos de sujetos (ejemplo: hombres y mujeres⁽⁷⁰⁾, músicos y no músicos⁽⁶⁰⁾, taxistas y no taxistas⁽¹⁰⁶⁾) ha sido documentada, con las investigaciones a la fecha es complicado saber si las diferencias anatómicas del cerebro son predeterminadas o si el cerebro es susceptible a cambios plásticos en respuesta a la estimulación del medio ambiente⁽¹⁰⁶⁾. El daño neuronal en la corteza y el HIPO han sido atribuido a un daño mecánico directo, excitotoxicidad y daño oxidativo después de trauma cerebral, por ejemplo⁽¹²⁷⁾.

HIPOCAMPO Y ELECTROFISIOLOGÍA

El HIPO es la estructura de la corteza cerebral más frecuentemente estudiada para una mejor comprensión de la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria. Estudios electrofisiológicos y morfológicos revelan la amplia diversidad de poblaciones de interneuronas con una amplia variedad de funciones en el hipocampo⁽⁸⁵⁾.

Los registros extracelulares de potenciales sinápticos son posibles debido a la geometría y fisiología ya que son favorables por sus hundimientos (sink). Estos registros son técnicamente simples y relativamente estables por largos períodos de tiempo por lo que se han vuelto populares en las rutinas farmacológicas⁽⁴²⁾.



Las CS y las neuronas de CA3 forman sinapsis con la región CA1 permitiendo de una forma directa, una conexión excitadora entre las dos áreas⁽²⁾. Con este arreglo histológico las CS pueden ser estimuladas mientras que los PPSE son registrados en la región CA1. La estimulación repetitiva de las aferentes hipocampales es capaz de despolarizar el medio neuronal hasta el potencial de membrana lo que asemeja el estado In Vivo, un efecto que parecer ser dependiente de la frecuencia y magnitud del estímulo⁽¹¹²⁾.

Las propiedades de descarga son diferentes entre las neuronas piramidales de CA1 y CA3⁽³⁵⁾. Las neuronas de CA3 tienden a descargar potenciales de acción con declinantes amplitudes⁽³⁵⁾. Trabajos realizados en la durabilidad del LTP en las sinapsis CS/CA1 indican que pueden ser regulados por rutas metabólicas, incluyendo las activadas por neurotransmisores y hormonas⁽⁵⁹⁾. Estudios previos sugieren que MEL puede regular la plasticidad sináptica⁽⁵⁹⁾. Las neuronas CA1 tienen una descarga repetitiva pero muestran un acomodo rápido y lento después de las hiperpolarizaciones⁽³⁵⁾ (Fig. 30).

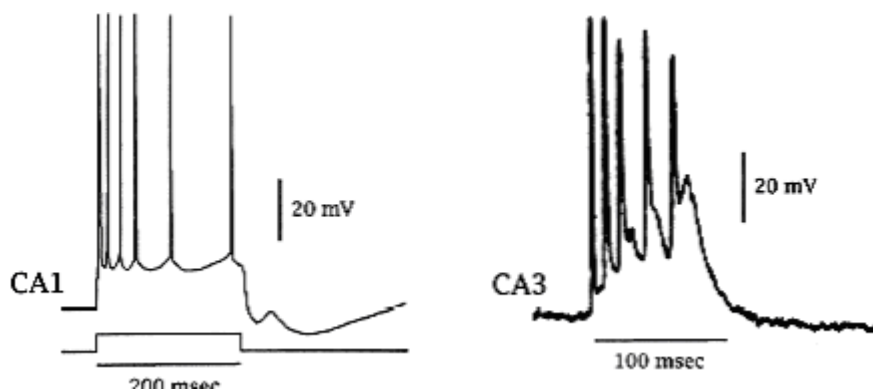


Fig. 30. Propiedades de las descargas entre las neuronas piramidales CA1 Y CA3⁽³⁵⁾.

A nivel molecular, los científicos estudian el comportamiento de los canales iónicos que facilitan la potenciación de respuestas neuronales (proceso involucrado en la memoria)⁽¹⁷⁵⁾. por lo que cambios en la durabilidad de la conexión sináptica de CS/CA1 son comúnmente vistas como modelo para el entendimiento de cambios dependientes de la actividad en la durabilidad sináptica y pueden ser ligados a la memoria y aprendizaje⁽⁵⁹⁾. La Neurofarmacología del hipocampo es relevante para la búsqueda de mejores anticonvulsivos y otros fármacos⁽⁴²⁾.

2.5 ELECTROFISIOLOGÍA

Cuando Cajal describió la arquitectura neuronal, dibujó junto a las neuronas unas pequeñas flechas que indicaban, a su juicio, el sentido de propagación de los impulsos nerviosos. Estos impulsos se transmitían de unas neuronas a otras a través de contactos especializados. Esa direccionalidad de la actividad eléctrica constituye una de las claves sobre la que se asienta la operación de las neuronas. La otra, es el concepto implícito de que los impulsos procedentes de neuronas vecinas pueden activar a una célula nerviosa y hacerla “disparar”. Esto implica la existencia de circuitos neuronales y aunque ahora parece obvio, en los tiempos de Cajal otros eran los criterios que imperaban⁽¹¹⁶⁾ (Fig. 31).

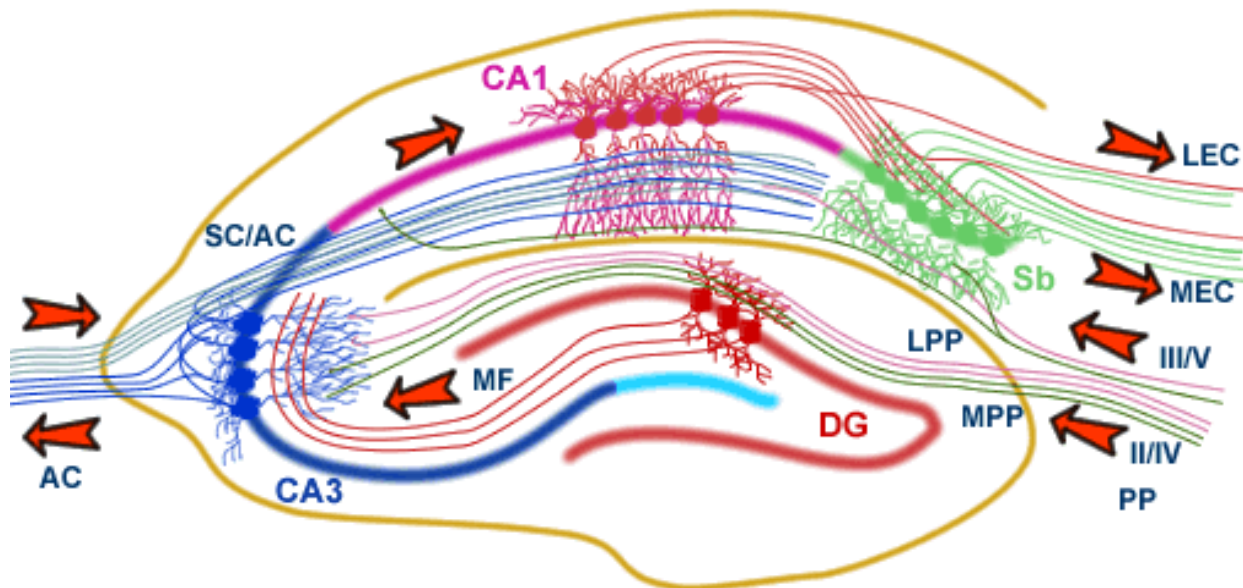


Fig. 31. Principales rutas de las redes neuronales hipocampales⁽¹¹²⁾.

Algún tiempo tuvo que pasar hasta que pudiéramos medir los impulsos y comprobar que las flechas eran correctas. Una primera evidencia vino desde el exterior del cerebro, cuando Hans Berger publicó los primeros registros de electroencefalografía en humanos, que mostraban la existencia de ritmos y ondas eléctricas y demostró que se podía medir la actividad neuronal, aunque sólo era posible introduciendo cables en el tejido, sin embargo las reducidas dimensiones de las neuronas exigían un gran esfuerzo de miniaturización. Fue a partir de la década de los 50, con el desarrollo de los microelectrodos, que se comenzó a comprender cómo los circuitos neuronales generan actividad eléctrica. Ahora sabemos que, efectivamente, el origen de la actividad eléctrica cerebral está en las neuronas. Que las dendritas son los sitios que reciben las señales eléctricas procedentes de otras neuronas, que los impulsos se propagan por el axón hasta las sinapsis, activando grupos neuronales en núcleos distantes y facilitando la generación de actividad eléctrica⁽¹¹⁶⁾.

Así la utilización “In Vitro” de rebanadas de cerebro en electrofisiología ha crecido explosivamente desde su desarrollo. El primer registro de rebanadas de cerebro fue desarrollado por Vamamoto y McIlwain quienes mostraron que las rebanadas pueden mantenerse “In Vitro” y continuar mostrando actividad eléctrica comparable con la obtenida de una preparación intacta⁽⁹⁷⁾. Skrede y Westgaard, en Oslo, establecen como candidato al hipocampo para estudios de rebanadas cerebrales⁽⁹⁷⁾.

UTILIZACIÓN DE REBANADAS

Las preparaciones “In Vitro” de rebanadas son ampliamente utilizadas y han permitido el estudio fisiológico y farmacológico del cerebro con más detalle y menos animales que los modelos “In Vivo”⁽¹⁵²⁾. La mayoría de las investigaciones publicadas utilizan las rebanadas de cerebro para registros electrofisiológicos enfocándose en la plasticidad del hipocampo⁽¹⁵²⁾.

La preparación de rebanadas de cerebro permite la aplicación de métodos electrofisiológicos para el estudio de neuronas y redes neuronales que no son factibles si se usan preparaciones “In Vivo”. El procedimiento convencional para preparar rebanadas involucra la disección del cerebro de una área, colocándolo en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) frío con hielo⁽¹⁾ y obtención de las rebanadas con una navaja vibratoria⁽⁵⁾. Las rebanadas son de las preparaciones más convenientes para investigar cambios moleculares, fisiológicos y morfológicos asociados con la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés)⁽¹⁴⁶⁾ (Fig. 32).

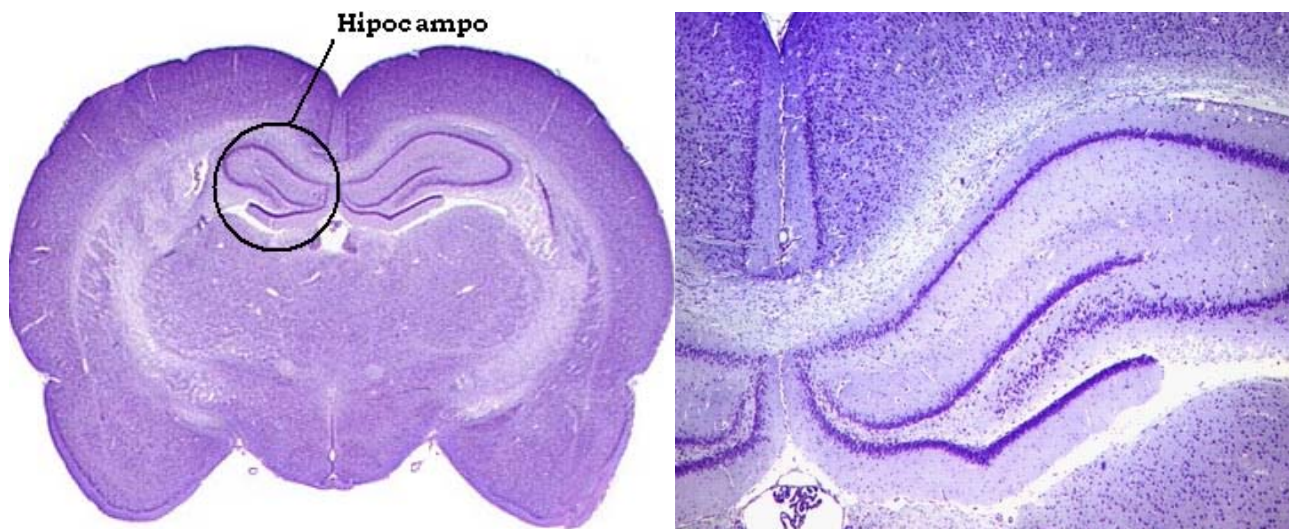


Fig. 32. Rebanada de cerebro de rata corte coronal con ubicación del hipocampo⁽⁹⁷⁾.

Los investigadores están comprometidos a reducir el número de animales usados en investigación médica por lo que las técnicas experimentales deben de ser refinadas. El diseño experimental apropiado y el análisis de los datos resultantes, con la consideración

estadística apropiada, pueden incrementar la utilidad de tejidos y la precisión de datos obtenidos y pueden permitir utilizar un número menor de animales que el modelo “In Vivo”⁽¹⁴⁹⁾. Por lo que las preparaciones de rebanadas de cerebro son ampliamente utilizadas y permite el estudio fisiológico y farmacológico del cerebro con mayor detalle. Así es posible preparar varias rebanadas de una región cerebral de un animal⁽¹⁴⁹⁾.

Algunos investigadores han desarrollado sistemas que permiten múltiples registros de diferentes regiones de una sola rebanada o la simultánea superfusión de numerosas rebanadas de cerebro, otros sistemas permiten registros electrofisiológicos de diferentes rebanadas de cerebro, simultáneamente e independiente⁽¹¹⁶⁾. La mayoría de los registros electrofisiológicos son extracelulares. De este modo los potenciales son amplificados por un amplificador para niveles que son confiables.

Algunas ventajas técnicas para la investigación neurobiológica del SNC son⁽⁹⁷⁾:

- La composición química del medio de incubación está especificada lo que lo permite ser constante o puede ser susceptible a cambios. Controles similares son la temperatura y el pH⁽⁹⁷⁾.
- Para los estudios “In Vivo” no es necesario el uso de agentes anestésicos o paralizantes para la preparación del tejido proveniente de animales pequeños⁽⁹⁷⁾.
- La preparación de las rebanadas ofrece un control visual directo sobre la colocación de los electrodos y la manipulación del tejido⁽⁹⁷⁾.
- Pueden ser estudiadas muchas rebanadas de un solo hipocampo y todas tener la misma historia genética y experimental antes de la preparación⁽⁹⁷⁾.
- No existen trastornos mecánicos causados por la respiración o el latido del corazón para impedir los registros electrofisiológicos⁽⁹⁷⁾.
- Las rebanadas hipocampales son útiles para el descubrimiento de fármacos evaluando su eficacia en un modelo farmacológico “In Vivo”⁽¹⁴⁾.

Muchos factores afectan la respuesta observada en rebanadas hipocampales incluyendo: la edad del animal, tiempo In Vitro, síntesis de proteínas y temperatura⁽¹⁴⁶⁾. La temperatura puede estar implicada en la respuesta, ya que variaciones de temperatura en la cámara de registro pueden ser reflejados en la respuesta del tejido⁽⁹⁷⁾. Numerosos experimentos han utilizado un rango de temperatura de 34-35°C y producen cualitativamente datos idénticos que los reportados a 36-37°C⁽⁹⁷⁾. En rebanadas hipocampales maduras las espinas dendríticas desaparecen inmediatamente después de la preparación en LCRA frío y rápidamente reaparecen después de algunos minutos de recalentamiento⁽¹⁴⁶⁾. Las rebanadas preparadas a bajas temperaturas disminuyen su



metabolismo celular y minimizan el daño neuronal debido a la disección cerebral⁽¹⁴⁶⁾. Las fluctuaciones en la temperatura tienen consecuencias significantes para respuestas electrofisiológicas en el cerebro. Varias señales bioeléctricas son más sensibles durante temperaturas cálidas, la conducción axonal es veloz y la liberación de neurotransmisores es más rápida y más sincronizada. Las respuestas poblacionales son diferencialmente afectadas por estos cambios, paradójicamente la amplitud de la espiga poblacional se reduce. Debido a estos cambios es necesario el monitoreo y control de las variaciones de temperatura en las rebanadas hipocampales⁽³⁾.

Registros intracelulares de neuronas hipocampales de rebanadas de cerebro han generado con detalle el entendimiento de su neurofisiología. Algunas de las sinapsis en el hipocampo muestran una remarcada forma de plasticidad llamada LTP.

POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO

La sinapsis es un sistema complejo, rico en subprocesos que median la comunicación entre neuronas pre y post sinápticas⁽³⁵⁾. Cuando un potencial de acción viaja a través del axón despolariza a la membrana y canales voltaje dependientes de Calcio (Ca^{2+}) se abren, permitiendo el aumento de la concentración intracelular de los iones Ca^{2+} ⁽³⁵⁾. Este incremento de Ca^{2+} inicia una secuencia de eventos que culminan en la liberación de neurotransmisores⁽³⁵⁾. Estos neurotransmisores pueden inhibir o excitar la neurona post-sináptica, dependiendo de la naturaleza de la sinapsis⁽³⁵⁾. (Diagrama 4.)

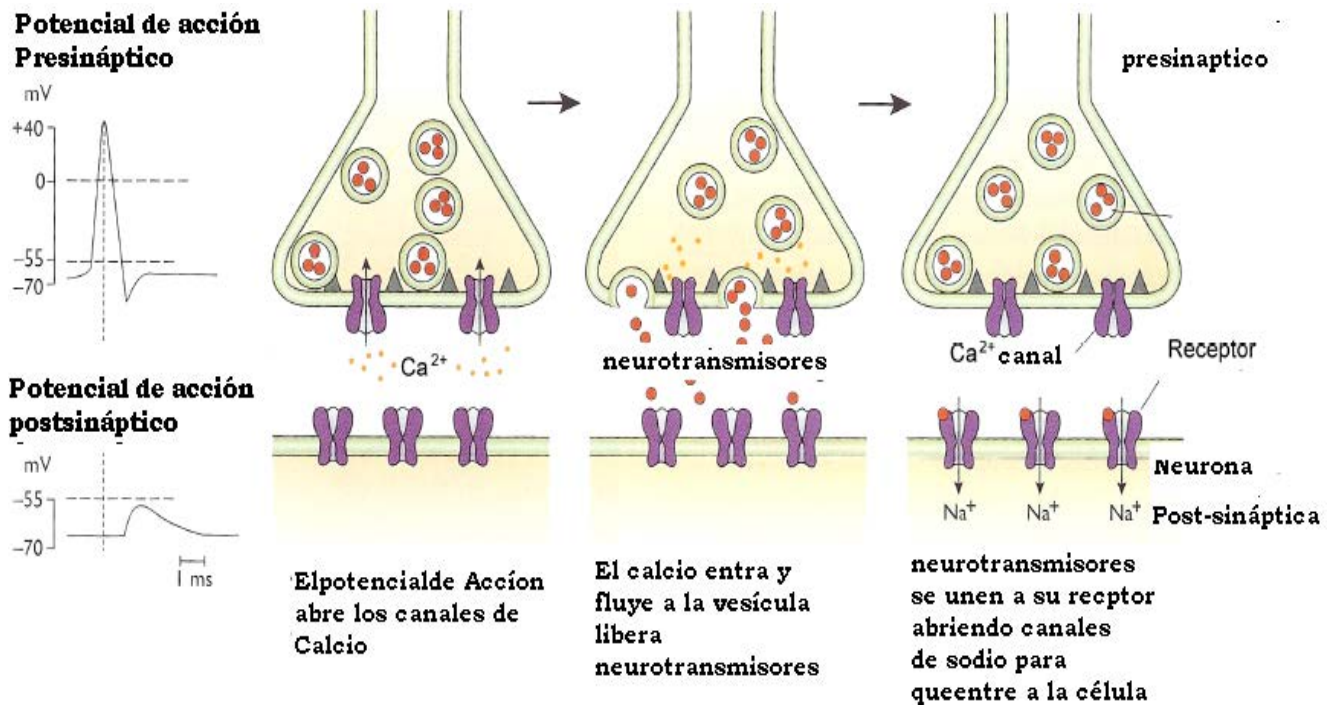


Diagrama 4. Proceso de una sinapsis⁽³⁵⁾.



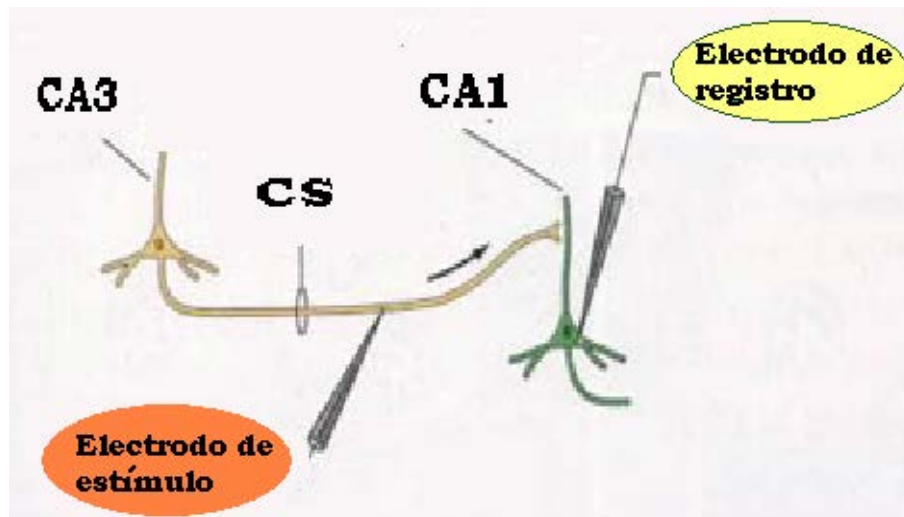


Fig. 33. Estimulación directa de las Colaterales de Schaffer⁽¹³²⁾.

