

Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE QUÍMICA

“Relajación del músculo liso duodenal de rata por administración de melatonina y análogos”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEYDA ALEJANDRA COVA BENITEZ



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Jurado asignado:

Presidente	Prof. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ
Vocal	Prof. ANA MARIA VÁZQUEZ ÁLVAREZ
Secretario	Prof. ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ
1 ^{er} suplente	Prof. ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
2 ^o suplente	Prof. RUTH BUSTAMANTE GARCÍA

Sitio de realización:

UNAM. Laboratorio de Neurofarmacología. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Edificio "A", Lab. 1/E anexo.

Asesor del tema: _____
Dra. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

Supervisor técnico: _____
M en C. CARLOS ARMANDO ZEPEDA VELÁZQUEZ

Sustentante: _____
ALEYDA ALEJANDRA COVA BENITEZ



Se agradece el apoyo otorgado por el UNAM- DGAPA –PAPIIT, para la realización de este proyecto

Se agradece al UNAM-PAIP-Facultad de Química., el apoyo otorgado para la realización de este trabajo



AGRADECIMIENTO A:

Ing. JORGE ZAMORANO VELASCO, por el apoyo para el manejo del software

Lic. en Diseño EFRAÍN MORA GALLEGOS, por la realización del trabajo fotográfico.



ÍNDICE

	PÁGINA
ABREVIATURAS	1
CAPÍTULO I.	
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II.	
GENERALIDADES	
2.1 MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL	4
➤ INTESTINO	4
➤ CARACTERÍSTICAS DE LA PARED GASTROINTESTINAL	5
➤ MOTILIDAD INTESTINAL	6
➤ ACTIVIDAD ELECTRICA DEL MUSCULO LISO	7
➤ TIPOS DE MOVIMIENTO	9
➤ SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO	11
2.2 GLÁNDULA PINEAL	13
➤ ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL O EPÍFISIS	13
➤ HISTORIA	14
2.3 MELATONINA	18
➤ ESTRUCTURA QUÍMICA	18
➤ ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DE MELATONINA	19
➤ POSIBLES APLICACIONES TERAPEUTICAS	20
➤ RECEPTORES A MELATONINA	24
➤ SECRECIÓN DE MELATONINA	26
➤ SÍNTESIS Y METABOLISMO	31
➤ MEL Y DUODENO	33
2.4 ANÁLOGOS DE MEL	34
➤ ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANÁLOGOS DE MELATONINA	35
CAPÍTULO III	
3.1. JUSTIFICACIÓN	38
CAPÍTULO IV	
4.1. HIPÓTESIS	39
4.2. OBJETIVOS	39
CAPÍTULO V	
METODOLOGÍA	
5.1 MATERIAL	40
5.2 MÉTODO	41



CAPÍTULO VI RESULTADOS	47
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES	77
CAPÍTULO IX BIBLIOGRAFÍA	78



ABREVIATURAS

Acetilcolina: Ach
Ácido gamma aminobutírico: GABA
Adenil tri-fosfato: ATP
Adenosinmonofosfato cíclico: AMPc
Amplitud: AMP
Área bajo la curva: ABC
Arlalquilamina N-acetiltransferasa AA-NAT
Colecistokinina: CCK
Curva Dosis Respuesta Gradual: CDRG
Dopamina: DP
Factor de Necrosis Tumoral: TNF
Frecuencias: FREC Gen conexo de péptido calcitonina: CGRP
Ganglio simpático cervical superior: GSCS
Gastrointestinal: GI
Glándula Pineal: GP
Guanosín difosfato: GDP
Guanosín monofosofato cíclico: GMPc
Guanosín trifosfato: GTP
Hidroxindol-O-metiltransferasa: HIOMT
Histamina: H
Interleuquina: IL
Ión calcio: Ca⁺⁺
Ión fósforo: P⁺⁺⁺
Ión sodio: Na⁺
Milivoltios mV
Melatonina: MEL
Natural killer: NK
Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato Hidroxilasa: NADPH
Noradrenalina: NA
Núcleo paraventricular: NPV
Núcleo supraquiasmático: NSQ
Oxido nítrico: NO
Pinelectomia (Px)
Péptido intestinal vasoactivo: VIP
Quinona reductasa de tipo II QR2
Serotonina: 5-HT
Síndrome de fase de sueño retardado: SFSR
Sistema Nervioso Central: SNC
Sistema Nervioso Entérico: SNE
Tracto gastrointestinal: TGI



I. INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que el principal sitio donde se lleva a cabo la síntesis de Melatonina (MEL) (**Fig.1**) es la glándula pineal (GP). La liberación de MEL se realiza de acuerdo a un patrón circadiano, donde su incremento se efectúa durante la noche (escotofase) y se reduce durante la fase de luz (fotofase) (60). Se ha reportado que la MEL, en los mamíferos se produce en diversos órganos y tejidos (6,55), por ejemplo se sintetiza: en el tracto gastrointestinal (TGI) de roedores, encontrando altas concentraciones de MEL en el recto, colon y duodeno y bajas concentraciones en íleo (6,26)

Todo esto ha permitido describir también, sitios de unión de alta y baja afinidad a MEL en el TGI de humanos (52,53) donde se plantea que hay una variación significativa en la densidad de los sitios de unión a lo largo del intestino con un máximo en duodeno, yeyuno e íleo, y un mínimo en el colon (35)

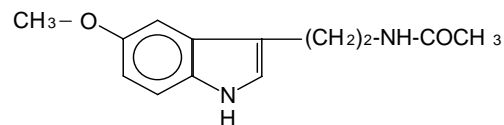


Fig. 1. Estructura molecular de la melatonina (22).

Estos antecedentes nos llevan a plantearnos preguntas del papel fisiológico de la MEL intestinal y la MEL pineal sobre las funciones gastrointestinales, ya que se han planteado hipótesis que dicen que probablemente la MEL puede servir como un regulador local por un mecanismo paracrino (27). También se ha planteado que la MEL puede participar en algunas



funciones intestinales como el transporte de iones y agua (36) proliferación epitelial (37) y citoprotección gástrica (6), por un lado.

Por otro lado, se ha demostrado “In Vitro” que la MEL inhibe la motilidad espontánea de ambos intestinos, grueso y delgado (6,26) que bloquean la motilidad inducida con serotonina (5-HT) (54).

Estudios previos determinaron en ratas que la MEL plasmática tiene un tiempo de vida de 10-40 minutos, situación que no permite utilizarla como fármaco o medicamento por lo tanto, estudios actuales están encaminados a encontrar sustancias análogas a MEL; con un mejor tiempo de vida media; así pues, los análogos que hay se sintetizan de acuerdo con estudios previos con radiolingandos como la iodomelatonina que se usa para determinar los sitios de unión entre la MEL y sus receptores. Estos estudios han permitido encontrar al núcleo indólico y catalogarlo como un sitio importante para las interacciones con transferencia de cargas de electrones con el receptor (38).

Estos análogos a MEL se sintetizaron con el fin de encontrar alguno con propiedades que proporcionen una mayor afinidad al sitio de unión, pero antes de demostrar esto es necesario realizar estudios preliminares “In Vitro” convencionales donde demostramos que los análogos presentan el mismo efecto que la MEL en el duodeno.



II. GENERALIDADES

2.1 MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL

➤ INTESTINO

El intestino delgado es la porción del tubo digestivo que comprende desde la válvula pilórica hasta la válvula ileocecal (20) (**Fig. 2**).

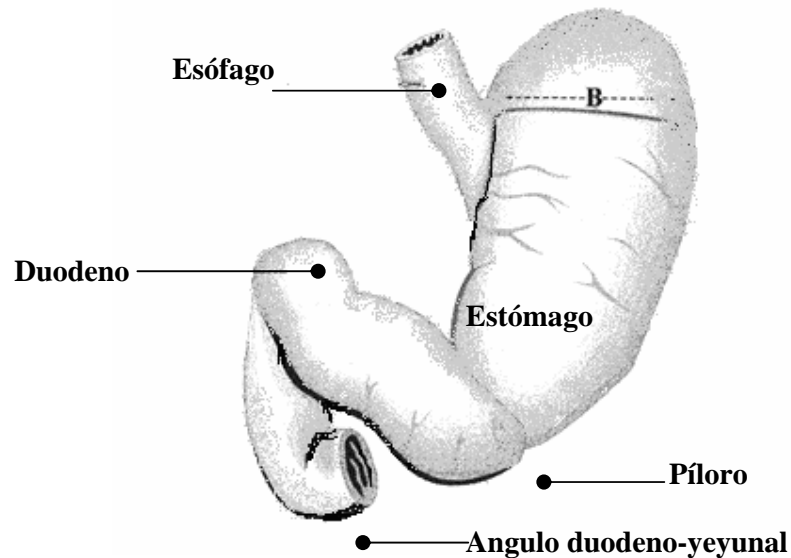


Fig. 2. Esquema del un segmento del tracto digestivo; desde el esófago hasta el duodeno de rata (76).

En el intestino se pueden distinguir dos partes una fija y una móvil. La parte fija del intestino delgado es el duodeno que se extiende desde el píloro hasta el ángulo duodenoyeyunal y está situado profundamente en la parte posterior y superior de la cavidad abdominal, a partir del píloro se dirige hacia arriba, atrás y a la derecha, hasta alcanzar el cuello de la vesícula biliar, en donde cambia de dirección bruscamente hacia abajo. Desciende por el borde externo de la cabeza del páncreas hasta su extremidad inferior y nuevamente cambia de dirección, dirigiéndose de derecha a izquierda hasta la parte media de la columna vertebral. Aquí cambia otra vez de dirección y se dirige hacia arriba y a la



izquierda hasta llegar al nivel de la cara lateral izquierda de la segunda vértebra lumbar, donde termina (**Fig. 3**) y la porción móvil, es el yeyuno-íleo (20).

El duodeno se mantiene en su posición mediante el peritoneo que lo acomoda contra la pared posterior del abdomen y en parte por el mesenterio.

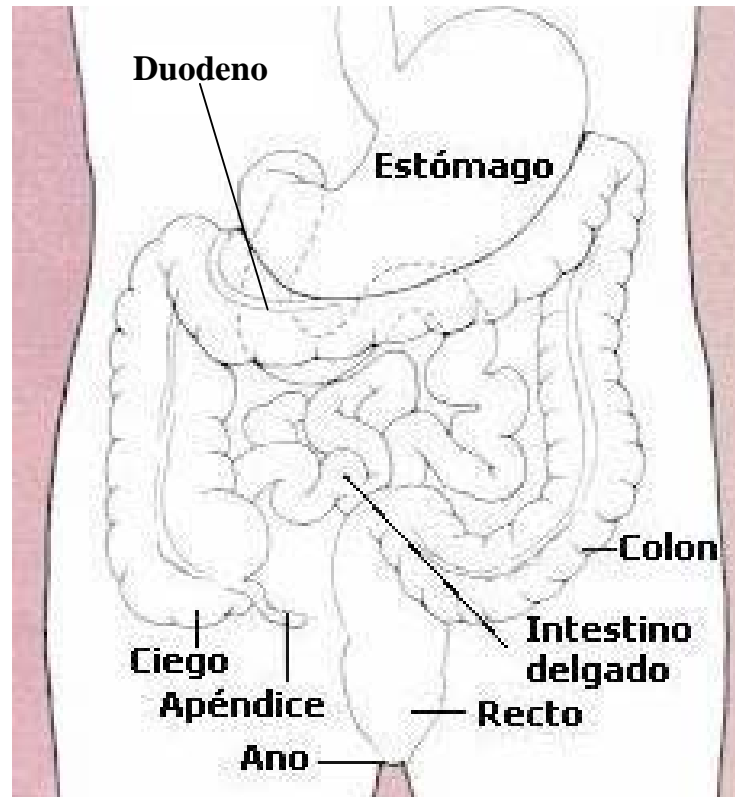


Fig. 3 Diagrama del sistema gastrointestinal humano. La flecha indica la posición del duodeno (77).

➤ CARACTERÍSTICAS DE LA PARED GASTROINTESTINAL

La pared intestinal esta formada interna y externamente por las siguientes capas: la serosa, una capa muscular longitudinal, una capa muscular circular, la submucosa y la mucosa (19, 77) (**Fig. 4**).