A comienzos de la década de 1970 Tim Bliss y col. descubrieron que algunos segundos de estimulación eléctrica de alta frecuencia de una vía de fibras en el HIPO de conejo aumenta la transmisión sináptica entre los axones estimulados y las células postsinápticas, y que este cambio persiste durante semanas⁽¹³²⁾. En consecuencia, este fenómeno ha sido denominado potenciación a largo plazo y así se le conoce universalmente⁽¹³²⁾. Si bien fue observada por primera vez en animales de experimentación intactos, el progreso en el conocimiento de su base celular se ha basado en preparaciones de cortes encefálicos “In Vitro”⁽¹³²⁾. (Fig. 33).

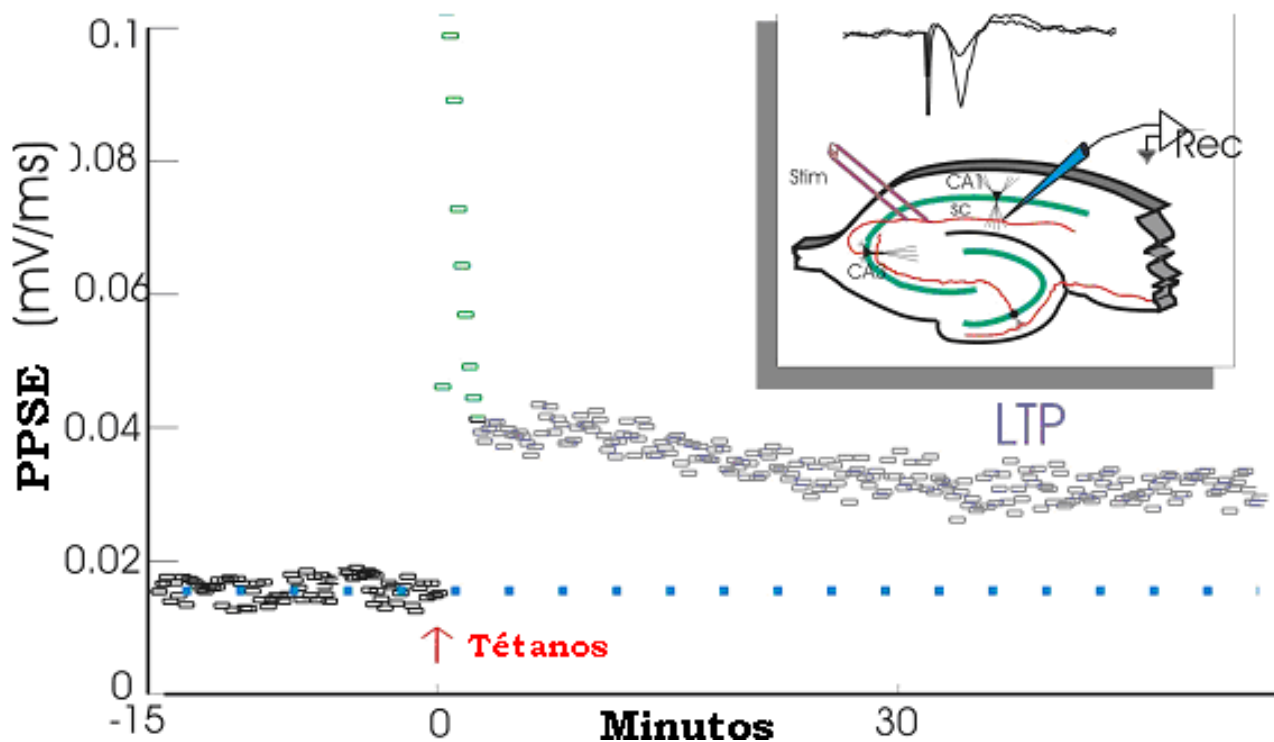


Fig. 34. Registro extracelular, el efecto de la estimulación eléctrica en los PPSE⁽¹³²⁾.

La estimulación directa de las colaterales de Schaffer genera potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) en las células CA1 postsinápticas. Los PPSE pueden ser registrados por células individuales con electrodos intracelulares o como una respuesta de la población (el efecto sumado de muchas neuronas postsinápticas), registrada mediante un electrodo extracelular. Si se estimulan las colaterales de Schaffer dos o tres veces por minuto, el tamaño del PPSE evocado en las neuronas CA1 se mantiene constante. Sin embargo, la estimulación de alta frecuencia produce un incremento duradero en la amplitud del PPSE, es decir una potenciación a largo plazo⁽¹³²⁾ (Fig. 34)

El LTP hipocámpal es el aumento persistente de la transmisión sináptica inducida por una estimulación aferente de alta frecuencia breve⁽⁵⁸⁾. La actividad dependiente de LTP se cree que es disparado por la entrada de los iones de calcio (Ca^{2+}) a la neurona a través de los receptores NMDA, receptores de glutamato acoplados a canales iónicos. El glutamato es el principal neurotransmisor en las neuronas hipocámpales y es liberado por una estimulación aferente de alta frecuencia breve (EAAFV) es un factor esencial de las Neuronas CA1 dependientes de la actividad de LTP (Figuras. 35 y 36).

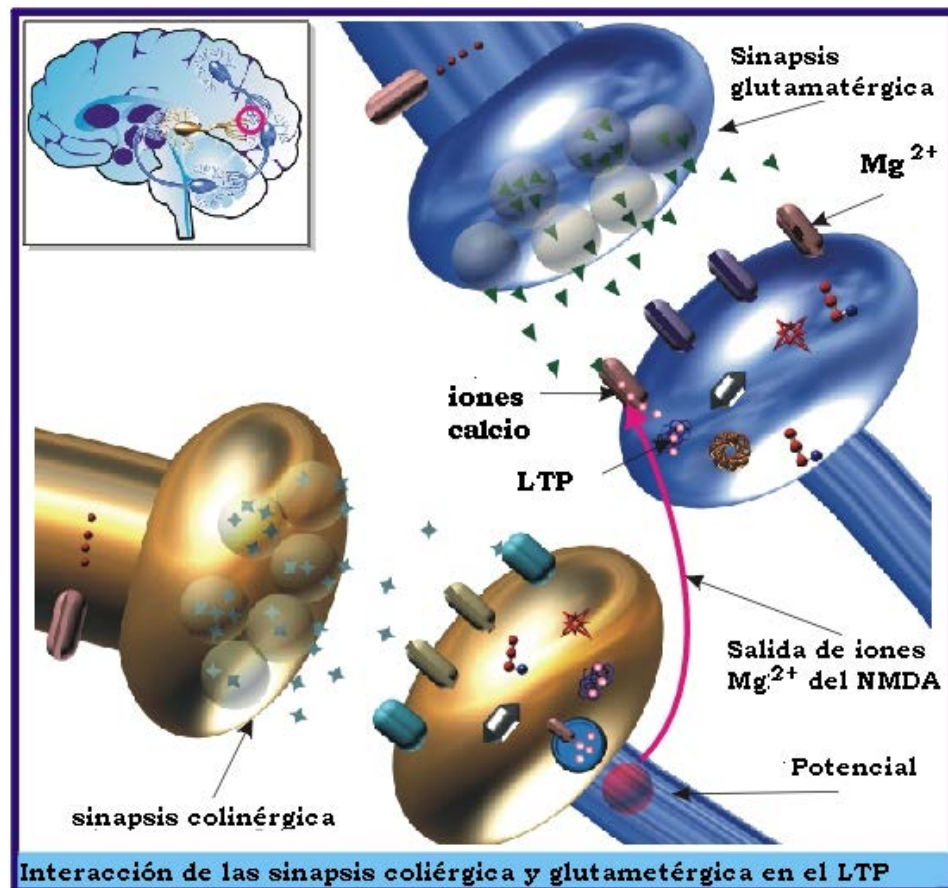


Fig. 35. Interacción de las sinapsis colinérgica y glutamatérgica en el LTP⁽⁵⁸⁾.

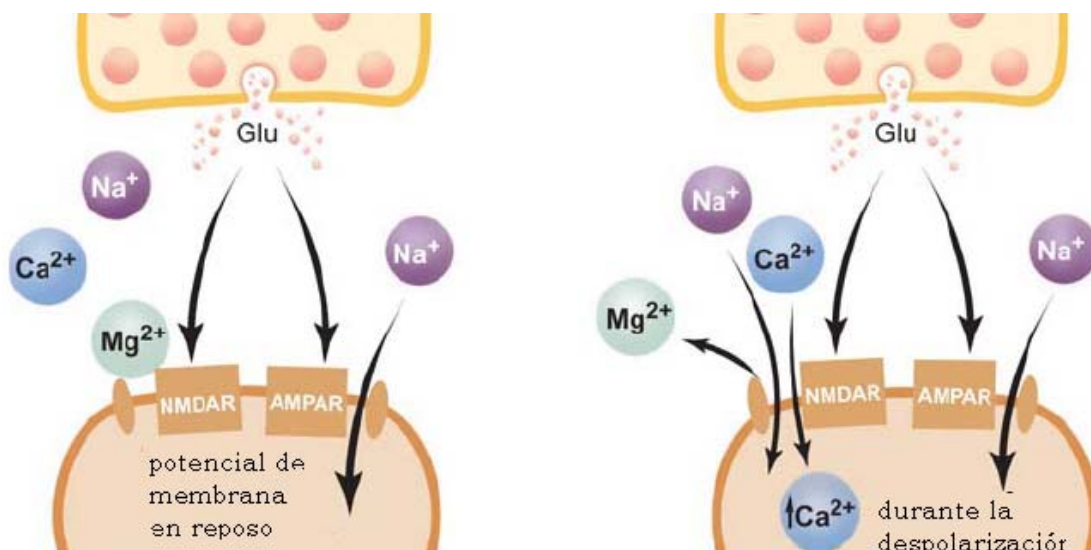


Fig. 36. Modelo de inducción de LTP⁽¹⁵⁾.

Varios cambios en la estructura y función del SNC ocurren durante el desarrollo para el almacenamiento y adquisición de información. Esta plasticidad neural no está disminuida completamente en la madurez, nuevas herramientas son adquirida durante la vida⁽⁴²⁾. Se cree que este fenómeno de plasticidad sináptica es cuidadosamente regulado⁽⁴²⁾, debido a los cambios a largo plazo en la durabilidad de las sinapsis existentes en varias regiones del cerebro⁽⁴²⁾. Dos modelos experimentales ampliamente estudiados son LTP y LTD (depresión a largo plazo por sus siglas en inglés) que son formas de plasticidad neuronal que aumentan o disminuyen respectivamente las sinapsis a manera de codificar y guardar nueva información⁽⁴²⁾. LTP y LTD son mecanismos celulares que representa las bases neurofisiológicas de aprendizaje y memoria⁽¹³¹⁾. LTD representa una forma de plasticidad que complementa al LTP⁽¹³¹⁾. El LTP y LTD pueden ser inducidos en la región CA1 del hipocampo con diferentes frecuencias de estimulación en las CS. Una estimulación de alta frecuencia induce LTP⁽¹⁵²⁾ mientras que una estimulación de baja frecuencia induce LTD. Gran parte de la investigación sobre la LTP se ha centrado en las conexiones sinápticas entre las células piramidales de CA3 y CA1, en parte porque muestran una forma particularmente fuerte de LTP, pero también debido a que el daño de la región CA1 tiene efectos espectaculares sobre la memoria humana⁽¹³²⁾.

Aunque, los mecanismos responsables de la plasticidad sináptica permanecen como uno de los principales retos de los neurocientíficos, se han encontrado algunos receptores y sustratos involucrados en la inducción de LTP y LTD⁽¹³²⁾. Ambos procesos son dependientes de la entrada postsináptica de los iones calcio a través de la activación de receptores de Glutamato, estos receptores glutamatérgicos incluyen metabotrópicos e ionotrópicos⁽¹³²⁾.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La posibilidad de que la MEL puede ser utilizada en la clínica es muy vasta, debido a su gran variedad de efectos fisiológicos y “terapéuticos”, sin embargo, la vida media de MEL es muy corta, por lo que se buscan compuestos similares a ella que puedan tener efectos similares, un tiempo de vida media mayor y sin efectos adversos severos como lo tiene MEL, con un margen de seguridad muy amplio. Profundizando en la amplia variedad de efectos fisiológicos de MEL se esperaría que sus análogos fueran más específicos para así poder solucionar de manera precisa el padecimiento y ser un tratamiento seguro y eficaz, sin embargo no se cuentan con sustancias capaces de diferenciar entre los tres tipos de receptores a MEL (hasta el momento identificados) y aunque se ha propuesto que la MEL actúa a nivel de receptores, no se ha determinado que factores influyen en la regulación de su acción sobre tales receptores por lo que el mecanismo de la hormona aún no es claro.

Se postula que la acción biológica de MEL es debido a la interacción con sus sitios receptores y que dicha interacción involucra a grupos funcionales (metoxilo, acetamido, anillo indólico) con los residuos de los aminoácidos aromáticos presentes en los MEL-R, con estas premisas se han sintetizado y evaluado varios tipos de compuestos con diversas variantes estructurales para determinar la topología de los sitios de los diferentes MEL-R, algunos autores reportan que es favorable mantener los grupos metoxilo y acetamida, entonces, una propuesta para obtener análogos activos de MEL es incorporar sustituyentes en el anillo indólico esperando que al alterar las propiedades electrónicas tenga repercusión sobre la actividad biológica. Bajo estas condiciones se sintetizaron los MEL análogos en la Facultad de Química Edificio “E”, Lab. 121.

Considerando que se ha logrado obtener sustancias con estructura similar a MEL, no se han reportado análogos que actúen similar o mejor que ella en modelos “*In Vitro*” como el modelo de rebanadas de hipocampo de rata, modelo que tiene la ventaja de usar un número menor de animales y en el que la variabilidad biológica es reducida, con respecto a este modelo hay controversias del comportamiento de MEL ya que algunos autores reportan una acción inhibitoria, otros una acción excitadora y otros no reportan acción de MEL sobre los PPSE, lo que hace convenientes aplicar diferentes concentraciones de MEL a nuestras condiciones del laboratorio para poder evaluar su efecto sobre las neuronas del hipocampo.



Se sabe que la MEL tiene un papel muy importante en el hipocampo como son en los procesos de memoria y aprendizaje así como en patologías tales como las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer^(22,23,27,28,72) y epilepsia^(67,68,118,120,133).

Por lo anterior es un gran aporte evaluar compuestos con estructura similar a MEL, para contar con compuestos que permitan corregir los inconvenientes que posee la MEL como herramienta en estudios farmacológicos y como agente terapéutico ya que sus análogos pueden ayudar en el tratamiento de desórdenes circadianos, ser anticonvulsivos, entre muchos efectos y ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de la MEL.



IV. HIPÓTESIS

Si la MEL genera una disminución en los potenciales evocados (espiga poblacional), en la región hipocampal CA1. Se espera que los compuestos M3C y M2B al ser análogos de MEL generen un efecto similar a ella.

V. OBJETIVOS

GENERAL

- ✓ Caracterizar el efecto electrofisiológico de los análogos M3C y M2B en el modelo “*In Vitro*” de rebanadas de cerebro de rata.

PARTICULARES

- ✓ Determinar el efecto de M3C y M2B a 30 μM en rebanadas de cerebro de rata en la región CA1 hipocampal.
- ✓ Comparar el efecto de los análogos M2B y M3C con respecto a MEL.



VI. METODOLOGÍA

Material

↳ Biológico

§ Ratas Wistar hembra o macho (Laboratorio Harlan, México S.A. de C.V.) de 21 a 22 días de edad^(121,131,152,156), con un peso promedio de 40 ± 2 g, mantenidas en condiciones constantes de temperatura, agua y alimento "Ad Libitum".

↳ Quirúrgico

§ Pinzas tipo gubias (*Marca Miltex*).
 § Tijeras para corte fino (*Marca Miltex*).
 § Tijeras Mayo (*Marca Miltex*).
 § Pinzas con dientes de ratón (*Marca Miltex*).

↳ Diverso

§ Cianoacrilato (*QuickTite*).
 § Gas carbógeno (mezcla 95% de O₂ y 5% de CO₂) (*INFRA S.A. de C.V.*).
 § Espátula.
 § Hoja para rasurar (*Marca Gillette*).
 § Frasco Mariotte (*Pyrex*).

↳ Equipo

§ Balanza analítica (*Metler Toledo AG204*).
 § Microscopio (*Iroscope*)
 § Vibratome 1000 Plus (*Pelco, Ted Pella, Inc. Mountain Lakes Blvd. Redding, CA*).
 § Micro-Forge (*MF-830 Narishige*).
 § Puller (*Narishige*).
 § Cámara de registro.
 § Guillotina para ratas (*World Precision Instruments, Inc. Sarasota, Fl. USA*).
 § Preamplificador Axopatch⁸ (*Axon Instruments Inc., USA*).
 § Osciloscopio (*Tektronix, TDS 3032*).
 § Digidata 1320 (*Axon Instruments Inc., USA*).
 § Recilculador
 § Estimulador
 § Computadora (*Samsung*)

↳ Programas

§ pClamp (*Axon Instruments*).
 § AxoScope (*Axon Instruments*).
 § Excel (*Microsoft, CA, USA*).

↳ Reactivos

§ Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA)^(33,39,58,61,88,112,120,121,131,149,154,156)
 • Solución fisiológica artificial: NaCl, [120mM], MgSO₄[1.3 mM], CaCl₂ [1.8 mM], NaHCO₃[26 mM], KCl [3.3mM], NaH₂PO₄ [1.23mM] y glucosa [11 mM] (*Sigma- Aldrich, Inc. St. Louis MO, USA*) en agua destilada.
 § Melatonina (*Sigma- Aldrich, Inc. St. Louis MO, USA*).
 § M3C_(*Fac. de Química*)^(100, 101).
 § M2B (*Fac. de Química*)^(100, 101).



Los animales se sacrificaron por decapitación^(61,88,120,121,131,149) con una guillotina (*World Precision Instruments*), el cerebro fue rápidamente removido^(39,61,88,121,149,154,156), extraído y colocado en una caja Petri con LCRA a 4°C^(39,61,88,112,121,131,149,156) a un pH de 7.4^(120,154) con el objetivo de dar al cerebro la suficiente firmeza para cortarlo en rebanadas, posteriormente se oxigenó con gas carbógeno^(61,112,121,131,149,154,156) con la finalidad de satisfacer la demanda de oxígeno por parte de las células. El procedimiento de decapitación y extracción del cerebro fue en un tiempo máximo de 30 segundos (Fig. 37).

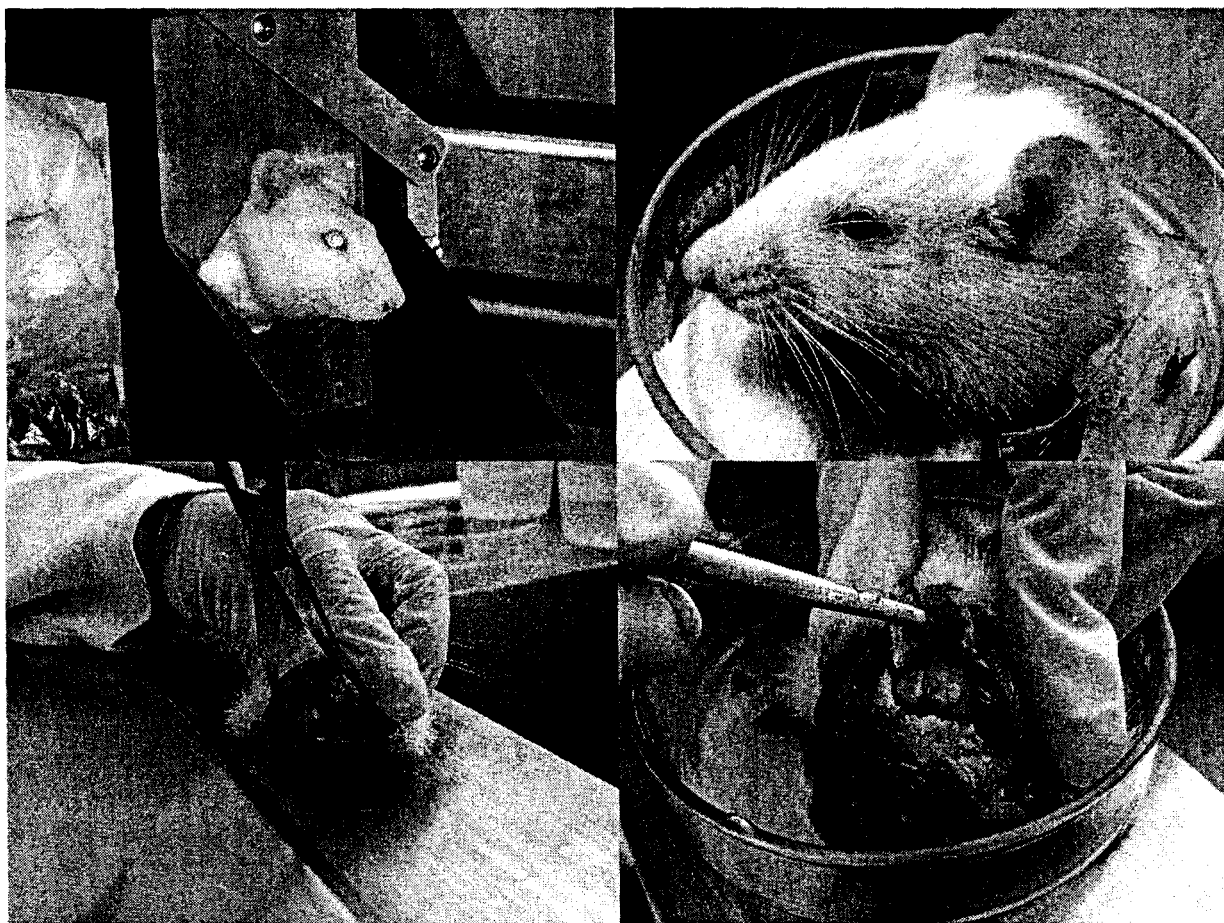


Fig. 37. Secuencia de imágenes de extracción de cerebro.

El cerebro se colocó ventralmente hacia arriba, en una caja Petri con LCRA, cortando la parte anterior del mismo a la altura del quiasma óptico y por la parte posterior a la altura del cerebelo formando un bloque⁽³⁹⁾, el cual, se fijó con una capa delgada de cianoacrilato^(39,152,154) a la base de la cámara del "Vibro Slice" (Vibratome)^(39,112,121,131,149) (Fig. 38).

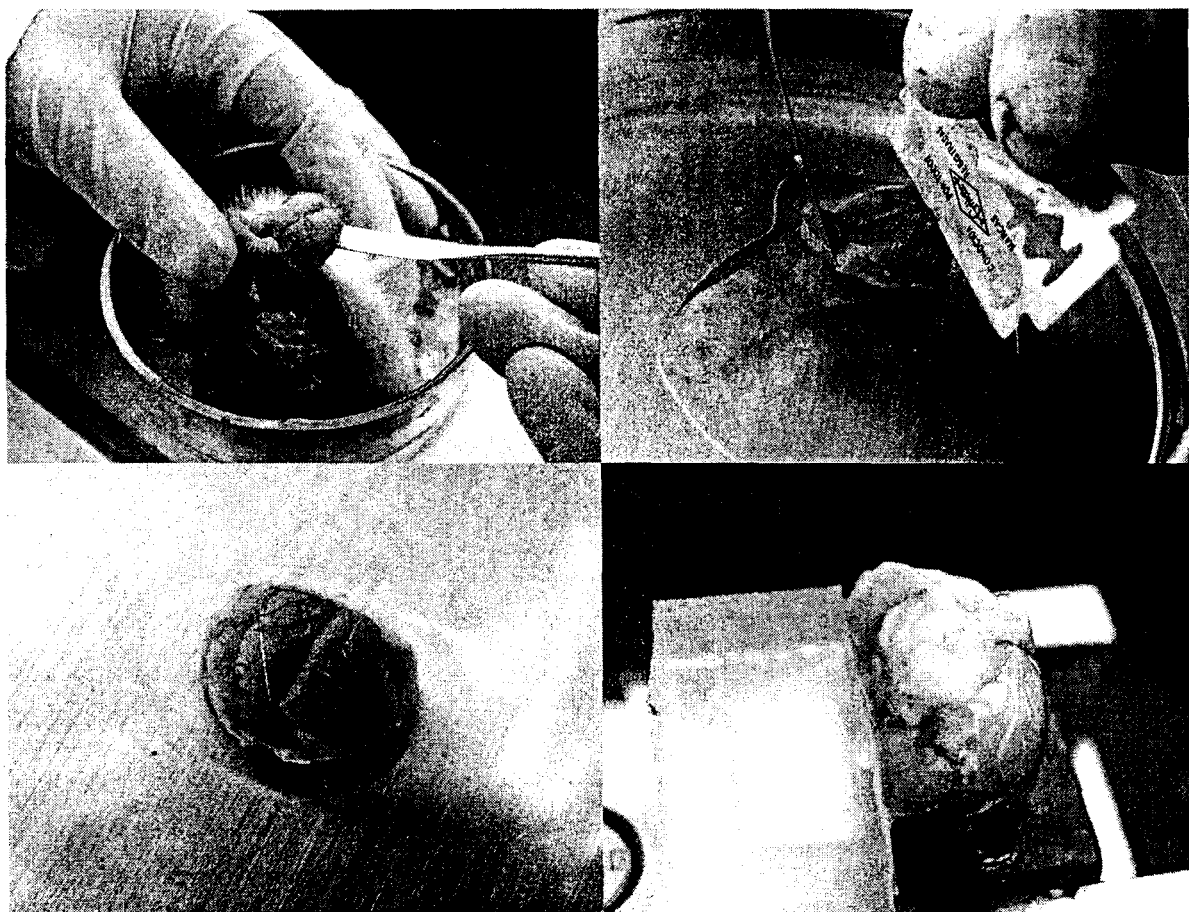


Fig. 38. Secuencia de colocación de cerebro.

Se obtuvieron rebanadas coronales hipocampales de 400 μm ^(39,61,88,112,149,154,156). Las dos primeras rebanadas del hipocampo se desecharon, para asegurar que la rebanada contenga el hipocampo anterior con la región CA1. La duración de todo este proceso desde que se sacrificó al animal hasta la obtención de las rebanadas fue de aproximadamente 5 min. Fig. 39.

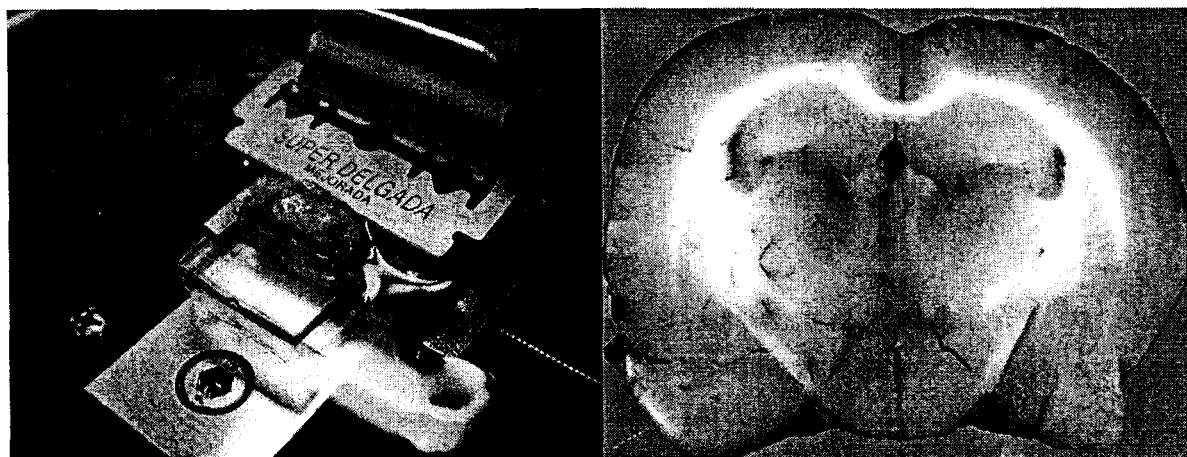


Fig. 39. Secuencia obtención de rebanadas de cerebro de rata.

Las rebanadas se sumergieron en la solución de LCRA a temperatura ambiente^(39,88,149) ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) y con burbujeo constante de gas carbógeno^(61,88,120,131,149,154,156), mientras eran utilizadas para los registros. En esta solución se consideraron como mínimo 60 min^(131,152) de estabilización para la primera rebanada^(61,131). La estabilización de las otras rebanadas dependió del tiempo que duró el protocolo experimental con respecto a la primera rebanada.

Electrofisiología

1. Cámara de registro

Para mantener a las rebanadas de hipocampo en condiciones fisiológicas durante el experimento, se utilizó una cámara de registro, localizada en la parte central de un bloque de acrílico (4.1 x 3.2 x 1.2cm). La cámara tiene una cavidad con 1.3 cm por lado, con una profundidad 0.4 cm y una capacidad de 1mL⁽¹⁵²⁾. Posteriormente, se transfirió una rebanada a la cámara de registro y continuamente se perfundió con una solución de LCRA ($36 \pm 1^\circ\text{C}$)^(39,112,120,156) y oxigenada con gas carbógeno⁽¹⁵⁴⁾. Para mantener el volumen constante de perfusión, la cámara está conectada a un tubo de succión el cual a su vez esta conectado a un sistema de vacío⁽¹⁵⁴⁾. El LCRA⁽¹¹²⁾ que perfundió a la rebanada llegó a la cámara de registro por medio de una presión constante ejercida por la fuerza de gravedad a través de una pipeta⁽¹⁴⁹⁾. La solución se mantuvo en un frasco Mariotte (*Pyrex*) colocado a 50 cm de la cámara y equilibrada con gas carbógeno, para mantener el pH = 7.4 y a una temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ⁽¹⁵⁴⁾, mediante un sistema de recirculación⁽¹⁵⁴⁾. La solución que se encontraba en contacto con la rebanada se mantuvo en un rango de temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, la cual se midió durante todo el registro. La velocidad de perfusión fue de 1.5 a 2 mL/min^(112,149,154,156). Para evitar efectos indeseables debido al goteo de las soluciones contenidas en la pipeta, ésta fue siempre colocada aproximadamente a 500 μm del lugar de la expulsión.

Una vez colocada la rebanada en la cámara se le colocó una malla de nylon^(152,154) formada por una herradura de plata (6 mm de diámetro) con 3 hilos de nylon en posición paralela, con la finalidad de mantener fija la rebanada.

Después de haber realizado este procedimiento, a la rebanada se le colocaron los electrodos de registro y de estimulación⁽⁸⁸⁾ en las colaterales de Schaffer en la región hipocampal CA1^(61,88,120,131,156) o CA3^(61,88), posteriormente se localizó la espiga poblacional y se registró. La espiga poblacional o potencial de campo poblacional es el reflejo del número de neuronas piramidales activadas (Fig. 40).



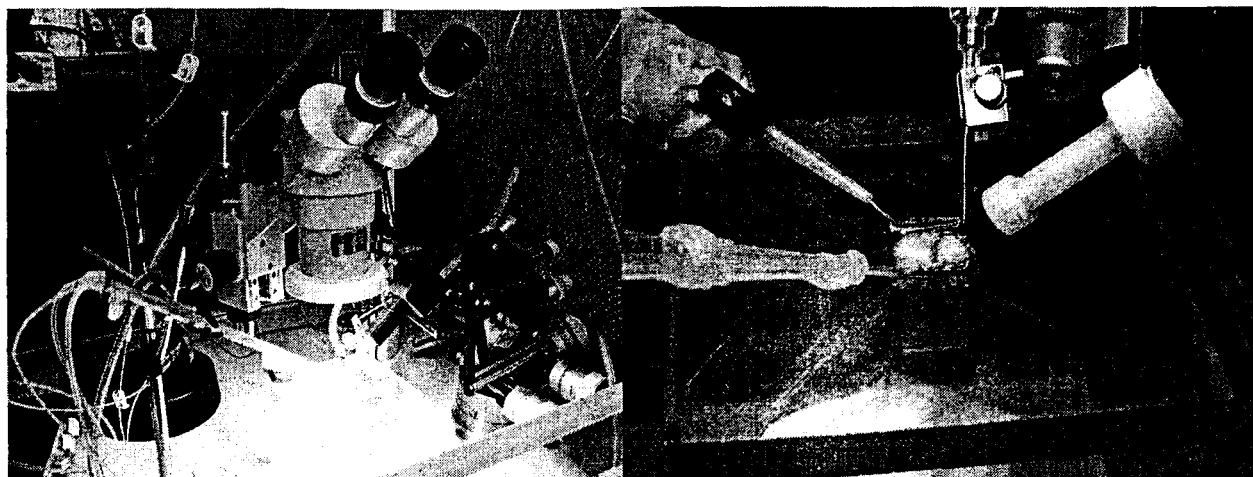


Fig. 40. Secuencia de fotos de la cámara de registro con la rebanada.

2. Registros de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales.

Los registros extracelulares se realizaron utilizando microelectrodos llenos con solución de NaCl 2M, con una resistencia de 2-6 M Ω ^(61,88,131,149). El potencial de membrana de un conjunto de neuronas se midió con un preamplificador Axopatch⁽¹⁵⁶⁾ (*Axon Instruments Inc., USA versión 8.0.1*). La salida de este preamplificador se conectó a un osciloscopio^(61,131) (Tektronix, TDS 3032), para observar las señales registradas, las cuales se almacenaron para su posterior análisis en una computadora, con la ayuda de los programas previamente instalados AxoScope y pClamp (*Axon Instruments*)^(131,156).

A continuación se en listan las características necesarias que deben de tener el registro extracelular basal para considerar que la rebanada es viable:

- ✓ El potencial de membrana debe ser mayor o igual a -55mV.
- ✓ La amplitud de los potenciales de acción debe ser mayor o igual a 60mV.
- ✓ Intensidad de estimulación de 36 mV.

Si el registro extracelular cumplía con estas condiciones entonces se proseguía a registrar la actividad neuronal con una perfusión constante de LCRA durante todo el tiempo que se registraba.

Al término del registro se aplicaba un LTP, es decir trenes de alta frecuencia (100Hz) durante 10 segundos a las colaterales de Schaffer, utilizando un electrodo bipolar de una aleación de tungsteno y platino de 50 μm de diámetro (cubierto con teflón). Diagrama 5.

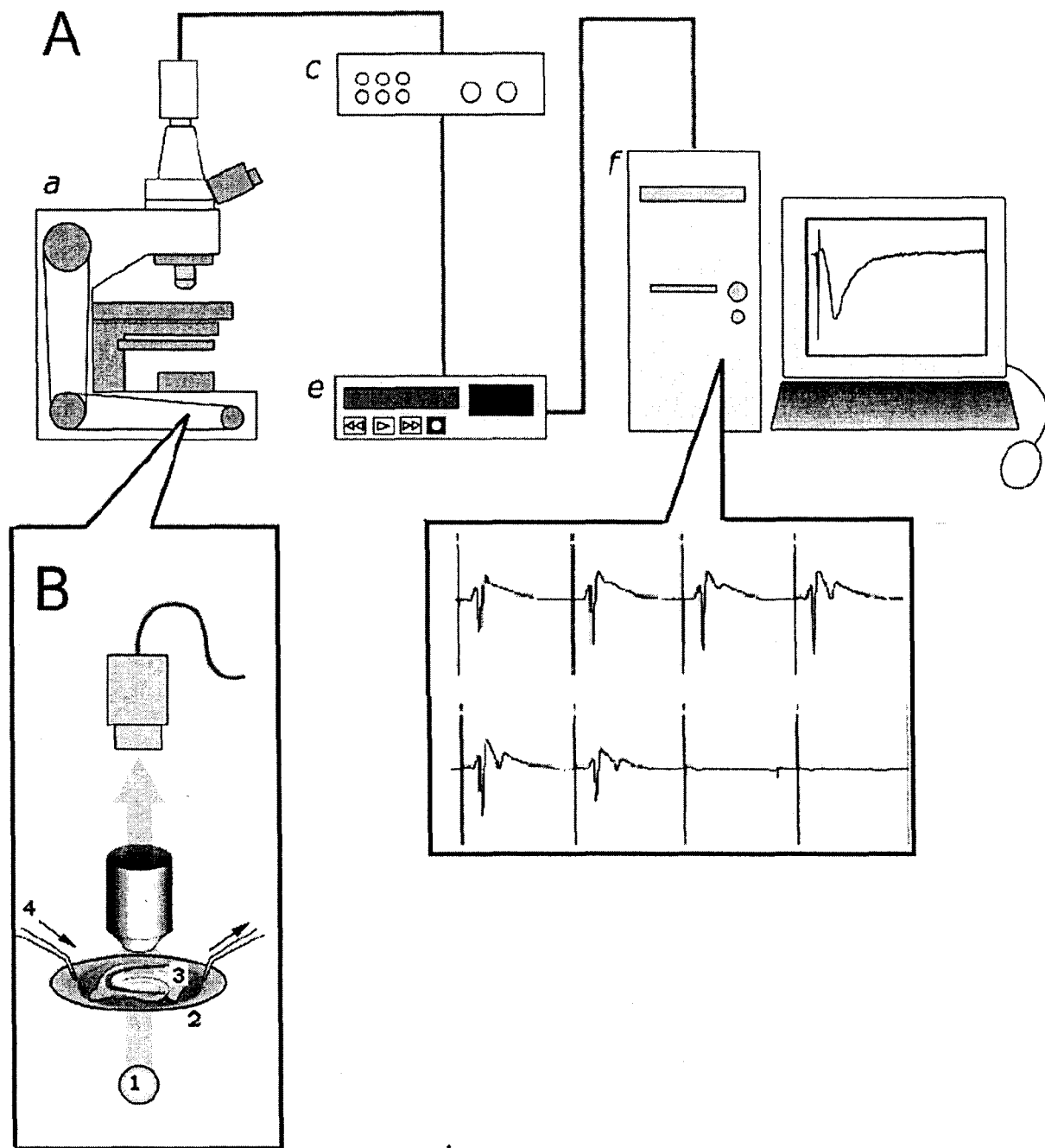


Diagrama 5. Diagrama del equipo utilizado para el registro, captura y análisis de los potenciales de campo de rebanadas hipocámpales de rata. (1) microscopio (2) rebanada (3) electrodo de registro (4) Electrodo de estimulación. Los potenciales fueron evocados por pulsos eléctricos aplicados y registrados en el *stratum pyramidale* de CA1(B) El estimulador eléctrico fue conectado a la computadora a través del convertidor analógico-digital (C y E) utilizando el software (pClamp, Axon Instruments) y una computadora (F).

Protocolo Experimental.

El potencial de campo se monitoreó y los experimentos se realizaron solamente con las rebanadas que mostraban una respuesta estable. Se realizó un registro control-vehículo con DMSO, un registro control (no se administró sustancia alguna) y el registro de cada fármaco. Una vez iniciado el registro, éste se sometió al siguiente protocolo experimental. Diagrama 6.

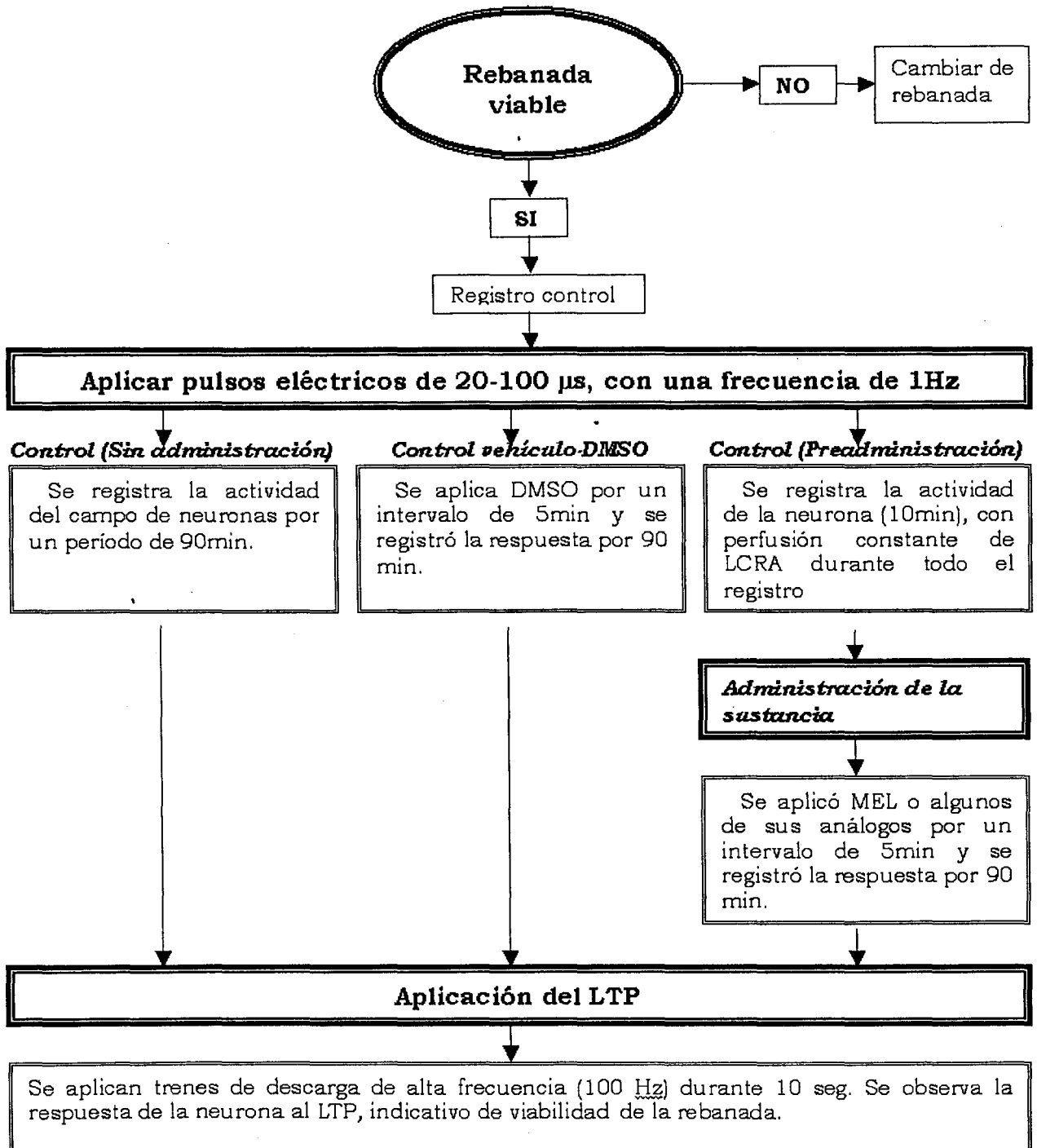


Diagrama 6. Protocolo experimental utilizado para determinar la actividad de las sustancias aplicadas sobre la transmisión sináptica.