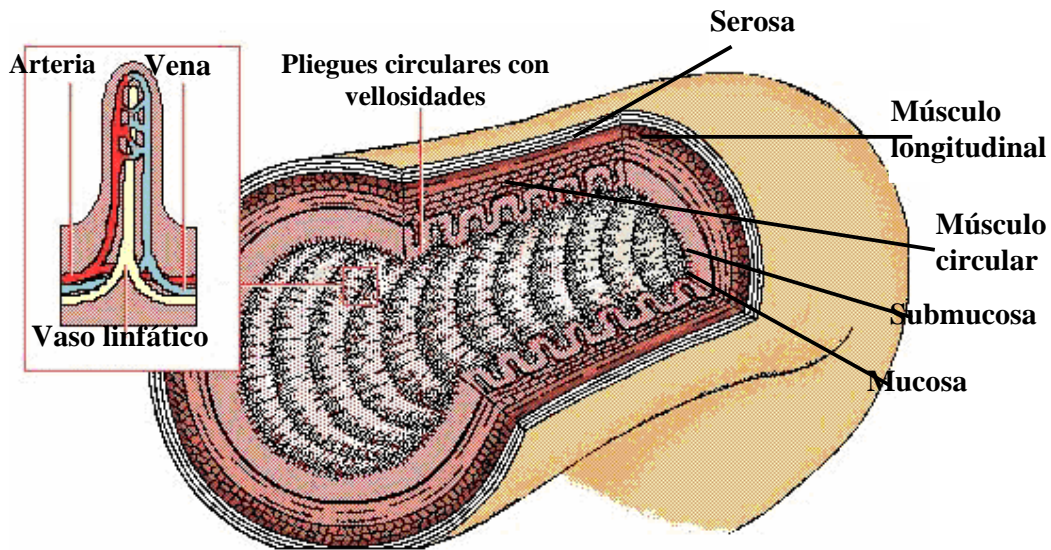


Fig. 4 Esquema de la pared intestinal (74).

Existe una fina capa de fibras de músculo liso, situada en la zona profunda de la mucosa. Las funciones motoras gastrointestinales dependen de las distintas capas del músculo liso (19).

La motilidad GI tiene funciones esenciales en el TGI ya que en sujetos normales comprende la deglución, la digestión mecánica y el vaciamiento del estómago, la absorción adecuada de los nutrientes y del agua en el intestino delgado y la defecación (19,24).

➤ MOTILIDAD INTESTINAL

Cada una de las fibras del músculo liso del TGI tiene de 200 a 500 micras de longitud y 2 a 10 micras de diámetro (18). En la capa muscular longitudinal, los haces se extienden en sentido longitudinal por el aparato digestivo, mientras que en la capa muscular circular se disponen rodeándolo (19).

En cada haz, las fibras musculares están conectadas eléctricamente unas con otras mediante un gran número de uniones intercelulares laxas, que permiten el paso de iones de unas células a otras con escasa resistencia. Por tanto, las señales eléctricas pueden viajar rápidamente de una fibra a otra dentro de cada haz (19,24).



➤ ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL MÚSCULO LISO

El músculo liso del TGI está sujeto a una actividad eléctrica lenta, pero casi continua.

Hay dos tipos básicos de ondas; las ondas lentas y las ondas en agujas. (24)

• ONDAS LENTAS.

La mayoría de las contracciones GI son rítmicas y este ritmo está determinado por la frecuencia de las ondas lentas en el potencial de membrana en el músculo liso. Estas ondas no son potenciales de acción, sino que constituyen cambios lentos y ondulantes del potencial de membrana en reposo. Su intensidad puede variar entre 5 y 15 milivoltios y su frecuencia oscila en las distintas partes del aparato gastrointestinal humano entre 3 y 12 por minuto: 3 en el cuerpo gástrico y hasta 12 en el duodeno, de 8 a 9 en el íleo terminal. Por tanto, el ritmo de contracciones del cuerpo gástrico es de tres por minuto, el del duodeno es de 12 por minuto y en el íleo, de 8 a 9 por minuto. En general, las ondas lentas no inducen por sí mismas contracciones musculares, su función principal consiste en controlar la aparición de los potenciales intermitentes en aguja y son estos los que, a su vez, producen la mayor parte de la contracción muscular (24) (**Fig. 5**).

• ONDAS EN AGUJA

Los potenciales en agujas son verdaderos potenciales de acción. Se producen automáticamente cuando el potencial de membrana en reposo del músculo liso GI adquiere un valor más positivo que -40 milivoltios (mV) (el potencial de membrana en reposo normal varía de -50 a -60 mV) (24). Los valores máximos de las ondas lentas se elevan temporalmente por encima de -40 mV y, por tanto, se hacen menos negativos que -40 mV y cuanto más sube el potencial de la onda lenta por encima de ese nivel mayor es la frecuencia de los potenciales en aguja, que suele oscilar entre 1 y 10 picos por segundo. Duran de 10 a 40 veces más que los potenciales de acción de las grandes fibras nerviosas y llegan a prolongarse durante 10 a 20 milisegundos cada uno (24) (**Fig. 5**).



En el músculo liso GI, los canales responsables de los potenciales de acción son muy distintos; permiten que penetren en las células, sobre todo, grandes cantidades de calcio (Ca^{2+}) junto con un pequeño número de iones de sodio (Na^+); por lo que reciben el nombre de canales de calcio- sodio (19).

Cuando el potencial se hace más positivo en lo que se denomina despolarización de la membrana, la fibra muscular se hace más excitable.

Cuando el potencial se hace más negativo la fibra se hace menos excitable es decir, se hiperpolariza (19).

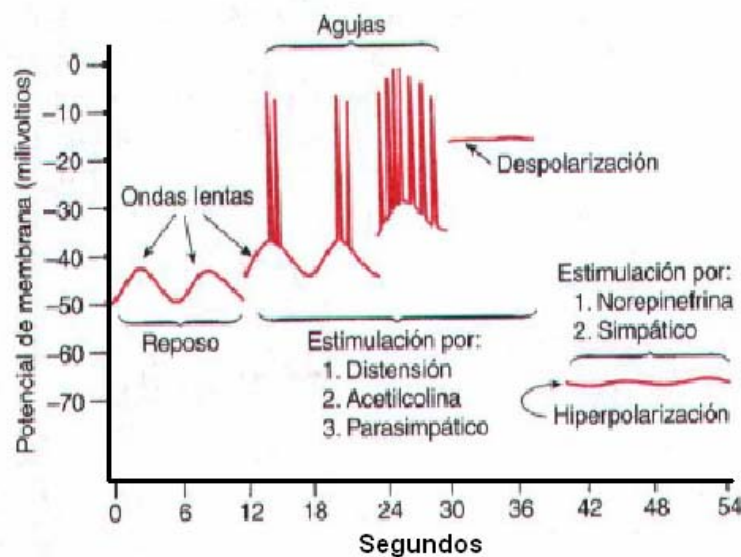


Fig. 5 Potenciales de membrana en el músculo liso intestinal. Obsérvense las ondas lentas, los potenciales en aguja, la despolarización total y la hiperpolarización que se producen en las diferentes condiciones fisiológicas del intestino (24)

Estas polarizaciones se deben principalmente por: a) la distensión del músculo; b) la estimulación con acetilcolina (Ach); c) la estimulación por los nervios parasimpáticos que liberan Ach en sus terminaciones y d) la estimulación de varias hormonas intestinales específicas.



Las hiperpolarizaciones que hacen que las fibras musculares se relajen, se deben principalmente por el efecto de la noradrenalina (NA) sobre la membrana muscular y por la estimulación de los nervios simpáticos que secretan NA en sus terminaciones (19, 24).

➤ TIPOS DE MOVIMIENTO

Se pueden distinguir dos tipos de contracciones: 1) contracciones de corta duración, más o menos rítmicas, llamadas fásicas y 2) contracciones de larga duración llamadas tónicas. En el estómago proximal, en la vesícula biliar y en los esfínteres predominan las contracciones tónicas. En el estómago distal y en el intestino delgado las contracciones son fásicas. Ambas, están en relación con las cargas eléctricas que tienen las células musculares lisas encargadas de la actividad contráctil, las que presentan cambios en su carga eléctrica en forma más o menos constante (19, 24, 77). Las contracciones peristálticas son contracciones fásicas (peristaltismo) de los músculos circulares, que se propagan a lo largo del tubo digestivo, propulsando el bolo alimentario (19,24) (**Fig. 6**).

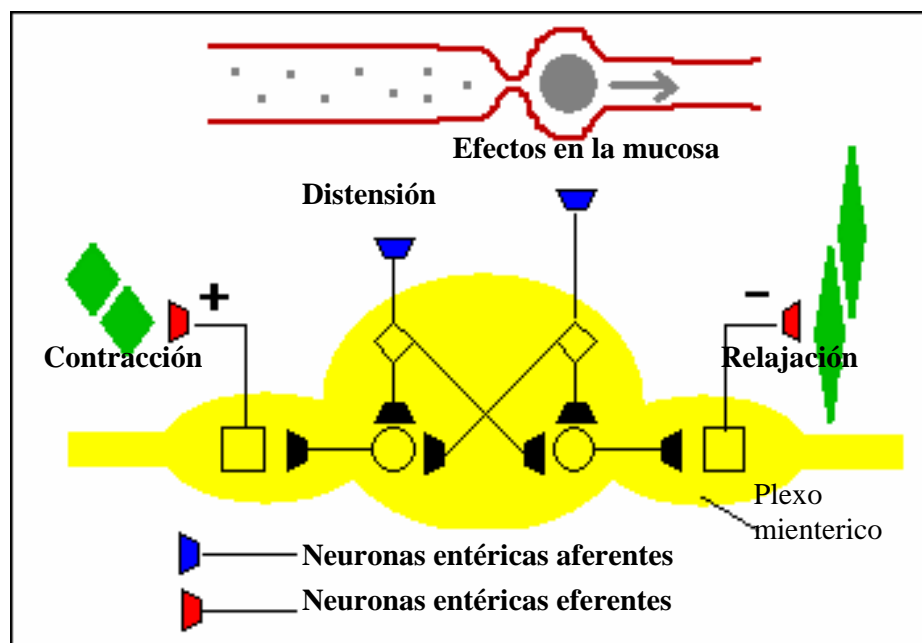


Fig. 6. Contracciones fásicas del intestino delgado (movimiento peristáltico) (75).



La actividad rítmica basal y las neuronas del Sistema Nervioso Entérico (SNE) tienen un papel importante para la realización de estas contracciones. Esta onda contráctil se propaga lentamente en sentido distal al estómago (22,30, 74).

Las neuronas del SNE controlan la coordinación de contracciones y relajaciones de los músculos circulares y longitudinales (18,19).

Existen varios tipos de hormonas que controlan el peristaltismo intestinal como son la gastrina, la colecistokinina (CCK), la insulina y la serotonina (5HT), todas estimulan la motilidad intestinal. Así la secretina y el glucagón inhiben la motilidad del intestino delgado (24).

Las neuronas que controlan el peristaltismo son: a) musculares excitadoras Ach, taquininas y sustancia P. b) musculares inhibitoras; óxido nítrico (NO), adenosil tri-fosfato ATP y péptido intestinal vasoactivo (VIP) c) secretomotoras (liberadas por terminaciones nerviosas) (Ach y VIP), d) entéricas vasodilatadoras (Ach y VIP), e) interneuronas como la Ach y la 5HT y f) otras como la CGRP (gen conexo de péptido calcitonina) (18) (**Fig. 7**).

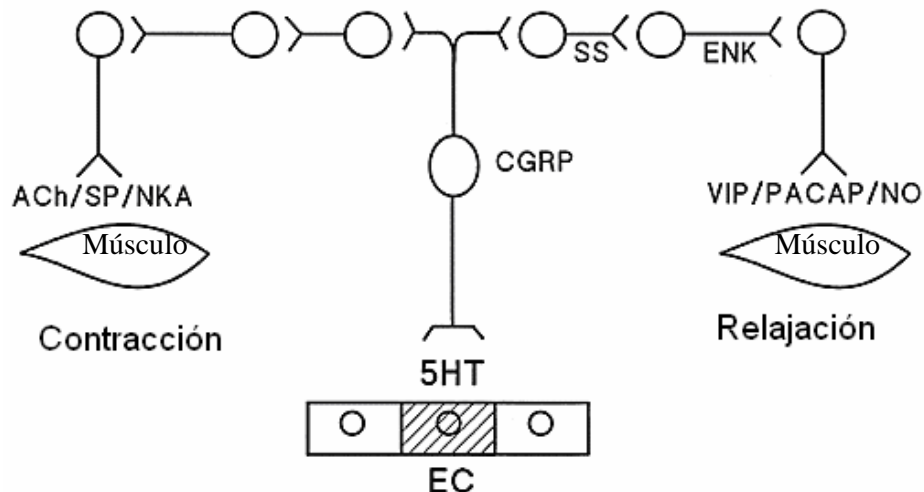


Fig. 7 Relajación y contracción del reflejo peristáltico por las neuronas del plexo mientérico. Donde se observa: Ach, NO, VIP, PACAP, 5HT, EC células enterocromafinas, SP sustancia p, NKA (18).