SUSTANCIAS DE PRUEBA

Las sustancias de prueba fueron las siguientes: análogo M3C, análogo M2B y Melatonina. Estas soluciones se prepararon 15 min. antes de los experimentos. *Tabla 1*

Tabla 1. Protocolo experimental utilizado para determinar la actividad de las sustancias aplicadas sobre la transmisión sináptica.

Protocolo Experimental	Procedimiento
Preparación de fármacos	<p>MEL Se disolvió en DMSO 0.03% y posteriormente se mezcló con LCRA (pH =7.4).</p> <p>ANÁLOGOS DE MEL Se disolvieron en DMSO 0.1% y posteriormente se mezclaron con LCRA(pH=7.4).</p>
Registro	<p>Control (Preadministración) Se registra la actividad de la neurona (10min), con perfusión constante de LCRA durante todo el registro.</p>
Administración de la sustancia	<p>Curva de Melatonina Para elegir las concentraciones de MEL se realizó una curva, con concentraciones de MEL: 15; 30, 45 y 90 µM.</p> <p>Análogos de Melatonina -La concentraciones con las que se trabajaron fueron: M3C y M2B [30µM].</p> <p>-Se aplicó el fármaco por un intervalo de 5min y se registró la respuesta. -La respuesta se registró por 90 min.</p>
Inducción del LTP	<p>- Se observa la respuesta de la neurona al LTP, indicativo de viabilidad.</p>

Los parámetros medidos a cada conjunto de células fueron: la duración de la espiga, la amplitud y el número de espigas por pulso así como el potencial de membrana en reposo.

Análisis de los potenciales de campo

Cada archivo de computadora se registró utilizando el programa pClamp consistiendo en 6 potenciales de campo agrupados en un archivo, es decir en un determinado tiempo el registro perteneciente a una rebanada muestra seis potenciales de



campo de una sola espiga usando el software Clampfit, cada uno de esos 6 potenciales de acción se promedia y así fue obtenido la amplitud promedio de la espiga en cada archivo. Los resultados se graficaron usando Excel (*Microsoft, CA, USA*) en una PC convencional. Los registros de cada conjunto de neuronas se analizaron como se muestra en el Diagrama 7. En este Diagrama se muestra, como se calcula la amplitud de la espiga utilizando el programa ClampFit (pClamp, Axon Instruments).

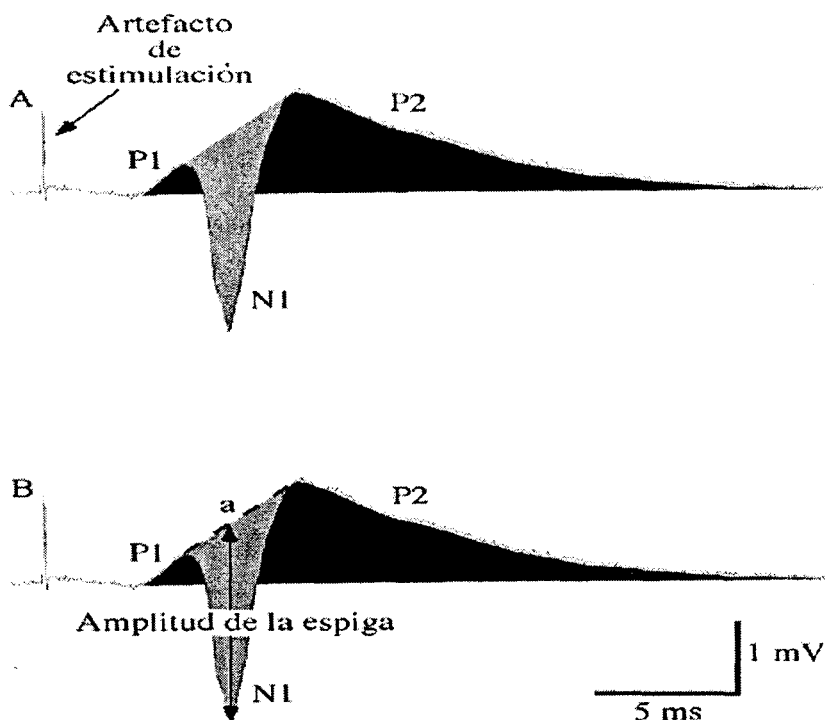


Diagrama 7. Potencial de campo típico en el registro del *stratum pyramidale* del área hipocámpal CA1. A) Usualmente se observan 3 ondas P1, N1 y P2. P1 y P2 corresponden al potencial postsináptico y N1 corresponde a la población de espigas. B). La amplitud de esta espiga se calculó usando el software ClampFit (pClamp, Axon Instruments). Se trazó una línea punteada en "a". Se calculó la amplitud de la población de las espigas como se indica.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos son de 3 rebanadas para MEL, M3C y M2B. Los datos obtenidos se analizaron con la prueba estadística "t de student" pareada para cuantificar las diferencias entre los valores promedio obtenidos en la misma espiga poblacional y con la prueba estadística "t de student" no pareada para analizar las diferencias entre los grupos de la espiga poblacional. Las diferencias estadísticamente significativas, se consideraron con una $p < 0.05^{(30)}$. El análisis estadístico y la realización de las gráficas se llevó a cabo con el programa Excel (*Microsoft, CA, USA*).

VII. RESULTADOS

Los potenciales de campo postsinápticos (PPSE) fueron registrados extracelularmente en el *stratum pyramidale* del hipocampo después de la estimulación eléctrica de las CS. A medida que la intensidad de la estimulación se incrementa la amplitud de la espiga se incrementa lo que sugiere que la forma de los potenciales de campo postsinápticos (PPSE) son estímulo dependientes una vez que la estimulación realiza el tamaño máximo de la espiga este es determinado para tener en consideración todos los experimentos de cada rebanada.

Curva de Melatonina

En la Tabla 2 se muestran los datos en el promedio de la amplitud de la espiga (%) después de 5 min. post-administración de MEL a 15, 30, 45, y 90µM. y posteriormente cada 10 minutos. En la misma tabla se muestran las datos del Control con DMSO y el control sin administrar.

Tabla 2. Promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de MEL 15, 30,45 y 90µM.

Tiempo (min.)	Promedio de la amplitud de la espiga (%)					
	Control DMSO	Control sin admon.	MEL 15 µM	MEL 30 µM	MEL 45µM	MEL 90µM
15	99.74	104.56	115.04*	97.05*	87.76*	27.75*
25	100.15	99.56	128.43*	91.21*	77.66*	28.47*
35	101.25	100.82	134.03*	95.87*	74.31*	24.69*
45	99.98	99.56	135.31*	95.49*	73.67*	31.87*
55	102.23	101.94	139.73*	96.41*	78.44*	31.54*
65	102.10	100.07	154.83*	97.48*	86.02*	34.54*
75	103.82	99.70	162.03*	93.32*	98.05*	31.19*

El análisis estadístico (t de student pareada) muestra una diferencia significativa al compararse con el registro control con *p< 0.05⁽³⁰⁾.

En la Gráfica 1 se muestra el efecto producido por la administración de MEL a las concentraciones de 15,30,45 y 90µM.

Para la aplicación de 15µM se observa un aumento en el promedio de la amplitud de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración), este efecto se puede observar a partir de los 5 minutos posteriores a la administración de MEL, este incremento continua conforme pasa el tiempo hasta el minuto 70 y durante 15 minutos se mantiene sin cambios hasta el final del registro, posteriormente se aplica LTP para determinar la viabilidad de la rebanada.



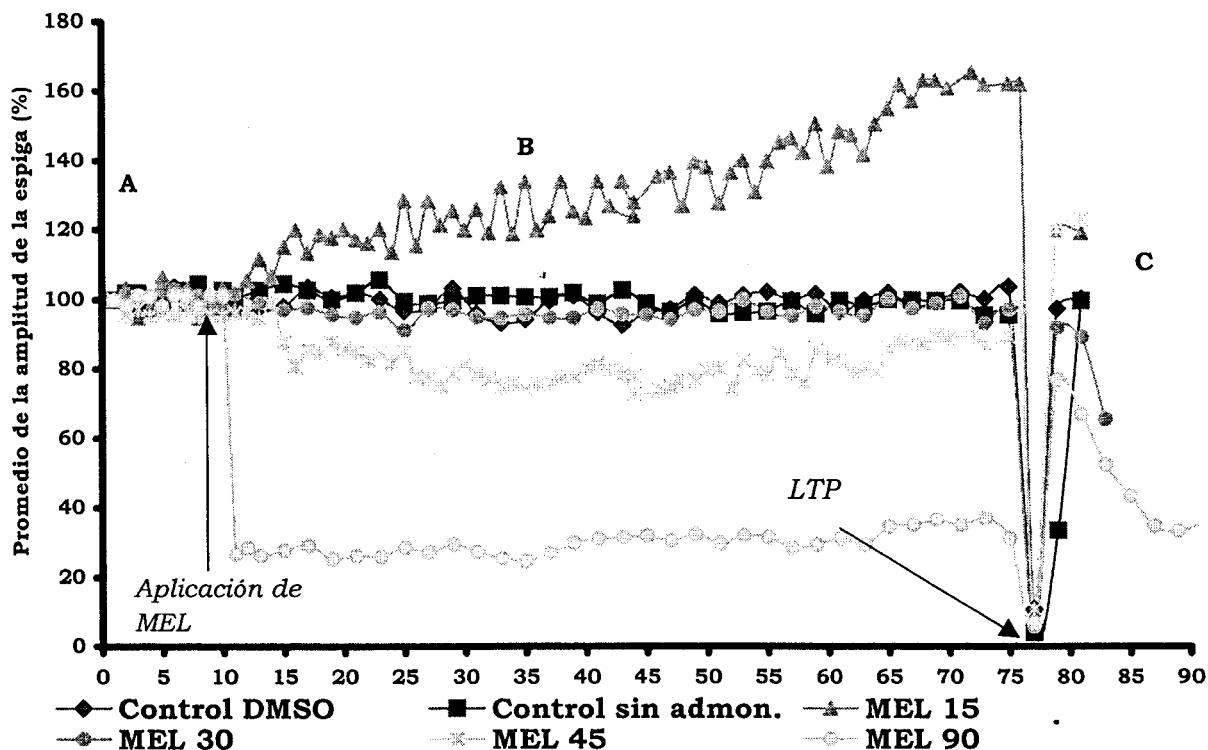
En la misma gráfica la respuesta obtenida con la aplicación de MEL a $30\mu\text{M}$ en las rebanadas de cerebro de rata se observa que produce una disminución de la amplitud de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración), este efecto se puede observar a partir de los 5 minutos posteriores a la administración de MEL, este efecto se mantiene constante hasta el final del registro, posteriormente se aplica LTP para determinar la viabilidad de la rebanada.

Al administrar MEL a una concentración $45\mu\text{M}$ en las rebanadas de cerebro de rata se presenta una disminución significativa en la amplitud de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración), se puede observar que la disminución de la respuesta comienza a los 5 min. post-administración y esta disminución se mantiene constante durante los siguientes 15 minutos post-administración (minuto 30) continua disminuyendo hasta los 30 min. post-administración (minuto 45), posteriormente se observa que hay un incremento de la respuesta hasta el término del registro, se aplica LTP para determinar la viabilidad de la rebanada.

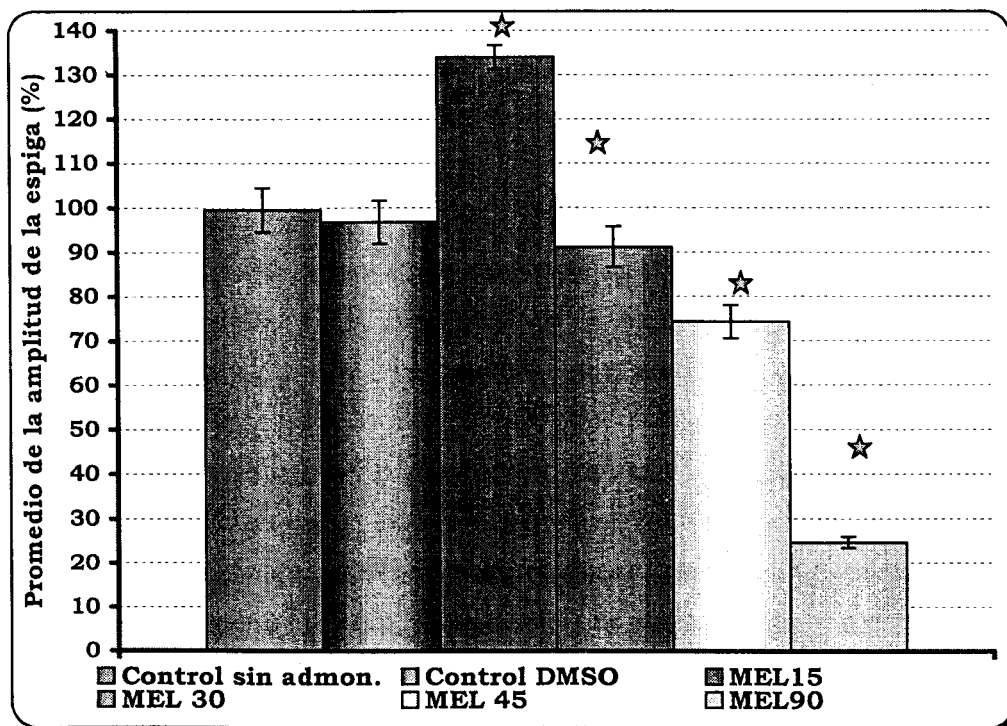
En los resultados obtenidos con MEL a $90\mu\text{M}$, se observa una disminución constante de la amplitud de la espiga respecto al control (preadministración) hasta el término del registro, para comprobar la viabilidad de la rebanada se aplica LTP

En la Gráfica 1 se observa que a una concentración baja de MEL ($15\mu\text{M}$) hay un incremento de la respuesta y conforme se aumenta la concentración de MEL disminuye la amplitud de la respuesta dependiente de la concentración lo que nos habla de un efecto bifásico por parte de MEL, es decir se observa un grafica concentración respuesta a MEL,

En la Gráfica 2, se muestra el promedio de la amplitud de los PPSE a los 35 minutos de duración del registro. Se eligió este tiempo por ser el más representativo para visualizar el efecto a cada concentración utilizada de MEL comparándolos con el control sin administración y el vehículo.



Gráfica 1. Comparación del efecto de MEL a 15, 30, 45 y 90µM. En la Grafica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo.



Gráfica 2. Promedio de la amplitud de la espiga(%) ± ESM de las concentraciones de MEL aplicadas 15, 30, 45 y 90µM con una diferencia significativa de *p<0.05 con respecto a los controles.



ANÁLOGOS DE MEL

Teniendo la curva de MEL se desea comparar el efecto de los análogos M3C y M2B de melatonina con MEL a 30μ , ya que es la primera concentración a la que se observa un efecto de disminución de los potenciales de acción.

En la Gráfica 3 se muestra el efecto producido por la administración de MEL a la concentración de 30μ M. En A se muestra la espiga poblacional que representa el potencial de campo, en B se observa el registro post-administración de MEL y en C el registro postaplicación del LTP.

En la Gráfica 3 se observa que la administración de MEL a 30μ M en las rebanadas de cerebro de rata produce una disminución en el promedio de la amplitud de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración), este efecto se puede observar a partir de los 5 minutos posteriores a la administración de MEL, este efecto se mantiene constante hasta el final del registro, posteriormente se aplica LTP para determinar la viabilidad de la rebanada.

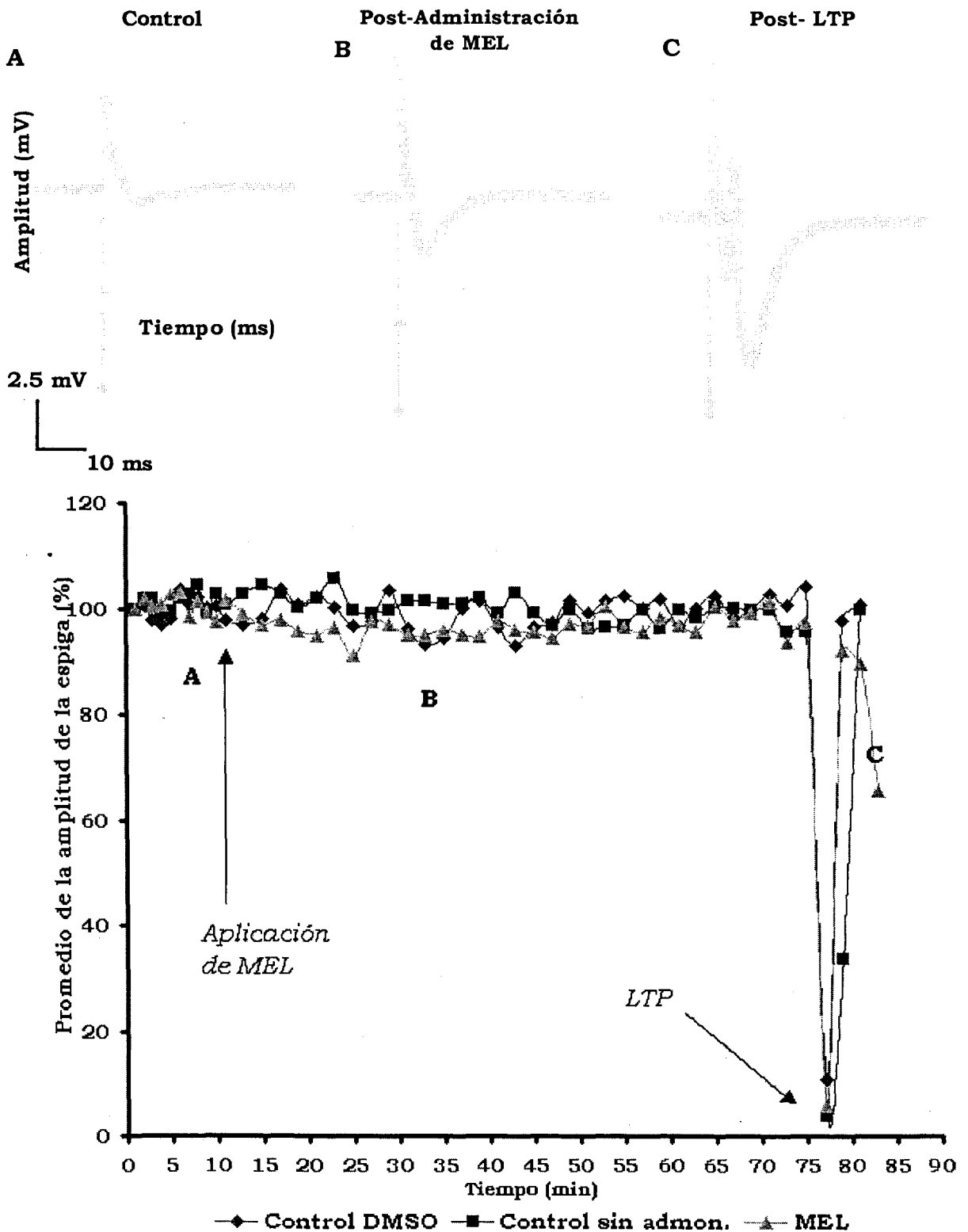
En la Gráfica 4 se observa que al administrar el análogo M3C a 30μ M se presenta una disminución significativa del promedio de la amplitud de la espiga respecto al control (preadministración). El efecto de disminución se observa a los 5 minutos de la administración de M3C y permanece constante durante todo el registro hasta la aplicación de LTP. En A se muestra la espiga poblacional que representa el potencial de campo, en B se observa el registro post-administración de M3C y en C el registro postaplicación del LTP.

El análogo de melatonina evaluado M2B, se aplicó a 3 rebanadas de manera independiente. En la Gráfica 5 podemos observar el efecto del M2B a una concentración de 30μ M sobre el promedio de la amplitud de la espiga. Con la aplicación de M2B se produce una disminución de la espiga poblacional con respecto al control (preadministración).

Con respecto al análogo M2B durante la realización de los registros se obtenían en repetidas ocasiones multiespigas, este era un inconveniente al analizar las respuesta ya que el programa pClamp está diseñado para analizar como respuesta una sola espiga, no varias espigas en un mismo registro, la aparición de multiespigas no era tan común como en los otros compuestos, así que para todos los fármacos solo se analizaron aquellas respuestas que eran de una sola espiga.