➤ SISTEMA NERVIOSO ENTERICO (SNE)

Inicialmente, se consideraba al SNE como una simple conexión con el sistema nervioso parasimpático, donde se transfieren los impulsos de las fibras preganglionares a las postganglionares sin modificarlas. Se tomaba al SNE por una simple prolongación del nervio vago (18, 19,24).

Actualmente, sabemos que el SNE consiste en un gran número de neuronas sensoriales, integradoras y motoras que transmiten las sensaciones producidas por los movimientos y actividad provenientes del tubo digestivo al cerebro. La integración de los movimientos GI se realiza en gran parte en el SNE. Se encuentra en la pared del tubo digestivo, desde el esófago hasta el ano. El número de neuronas de este sistema entérico es de unos 100 millones, casi exactamente igual que el número existente en toda la médula espinal lo que demuestra su importancia en el control de la función GI (18, 19,24).

No obstante, el SNE contacta con el cerebro a través de diferentes fibras nerviosas, como los nervios vagos. Las señales por lo tanto van del cerebro al SNE como del estómago hacia el cerebro (**Fig.8**). Por su estructura se cree que las sustancias que afectan al cerebro como son algunas hormonas y medicamentos afectan a la motilidad del músculo liso GI. Por ejemplo el prozac al igual que la MEL, afectan disminuyendo la actividad peristáltica del intestino (18,30).

El SNE esta formado fundamentalmente por dos plexos, un plexo externo que descansa entre las capas musculares longitudinal y circular y que reciben el nombre de plexo mientérico, y un plexo interno, llamado plexo submucoso, que ocupa la submucosa (18,19,20).

El plexo mientérico controla, sobre todo, los movimientos GI y el plexo submucoso controla fundamentalmente la secreción y el flujo sanguíneo local (18).

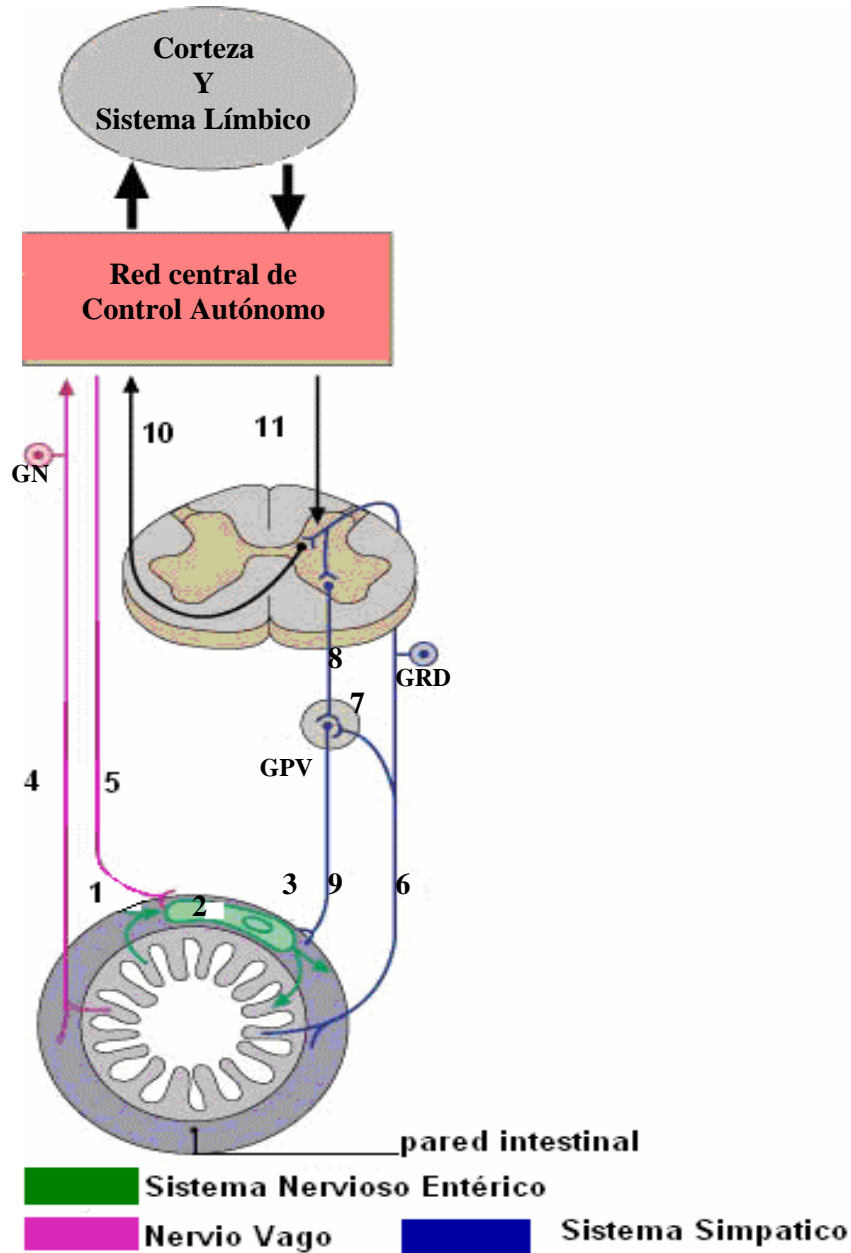


Fig. 8. Inervación del tubo digestivo. Sistema Nervioso Entérico: 1) neurona sensorial, 2) interneuronas. 3) neuronas motoras. Nervio vago: 4) vía aferente. 5) vía eferente preganglionar. GN (ganglio nodoso). Sistema simpático: 6) vía aferente. 7) comunicación a la vía eferente. 8), vía eferente preganglionar. 9) vía eferente postganglionar. GDR: ganglio de la raíz dorsal GPV: ganglios prevertebrales 10 y 11) vía espinal ascendente y descendente. El sistema parasimpático sacro no está dibujado (76).

El plexo mientérico (**Fig. 9**), es una estructura lineal que se extiende por la totalidad de la pared intestinal y como se encuentra entre las capas musculares lisas longitudinal y



circular, interviene sobre todo en el control de la actividad motora de toda la longitud del tubo digestivo (18).

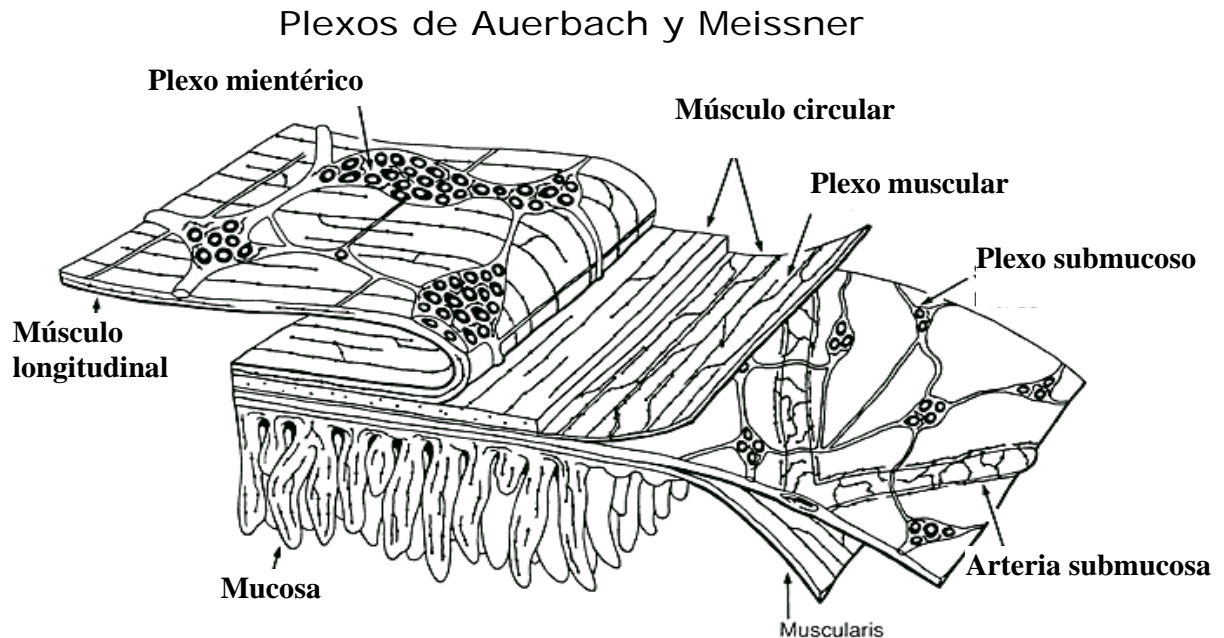


Fig. 9 Diagrama del plexo mientérico. Segmento del intestino mostrando las capas separadas (18).

El plexo submucoso interviene de forma primordial en el control de la función del interior de la pared de cada uno de los diminutos segmentos del intestino (18).

2.2 GLÁNDULA PINEAL

➤ ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA PINEAL O EPÍFISIS

Esta glándula (**Fig. 10.**) es de color grisáceo, esta localizada en el tercer ventrículo del cerebro. En humanos mide aproximadamente ocho milímetros de longitud por cuatro de anchura, pesa alrededor de veinticinco centigramos y esta constituida por células especializadas, denominadas pinealocitos (85%), células gliales (15%), que tienen la función de sostén y terminaciones nerviosas.

Se origina a partir de una evaginación neuroepitelial del techo del diencéfalo, la cual es evidente desde el segundo mes de gestación (14,39).



De su forma se pueden distinguir dos láminas, una se dirige hacia arriba y la otra hacia abajo. Las láminas que se desprenden de la base forman las prolongaciones de la epífisis. El anterior va al triángulo de la habénula para dirigirse después al tálamo óptico, limitando allí la cavidad ventricular; alcanza luego la extremidad anterior del tálamo, más adelante, el trigono y desciende con él para perderse en la sustancia gris de la base del cerebro (39).

De la lámina inferior, se desprenden los pedúnculos inferiores que cruzan por delante a la comisura blanca posterior, se dirigen hacia fuera y se pierden en el tálamo óptico (39).

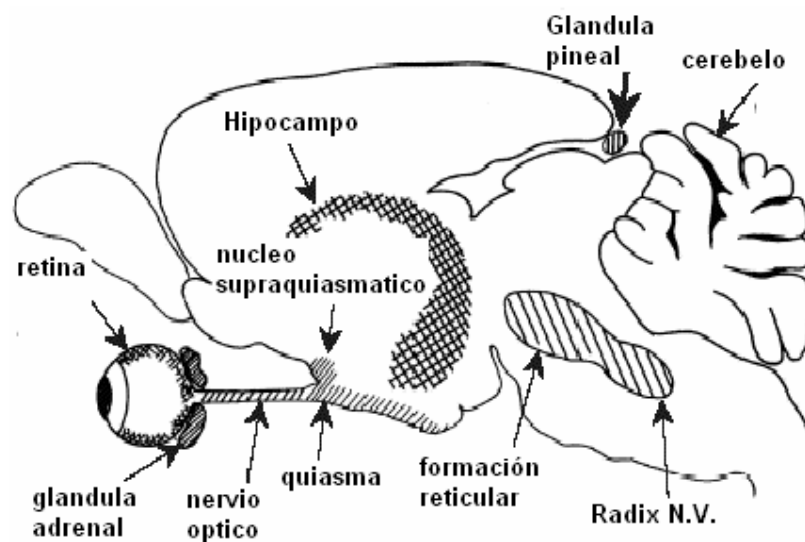


Fig. 10. Esquema de la localización de la glándula pineal (33).

➤ HISTORIA

La glándula pineal (GP) o epífisis cerebri desempeña un papel esencial en el control de los ritmos circadianos de los procesos biológicos. Directa o indirectamente sensible a la luz, suministra al organismo una información temporal, al liberar diversas cantidades de productos al torrente sanguíneo, en función de la hora del día (25,39).

Esta glándula se conocía desde tiempos antiguos, asignándole funciones todas ellas de tipo espiritual como por ejemplo: La GP se consideraba como el órgano de la clarividencia según la cultura hindú en el año 2000 a.C. Más adelante los griegos, debido a la posición



anat6mica consideraban a la GP como el 6rgano regulador del “fluido vital” que otorgaba la capacidad de pensar (39).

En el siglo XV, Descartes (1664) consider6 a la GP como “el asiento del alma” e influy6 para que se considerara a 6sta gl6ndula en el plano filos6fico y cient6fico este concepto prevaleci6 hasta el siglo XIX, en que se obtuvieron algunos datos de su papel como gl6ndula endocrina (39) (**Fig. 11**).