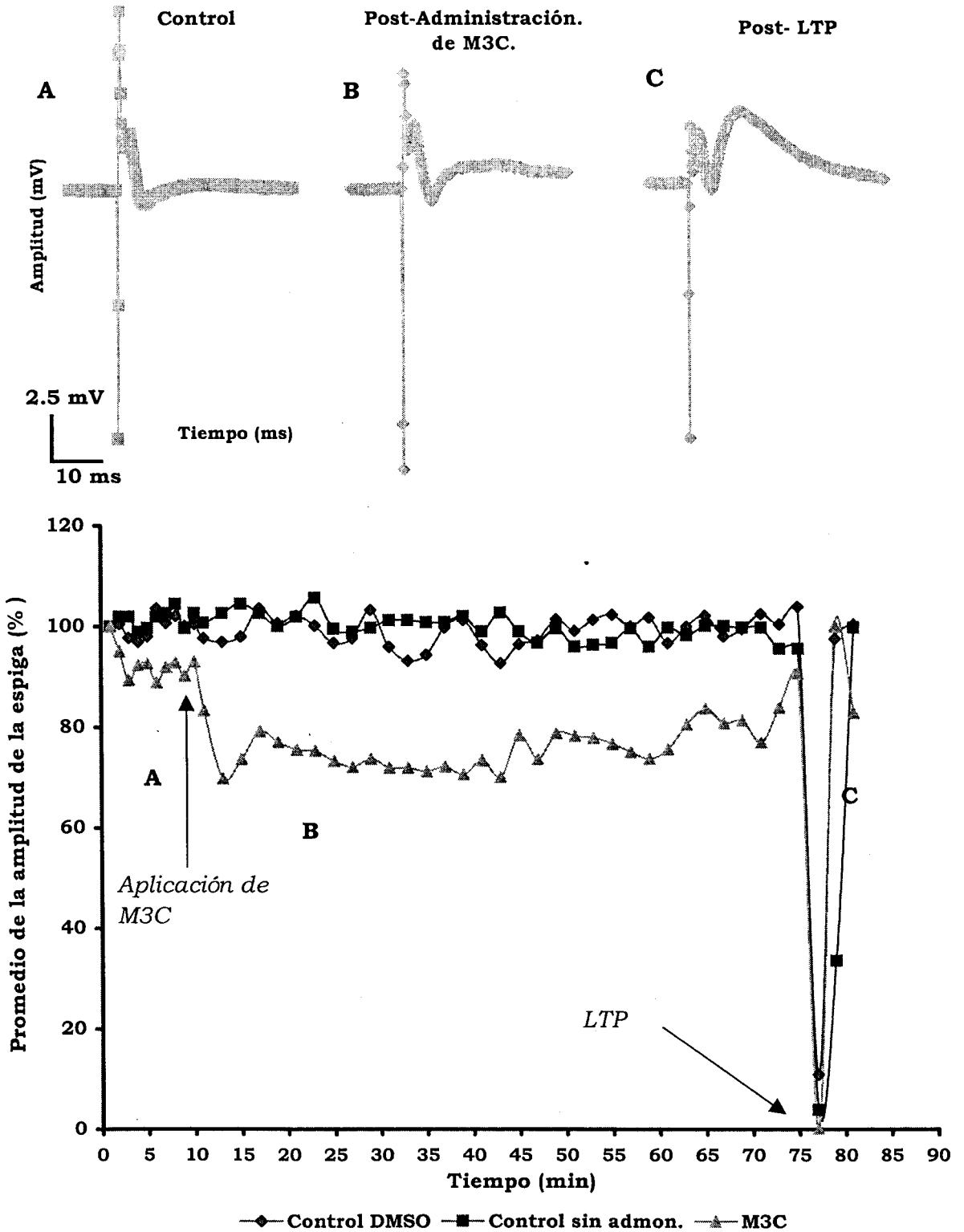
EFFECTO DE MEL 30 μ M SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO



Gráfica 3. Efecto de MEL a 30 μ M sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal. En la Gráfica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo para los tres tratamientos.



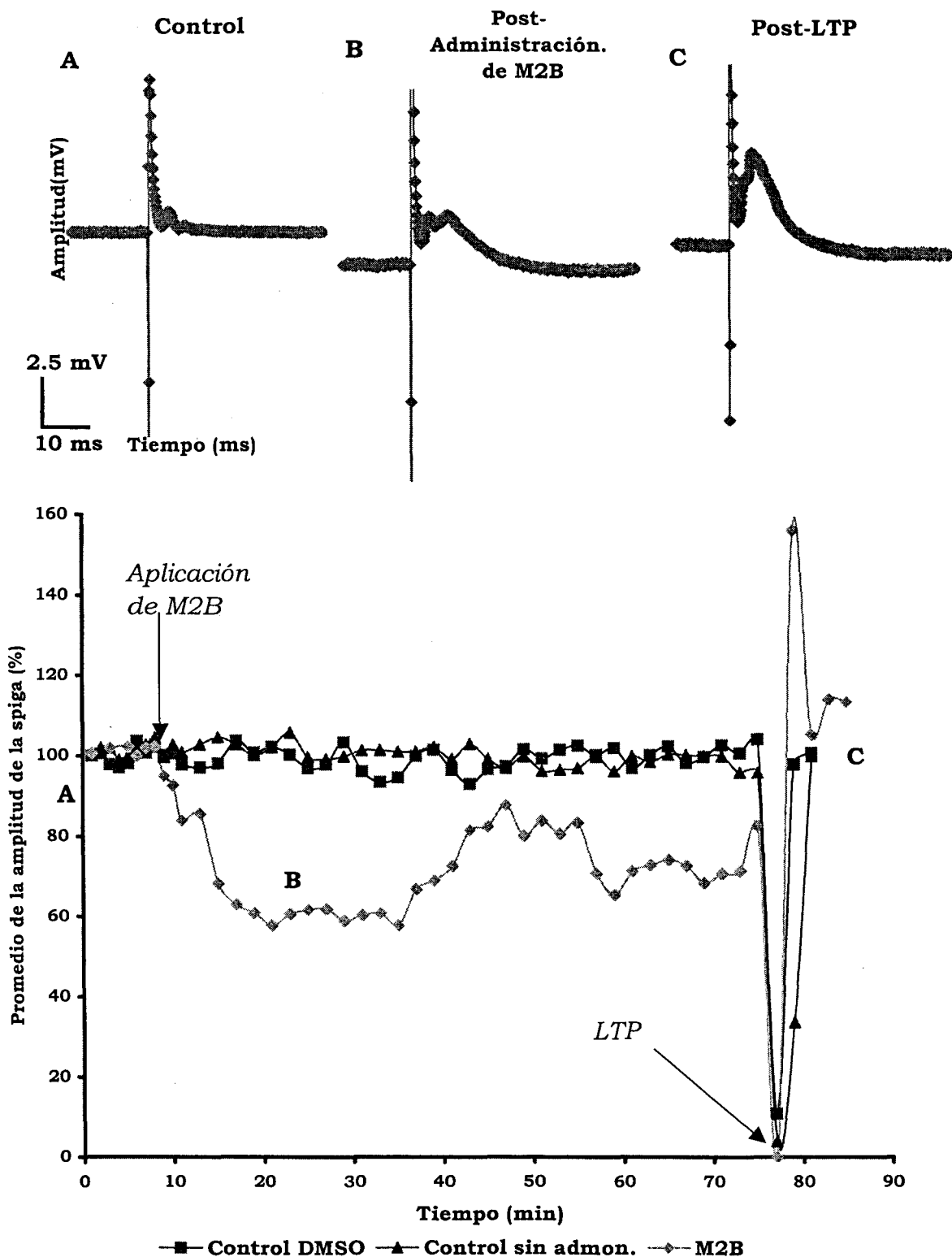
EFFECTO DE M3C 30 μ M SOBRE LA TRANSMISI3N SIN3PTICA DEL HIPOCAMPO



Gr3fica 4. Efecto de M3C a 30 μ M sobre la transmisi3n sin3ptica de la regi3n CA1 hipoc3mpal. En la Gr3fica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en funci3n del tiempo para los tres tratamientos.



EFFECTO DE M2B 30 μ M SOBRE LA TRANSMISI3N SIN3PTICA DEL HIPOCAMPO



Gr3fica 5. Efecto de M2B a 30 μ M sobre la transmisi3n sin3ptica de la regi3n CA1 hipocampal. En la Gr3fica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en funci3n del tiempo para los tres tratamientos.



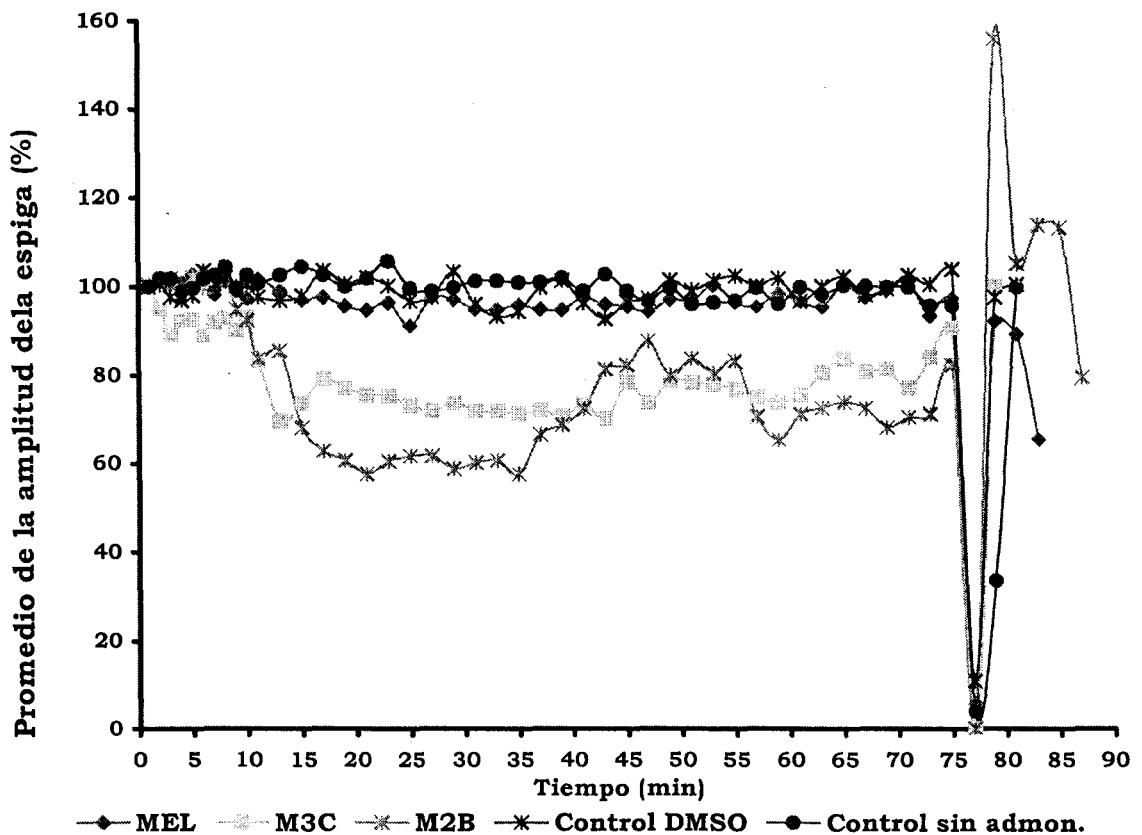
En la Tabla 3 se muestran los promedios obtenidos con MEL, M3C, M2B a 30µM. en las rebanadas de cerebro de rata.

Tabla 3. Promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de MEL, M3C y M2B a 30µM.

Tiempo (min.)	Promedio de la amplitud de la espiga (%)				
	Control DMSO	Control sin admon.	MEL 30µM	M3C 30µM	M2B 30µM
15	99.74*	104.56*	97.05	73.77*	68.10*
25	100.15*	99.56*	91.21	73.30*	61.56*
35	101.25*	100.82*	95.87	71.23*	57.53*
45	99.98*	99.56*	95.49	78.36*	82.18*
55	102.23*	101.94*	96.41	76.67*	83.13*
65	102.10*	100.07*	97.48	83.65*	73.87*
75	103.82*	99.70*	93.32	90.64*	82.29*

El análisis estadístico (t de student no pareada) muestra una diferencia significativa de los análogos con respecto a MEL 30µM con *p< 0.05⁽³⁰⁾.

Gráficas de comparación de MEL 30µM, M3C 30µM y M2B 30µM

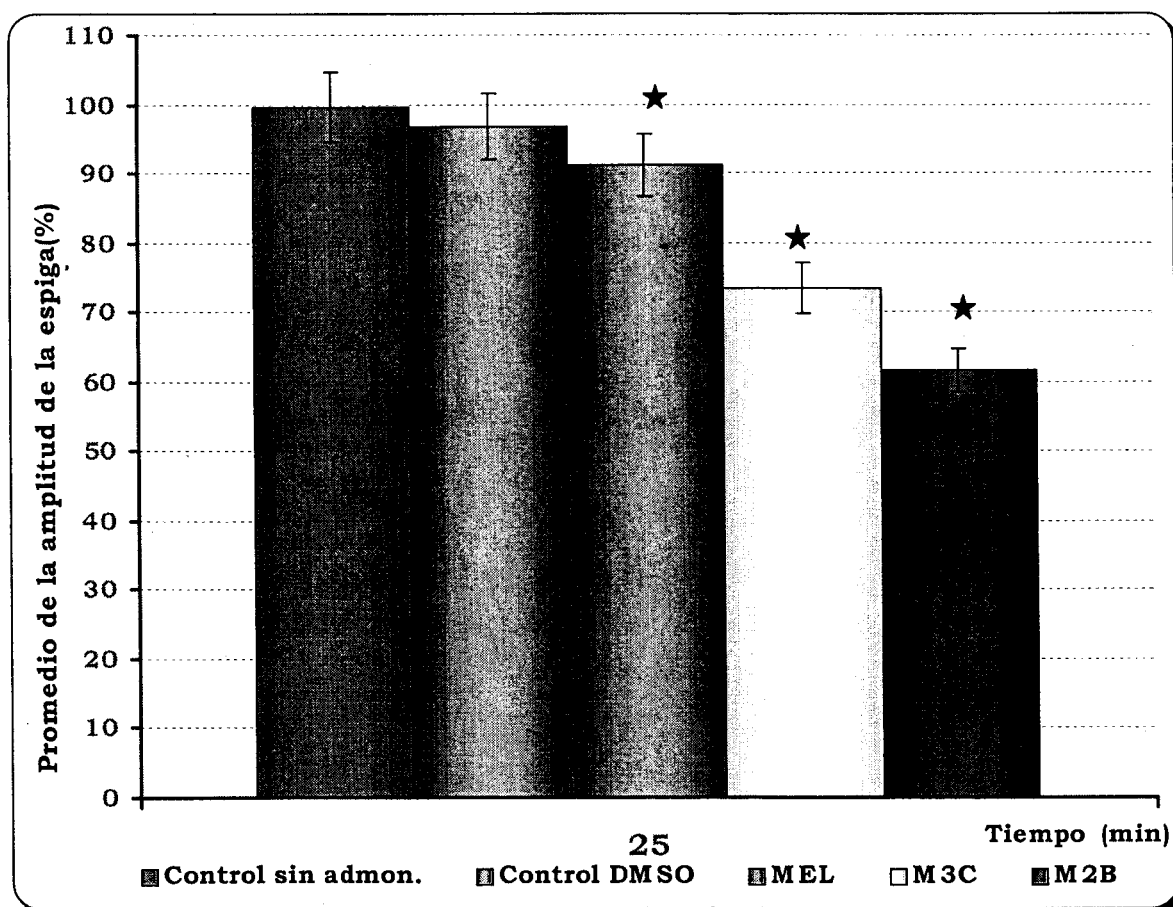


Gráfica 6. Se observa el efecto en el promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de MEL, M3C y M2B a 30µM sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal. En la Gráfica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo para todos los tratamientos.



En la Gráfica 6 se observa una disminución gradual con los tres compuestos, a excepción del control y vehículo, para posteriormente incrementarse con MEL se muestra una disminución en el promedio de la amplitud espiga de la espiga y es de forma constante; con los análogos se observa una disminución mayor que con MEL, a partir de los 45 min. Se registró un incremento de la amplitud por parte de los análogos sin alcanzar el valor basal.

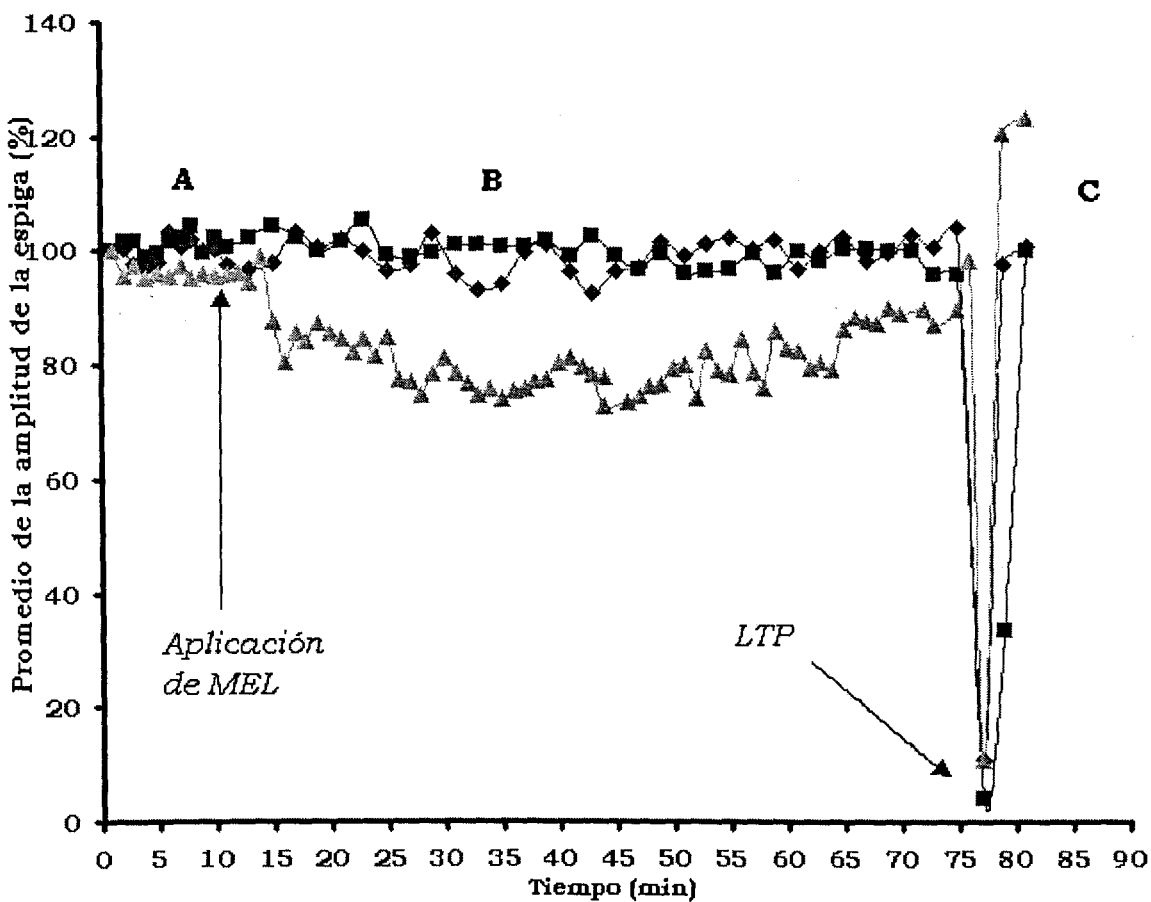
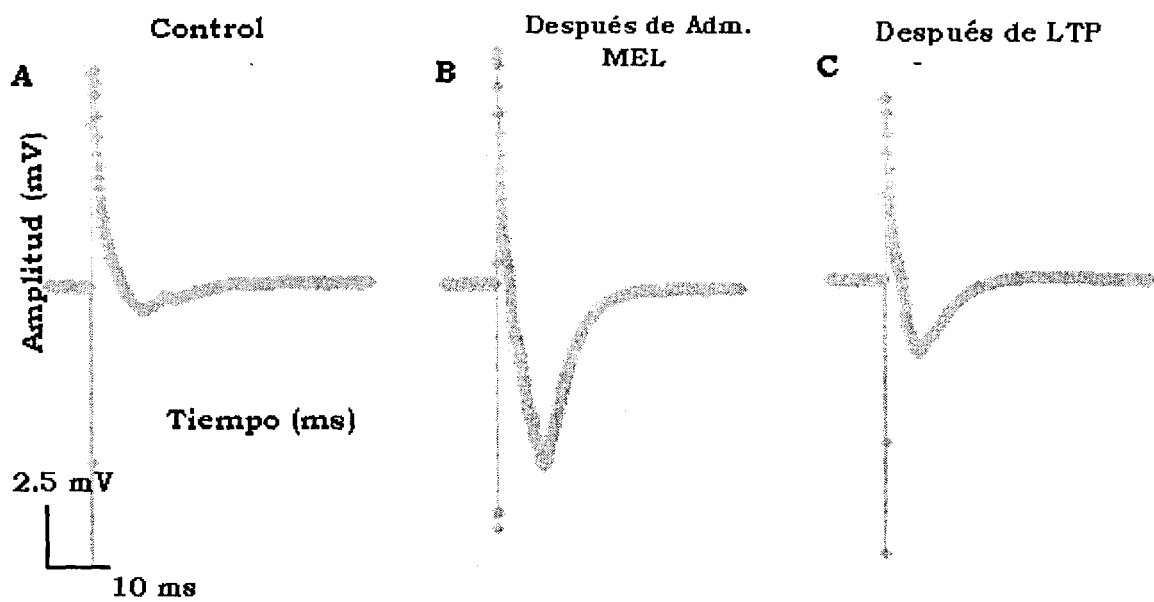
En la Gráfica 7, se muestra el promedio de la amplitud de los potenciales (PPSE) a los 25 minutos de duración del registro. Se eligió este tiempo por ser el representativo para visualizar el efecto de cada tratamiento, comparados con el control y el vehículo los tres compuestos probados muestran una disminución en forma gradual.