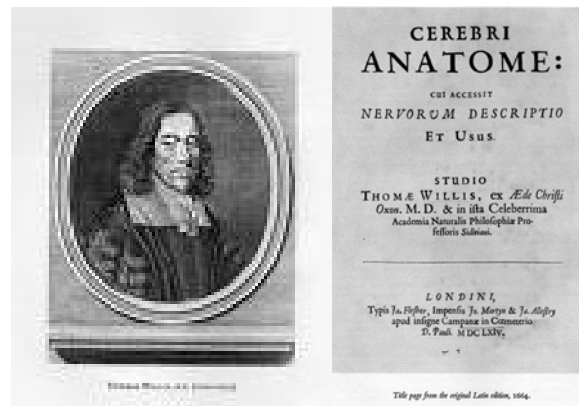


Fig. 11 A la Izquierda Rene Descartes y a la derecha el tratado de anatomía del cerebro. “La gl6ndula pineal es como el asiento del alma”: Rene Descartes, (1664) (81).

Sin embargo, despu6s de la investigaci6n que se llev6 a cabo durante la primera mitad del siglo XIX se obtuvieron escasos resultados que llevaron a los investigadores a considerar a la GP como un 6rgano vestigial y atr6fico (25, 39).

Ahlborn (1884) correlacion6 la GP con el 6rgano parietal (tercer ojo) de algunos peque1os vertebrados y con las estructuras de los ojos laterales. Gutzeit (1896) asocia por primera vez la existencia de un tumor pineal a un s6ndrome de desarrollo sexual precoz (22). Otto Heubner (1898), public6 el caso cl6nico de un ni1o que presentaba pubertad precoz, acompa1ada de la existencia de un tumor pineal. En los cincuenta a1os siguientes, fueron observados otros casos similares de ni1os con tumor de la pineal y desarrollo sexual precoz (25,39).



En 1905, Studnicka comprobó que el órgano fotosensorial de algunos pequeños vertebrados evolucionó hasta llegar a ser la GP. Holgrem apuntó que las células de la GP de un elasmobranquio eran de naturaleza sensorial, puesto que los pinealocitos se asemejaban a las células sensoriales de la retina. Como algunos reptiles presentan un “tercer ojo” muy prominente, la pineal de los mamíferos fue considerada como un vestigio de este órgano visual primitivo **Fig. 12** (25).

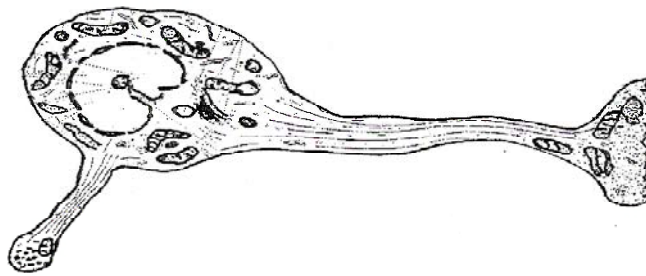


Fig. 12 Pinealocito (59).

Fue hasta 1959 cuando Lerner, basándose en las experiencias de Mc Cord y Allen (1936), aisló e identificó en la GP de los bovinos el factor que produce la contracción de los melanóforos y, por lo tanto, el aclaramiento de la piel de los batracios. Esta sustancia encontrada fue llamada melatonina (MEL) (la principal hormona que es segregada por la GP). Se denominó así debido a su acción blanqueadora cuando se aplicaba a vertebrados inferiores en las que es responsable del empalidecimiento que se observa en algunas especies nocturnas. En aves y mamíferos no se han observado cambios diarios en el color, sin embargo, se ha relacionado a la pineal y la MEL con los cambios estacionales en el mismo, aunque los descubrimientos más importantes fueron los relacionados con sus efectos antigonadales en el sistema reproductor de los mamíferos (25).

A medida que se va evolucionando filogenéticamente, los elementos sensoriales desaparecen y van siendo sustituidos por las células parenquimatosas con capacidad



secretora, de modo que en los vertebrados superiores incluyendo al hombre, sólo persiste la función de secreción interna (39) (**Fig. 13**).

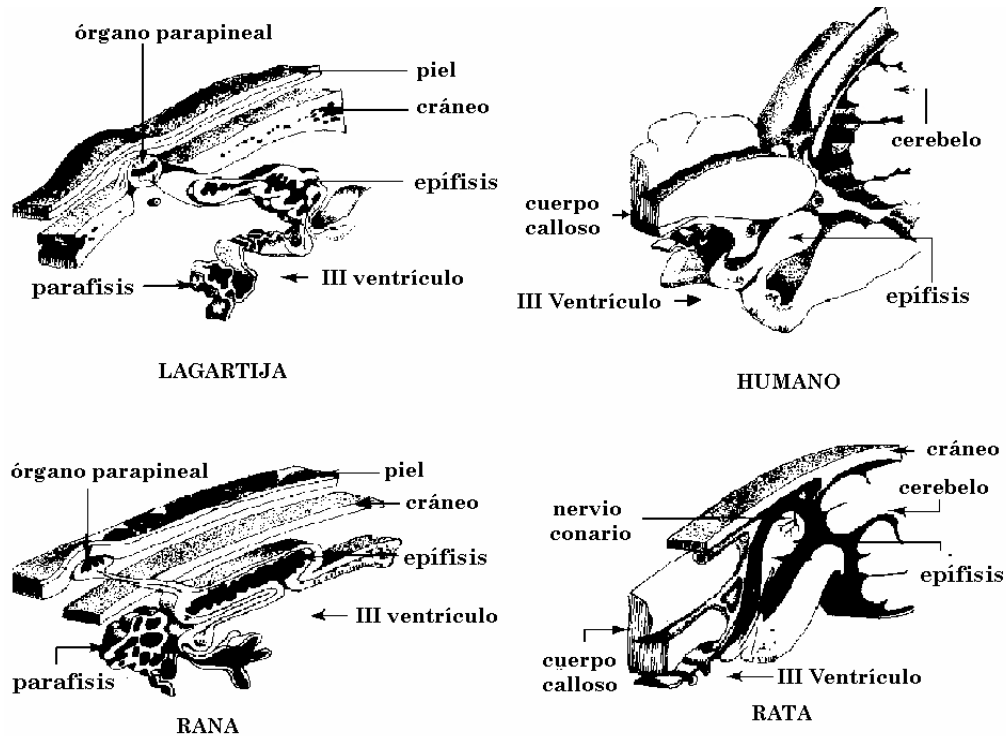


Fig. 13 glándula pineal de diferentes especies (41).

La GP contiene muchas sustancias biológicamente activas, entre ellas están la NA, serotonina (5-HT), histamina (H), dopamina (DP) y MEL (15).

De estas sustancias la más investigada es la MEL, aunque aún falta mucho para saber si es la única, o la principal, hormona reguladora de la gonadotropina (39).

El tipo celular característico de la GP de mamíferos es el pinealocito, célula epifisaria o célula principal (69). Los pinealocitos derivan del foro endimario del epítalamo y pueden distinguirse tanto células claras como células oscuras. Las células oscuras contienen gránulos de un pigmento de naturaleza desconocida, así como depósitos de glucógeno cuyo significado fisiológico tampoco está aclarado (25). Esta distinción se basa únicamente en la



diferencia de densidad electrónica del citoplasma, lo que permite clasificarlos en cromófilos y cromófobos (57).

2.3 MELATONINA

La MEL también puede actuar como antagonista de la calmodulina. En los estudios realizados, la MEL parece ser capaz de regularizar patrones de sueño, a pesar de que no son observables las acciones hipnóticas, tanto en adultos y jóvenes como en ancianos que padecen graves trastornos del sueño. Estas observaciones favorecen la sugerencia de que la MEL, además de ser la última novedad en suplementos alimenticios, también puede tener utilidad clínica. (30).

➤ ESTRUCTURA QUÍMICA

La MEL es sintetizada a partir del triptófano en las células parenquimatosas pineales formando los intermediarios; 5-hidroxitriptófano, 5-HT, N-acetilserotonina, y finalmente la MEL (**Fig. 14**)

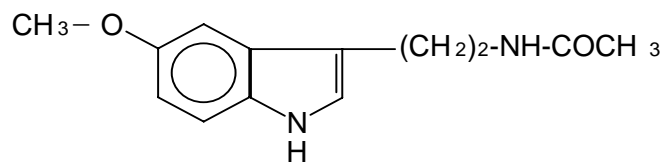


Fig.14. Estructura de la MELATONINA (N-Acetil-5-Metoxi-triptamina) (22).

La MEL es altamente lípofílica y por ello llega a mucha partes del organismo. Sin embargo, sus efectos biológicos están mediados por sitios aceptores específicos en diferentes especies, incluyendo al ser humano (15), recientemente la MEL esta ligada a sitios que pueden estar identificados en el intestino (34).



➤ ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DE LA MELATONINA

Estudios sobre la síntesis de MEL sugieren que el foto y termoperiodo interactúan para determinar la amplitud y duración del ritmo de MEL (16, 48, 72). Bajo condiciones de oscuridad constante los ciclos de temperatura por sí mismos son capaces de sincronizar los relojes que llevan el ritmo de la producción de MEL. Los efectos de los ciclos de temperatura son complejos, poco claros y varían de una especie a otra. Las diferencias observadas pueden resultar de las variaciones metabólicas propias de cada especie. La modulación de la producción y liberación de MEL por el ciclo luz-oscuridad puede potencialmente funcionar como un reloj capaz de informar al organismo si es de día o de noche, y como un calendario, capaz de indicar la estación del año en la que se encuentra el individuo y así, regular los procesos de hibernación, migración, pérdida o ganancia de peso etc. (59) La época del año en la cual los individuos se encuentran resulta muy importante, ya que de ello dependen comportamientos que garanticen la sobrevivencia de diferentes especies (8).

En cuanto a la actividad de MEL sobre el SNC se muestra en algunas pruebas que la administración de esta hormona reduce la actividad motora espontánea, promueve el sueño y prolonga la duración del sueño inducido por barbitúricos. La MEL puede modificar la función de los neurotransmisores del SNC, ya que se ha demostrado que los niveles de 5-HT y ácido gamma aminobutírico (GABA) se incrementan en el cerebro tras la administración de la misma (8,22).

Se han estudiado, durante los últimos 20 años los efectos de la administración exógena de MEL, para determinar las acciones, si las tiene, que esta indolamina realiza sobre funciones corporales, con la esperanza de describir si las aplicaciones terapéuticas son capaces de corregir anomalías en los ritmos circadianos. Así, se ha visto que la administración oral de MEL puede adelantar el momento de autoevaluación de la “fatiga”, o dicho de otra forma, del inicio del sueño. También, se ha visto que la hormona puede inducir



un adelanto en su ritmo endógeno de secreción (5, 25, 50). Con base a estas observaciones se ha administrado la hormona como un remedio capaz de atenuar los efectos del desfase horario (“jet-lag”) que se produce como consecuencia de los vuelos transmeridianos y, se ha afirmado que los resultados apoyan el concepto de que la secreción de MEL actúa como sincronizador interno, evitando la pérdida de sincronía entre los distintos ritmos corporales (8,51).

La función de la MEL en los mamíferos consiste en regular los ritmos biológicos como son: la actividad locomotriz, cambios en la coloración de la piel, pelaje durante el invierno, sueño, apetito, así como cambios en la producción y desarrollo hormonal (efectos antigonadotrópicos) (63).

➤ POSIBLES APLICACIONES TERAPEUTICAS DE LA MEL

En la actualidad se llevan a cabo numerosas investigaciones sobre los efectos fisiológicos de la MEL y sus posibles aplicaciones terapéuticas.

A continuación se presentan algunas de las áreas en las que se está evaluando la posible utilidad de la MEL como una sustancia terapéutica.

- **Desórdenes del tiempo “jet- lag”**

“Jet-Lag” es el resultado de viajes de larga distancia que cruzan varios husos horarios en un corto periodo de tiempo (**Fig. 15**). Síntomas como trastornos del sueño, pérdida de apetito, reducción de la eficiencia psicomotora y malestar general, están relacionados con este fenómeno.

El problema se ha tratado de resolver utilizando sincronizadores, que son factores ambientales que ayudan al organismo a mantenerse en fase. Los ritmos circadianos necesitan aproximadamente un día para adaptarse a cada huso horario cruzado. En otras palabras 3 horas de diferencia de tiempo requerirán 3 días de adaptación aproximadamente (2). La MEL



ha sido utilizada como un “sincronizador” para disminuir el tiempo de recuperación al “Jet-lag”.