Gráfica 7. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de MEL, M3C y M2B a $30\mu\text{M}$ (a los 25min) Con una diferencia significativa de $*p < 0.05$ al compararse con el registro control.

Como se observa en la Gráficas 6 y 7 el efecto de los análogos es mayor comparándolos con MEL a una concentración de $30\mu\text{M}$ por lo que se decidió comparar el efecto de los análogos a una concentración de $30\mu\text{M}$ con MEL a $45\mu\text{M}$ Gráfica 8.

EFFECTO DE MEL 45 μ M SOBRE LA TRANSMISI3N SIN4PTICA DEL HIPOCAMPO



◆ Control DMSO ■ Control sin admon. ▲ MEL 45

Gráfica 8. Efecto de MEL a 45 μ M sobre la transmisi3n sin4ptica de la regi3n CA1 hipocampal. En la Gráfica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en funci3n del tiempo para los tres tratamientos .

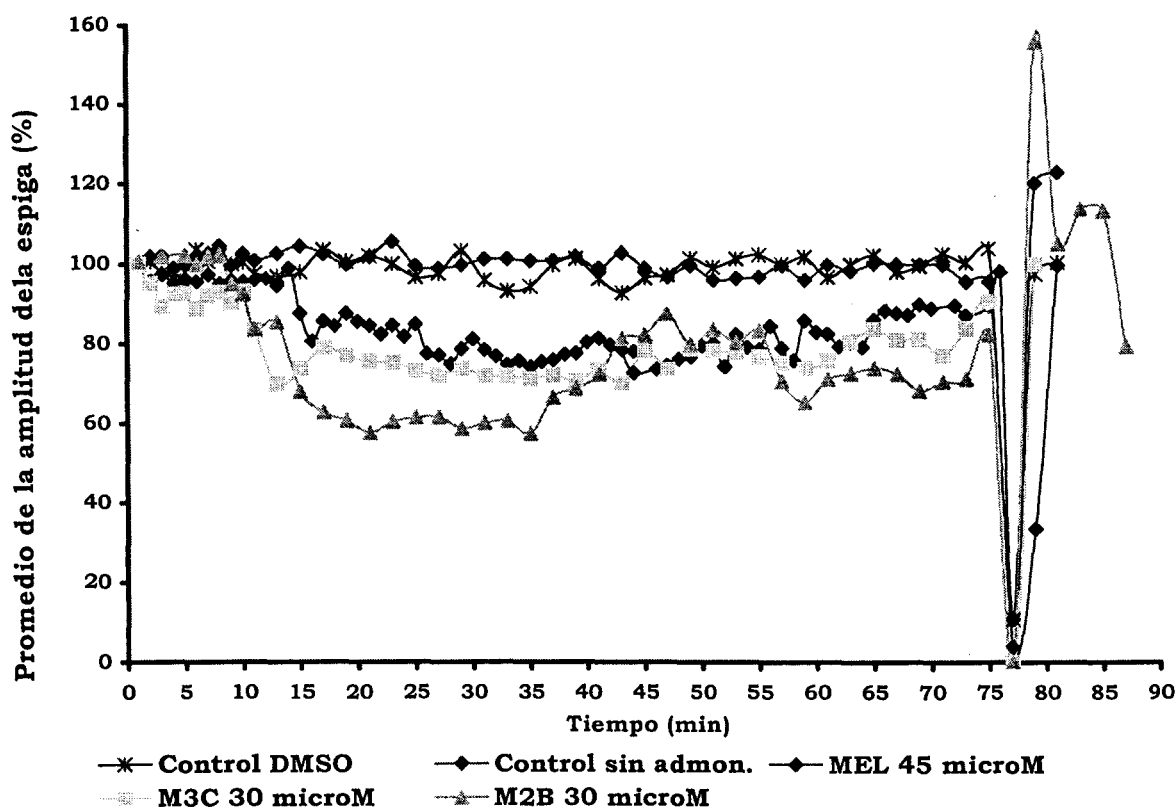
En la Tabla 4 se muestran los promedios obtenidos con M3C, M2B a 30µM y MEL 45µM en las rebanadas de cerebro de rata.

Tabla 4. Promedio de la amplitud de la espiga con la aplicación de M3C, M2B a 30µM y MEL 45µM.

Tiempo (min.)	Promedio de la amplitud de la espiga (%)				
	Control DMSO	Control sin admón..	MEL 45µM	M3C 30µM	M2B 30µM
15	99.74	104.56	87.76	73.77*	68.10*
25	100.15	99.56	77.66	73.30*	61.56*
35	101.25	100.82	74.31	71.23*	57.53*
45	99.98	99.56	73.67	78.36*	82.18*
55	102.23	101.94	78.44	76.67*	83.13*
65	102.10	100.07	86.02	83.65*	73.87*
75	103.82	99.70	98.05	90.64*	82.29*

El análisis estadístico (t de student no pareada) muestra una diferencia significativa de los análogos con respecto al control DMSO y sin admón. con *p< 0.05⁽³⁰⁾.

Gráfica de comparación de M3C, M2B 30µM y MEL 45µM.

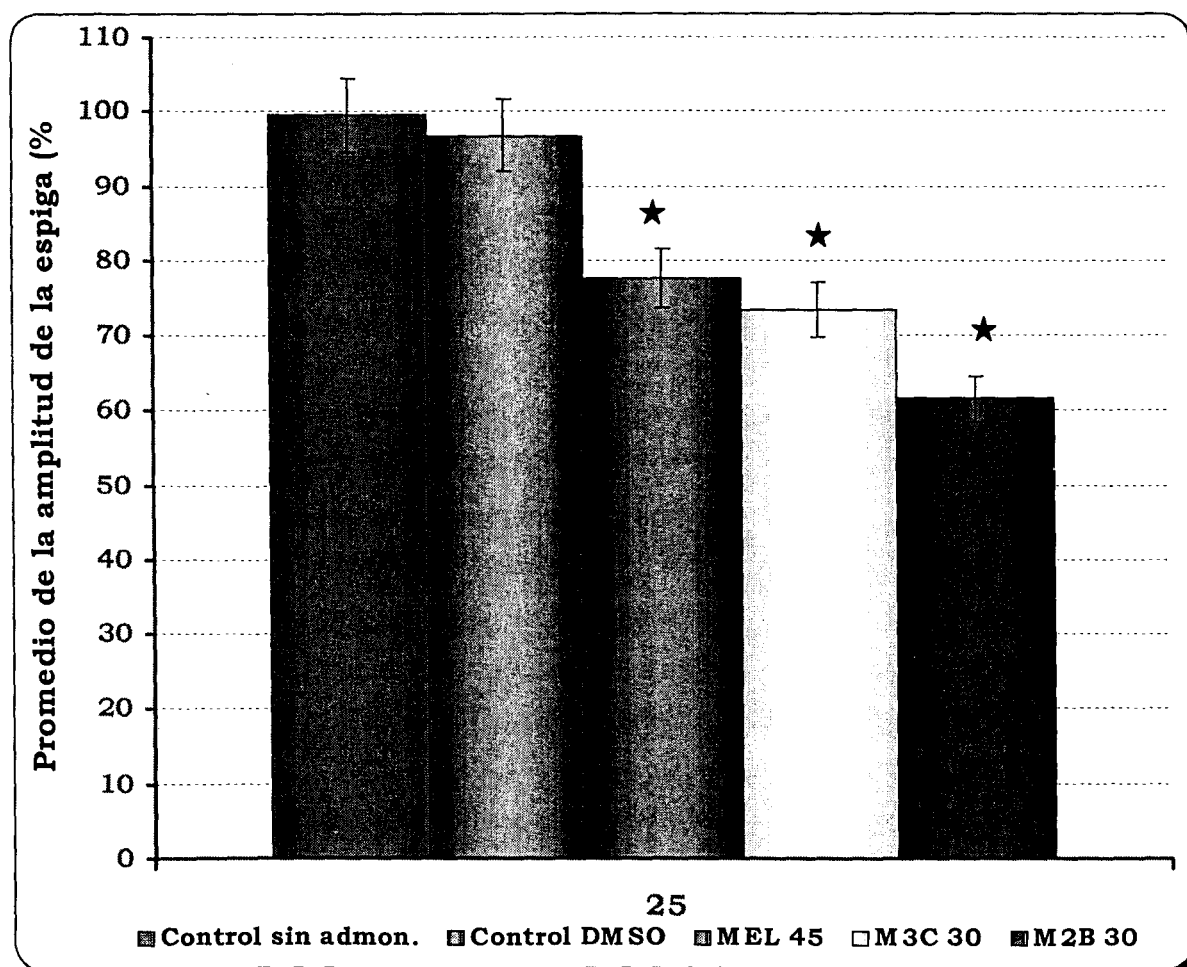


Gráfica 9. Se observa el efecto en el promedio de la amplitud de la respuesta con la aplicación de M3C, M2B a 30µM y MEL 45µM sobre la transmisión sináptica de la región CA1 hipocampal. En la Gráfica se muestra el promedio de la amplitud de la espiga (%) en función del tiempo para todos los tratamientos.



En la Gráfica 9 se observa una disminución gradual con los tres compuestos, a excepción del control y vehículo, para posteriormente incrementarse. Respecto a MEL se muestra una disminución en el promedio de la amplitud espiga de la espiga y es de forma constante, el comportamiento del análogo M3C a una concentración de 30 μ M es muy similar al comportamiento de MEL a 45 μ M, un comportamiento semejante se observa con el análogo M2B.

En la Gráfica 10, se muestra el promedio de la amplitud de los potenciales (PPSE) a los 25 minutos de duración del registro. Se eligió este tiempo por ser el representativo para visualizar el efecto de cada tratamiento, comparados con el control y el vehículo los tres compuestos probados se observa una disminución, siendo muy semejante el comportamiento de M3C 30 μ M con el de MEL 45 μ M.



Gráfica 10. Promedio de la amplitud de la espiga (%) \pm ESM de MEL a 45 μ M, M3C y M2B a 30 μ M (a los 25min) Con una diferencia significativa de *p< 0.05 al compararse con el registro control.

VIII. DISCUSIÓN.

Aunque los neurotransmisores son las primeras moléculas en iniciar la actividad neuronal, hay varios compuestos endógenos que modulan la neurotransmisión, uno de estos es la MEL⁽⁵²⁾.

La MEL endógena actúa a través del receptor específico MT₂, el cual se ha determinado por análisis inmunohistoquímicos en el que se muestra que en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo humano hay una mayor densidad de estos, esta densidad es variable y depende de diversas condiciones como la edad y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo en Alzheimer se ve disminuida⁽¹³⁹⁾. En ratas un análisis utilizado para la detección de MEL-R es la cuantificación de RNA mensajero^(115,119) para MT₁ y MT₂, en la región hipocampal, este tipo de análisis ha demostrado la presencia de ambos receptores en el hipocampo, indicando una mayor expresión de MT₂ que de MT₁, además se reporta que hay variación en la densidad de MEL-R de acuerdo a la región hipocampal (CA1, CA2, CA3 y GD)^(115,119), lo que es consistente con lo encontrado en los análisis inmunohistoquímicos en humanos⁽¹³⁹⁾.

El efecto de la MEL exógena, se conoce a través de estudios electrofisiológicos en la región CA1, donde se ha reportado que puede regular la actividad eléctrica de las neuronas hipocampales^(52,119,176) y que es capaz de alterar la actividad sináptica entre las neuronas^(51,73). Algunos investigadores reportaron que la acción de MEL en las neuronas es predominantemente inhibitoria^(9,110,111,120,136,147,176), otros que es excitadora^(21,98,120) y otros no reportan efecto en la transmisión sináptica⁽³¹⁾.

Musshoff y Cols.(2002)⁽¹¹⁹⁾ reportaron que al aplicar MEL a una concentración de 1µM en rebanadas hipocampales (CA1) de rata durante la fase de oscuridad se incrementó la actividad en ésta y cuando se aplicaba en la fase de luz se presentaba un modesto efecto excitador lo que puede reflejar la secreción rítmica de la hormona, es decir, la densidad de MEL-R esta en relación al horario, habiendo una alta densidad de receptores en la fotofase y una baja densidad de MEL-R en la escotofase^(63,171). El horario en el que se realizaron los registros fue entre las 11 y 12 hrs., debido a que es el tiempo en el que la concentración de MEL endógena es baja^(6,10) por lo que no interfiere con nuestros resultados. Para saber si hay una variación en la respuesta electrofisiológica, bajo nuestras condiciones de laboratorio, debido a la densidad de MEL-R sería útil contrastar el efecto que tendrían MEL y sus análogos en un horario nocturno.



Por otro lado *Hogan y Cols. (2001)*⁽⁷³⁾ y *El-Sherif y Cols. (2002)*⁽⁵¹⁾ reportaron un efecto bifásico en los PPSE al aplicar MEL en rebanadas hipocampales de ratón, primero se presenta una depresión de la actividad eléctrica y posteriormente una recuperación⁽⁵¹⁾ lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos a las condiciones del Laboratorio en la que observamos una depresión de los PPSE al aplicar MEL a $45\mu\text{M}$. Al aplicar MEL exógena en nuestras rebanadas podemos descartar que haya ocurrido una desensibilización de MEL-R como algunos autores han reportado ya que este fenómeno se presentan en una exposición de MEL exógena prolongada^(62,63,43,174).

En nuestros experimentos observamos que la MEL a la concentración de 30, 45 y $90\mu\text{M}$, produce un efecto inhibitor de los PPSE. En la concentración de $30\mu\text{M}$ el efecto inhibitor que se observa es constante, si este efecto se compara con la concentración de $45\mu\text{M}$ se observa en un inicio una inhibición en los PPSE y después de 45 minutos de registro se observa un incremento en los PPSE este comportamiento nos puede decir que MEL tiene un efecto bifásico a esta concentración, aunque cabe aclarar que la excitación de los PPSE jamás llega a superar a la basal. Cuando se aplica MEL a $90\mu\text{M}$ se observa un efecto inhibitor en los PPSE significativo la inhibición es constante durante los primeros 45 minutos del registro para posteriormente observarse un ligero incremento en los PPSE sin acercarse a la basal este incremento no es tan marcado como a la concentración de $45\mu\text{M}$. El efecto inhibitor encontrado concuerda con lo reportado en la literatura por *Musshoff y Cols.(2002)*⁽¹¹⁹⁾ y por *Zeise y Cols.(176)* quienes mencionan la acción inhibitor de MEL en la actividad neuronal^(119,176). Por ejemplo *El-Sherif y Cols. (2003)*⁽⁵²⁾; reportaron que la aplicación de MEL a $100\mu\text{M}$ en la región CA1 hipocampal produce una disminución de la amplitud del promedio de la espiga (depresión en la actividad neuronal hipocampal) concentración muy similar a la más alta utilizada en nuestra curva ($90\mu\text{M}$ de MEL).

En otro modelo utilizado, p-Clamp en neuronas del NSQ *Jiang ZG y Cols. (1995)*⁽⁷⁹⁾ reportaron un efecto inhibitor de MEL en la actividad neuronal de este núcleo y asumen que es por la hiperpolarización de las neuronas mediadas por la activación de la conductancia de K^+ ^(79,122) mientras que *Wan y Cols.(1999)*⁽¹⁶⁷⁾ proponen que este mismo efecto es por el incremento en la inducción del receptor GABA_a ⁽¹⁶⁷⁾, por otro lado, *Zeise y Cols.(176)* al aplicar MEL en rebanadas hipocampales de cobayo observaron una hiperpolarización del potencial de membrana la cual pudo deberse a la acción de MEL en los canales de Cl^- y K^+ ⁽¹⁷⁶⁾. Como ejemplo se han reportado acciones inhibitoras de la



MEL con respecto a la actividad epiléptica en una amplia variedad de modelos animales de epilepsia para posteriormente tratarla en humanos^(118,120,133).

Un mecanismo que puede ayudar a entender los efectos de MEL en la plasticidad sináptica es la modulación de la excitabilidad intrínseca de las neuronas hipocampales. La inducción de la hiperpolarización por MEL puede reducir el LTP debido a la inhibición de la activación del receptor NMDA durante la estimulación tetánica⁽¹⁶⁸⁾. En otras regiones del SNC, la aplicación de MEL disminuye la excitabilidad de la neurona a través de un aumento de la corriente de K⁺. Estas acciones de MEL en las propiedades de la membrana han sido bien estudiadas en el NSQ donde la MEL disminuye la generación de potenciales de acción espontáneos como lo reportan: *Shibata y Cols. (1989)*⁽¹⁴¹⁾; *Stehle y Cols.(1989)*⁽¹⁴⁷⁾; *Mason y Rusak (1990)*⁽¹¹¹⁾, a través de un incremento en la conductancia de K⁺.

Por otro, *Musshoff*⁽¹²⁰⁾ menciona que el efecto de MEL puede deberse a alteraciones del microambiente iónico capaz de incrementar los niveles de excitabilidad por el desbloqueo de receptores NMDA (modelo con baja concentración de Mg²⁺)⁽¹²⁰⁾.

Con base a esto *Vanecek*, plantea una hipótesis que se ve respaldada por *Klein D. C.*, con sus estudios realizados en ratas neonatales^(161,163). *Vanecek* encontró que la MEL es efectiva en un medio sin Ca²⁺, lo que nos indica que el efecto de MEL en el potencial de membrana no está mediado por Ca²⁺, sino que la hiperpolarización es un efecto primario de MEL el cual inhibe la entrada de Ca²⁺ a través de los canales voltaje dependientes y como consecuencia en la [Ca²⁺]⁽¹³⁷⁾. *Vanecek*⁽¹³⁷⁾ entonces, propone que la MEL induce cambios en la concentración intracelular de Na⁺ y que el potencial de membrana es una consecuencia secundaria inducida por el primer efecto de MEL en la movilización de Ca²⁺⁽¹³⁷⁾. En cuanto al flujo de Na⁺ *Vanecek*⁽¹³⁷⁾ propone que la MEL al hiperpolarizar la célula inhibe la entrada de Na⁺ sin embargo a la fecha el mecanismo no es claro⁽¹³⁷⁾.

Con esta evidencia y con el hallazgo los MEL-R en las regiones hipocampales CA1 y CA3^(115,119,126,139) se plantea otra hipótesis que dice que la MEL probablemente ejerce sus efectos en el hipocampo vía receptores específicos acoplados a proteínas G (MT₁ o MT₂)⁽¹²⁰⁾ donde se puede asumir qué mecanismos intracelulares están involucrados en el cambio de la excitabilidad⁽¹²⁰⁾. *Wang y Cols. (2005)* sugieren que la MEL altera la plasticidad sináptica hipocampal a través de un mecanismo que involucra al receptor MT₂ mediante la regulación de la ruta adenilato ciclasa-proteína cinasa⁽¹⁶⁸⁾, ya que en el hipocampo existen una mayor densidad de MEL-R del tipo MT₂^(119,139). *Hogan y Cols. (2001)*⁽⁷³⁾ y *Musshoff y Cols. (2002)*⁽¹¹⁹⁾ y *2003*⁽¹²⁰⁾ reportaron que el Luzindol, un antagonista a los



receptores MT_2 bloquea los efectos de MEL en la ruta CS-CA1^(73,119,120). Al respecto Wang y Cols. (2005) demostraron que el Luzindol bloquea la inhibición de LTP en la misma ruta⁽¹⁶⁸⁾, lo que indica que los efectos de MEL en ésta ruta están mediados por los receptores membranales MT_2 ^(73,120,126,168), existen reportes donde mencionan que el Luzindol es un antagonista de ambos subtipos de MEL-R, sin embargo, se reporta que Luzindol tiene preferencia a MT_2 ^(46,47,93,151). El-Sherif y Cols. (2002)⁽¹¹⁶⁾ mostraron que la sensibilidad en las rebanadas hipocampales depende de la expresión de los MEL-R en estas y como se discutió anteriormente, la densidad de MEL-R entre otros aspectos está regulada por el ciclo luz-oscuridad⁽⁷²⁾.

Con relación al LTP se ha reportado que la MEL bloquea la inducción de este en las regiones CA1 y giro dentado del hipocampo^(31,51,73,168). Larson y Cols. (2006)⁽⁹⁶⁾ reportaron una reducción del LTP en la región CS-CA1 de animales knock-out a los receptores MT_2 de MEL.

Se puede decir al respecto que el efecto depresor de la MEL se podría llevar a cabo a través de interacciones con MEL-R o con otros receptores o canales iónicos^(9,19,75,120,164,167,172). Situación que se ha demostrado en estudios anticonvulsivos, ansiolíticos y motores donde la MEL es inhibida por flumazenil, indicando cercana relación con los receptores benzodiazepínicos^(19,65,66,67,130), por lo que es posible que la MEL actué sobre el receptor GABA (Olsen 1981⁽³⁹⁾). Se ha especulado que los procesos intracelulares postulados permiten una inhibición parcial del receptor $GABA_a$ en las neuronas CA1 las cuales incrementan la excitabilidad debido a una desinhibición⁽¹²⁰⁾.

Evidencias experimentales muestran que la MEL tiene una acción inhibitoria en la actividad neuronal⁽¹²⁰⁾. La acción inhibitoria de MEL en la actividad epiléptica se ha reportado en una amplia variedad de modelos de epilepsia en humanos y animales de laboratorio⁽¹²⁰⁾. La MEL afecta las neuronas del NSQ teniendo una acción inhibitoria debido a la hiperpolarización de las neuronas mediada por la activación de la conductancia de K^+ y el incremento de la inducción de receptores $GABA_a$ ⁽¹²⁰⁾.