Fig. 15. Representación del desfase de horario por los viajes trans-meridionales (79).

Por otra parte, sujetos ciegos con trastornos del sueño pueden sincronizar el ritmo circadiano con la administración oral de MEL (51)

- **Fase del sueño retardado**

El síndrome de fase de sueño retardado (SFSR) es una causa común del insomnio severo, que se le caracteriza por una dificultad para dormir y la incapacidad de hacerlo en horas socialmente aceptables; si una persona con SFSR se acuesta a las 11:00 p.m. no se dormirá hasta que el cuerpo este listo, usualmente entran en fase de sueño hasta las 3:00 o 4:00 a.m.; el SFSR podría deberse a una alteración del ritmo circadiano del ciclo sueño vigilia. Un estudio realizado recientemente mostró que la administración oral de MEL disminuye el SFSR (43,51).

- **Agente oncostático**

La inmunidad celular frente a los tumores puede potenciarse expresando coestimuladores y citocinas en las células tumorales y tratando a los pacientes portadores de tumores con citocinas que estimulen la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T y las células citocinas naturales (NK). Las citocinas se pueden administrar por vía sistémica para el tratamiento de diversos tumores humanos. Este tipo de terapia experimental se hizo factible cuando se dispuso de preparaciones puras de citocinas en cantidades suficientes. La



experiencia clínica más amplia corresponde a la IL-2, administrada en dosis elevadas. Después de la administración de IL-2, aumenta el número de linfocitos sanguíneos y de células NK, aumenta la actividad de las células NK y aumentan en el suero el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleukina 1 (IL-1) y el interferón γ (IFN- γ). Cabe suponer que la IL-2 actúa estimulando la proliferación y la actividad antitumoral de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos (CTL). La IL-2 ha sido eficaz en la inducción de respuestas medibles de regresión tumoral en aproximadamente el 10% de enfermos con melanoma y carcinoma de células renales avanzados, actualmente, es un tratamiento aprobado para estos tipos de cánceres. La MEL debe aumentar actividad antitumoral de la interleukina 2 (IL-2) por inhibición del factor de crecimiento tumoral. Un estudio piloto fue realizado utilizando una dosis baja de IL-2 combinada con MEL en 14 pacientes que tenían tumores endocrinos y cuyos tratamientos anteriores no habían sido eficaces, los resultados mostraron que la terapia de IL-2 junto con la MEL es tolerada por los pacientes con los tumores antes mencionados sumado al bajo costo de este tratamiento, 3/14 mostraron una regresión en el crecimiento del tumor, esto es importante ya que la terapia de IL-2 en altas dosis, es tóxica, provoca fiebre, edema pulmonar y shock vascular (82).

- **Regulación de desórdenes endocrinos**

La MEL ha sido relacionada en la regulación del metabolismo del Ca^{++} y del fósforo (P^{+++}) por estimular la glándula paratiroides e inhibiendo la liberación de calcitonina y la síntesis de prostaglandinas. La menopausia está asociada con un decaimiento en la secreción de MEL y un incremento en la calcificación pineal (25).

La GP ha sido relacionada con el sistema inmune y la inmunodepresión, la cual ha sido tratada con el uso de MEL. El timo es uno de los principales blancos de la MEL y sus efectos inmunoestimulantes pueden ser mediados por derivados de las células T colaboradoras, lipoquinas y posiblemente hormonas pituitarias.



- **Agente antioxidante**

La MEL es un potente eliminador de radicales hidroxilo tiene capacidad de aumentar la actividad y la glutatión reductasa, en cerebro hígado y riñon de rata (64). Adicionalmente, se ha comprobado su acción antioxidante durante el estrés oxidativo causado por radiaciones y contra la oxidación de la membrana plasmática originada por carcinógenos (13).

Los radicales libres son moléculas que tienen un par de electrones desapareado, si un electrón es adicionado a O_2^- entonces se forma el radical superóxido O_2^- , éste es reducido por la superóxido dismutasa a H_2O_2 que es tóxico a altas concentraciones y puede ser reducido a $\cdot OH$. El radical hidroxilo ($\cdot OH$) daña a las células. La MEL es probablemente un neutralizador de $\cdot OH$ (59).

La MEL puede tener un efecto neuroprotector, ya que reduce el daño oxidativo sobre el SNC (60) Estas propiedades de la hormona se han utilizado para el tratamiento de enfermedades como Huntington, Parkinson y Alzheimer (59,64).

- **Otros posibles usos de la MEL**

Los recién nacidos durante el periodo neonatal (28 primeros días de vida) no sintetizan melatonina ya que, empiezan a producir escasos niveles de la misma a partir de 12 semanas de vida (31) iniciándose su síntesis a partir del desarrollo de su propia epífisis, estableciéndose un ritmo circadiano de dicha hormona (1). Los niveles de MEL van incrementándose desde los nueve o diez meses hasta la pubertad, momento en el cual empiezan a decrecer. El ciclo sueño/ vigilia es muy difícil de consolidar durante el periodo neonatal.

Desórdenes crónicos en el sueño de los bebés pueden afectar adversamente el desarrollo de los mismos, ya que el sueño ejerce un importante papel en la temprana maduración del cerebro (44).



Hasta el momento se ha observado en niños que los niveles plasmáticos se elevan transcurridos una hora y muestra un patrón bifásico de eliminación con una vida media de entre tres a cuarenta y cinco minutos (50).

La MEL también tiene beneficios en niños epilépticos (44,48); y su uso terapéutico es debido a la potenciación de los receptores GABA-Benzodiazepina produciendo la inhibición de neuronas en el SNC, involucradas en la generación de mioclonías (43), sugiriendo que la administración de MEL sintética puede ser efectiva en niños de mayor edad, con síndrome de autismo y retraso severo de aprendizaje mostrado en algunos instantes un incremento en la duración y calidad del sueño.

➤ RECEPTORES A MELATONINA

Se han descrito receptores para melatonina en membranas de células del timo, la bolsa de Fabricio e Hígado de aves (53), así como de linfocitos TCD8+ y linfocitos β humanos (44)

La acción de la MEL se produce después de su unión a receptores específicos. Inicialmente Cardinali en 1979 (8), mediante el empleo del radioligando [^3H]-melatonina, logró detectar sitios aceptores específicos de MEL en cerebro de bovino. Este descubrimiento trajo consigo el desarrollo del 2[^{125}I]-yodomelatonina, un radioligando de alta afinidad y agonista a MEL, que ha permitido el estudio bioquímico y autoradiográfico de la ubicación de estos sitios aceptores de alta afinidad en un gran número de tejidos neuronales y no neuronales de diferentes especies, incluyendo al ser humano (15) (**Fig. 16**)

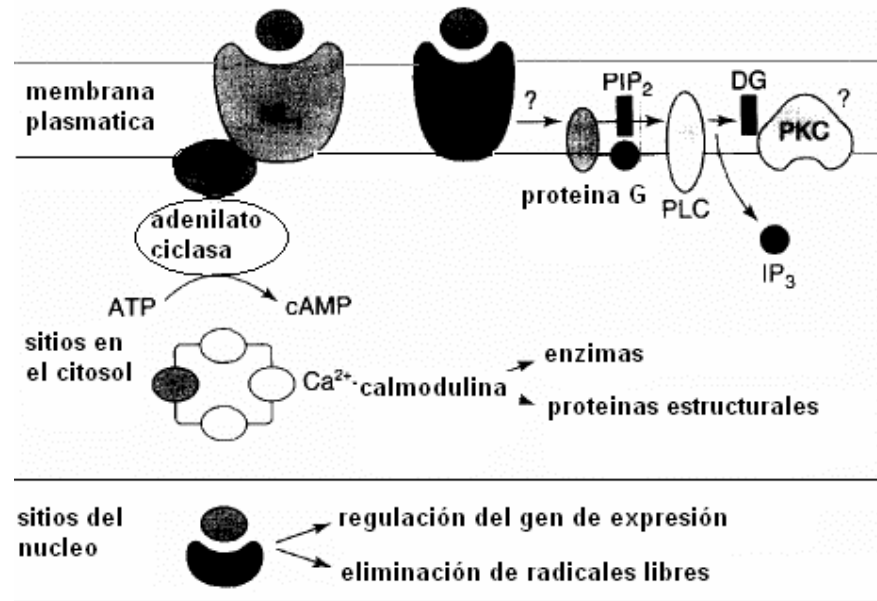


Fig. 16. Sitios de acción de MEL (vía receptores ML₁ y ML₂ en la Membrana plasmática, el citosol, y el núcleo celular. DG diacilglicerol; IP₃ inositol 1,4,5-trifosfato; PIP Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PKC (proteína quinasa C); PLC fosfolipasa C (15).

La primera clasificación de los supuestos receptores de MEL en los tipos ML1 y ML2 se basó en las diferencias cinéticas y farmacológicas de unión de la 2[125I]-yodomelatonina. Estudios de clonación revelaron dos receptores recombinantes de MEL, Mel1a y Mel2a, actualmente llamados MT1 y MT2, utilizando 2[125I]-yodomelatonina estos receptores mostraron la misma farmacología general que los ML1 y fueron definidos como entidades únicas con base en su estructura molecular y su localización cromosomal. Posteriormente, se caracterizó un tercer tipo de receptor de MEL que se denominó MT3, el cual es una quinona reductasa de tipo II (QR2), localizado principalmente en cerebro de hámster. Al contrario de los receptores MT1 y MT2 (21,40) que muestran una alta afinidad a los receptores el tipo MT3 (15,21) corresponde a un sitio de baja afinidad.

Los receptores MT1 y MT2 están acoplados a la proteína G de membrana y median la inhibición de la adenilato ciclasa. En el cerebro, el receptor MT1 se encuentra en las membranas de las neuronas en el NSQ del hipotálamo, un área relacionada, de lesión experimental con el ritmo circadiano.



El receptor MT1 es siete-transmembranal (7 TM) acoplado a su efector vía una proteína G. El resultado de la unión del receptor es la inhibición de la adenililciclase. La mayor parte de las especies estudiadas tienen tres variantes del receptor (1a, 1b y 1c), pero de éstos, sólo los 1a y 1b se encontraron en humanos. La activación de este receptor con dosis farmacológicas de MEL parece portar el reloj circadiano y disponer los ciclos de sueño-vigilia y sobre la temperatura en animales de experimentación, con probabilidad también en humanos. La MEL es más o menos liposoluble y parece interactuar con receptores intracelulares además de otros en la membrana celular (21,22, 40).

Recientemente, un número de agonistas y antagonistas parciales selectivos del receptor MT2 han sido identificados. La activación de los receptores recombinantes de MEL (Humana) inhibe a la formación de Adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) y Guanosín monofosfofato cíclico (GMPc).

➤ SECRECIÓN DE MELATONINA

Los mecanismos de fototransducción han sido estudiados más a fondo en los conos y bastones de la retina, observando que estas células fotorreceptoras muestran una diferente sensibilidad a la luz y respuesta cinética, pero el proceso de fototransducción es similar en ambas células. El receptor del fotón es la rodopsina (**Fig. 17**), que se sitúa en el segmento externo de la membrana plasmática. El GMPc es el segundo mensajero de la fototransducción.

La rodopsina consiste en una proteína transmembranal, opsina, unida al 11-cis-retinal. La rodopsina fotoexcitada activa a la transducina, una proteína G heterotrimérica. En su estado inactivo, la subunidad α de la transducina une al guanosil difosfato (GDP). En la activación de la rodopsina, este GDP se cambia por un guanosil trifosfato (GTP), lo que induce una disociación de la subunidad α del complejo de subunidades $\beta \gamma$. En estado activo la subunidad α unida a GTP activa una fosfodiesterasa de GMPc unida a la membrana, que



cataliza la hidrólisis de GMPc, dando lugar a una disminución de los niveles intracelulares de GMPc. En la oscuridad, el GMPc induce la apertura de canales catiónicos y la entrada de Na^+ y Ca^{++} . Debido a esta hidrólisis de GMPc el canal catiónico se cierra, lo que induce la inhibición de la liberación de neurotransmisores a los espacios sinápticos que hay entre el bastón o cono y neuronas de segundo orden. La subunidad α de la transducina tiene una actividad GTPasa intrínseca y se reasocia con el complejo de subunidades β y γ . Un nuevo ciclo puede empezar; permitiendo la amplificación de la respuesta. La inactivación del sistema implica fosforilación de la rodopsina por una rodopsina quinasa seguido de la unión de arrestina a la rodopsina fosforilada (21,22, 32).

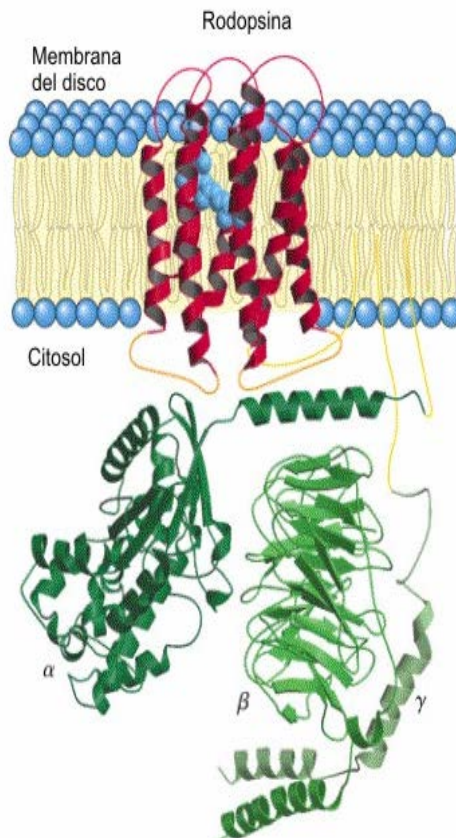


Fig. 17 Molécula de rodopsina (80).

Los iones de Ca^{++} y proteínas que unen Ca^{++} juegan un papel importante en el proceso de fototransducción. En la oscuridad la concentración de Ca^{++} intracelular es alto, y se une a:



1) una proteína activadora de guanil ciclasa que resulta en la reducción de la actividad ciclasa y 2) recoverina para inhibir la rodopsina quinasa (62, 68, 72).

En la luz la concentración de iones Ca^{++} es baja. Esto activa la guanil ciclasa, incrementa la sensibilidad de los canales a GMPc y, favorece la activación de la rodopsina por la rodopsina quinasa. Favoreciendo la entrada de cationes en oscuridad simulando el periodo nocturno, el GMPc permite la despolarización de la célula.

A la inversa, el cierre de los canales catiónicos debido a iluminación hiperpolariza la célula. Esto da lugar a la inhibición de la liberación de un neurotransmisor excitador, como el glutamato o aspartato (28, 62, 68). Investigaciones inmunocitoquímicas han indicado que ambos neurotransmisores se co-localizan en las terminales presinápticas de fotorreceptores en varias especies de animales no mamíferos (68) (**Fig. 18**).

Los componentes indólicos muestran variaciones indólicas en la pineal (55). Así los niveles de serotonina y derivados desaminados son normalmente altos durante el día y bajos durante la noche en humanos y en aves (3,4, 23, 49, 55), hecho que también ha sido observado en vertebrados de sangre fría y en otros mamíferos. La existencia de variaciones luz/oscuridad en el contenido de MEL en la pineal está bien documentada en todas las clases de vertebrados. Los niveles de MEL son bastante mayores durante la noche que durante el día en humanos (3, 4, 11, 57, 66) y también en otros mamíferos.

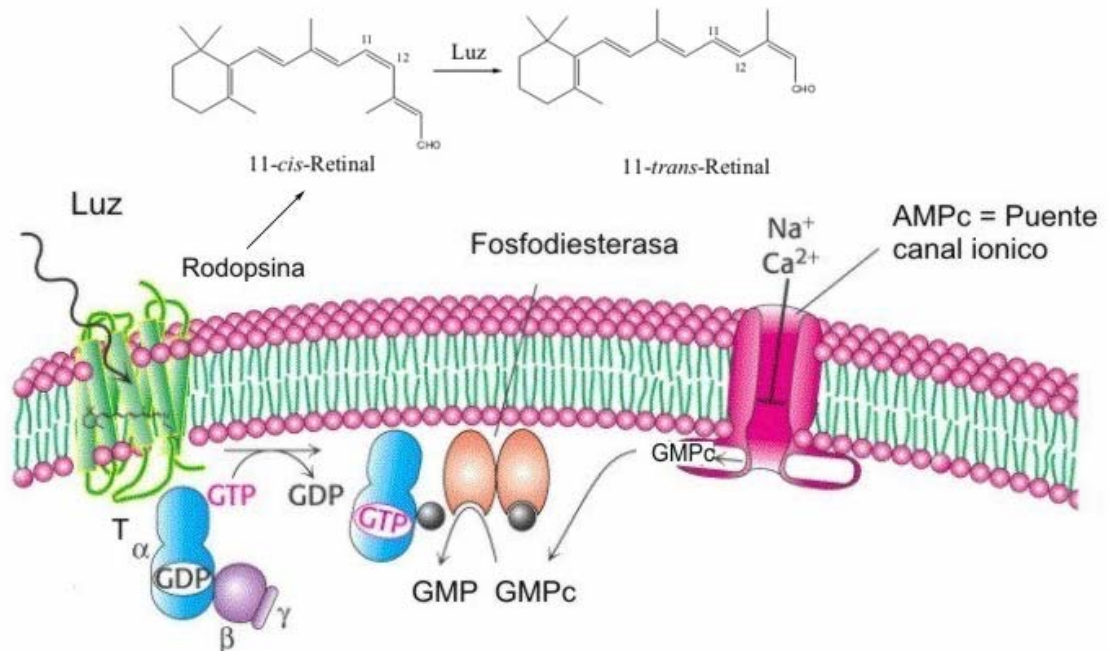


Fig. 18 Mecanismo de foto transducción de vertebrados. La luz activa la rodopsina, la subunidad alfa de transducción ($T\alpha$) se activa por cambio de GDP a GTP, se disocian las subunidades β - γ de esta, esto induce la activación del guanosina monofosfato cíclico (GMPc), lo cual permite la apertura del canal catiónico (80).

Las concentraciones de MEL en la pineal y en sangre además reflejan el ritmo circadiano en la actividad pineal de arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), los cuales están correlacionados con los niveles de AMPc en los pinealocitos (17).

Tanto la duración como la amplitud del ritmo de MEL depende del fotoperiodo prevalente (42).

Normalmente, la señal corresponde a la duración de la noche, y la amplitud del ritmo incrementa cuando lo hace el fotoperiodo (**Fig. 19**).

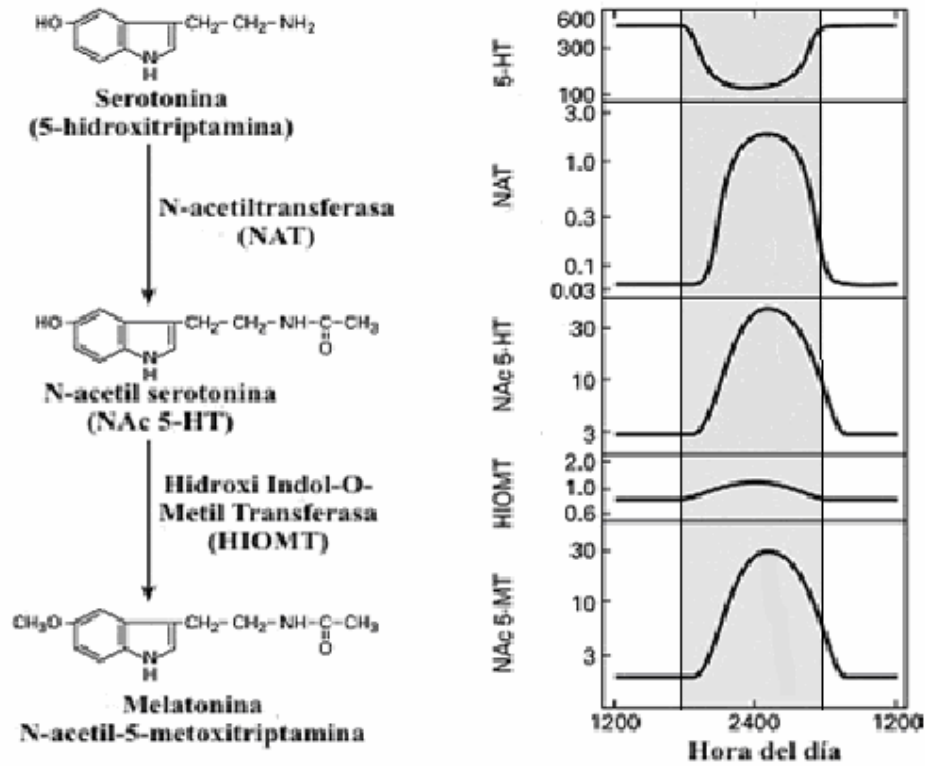


Fig. 19 Representación de la variación de los niveles de melatonina, con respecto al ritmo circadiano (2)

Los ojos y el NSQ son esenciales para mantener una producción rítmica de MEL. La información fótica capturada por el ojo es retransmitida por el tracto retinohipotalámico al NSQ (32), actuando éste como un oscilador auto-mantenido (42). A partir de aquí, la información se lleva a la pineal sucesivamente a través del (NPV) del hipotálamo, la columna celular intermediolateral de la espina dorsal y el GSCS (32). Fibras simpáticas, concretamente catecolaminérgicas, del GSCS inervan el órgano pineal. La liberación nocturna de NA a partir de las terminaciones nerviosas en el parénquima pineal desencadena la subidad de actividad de la AA-NAT y secreción de MEL a través de una acción sinérgica en receptores adrenérgicos β_1 y α_1 . El órgano pineal de mamíferos es incapaz de sintetizar MEL *in vitro* a no ser que se añada NA o algún análogo al medio de cultivo (32, 63).



➤ SINTESIS Y METABOLISMO

La 5-HT se sintetiza por una vía de dos etapas dentro del pinealocito a partir del aminoácido triptófano. La hidroxilasa del triptófano, oxida la función mixta que requiere oxígeno molecular, hierro y factor de pteridina reducido para entrar en actividad, es la enzima limitante del ritmo en esta vía. La hidroxilasa del triptófano cerebral no se encuentra saturada con sustrato; por tanto, la cantidad de triptófano existente en el cerebro influye en la síntesis de 5-HT (22).

El cerebro capta activamente al triptófano por medio de un portador que también transporta a otros grandes aminoácidos naturales y de cadena ramificada. Las concentraciones de triptófano en el encéfalo se ven influidas no solo por su concentración plasmática, si no también por las concentraciones plasmáticas de otros aminoácidos que compiten por el portador de captación cerebral (22).

La enzima que convierte al L-5-hidroxitriptófano en 5-HT, es la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, se encuentra distribuida con amplitud y tiene amplia especificidad por los sustratos (3).

La cantidad de la 5-HT en el hombre se acerca a 10mg, de los cuales el 90%, en promedio, están en las vías gastrointestinales. Del resto la mayor parte esta en plaquetas, pulmones, medula ósea y cerebro aunque muchos tejidos contienen algo de 5-HT. Las vías gastrointestinales tienen 90% de todas las serotoninas corporales en tanto que el cerebro contiene en promedio, 3%; sin embargo; el lapso de recambio de la 5-HT gastrointestinal y la cerebral es de 12 a 16 horas y 1 hora, respectivamente. (14, 22, 25, 30). La 5-HT es convertida en melatonina mediante dos reacciones enzimáticas principales (**Fig. 20**).

La primera AA-NAT, que convierte la 5-HT en N-acetilserotonina. La segunda, hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), metila la N-acetilserotonina para producir MEL(14, 22, 25, 30).



Finalmente en el humano y en otros mamíferos la MEL circulante es inactivada en el hígado, convirtiendo a la MEL en 6-hidroximelatonina (carente de actividad biológica), esta última se conjuga con los ácidos: glucurónico o sulfúrico y es excretada en orina y heces. En menor proporción, puede ser desacetilada y convertida a 5-metoxitriptamina por una arilamidasa hepática. La MEL también es excretada en los humanos de forma libre diariamente en una cantidad de 60 a 80% del total excretado entre las 23 y las 7 horas (22, 25) (Fig. 21).