Con respecto al comportamiento bifásico de MEL observado en la curva (Gráficas 1 y 2) al comparar la concentración de $15\mu M$ con las otras concentraciones, también se observa un comportamiento bifásico en la concentración de $45\mu M$ (Gráfica 8), ya que al inicio del registro se observa una disminución y a los 45 minutos de haber iniciado el registro, se observa un incremento de los PPSE; probablemente el incremento electrofisiológico esté mediado a través de glutamato quien actúa en la región hipocampal permitiendo la entrada de Ca^{2+} mediante los receptores NMDA. Se sabe que a bajas



concentraciones la MEL puede actuar sobre receptores de Glutamato y serotonina y a concentraciones altas la MEL actúa sobre los receptores GABA, así el efecto bifásico de MEL puede ser explicado con estas aseveraciones^(50,136,108). Otra posible explicación puede ser que MEL activa dos subtipos de receptores en el Hipocampo, el receptor MT₂ puede inducir disminución en el promedio de la amplitud de la espiga, mientras que un segundo subtipo de receptor puede mediar el incremento de la amplitud de la espiga, hipótesis que se ha relacionado con el efecto bifásico de MEL en otros tejidos^(40,100), para verificar esta hipótesis es necesario contar con agonistas selectivos a cada subtipo de MEL-R, para poder saber si la actividad bifásica de MEL en rebanadas de cerebro de rata esta mediada por diferentes subtipos de MEL-R, ya que las diferencias en la secuencia de aminoácidos se ve reflejada en diferentes perfiles farmacológicos para cada subtipo de MEL-R⁽⁴⁴⁾.

En el hipocampo la posibilidad de que la MEL interactúe con ambos sistemas de neurotransmisores excitadores e inhibidores^(52,53,137,144,167,177) la hace un potencial regulador de procesos que contribuyen a la formación de la memoria^(52,126,168).

Además de las funciones reguladoras de MEL en el ciclo circadiano, esta sustancia juega un papel importante en la actividad epiléptica por lo que sus derivados pueden ser candidatos como ansiolíticos^(121a), anticonvulsivos⁽¹⁷⁶⁾, antiepilépticos^(23,120,121a,133), ser útiles en el tratamiento de otros padecimientos por tener efectos similares a MEL^(36,56,82,84,93,158,160,178) y ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de la MEL^(7,54,157).

En cuanto a los análogos de MEL, al tener los compuestos M3C y M2B una estructura similar (solo difiriendo del radical en la posición 1 del anillo indólico), y debido a las variaciones estructurales estos compuestos podían haber presentado 3 de los siguientes efectos: 1) ser más activos que MEL, 2) no ser activos o 3) ser casi igual de activos que MEL en la región hipocampal CA1. Al ser aplicados se encontró que ambos análogos producen una inhibición de los PPSE mayor a como lo hace la MEL^(9,12,52,176) a la concentración de 30 μ M, esto puede explicarse por los sustituyentes de los análogos los cuales proporcionan una mayor lipofilia al compuesto lo que pudiera relacionarse con una mayor absorción, además en relación al núcleo indólico de la melatonina, éste presenta dos lóbulos de densidad de carga, se esperaría que aquellos compuestos que mantengan dichas zonas tendrán una actividad biológica similar a MEL y si se mantienen constantes los grupos 5-metoxilo y acetamido pero se incorporan sustituyentes al núcleo indólico que modifiquen las propiedades electrónicas de este farmacóforo se podrán alterar las propiedades biológicas de la melatonina⁽¹⁰⁰⁾, por lo que la unión ligando



receptor puede ser mayor. Cabe recalcar que no se sabe específicamente sobre que receptores actúa cada análogo, tal vez pueden actuar a través de MT_2 como MEL además de ser el subtipo con mayor expresión en esta zona hipocámpal, ya que algunos autores reportan que el grupo *N*-acetil presente en 2- I^{125} MEL puede interaccionar con el segundo dominio del receptor MT_2 ⁽¹¹³⁾ y que la afinidad al receptor MT_2 se incrementa con el aumento del tamaño de este grupo y que disminuye la afinidad al receptor MT_1 ⁽⁵⁵⁾, este grupo está presente en los análogos y debido a las modificaciones realizadas en éstos la densidad electrónica en M3C se ve modificada (Fig. 23), por lo que tal vez esto pudiera explicar porque son más activos que MEL, también se ha reportado que el R- 5 metoxi⁽⁵⁶⁾ influye en la afinidad con el receptor, si observamos la densidad electrónica de nuestros análogos podemos observar que el análogo M3C tiene una mayor densidad en esta zona que MEL.

Al observar en la Tabla 3 aproximadamente a los 45 min. de haber iniciado el registro ambos análogos incrementan su actividad sobre las neuronas hipocámpales, efecto que se ve más marcado en el análogo M2B en comparación con M3C (Gráfica 6) esto permite plantear dos hipótesis que debido a que M3C y M2B tienen una estructura similar a MEL su metabolismo pueda ser muy cercano a MEL la cual a los 30 min. empieza a metabolizarse y/o bien que presenten un efecto bifásico en el que inicialmente haya una inhibición y posteriormente haya un incremento de la actividad neuronal como MEL^(51,73) a una concentración de $45\mu M$ para corroborar esto sería útil realizar una curva de los análogos como se hizo con MEL.

Se observa que la actividad de los análogos M3C y M2B a una concentración de $30\mu M$ es similar a MEL a $45\mu M$ por lo que se puede decir que los análogos son más potentes que MEL. Al comparar los dos análogos con MEL se puede observar que el comportamiento de M3C es muy similar a MEL (Gráfica 9) por lo que la presencia del grupo polar fenilo permite un comportamiento semejante a MEL, así estudios electrofisiológicos de M3C y M2B concuerdan con otros ensayos realizados a estos análogos⁽¹⁰⁰⁾.

Con respecto al análogo M2B cabe mencionar que en ocasiones se obtenían multiespigas, este efecto puede ser debido a la potencia de la actividad intrínseca del análogo, sin embargo esta respuesta no pudo ser analizada debido a que el programa pClamp solo puede analizar una espiga, no multiespigas, por lo que se trabajó hasta obtener una sola espiga para poder ser analizada y comparada. Esta actividad del M2B puede tal vez explicarse a través de otros modelos en donde M2B ha mostrado tener un



comportamiento distinto a MEL, ya que en un estudio de ansiedad se encontró a M2B como un ansiogénico, en vez de ser un ansiolítico⁽¹⁰⁰⁾, en la evaluación de M2B sobre la actividad contráctil del duodeno de rata presentó poca actividad como agente relajante del músculo liso, por el contrario, este compuesto se comportó como agente estimulante del tejido a concentraciones bajas⁽¹⁰⁰⁾; en los estudios de afinidad muestra el mejor valor de afinidad de su serie por lo que debería ser muy activo^(100,101), estas aseveraciones pueden explicar el comportamiento bifásico de M2B a una concentración de 30 μ M sobre las rebanadas de hipocampo de rata y que en ocasiones en el registro se observaron multiespigas, una posible respuesta a este comportamiento sería que M2B es un antagonista a los MEL-R ya que presenta afinidad al receptor pero una baja actividad biológica en ensayos funcionales⁽¹⁰⁰⁾; sin embargo es necesario realizar más estudios que involucren diferentes concentraciones de M2B para establecer un posible efecto bifásico dependiente de la concentración en rebanadas de hipocampo de rata e interacciones farmacológicas para determinar si M2B es un agonista o un antagonista.

Al finalizar cada registro obtenido con los diferentes compuestos se aplicó LTP, para determinar la viabilidad de la rebanada y asegurar que los resultados obtenidos se presentan por la aplicación de la sustancia. Como se puede observar en las Gráficas 1, 2 y 3 en los minutos posteriores a la aplicación del LTP el promedio de la amplitud de la espiga, aumenta alcanzando un valor similar al del registro control (preadministración). Esta inducción de LTP involucra un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular el cual controla la expresión de LTP en sinapsis individuales⁽¹⁴⁶⁾. En condiciones basales la estimulación de las CS induce potenciales postsinápticos excitadores (PPSE) de las neuronas Piramidales CA1 principalmente por la activación de los receptores AMPA y su modulación con la inhibición de GABA⁽¹⁴⁶⁾. Durante las estimulaciones tetánicas en las neuronas piramidales hay un incremento en la liberación de glutamato, resultado de una fuerte activación de los receptores NMDA postsinápticos⁽¹⁴⁶⁾.

Entonces, la estimulación tetánica eléctrica para obtener LTP en hipocampo⁽¹⁵⁶⁾ causa incremento extracelular del ion K⁺, liberación del neurotransmisor excitador Glutamato, disminución de los niveles extracelulares de [Ca²⁺] y elevación de los niveles intracelulares de [Ca²⁺]⁽¹⁴²⁾. Estos antecedentes proponen que el LTP en las sinapsis de las CS-CA1 piramidal requieren modificaciones postsinápticas que son mediadas por la elevación de la concentración intracelular de los iones Ca²⁺, que dispara también la activación de receptores tipo NMDA o por mecanismos no NMDA⁽¹⁴²⁾, esta propuesta se



basa en reportes que mencionan la inducción de LTP dentro de la ruta de las CS que es críticamente dependiente de la activación postsináptica de receptores de NMDA⁽¹⁴⁹⁾.

De los resultados experimentales se puede decir que los compuestos sintetizados actúan de forma similar a MEL, presumiéndose que dicha acción es mediada por los MEL-R, cabe señalar que en este modelo de rebanadas después de la adición del compuesto a evaluar, registro y posteriormente la aplicación del LTP y del lavado del tejido, se restableció la respuesta del tejido, lo que indica que los receptores responsables de la respuesta se localizan en la superficie de la membrana.

IX. CONCLUSIONES

Con el presente estudio no es suficiente para esclarece el mecanismo por el cual MEL influye sobre los PPSE. Sin embargo se pueden llegar a las siguientes conclusiones.

1. La MEL produce un efecto excitador de los potenciales evocados (espiga poblacional), en la región CA1 hipocampal a la concentración de 15 μ M y produce depresión de los potenciales evocados (espiga poblacional), en la región CA1 hipocampal a las concentraciones de 30, 45 y 90 μ M.
2. El M3C produce depresión de los potenciales evocados en la región CA1 hipocampal, a 30 μ M mayor a MEL a 30 μ M.
3. El M3C produce depresión de los potenciales evocados en la región CA1 hipocampal, a 30 μ M similar a MEL a 45 μ M.
4. El M2B produce una mayor depresión de los potenciales evocados, en la región CA1 hipocampal, a 30 μ M comparado con MEL a 30 μ M.
5. El M2B produce una mayor depresión de los potenciales evocados, en la región CA1 hipocampal, a 30 μ M comparado con MEL a 45 μ M..
6. Comparando el análogo M2B con MEL y M3C, el análogo M2B produce una mayor depresión de los potenciales evocados, en la región CA1 hipocampal, a 30 μ M comparado con el análogo M3C μ M y MEL a 30 y 45 μ M .
7. Los análogos M3C y M2B tienen un comportamiento similar (de depresión) a MEL en potenciales evocados, en la región CA1 hipocampal, siendo más potentes que MEL en concentraciones iguales.



X. REFERENCIAS

1. **Ackermann K, Stehle JH.** "Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties." *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):369-79.
2. **Afifi, Adel K.;** "Neuroanatomía funcional" *Mc Graw Hill México* 2004 pp428-437 Cap 21: Sistema límbico.
3. **Andersen P, Moser EI.** "Brain temperature and hippocampal function." *Hippocampus.* 1995;5(6):491-8.
4. **Arendt J.** "Jet-lag and shift work: (2). Therapeutic use of melatonin." *J R Soc Med.* 1999;92(8):402-5.
5. **Arendt J.** "Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology." *Rev Reprod.* 1998;3(1):13-22
6. **Arendt J.** "Melatonin: characteristics, concerns, and prospects". *J Biol Rhythms.* 2005;20(4):291-303.
7. **Audinot V, Mailliet F, Lahaye-Brasseur C, Bonnaud A, Le Gall A, Amossé C, Dromaint S, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, Malpoux B, Guillaumet G, Lesieur D, Lefoulon F, Renard P, Delagrangre P, Boutin JA.** "New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367(6):553-61.
8. **Avery D, Lenz M, Landis C.** "Guidelines for prescribing melatonin." *Ann Med.* 1998;30(1):122-30.
9. **Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H.** "Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones." *Neurosci Lett.* 2001 2;313(1-2):73-7.
10. **Barrenetxe J., Delagrangre P., Martinez J.A.** "Physiological and metabolic functions of melatonin." *J Physiol Biochem.* 2004;60(1):61-72
11. **Bartsch C, Bartsch H.** "Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals." *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:247-64.
12. **Baydas G, Kutlu S, Naziroglu M, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Kelestimur H.** "Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine." *J Pineal Res.* 2003;34(1):36-9.
13. **Bear MF, Connors BW, Paradiso M.A.** "Neurociencia : explorando el cerebro" Cap: 19 Sistemas de la memoria. *Edit Masson Barcelona* 2002 pp536-536-540
14. **Becker S, Liu X.** "Evaluation of the utility of brain slice methods to study brain penetration". *Drug Metab Dispos.* 2006;34(5):855-61.
15. **Bissière Stéphanie.** "Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity in the Lateral Amygdala". *Universidad Basel Francia* 2004.



16. **Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT.** "Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy." *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):113-32.
17. **Borjigin J, Li X, Snyder SH.** "The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation." : *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:53-65.
18. **Bourin M, Mocaër E, Porsolt R.** "Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors." *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29(2):126-33.
19. **Bourne JN, Kirov SA, Sorra KE, Harris KM.** "Warmer preparation of hippocampal slices prevents synapse proliferation that might obscure LTP-related structural plasticity". *Neuropharmacology.* 2007;52(1):55-9..
20. **Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE.** "Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004,5;101(40):14515-20.
21. **Brotto LA, Gorzalka BB.** "Melatonin enhances sexual behavior in the male rat". *Physiol Behav.* 2000;68(4):483-6.
22. **Bruls E, Crasson M, Van Reeth O, Legros JJ.** "Melatonin. II. Physiological and therapeutic effects" *Rev Med Liege.* 2000;55(9):862-70.
23. **Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Pang SF, Reiter RJ, Viswanathan M, Zisapel N.** "Prospects of the clinical utilization of melatonin." *Biol Signals Recept.* 1998;7(4):195-219
24. **Bubenik GA.** "Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance." *Dig Dis Sci.* 2002;47(10):2336-48.
25. **Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, Pandya R, Tjosvold L, Hartling L, Vohra S, Klassen TP, Baker G.** "Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis." *BMJ.* 2006, 18;332(7538):385-93.
26. **Buscemi N, Vandermeer B, Pandya R, Hooton N, Tjosvold L, Hartling L, Baker G, Vohra S, Klassen T.** "Melatonin for treatment of sleep disorders". *Evid Rep Technol Assess (Summ).* 2004;(108):1-7.
27. **Cardinali DP, Brusco LI, Liberczuk C, Furio AM.** "The use of melatonin in Alzheimer's disease". *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23 Suppl 1:20-3.
28. **Cardinali DP, Brusco LI, Lloret SP, Furio AM.** "Melatonin in sleep disorders and jet-lag". *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23 Suppl 1:9-13.
29. **Cardinali DP, Furio AM, Reyes MP.** "Clinical perspectives for the use of melatonin as a chronobiotic and cytoprotective agent". *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1057:327-36.
30. **Castilla Serna L., Cravioto J.** "Estadística simplificada. Para la investigación en ciencias de la salud." Cap. 23 Prueba t de Student para muestras independientes. Cap 24. Prueba t de Student para muestras dependientes *Edit. Trillas México* 1991.pp241-251.



31. **Collins DR, Davies SN.** "Melatonin blocks the induction of long-term potentiation in an N-methyl-D-aspartate independent manner." *Brain Res.* 1997 29;767(1):162-5.
32. **Conn P. Michael y Freeman Marc E.** "Neuroendocrinology in Physiology and Medicine" *Human* EUA 2000. pp 405-432.
33. **Da Silva BM, de Mendonca A, Ribeiro JA.** "Long-term depression is not modulated by ATP receptors in the rat CA1 hippocampal region". *Neurosci Lett.* 2005, 5;383(3):345-9.
34. **Dawson D, Van den Heuvel CJ.** "Integrating the actions of melatonin on human physiology." *Ann Med.* 1998;30(1):95-102.
35. **De Castro Aguiar Paulo,** "A General Hippocampal Computational Model, Combining Episodic and Spatial Memory in a Spiking Model", *Institute for Adaptive and Neural Computation School of Informatics University of Edinburgh* 2005.
36. **Delagrange P, Boutin JA.** "Therapeutic potential of melatonin ligands". *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):413-8.
37. **Dhanaraj E, Nemmani KV, Ramarao P.** "Melatonin inhibits the development of tolerance to U-50,488H analgesia via benzodiazepine-GABAergic mechanisms". *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;79(4):733-7.
38. **Di Mascio P, Dewez B, Garcia CR.** "Ghost protein damage by peroxy nitrite and its protection by melatonin". *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(1):11-7.
39. **Dingledine R, Dodd J, Kelly JS.** "The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording". *J Neurosci Methods.* 1980;2(4):323-62.
40. **Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP.** "Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle." *Eur J Pharmacol.* 1998 12;345(1):67-9
41. **Dorantes Cuella Y.; Martinez C; Guzmán A.** "Endocrinología clínica" 2da edición. Cap. 10: Glándula Pineal *El Manual Moderno México* 2005 pp 93-99.
42. **Drucker CR.** "Fisiología Médica" Cap.82: Sistema Límbico. *El manual Moderno México* 2005. pp885-886.
43. **Dubocovich ML, Markowska M.** "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." *Endocrine.* 2005;27(2):101-10.
44. **Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM.** "Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mella and Mellb recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;355(3):365-75.
45. **Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI.** "Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors." *Front Biosci.* 2003 1;8:d1093-108
46. **Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI.** "Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms." *FASEB J.* 1998;12(12):1211-20.



47. **Dubocovich ML.** "Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist." *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 246(3):902-10.
48. **Dubocovich ML.** "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?". *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(2):50-6.
49. **Dubocovich ML.** "Pharmacology and function of melatonin receptors." *FASEB J.* 1988;2(12):2765-73.
50. **Ebert E, Hanke W, Wiedemann M, Fernandes de Lima VM.** "Biphasic effects of melatonin on the propagation of excitation waves in the chicken retina" *Neurosci Lett.* 1999; 11;268(1):37-40.
51. **El-Sherif Y, Hogan MV, Tesoriero J, Wieraszko A.** " Factors regulating the influence of melatonin on hippocampal evoked potentials: comparative studies on different strains of mice." *Brain Res.* 2002; 2;945(2):191-201.
52. **El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan MV, Wieraszko A.** "Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus." *J Neurosci Res.* 2003 15;72(4):454-60.
53. **Escames G, Macias M, Leon J, Garcia J, Khaldy H, Martin M, Vives F, Acuna-Castroviejo D.** "Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum." *J Neuroendocrinol.* 2001;13(5):459-66.
54. **Faust R, Garratt PJ, Jones R, Yeh LK, Tsotinis A, Panoussopoulou M, Calogeropoulou T, Teh MT, Sugden D.** "Mapping the melatonin receptor. 6. Melatonin agonists and antagonists derived from 6H-isoindolo[2,1-a]indoles, 5,6-dihydroindolo[2,1-a]isoquinolines, and 6,7-dihydro-5H-benzo[c]azepino[2,1-a]indoles". *J Med Chem.* 2000 23;43(6):1050-61.
55. **Faust R, Garratt PJ, Trujillo Pérez MA, Piccio VJ, Madsen C, Stenstrøm A, Frølund B, Davidson K, Teh MT, Sugden D.** "7-Substituted-melatonin and 7-substituted-1-methylmelatonin analogues: Effect of substituents on potency and binding affinity". *Bioorg Med Chem.* 2007; 1;15(13):4543-51
56. **Fitzgerald Laura R., Reed E. Jessica.** "Melatonin Agonists for the Treatment of Sleep Disorders and Major Depression" *Annu Rep Med Chem* 2004,39, 25-37
57. **Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J.** "Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(1):E11-22
58. **Fujii S, Kato H, Kuroda Y.** " Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices." *Neurosci Lett.* 1999 26;276(1):21-4.
59. **Gao ZB, Chen XQ, Hu GY,**"Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus". *Brain Res.* 2006, 21;1111(1):41-7.
60. **Gaser C, Schlaug G.** "Brain structures differ between musicians and non-musicians." *J Neurosci.* 2003 8;23(27):9240-5.
61. **Gasparova Z, Stolic S, Snirc V.**" In vitro physiological evidence of enhanced antioxidant and neuroprotective action of 2,3-dihydromelatonin, a melatonin analogue." *Pharmacol Res.* 2006;53(1):22-7.