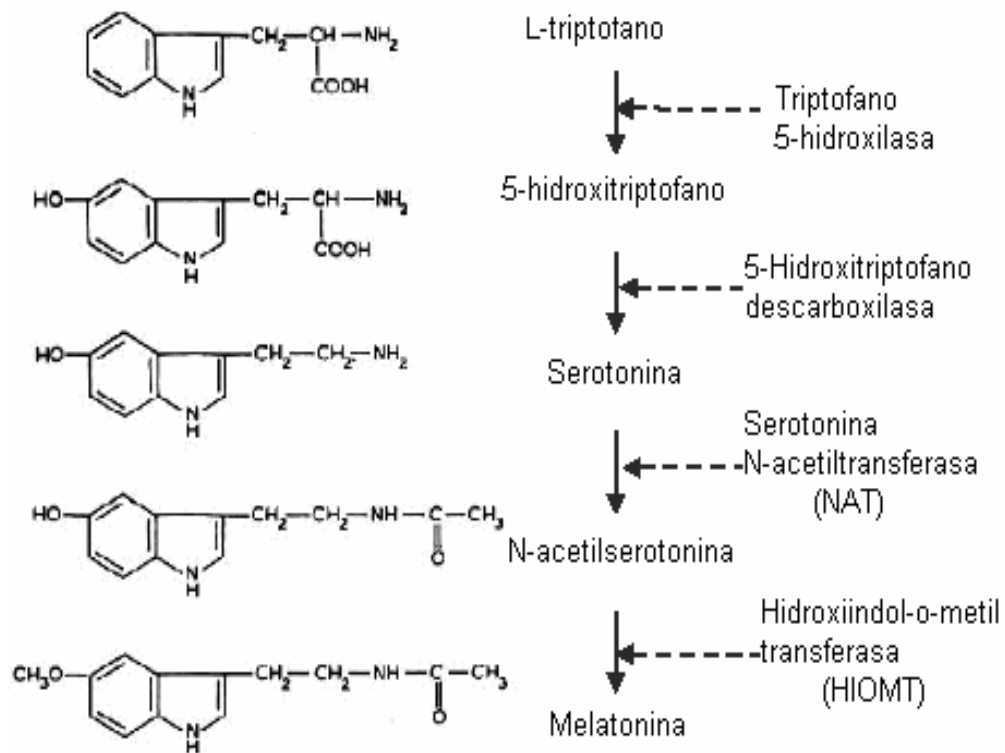


Fig. 20 Biosíntesis de MEL a partir del triptófano, en la glándula pineal (33)

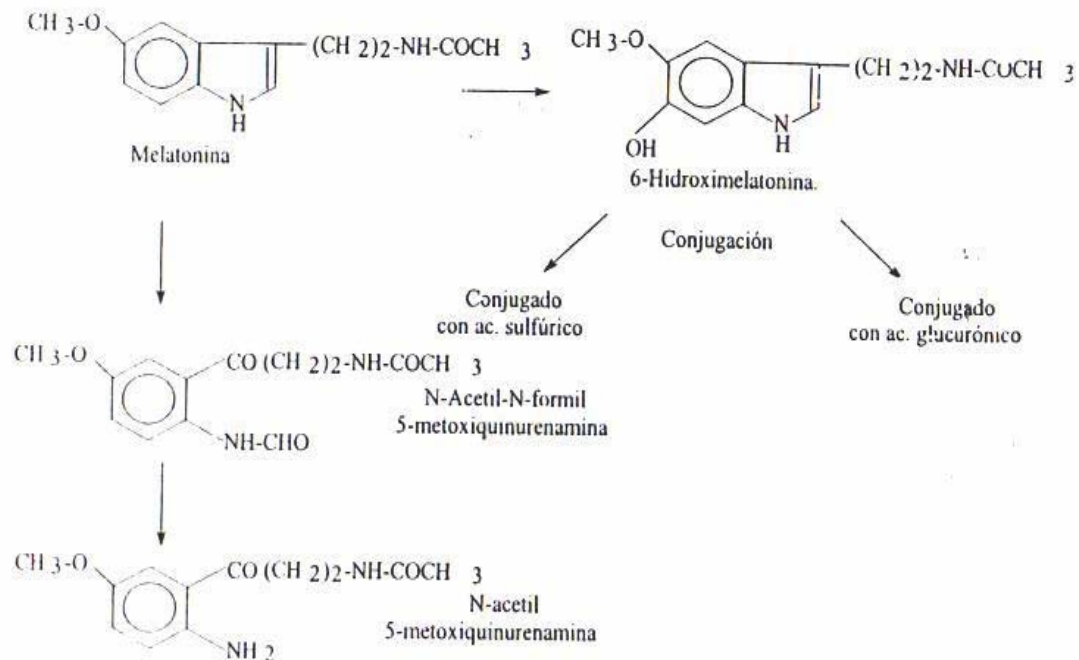


Fig. 21. Metabolismo de la melatonina. Muestra la conjugación con el ácido sulfúrico y el ácido glucurónico. (22)

➤ MELATONINA Y DUODENO

Como se mencionó en la introducción nosotros podemos encontrar a la MEL en varias partes del cuerpo efectuando diversas funciones biológicas. Encontramos a la MEL en órganos como son la retina, glándulas adrenales, cerebelo, hígado, timo, tiroides, páncreas, ovarios, cuerpo carótide, placenta y endometrio a este tipo de MEL la conocemos como MEL exógena ya que se encuentra fuera de su sitio de acción en la glándula pineal (34, 56). Además de los órganos ya mencionados podemos encontrar a la MEL en células no endocrinas como son las células NK, eosinófilos, plaquetas, y otras (33,56).

Encontramos la mayor parte de la MEL exógena en el tracto gastrointestinal (60). La MEL se distribuye a lo largo del TGI en diferentes concentraciones, encontrando la mayor concentración de esta en la parte del duodeno-íleon y la menor concentración en el colon y



otras regiones del TGI. Teniendo una distribución muy similar a la que tiene 5HT en el TGI (34, 41, 56).

En el SNE la MEL parece estar asociada a funciones endocrinas, parácrinas y autócrinas, así como a la relajación de la actividad muscular. En el intestino delgado se han encontrado un tipo de receptor de MEL, el MT 1 que se caracteriza por pertenecer a los receptores acoplados a la proteína G que es capaz de inhibir la adenilato ciclasa, inhibiendo la actividad contráctil del músculo liso (34).

En el TGI la MEL puede ser identificada usando una variedad de métodos incluyendo métodos inmunocitoquímicos, cromatográficos y de radioinmunoensayo.

Estudios recientes han mostrado que al realizar una pinealectomía (Px) altera los niveles de MEL en plasma, pero esto no disminuye los niveles de MEL en el TGI. Es por esto que se dice que la MEL en el TGI, puede ser sintetizada no en la glándula pineal sino por las células enterocromafines (EC) de la mucosa GI. Puede ser que la MEL GI sea producida en las EC a partir de diferentes estímulos como con la ingesta de alimentos actuando de tal manera que afecta a la absorción de estos, y tal vez influyendo en la proliferación celular del TGI (34, 56, 46).

2.4 ANÁLOGOS DE MEL

Estudios previos con análogos de MEL han mostrado que de los modelos teóricos propuestos para la interacción de MEL con su sitio receptor se ha postulado que son esenciales el grupo 5-metoxilo y el grupo acetamido, pero también se ha considerado al núcleo indólico como punto importante, debido a que éste puede formar una interacción del tipo transferencia de carga con los residuos de los aminoácidos aromáticos del sitio receptor (38).



Se investigaron las propiedades electrónicas de diversos derivados de MEL y su relación con la actividad biológica, en particular con su afinidad al receptor de MEL determinada en la membrana de cerebro de pollo (38).

En dicho estudio se incorporaron en la posición 1 de la estructura de la MEL grupos aralquil, aralcil y aril no sustituidos o con sustituyentes en la posición “*para*” (38). Los análogos utilizados en este estudio están basados en esta investigación previa.

➤ ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANÁLOGOS DE MEL

En el presente estudio se utilizaran los siguientes análogos sintetizados en la Facultad de Química presentados por su clave.

Análogo M6A

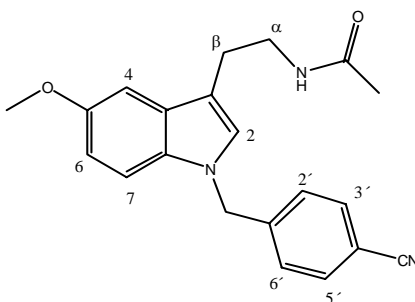


Fig. 22. Análogo *N*-{2-[1-(4-cianobencil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il]-etil}-acetamida (F.Q.)

Análogo M6B

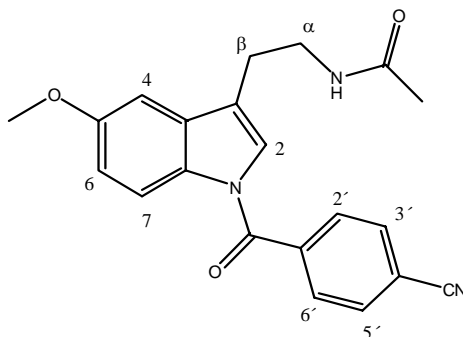


Fig. 23. Análogo *N*-{2-[1-(4-cianobenzoil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il]-etil}-acetamida (F.Q.)



Análogo M6C

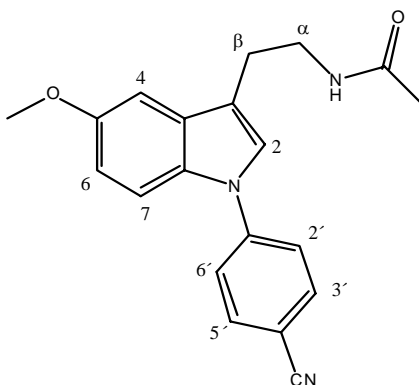


Fig. 24. Análogo N-{2-[1-(4-cianofenil)-5-metoxi-1H-indol-3-il]-etil}-acetamida (F. Q.)

Análogo M7A

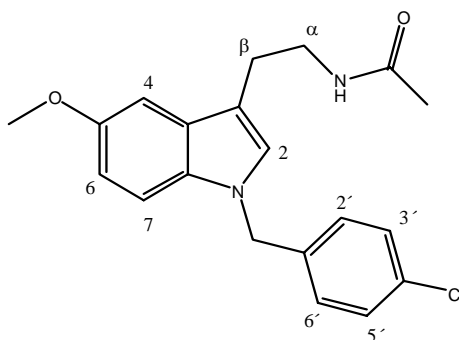


Fig. 25. Análogo N-{2-[1-(4-clorobencil)-5-metoxi-1H-indol-3-il]-etil}-acetamida (F.Q.)

Análogo M7B

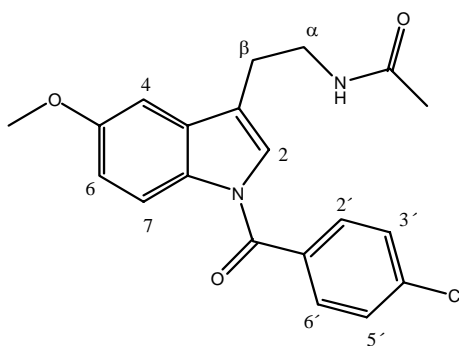


Fig. 26. Análogo N-{2-[1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-1H-indol-3-il]-etil}-acetamida (F.Q.)



Análogo M7C

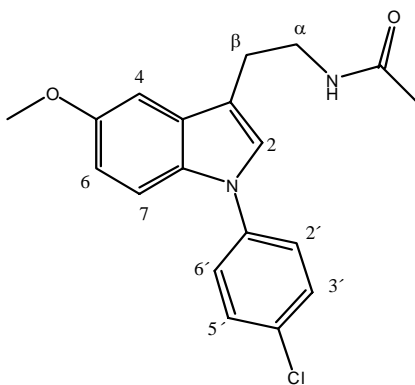


Fig. 27. Análogo *N*-{2-[1-(4-clorofenil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il]-etil}-acetamida (F.Q.)



III. JUSTIFICACIÓN

La MEL es una hormona que tiene una gran utilidad en diferentes enfermedades neurodegenerativas y otras, hasta el momento, no se le han encontrado efectos adversos. A pesar de los estudios exhaustivos a los que ha estado sometida no se ha demostrado cuales son los mecanismos de acción con los que actúa.

Otra situación podría ser el tiempo de vida media en el organismo reportada en humanos después de una administración de MEL por vía oral o intravenosa aproximadamente de 10 a 40 minutos, lo que nos daría como consecuencia un tratamiento complicado e incomodo para los pacientes.

Es por estas razones es que este estudio se realizó, para poder ayudar a encontrar un análogo que pueda ser alternativo a MEL.

Ya que la mayor parte de MEL exógena se encuentra en el TGI y la mayor concentración de esta se encuentra en el duodeno-íleo, en el presente estudio se utilizaron segmentos de duodeno para medir la actividad de MEL sobre este tejido.



IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Si la MEL produce una relajación de la actividad contráctil del músculo liso del intestino, entonces los análogos de la melatonina N-sustituidos actuaran como agonistas de MEL, obteniendo la misma respuesta de relajación.

4.2 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de los análogos de MEL en el tejido aislado.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar y cuantificar la actividad eléctrica del duodeno con la administración de MEL y de los análogos.
- Describir el efecto provocado al tejido por la adición de diferentes concentraciones de MEL y los análogos, calculando la C_{150} (Concentración de inhibición al 50%) por medio de las curvas dosis respuesta gradual de cada uno.
- Describir el posible efecto provocado por los análogos haciendo un análisis comparativo con MEL.
- Demostrar cual de las sustancias tiene el efecto similar o diferente a de MEL.