62. **Gerdin MJ, Masana MI, Dubocovich ML.** “Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells.” *Biochem Pharmacol.* 2004 1;67(11):2023-30.
63. **Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermúdez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gillette MU, Dubocovich ML.** “Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin.” *FASEB J.* 2004;18(14):1646-56
64. **Gerdin MJ, Mseeh F, Dubocovich ML.** “Mutagenesis studies of the human MT2 melatonin receptor.” *Biochem Pharmacol.* 2003 15;66(2):315-20.
65. **Golombek DA, Escolar E, Burin LJ, De Brito Sanchez MG, Cardinali DP.** “Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism.” *Eur J Pharmacol.* 1991 26;194(1):25-30.
66. **Golombek DA, Escolar E, Cardinali DP.** “Melatonin-induced depression of locomotor activity in hamsters: time-dependency and inhibition by the central-type benzodiazepine antagonist Ro 15-1788.” *Physiol Behav.* 1991;49(6):1091-7.
67. **Golombek DA, Fernandez Duque D, De Brito Sanchez MG, Burin L, Cardinali DP.** “Time-dependent anticonvulsant activity of melatonin in hamsters”. *Eur J Pharmacol.* 1992 21;210(3):253-8.
68. **Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP.** “Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system”. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996;20(3):403-12.
69. **Greenspan S. F.** “Endocrinología básica y clínica” El manual moderno 6ta Edición México 2005 pp 128-129 .
70. **Gur RC, Turetsky BI, Matsui M, Yan M, Bilker W, Hughett P, Gur RE.** “Sex differences in brain gray and white matter in healthy young adults: correlations with cognitive performance.” *J Neurosci.* 1999 15;19(10):4065-72.
71. **Hagan RM, Oakley NR.** “Melatonin comes of age?” *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(3):81-3.
72. **Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP.** “Melatonin.” *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):313-6
73. **Hogan MV, El-Sherif Y, Wieraszko A.** “The modulation of neuronal activity by melatonin: in vitro studies on mouse hippocampal slices.” *J Pineal Res.* 2001;30(2):87-96.
74. **Houssay B. Alberto, Ciangolani Horacio E.** “Fisiología Humana de Houssay” 9na Edición. Cap. 49 Fisiología de la glándula Pineal. *Edit. El ateneo Argentina* 2000 pp. 632-636
75. **Huan C, Zhou M, Wu M, Zhang Z, Mei Y.** “Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K⁺ current in rat cerebellar granule cells.” *Brain Res.* 2001 2;917(2):182-90.



76. **Huang YY, Kandel ER**, "D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 28;92(7):2446-50.
77. **Huether G**. "The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates." *Experientia*. 1993 15;49(8):665-70.
78. **Jara Albarrán A**. "Endocrinología". Cap. 5: Neuroendocrinología hipotálamo y glándula pineal. *Edit., Médica Panamericana España* 2003 pp30-34.
79. **Jiang ZG, Nelson CS, Allen CN**. "Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons." *Brain Res*. 1995; 31;687(1-2):125-32.
80. **Jinno S, Kosaka T**. "Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology". *Neurosci Res*. 2006 ;56(3):229-45.
81. **Kandel E.R.**. "Principios de neurociencia" *Mc Graw Hill* 2001. Madrid España 4ta edición.
82. **Karasek M**. "Melatonin, human aging, and age-related diseases". *Exp Gerontol*. 2004 ;39(11-12):1723-9.
83. **Karbownik M, Reiter RJ**. "Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation." *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000; 225(1):9-22.
84. **Karbownik M**. "Potential anticarcinogenic action of melatonin and other antioxidants mediated by antioxidative mechanisms." *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23 Suppl 1:39-44.
85. **Khazipov R, Congar P, Ben-Ari Y**, "Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: modulation of monosynaptic GABAergic IPSCs by presynaptic GABA_B receptors", *J Neurophysiol*. 1995;74(5):2126-37.
86. **Knight JA, Thompson S, Raboud JM, Hoffman BR**. "Light and exercise and melatonin production in women." *Am J Epidemiol*. 2005 Dec 1;162(11):1114-22.
87. **Kohyama J**. "Late nocturnal sleep onset impairs a melatonin shower in young children." *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23(5-6):385-6.
88. **Kuenzi FM, Fitzjohn SM, Morton RA, Collingridge GL, Seabrook GR**. "Reduced long-term potentiation in hippocampal slices prepared using sucrose-based artificial cerebrospinal fluid" *J Neurosci Methods*. 2000 31;100(1-2):117-22.
89. **Kumar V**. "Melatonin: a master hormone and a candidate for universal panacea" *Indian J Exp Biol*. 1996;34(5):391-402.
90. **Kvetnoy IM, Ingel IE, Kvetnaia TV, Malinovskaya NK, Rapoport SI, Raikhlin NT, Trofimov AV, Yuzhakov VV**. "Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role." *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23(2):121-32.
91. **Kvetnoy IM**. "Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness." *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23 Suppl 1:92-6.



92. **Kvetnoy IM.** "Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system." *Histochem J.* 1999;31(1):1-12.
93. **L. Drazen Deborah, Nelson Randy J.** "Melatonin Receptor Subtype MT2 (Mel 1b) and Not mt1 (Mel 1a) Is Associated with Melatonin-Induced Enhancement of Cell-Mediated and Humoral Immunity" *Neuroendocrinology* 2001;74:178-184
94. **Langer M, Hartmann J, Turkof H, Waldhauser F.** "Melatonin in the human--an overview" *Wien Klin Wochenschr.* 1997 3;109(18):707-13.
95. **Larson J, Jessen RE, Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Manev H,** "Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice". *Neurosci Lett.* 2006 23;393(1):23-6.
96. **Larson J, Jessen RE, Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Manev H.** "Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice." *Neurosci Lett.* 2006 23;393(1):23-6.
97. **Lauri SE, Palmer M, Segerstrale M, Vesikansa A, Taira T, Collingridge GL.** "Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus". *Neuropharmacology.* 2007;52(1):1-11.
98. **Leon J, Vives F, Gomez I, Camacho E, Gallo MA, Espinosa A, Escames G, Acuna-Castroviejo D.** "Modulation of rat striatal glutamatergic response in search for new neuroprotective agents: evaluation of melatonin and some kynurenine derivatives". *Brain Res. Bull.* 45, 525-530.
99. **Lima L. M. B., Reis L. C. y Lima M. A.** "Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats", *Rev. Brasil. Biol.,* 61(2): 333-340, 2001.
100. **Lira Rocha A. S.** "Obtención de análogos de melatonina como posibles agonistas o antagonistas". UNAM Posgrado de Ciencias Químicas 2006.
101. **Lira-Rocha A, Espejo-González O, Naranjo-Rodríguez EB.,** "Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues", *Eur. J. Med. Chem.,* Vol. 37,12, 2002, pp. 945-51.
102. **Lissoni P.** Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer.* 2002;10(2):110-6.
103. **Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuizen J, Hofman MA, Swaab DF.** "Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-epsilon4/4 genotype". *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(1):323-7.
104. **M. Mila Macchi, JeVrey N. Bruce.** "Human pineal physiology and functional significance of melatonin" *Frontiers in Neuroendocrinol.* 25, 177-195,2004.
105. **Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ.**"Metabolism of melatonin by human cytochromes p450". *Drug Metab Dispos.* 2005;33(4):489-94.
106. **Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD.** "Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000,11;97(8):4398-403.



107. **Maharaj DS, Maharaj H, Daya S, Glass BD.** "Melatonin and 6-hydroxymelatonin protect against iron-induced neurotoxicity." *J Neurochem.* 2006;96(1):78-81.
108. **Mantovani M, Pértile R, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL.** "Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway." *Neurosci Lett.* 2003 29;343(1):1-4.
109. **Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sondhein D, Paul SM, Skolnick P, Goodwin FK.** "Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine." *Life Sci.* 1981 20;29(3):259-67.
110. **Mason R, Brooks A.** "The electrophysiological effects of melatonin and a putative melatonin antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro." *Neurosci Lett.* 1988 19;95(1-3):296-301.
111. **Mason R, Rusak B.** "Neurophysiological responses to melatonin in the SCN of short-day sensitive and refractory hamsters." *Brain Res.* 1990;12;533(1):15-9.
112. **Matthews RT, Coker O, Winder DG.** "A novel mouse brain slice preparation of the hippocampo-accumbens pathway". *J Neurosci Methods.* 2004;15;137(1):49-60.
113. **Mazna P, Berka K, Jelinkova I, Balik A, Svoboda P, Obsilova V, Obsil T, Teisinger J.** "Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: the role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7." *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 8;332(3):726-34.
114. **Mazna P, Obsilova V, Jelinkova I, Balik A, Berka K, Sovova Z, Ettrich R, Svoboda P, Obsil T, Teisinger J.** "Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val204, Leu272 and Tyr298 in ligand binding". *J Neurochem.* 2004;91(4):836-42.
115. **Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM.** "The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies." *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;39(1-2):117-26.
116. **Menéndez de la Prida Liset** "Las flechas de Cajal" *Tecno Ciencia*, Periódico Gratuito de divulgación científico-técnica. 2006 año 1 No. 3 .
117. **Motoyama A, Kanda T, Namba R.** "Direct determination of endogenous melatonin in human saliva by column-switching semi-microcolumn liquid chromatography/mass spectrometry with on-line analyte enrichment." *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(12):1250-8.
118. **Munoz-Hoyos A, Sanchez-Forte M, Molina-Carballo A, Escames G, Martin-Medina E, Reiter RJ, Molina-Font JA, Acuna-Castroviejo D.** "Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: experimental and clinical evidence." *J Child Neurol.* 1998 ;13(10):501-9.
119. **Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ.** "Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations." *Hippocampus.* 2002;12(2):165-73.



120. **Musshoff U, Speckmann EJ.** “Diurnal actions of melatonin on epileptic activity in hippocampal slices of rats”. *Life Sci.* 2003 3;73(20):2603-10.
- 121 **Nakajima R, Nakamura T, Ogawa M, Miyakawa H, Kudo Y.** “Novel method for quantification of brain cell swelling in rat hippocampal slices”. *J Neurosci Res.* 2004 1;76(5):723-33.
- 121.a **Naranjo-Rodriguez EB, Osornio AO, Hernandez-Avitia E, Mendoza-Fernández V, Escobar A.** “Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxtryptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure”. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2000;24(1):117-29
122. **Nelson CS, Marino JL, Allen CN.** “Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels.” *Neuroreport.* 1996; 29;7(3):717-20.
123. **Noseda R, Hernandez A, Valladares L, Mondaca M, Laurido C, Soto-Moyano R.** “Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent”. *Neurosci Lett.* 2004 22;360(1-2):41-4.
124. **Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrance P, Canet E, Boutin JA.** “Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2.” *J Biol Chem.* 2000;275(40):31311-7.
125. **Olsen RW.** “The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs.” *Mol Cell Biochem.* 1981 25;39:261-79.
126. **Ozcan M, Yilmaz B, Carpenter DO.** “Effects of melatonin on synaptic transmission and long-term potentiation in two areas of mouse hippocampus.” *Brain Res.* 2006 21;1111(1):90-4.
127. **Ozdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U, Sonmez A, Acikgoz O, Ozdemir N, Duman M, Ozkan H.** “Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats”, *Neurosci Lett.* 2005 16;385(3):234-9.
128. **Ozguner F, Koyu A, Cesur G.** “Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels.” *Toxicol Ind Health.* 2005;21(1-2):21-6.
129. **Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R.** “Melatonin: Nature's most versatile biological signal?” **FEBS J.** 2006 ;273(13):2813-38.
130. **Pierrefiche G, Zerbib R, Laborit H.** “Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors.” *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993;82(2):131-42.}
131. **Pu L, Bao GB, Xu NJ, Ma L, Pei G.** “Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates”. *J Neurosci.* 2002 1;22(5):1914-21.
132. **Purves D.** “Invitación a la neurociencia” *Edit. Panamericana.* Argentina 2001 pp 477-501.



133. **Quigg M.** "Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy." *Epilepsy Res.* 2000;42(1):43-55.
134. **Ramírez I. Lílido N.** Universidad de Los Andes – Trujillo. "Glándula pineal: el Tercer ojo en rumiantes" *Mundo Pecuario*, Vol. I, N° 3, 49-51, 2005
135. **Redins, G. M., Redins, C. A. And Novaes, J. C.** "The Effect Of Treatment With Melatonin Upon The Ultrastructure Of The Mouse Pineal Gland: A Quantitative Study" *Braz. J. Biol.*, 61(4): 679-684, 2001
136. **Reyes Flores Jenny** "Efecto de la Melatonina, GABA y Diazepam en rebanadas de hipocampo de rata" *UNAM. Facultad de Química* 2007
137. **Saenz DA, Goldin AP, Mincez L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE.** "Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina." *FASEB J.* 2004;18(15):1912-3.
138. **Sanders DC, Chaturvedi AK, Hordinsky JR.** "Melatonin: aeromedical, toxicopharmacological, and analytical aspects". *J Anal Toxicol.* 1999;23(3):159-67.
139. **Savaskan E, Ayoub MA, Ravid R, Angeloni D, Frascini F, Meier F, Eckert A, Muller-Spahn F, Jockers R.** "Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease." *J Pineal Res.* 2005;38(1):10-6.
140. **Savaskan E.** "Melatonin in aging and neurodegeneration". *Drug Dev. Res.* 2002;56:482-490.
141. **Shibata S, Cassone VM, Moore RY.** "Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro." *Neurosci Lett.* 1989; 13;97(1-2):140-4.
142. **Sick TJ, Perez-Pinzon MA, Feng ZZ,** "Impaired expression of long-term potentiation in hippocampal slices 4 and 48 h following mild fluid-percussion brain injury in vivo". *Brain Res.* 1998 Mar 2;785(2):287-92.
143. **Simonneaux V, Ribelayga C.** "Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters" *Pharmacol Rev* 2003, 55, (2):325–395.
144. **Skaper SD, Ancona B, Facci L, Franceschini D, Giusti P.** "Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway." *FASEB J.* 1998;12(9):725-31.
145. **Skene DJ, Lockley SW, Arendt J.** "Use of melatonin in the treatment of phase shift and sleep disorders." *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:79-84.
146. **Sliwinski A, Monnet FP, Schumacher M, Morin-Surun MP.** "Pregnenolone sulfate enhances long-term potentiation in CA1 in rat hippocampus slices through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptors". *J Neurosci Res.* 2004, 1;78(5):691-701.
147. **Stehle J, Vanecek J, Vollrath L.** "Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study." *J Neural Transm.* 1989;78(2):173-7.



148. **Stewart LS, Leung LS.** "Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold". *Epilepsia*. 2005; 46(4):473-80.
149. **Stopps M, Allen N, Barrett R, Choudhury HI, Jarolimek W, Johnson M, Kuenzi FM, Maubach KA, Nagano N, Seabrook GR.** "Design and application of a novel brain slice system that permits independent electrophysiological recordings from multiple slices". *J Neurosci Methods*. 2004 30;132(2):137-48
150. **Sugden D, Pickering H, Teh MT, Garratt PJ.** "Melatonin receptor pharmacology: toward subtype specificity." *Biol Cell*. 1997;89(8):531-7.
151. **Sumaya IC, Masana MI, Dubocovich ML.** "The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors." *J Pineal Res*. 2005;39(2):170-7.
152. **Surges R, Sarvari M, Steffens M, Els T.** "Characterization of rebound depolarization in hippocampal neurons" *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 6;348(4):1343-9.
153. **Terrón Sánchez M^a Del Pilar.** "Melatonina: fagocitosis y metabolismo oxidativo en heterófilos de Streptopeli risoria. Variaciones con la edad". Tesis Doctoral Universidad de Extremadura. Departamento de Fisiología. 2004.
154. **Teyler TJ.** "Brain slice preparation: hippocampus." *Brain Res Bull*. 1980;5(4):391-403.
155. **Thompson AM, Swant J, Wagner JJ.** "Cocaine-induced modulation of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus". *Neuropharmacology*. 2005;49(2):185-94.
156. **Tominaga T, Tominaga Y, Ichikawa M.** "Optical imaging of long-lasting depolarization on burst stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices". *J Neurophysiol*. 2002;88(3):1523-32.
157. **Tsotinis A, Vlachou M, Papahatjis DP, Calogeropoulou T, Nikas SP, Garratt PJ, Piccio V, Vonhoff S, Davidson K, Teh MT, Sugden D.** "Mapping the melatonin receptor. 7. Subtype selective ligands based on beta-substituted N-acyl-5-methoxytryptamines and beta-substituted N-acyl-5-methoxy-1-methyltryptamines." *J Med Chem*. 2006, 15;49(12):3509-19
158. **Turek FW, Gillette MU.** "Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists." *Sleep Med*. 2004;5(6):523-32.
159. **Tuzcu M, Baydas G.** "Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats". *Eur J Pharmacol*. 200610;537(1-3):106-10.
160. **Vachharajani NN, Yeleswaram K, Boulton DW.** "Preclinical pharmacokinetics and metabolism of BMS-214778, a novel melatonin receptor agonist". *J Pharm Sci*. 2003;92(4):760-72
161. **Vanecek J, Klein DC.** "A subpopulation of neonatal gonadotropin-releasing hormone-sensitive pituitary cells is responsive to melatonin." *Endocrinology*. 1993; 133(1):360-7.
162. **Vanecek J.** "Cellular mechanisms of melatonin action." *Physiol Rev*. 1998;78(3):687-721.



163. **Vanecek J.** "Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways." *Mol Cell Endocrinol.* 1995;107(2):149-53.
164. **Varga Z, Panyi G, Peter M Jr, Pieri C, Csecsei G, Damjanovich S, Gaspar R Jr.** "Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3." *Biophys J.* 2001 ;80(3):1280-97.
165. **Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX, Herman TS, Thomas CR Jr.** "Melatonin as a radioprotective agent: a review." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 1;59(3):639-53.
166. **Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR.** "Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction." *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):151-62.
167. **Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM, Wang YT.** "Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors." *Nat Neurosci.* 1999;2(5):401-3.
168. **Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS.** "Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation." *Eur J Neurosci.* 2005;22(9):2231-7.
169. **Wermer Kahle,** "Color Atlas of Human Anatomy", Vol. 3 Nervous System and Sensory Organs *Thieme New York* 2003 pp 10-13, 43-44.
170. **Williams R. H.** "Tratado de endocrinología." 6^{ta} ed. Cap 10: La glándula pineal y órganos periventriculares. Interamericana. 1985 pp 673-677.
171. **Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA.** "Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms". *Life Sci.* 2003 4;72(20):2183-98.
172. **Wu FS, Yang YC, Tsai JJ.** "Melatonin potentiates the GABA(A) receptor-mediated current in cultured chick spinal cord neurons." *Neurosci Lett.* 1999;260(3):177-80.
173. **Ying SW, Rusak B, Delagrangé P, Mocaer E, Renard P, Guardiola-Lemaitre B.** "Melatonin analogues as agonists and antagonists in the circadian system and other brain areas." *Eur J Pharmacol.* 1996 18;296(1):33-42.
174. **Ying SW, Rusak B, Mocaer E.** "Chronic exposure to melatonin receptor agonists does not alter their effects on suprachiasmatic nucleus neurons." *Eur J Pharmacol.* 1998 19;342(1):29-37.
175. **Zeineh MM, Engel SA, Thompson PM, Bookheimer SY.** "Unfolding the human hippocampus with high resolution structural and functional MRI". *Anat Rec.* 2001;265(2):111-20.
176. **Zeise ML, Semm P.** "Melatonin lowers excitability of guinea pig hippocampal neurons in vitro." *J Comp Physiol [A].* 1985;157(1):23-9.
177. **Zhang QZ, Gong YS, Zhang JT.** "Antagonistic effects of melatonin on glutamate release and neurotoxicity in cerebral cortex." *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1999;20(9):829-34.
178. **Zlotos DP.** "Recent advances in melatonin receptor ligands". *Arch Pharm (Weinheim).* 2005;338(5-6):229-47





Estimada Xóchitl P. Vega Acevedo:

Su trabajo para la presentación en póster en el Tercer **Encuentro**

“Participación de la Mujer en la Ciencia” ISBN 968-9241-02-8 titulado “EFECTO DE LA MELATONINA Y ANÁLOGO, SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS EN REBANADAS DE HIPOCAMPO DE RATA” ha sido registrado con la clave S4-MCS02 para presentarse el día VIERNES 19 de Mayo del presente año de 16:00-17:00 hrs (SESIÓN IV) en el salón de usos múltiples del Centro de Investigaciones en Óptica.

Por el comité organizador

M.C. María Eugenia Sánchez Morales
Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.
Loma del Bosque No. 115, Col. Lomas del Campestre
C.P. 37150. LEÓN, GTO. MÉXICO.



México, D.F. a 13 de Julio de 2006

Xóchitl P. Vega Acevedo
Departamento de Farmacia
Facultad de Química , UNAM

Presente

Estimado colega:

Nos complace informarle que el trabajo libre intitulado:

EFFECTO DE ANÁLOGOS DE MELATONINA, SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS EN REBANADAS DE HIPOCAMPO DE RATA

Autores: Vega-Acevedo Xóchitl Patricia, Naranjo-Rodríguez Elia Brosla., Lira-Rocha Alfonso Sebastián

fue **ACEPTADO** por el Consejo Científico para presentarse en la modalidad de **Cartel (Área: Farmacología y Toxicología)**, como parte del programa del **XXXIX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

Le recordamos que este evento se llevará a cabo del 22 al 26 de octubre de 2006 en el Hotel Sheraton Baganvillias, Puerto Vallarta, y que para que el resumen enviado sea publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (indexada por CONACYT), requerimos contar con el comprobante de **inscripción del autor principal** al congreso a más tardar el 31 de Agosto.

Los autores serán responsables de colocar el Cartel en el sitio que se les asigne (ver programa en Hotel sede) desde las 09:00 y hasta las 15:00 horas del día Miércoles 25 de octubre. El autor principal estará obligado a permanecer enfrente del cartel y exponer su trabajo a partir de las 11:15 y hasta las 12:45 horas.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.
Favor de confirmar la recepción del comunicado

Atentamente,

Dra. Dea Herrera Ruíz
Directora de Ciencia y Tecnología