V. MATERIAL Y METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL

➤ REACTIVOS

Bicarbonato de sodio (Sigma-aldrich)

Cloruro de sodio (Sigma-aldrich)

Cloruro de potasio (J.T. Baker)

Sulfato de magnesio (Merck)

Cloruro de calcio (Merck)

Glucosa monohidratada (Merck)

Fosfato de potasio (Guard)

Agua destilada (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)

Melatonina (Sigma-aldrich)

Polietilenglicol (Merck)

Tween 80 (Merck)

Los análogos de MEL, se clasificaron por claves y la concentración para cada uno de ellos fue de 3.33mM/ ml

M6A (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)

M6B (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)

M6C (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)

M7A (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)

M7B (UNAM. F.Q. Departamento de Farmacia)

M7C (UNAM F.Q. Departamento de Farmacia)



➤ EQUIPO Y DIVERSO

MP 100 BIOSYSTEM-BIOPAC con su respectivo software

Recirculador de agua (Circon)

Computadora (Dell)

4 Cámaras de baño (Pirex)

Cajas Petri (Pirex)

Agujas e hilo

Equipo de disección (Miltex)

4 Jeringas de 10ml

Micropipetas de 5-40 y de 40-1000 μ l (eppendorf)

5.2 MÉTODO

I. Preparación de las sustancias:

- Solución Ringer-Krebs:

Se prepararon las soluciones stock de la siguiente forma:

Se preparó 1 L de solución de NaHCO_3 a 0.1 M, 1 L de solución de NaCl a 1M, 100 mL de solución de KCl a 1M, 100 mL de solución de KH_2PO_4 a 1M, 100 mL de solución de MgSO_4 a 1M y 100 mL de solución de CaCl_2 a 1M.

Consecutivamente se tomaron las alícuotas para obtener una solución que contenía 119 μM de NaCl , 11 μM de KCl , 1.2 μM de KH_2PO_4 , 2 μM de NaHCO_3 , 1.5 μM de CaCl_2 , 1.2 de μM MgSO_4

- Soluciones vehículo; se prepararon de la siguiente forma:

El vehículo₁ se preparó con 0.75 mL de polietilenglicol y se diluyó en 2.25 mL de agua.



El vehículo₂ se preparó con 0.75 mL de tween 80 y se diluyó en 2.25 ml de agua.

- Sustancias

La solución de MEL se preparó a una concentración de 3.33mM, al igual que los análogos que se utilizaron.

II. Condiciones de los animales:

Se utilizaron 9 ratas Wistar macho con un peso aproximado de 300 a 450g de las que se obtuvieron 36 tejidos en condiciones de ayuno por 5 horas. (Cada animal se colocaba diariamente en aislamiento sin alimento)

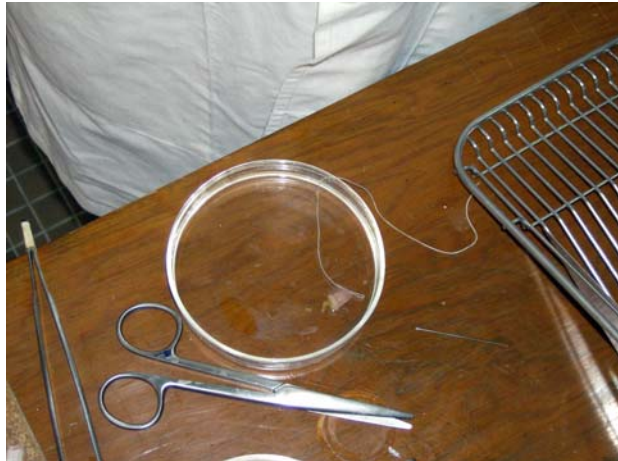
III. Obtención del tejido

Primero se llenó el baño y se verificó el nivel de agua del recirculador, e inmediatamente después se encendió para alcanzar una temperatura de 37°C +/- 0.5°C.

Mientras el baño llegaba a la temperatura elegida se preparó la solución Ringer-krebs se almacenó en un matraz y posteriormente, se colocó en el baño para que ésta alcanzara la misma temperatura de 37°C.

Se sacrificó a la rata por dislocación cervical y, después se localizó el primer segmento del intestino (duodeno), se seccionó de 5 a 6 cm del tejido separándolo del mesenterio con el que esta unido procurando no afectar al tejido y colocarlo lo más pronto posible en la caja Petri con solución Ringer.

Del tejido obtenido se Seccionaron 4 segmentos de un centímetro aproximadamente para colocarlos en las cámaras correspondientes, sin perder de vista la parte proximal y la distal al estómago (Fotografía 1).



Fotografía 1. Tejido aislado atado por el extremo proximal al estómago.

Para fijarlos en las cámaras, los segmentos se atan de los extremos de los segmentos con los hilos con la ayuda de las agujas y se colocaron en la cámara para tejido aislado (Fotografía 2).



Fotografía 2. Cámara convencional donde se muestra el tejido colocado de manera correcta.



Los tejidos se colocaron de la siguiente forma: la parte proximal al estómago se colocó hacia la parte superior de la cámara y la parte inferior se sujetó a la base de la misma.

Posteriormente, se llenaron las cámaras con 10 mL del medio (solución Ringer-Krebs), donde se mantenía la temperatura con el baño con recirculación.

Por último se dio tensión a los tejidos ajustando la altura de la calibración y se esperó de 30 a 45 minutos para la estabilización del tejido.

IV. Calibración

Para calibrar el equipo se ajustó la escala para que 10mV produjeran un desplazamiento de 10 mm (En la escala de 10 a -10 mV / 10 a -10 mm) (**Fig.28.**).

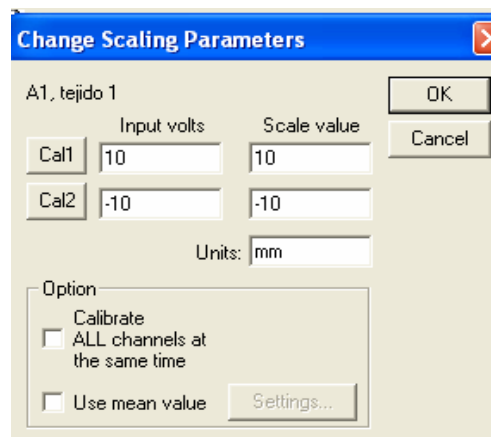


Fig. 28. Ventana de dialogo donde se muestra el ajuste de escala (58).

La velocidad de barrido se ajustó a 2.5 min. dando un desplazamiento de 5 cm por división y se registraron 5 min. de tiempo basal para administrar posteriormente la concentración correspondiente de las diferentes concentraciones de los compuestos y obtener una CDRG (**Fig.29.**).

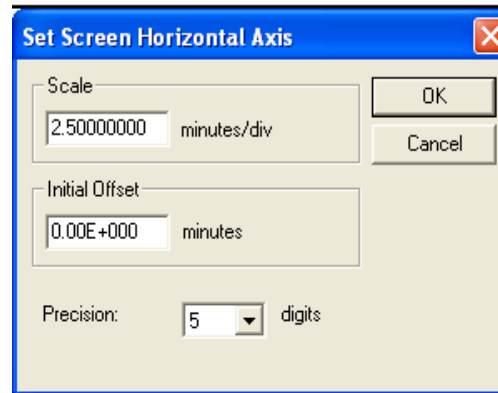


Fig. 29. Ventana de dialogo donde se muestra el ajuste de la velocidad (58).

V. Toma de registros

Todas las respuestas de la actividad eléctrica intestinal se capturaron mediante la ayuda del software en la computadora para analizarlas (Fig. 30).

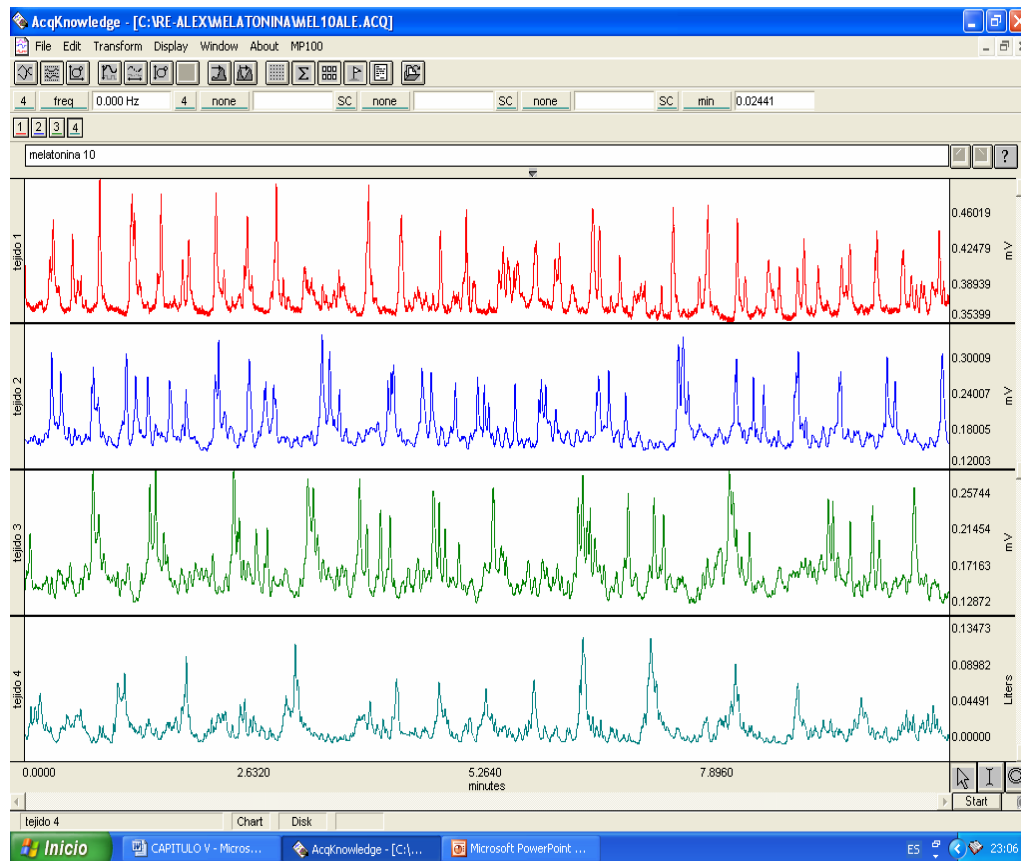


Fig. 30. Ventana principal de la pantalla de la computadora donde se muestran registros de los tejidos, el ∇ señala el momento de la aplicación (58).



Posterior a la estabilización del tejido, se obtuvieron 4 registros los cuales se conformaban de: registro basal preaplicación con duración de 5 min. y registro postaplicación con duración de 5 min. con la administración de solución vehículo (1 y 2) y obtener una respuesta basal, posteriormente se realizó una curva dosis respuesta gradual (CDRG) para la solución vehículo (10, 20, 40, 80, 160, 320 μ l).

Se obtuvo una respuesta basal para cada compuesto y para cada tejido, se aplicaron las soluciones problema y se registró la respuesta.

Una vez obtenidos los registros se analizaron los datos para frecuencias (FREC), Amplitud (AMP) y área bajo la curva (ABC), mediante el software, las espigas para determinar la frecuencia se calcularon una por una.

Se vertieron los datos en una hoja de cálculo (Microsoft- Excel) y se obtuvieron los promedios de los datos de estos parámetros.

Con estos datos se calculó el porcentaje de los datos.

Se graficaron estos datos en porcentaje para obtener la CDRG

Con esta curva se calculó la concentración de inhibición al 50% (CI_{50%}).

Posteriormente, con todos estos datos se realizó un análisis estadístico con la prueba de χ^2 , obteniendo el valor de la probabilidad con una $p < 0.05$ para comparar el efecto de los análogos contra el efecto de MEL (47).



VI. RESULTADOS

Una vez que se obtuvieron los registros de la actividad eléctrica espontánea del tejido aislado (duodeno) en la PC se cuantificaron los siguientes parámetros: amplitud (AMP en cm), área bajo la curva (ABC en cm^2), y la frecuencia (FREC en Hz) por medio del software Acqnowledge del sistema Biopac, obteniendo los datos cuantitativos de los mismos.

➤ EFECTO DE VEHÍCULO₁ y ₂ SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO.

En las **Figs. 31 y 32.** y en las tablas 1 y 2 se muestran los registros obtenidos para la soluciones vehículo 1 y 2

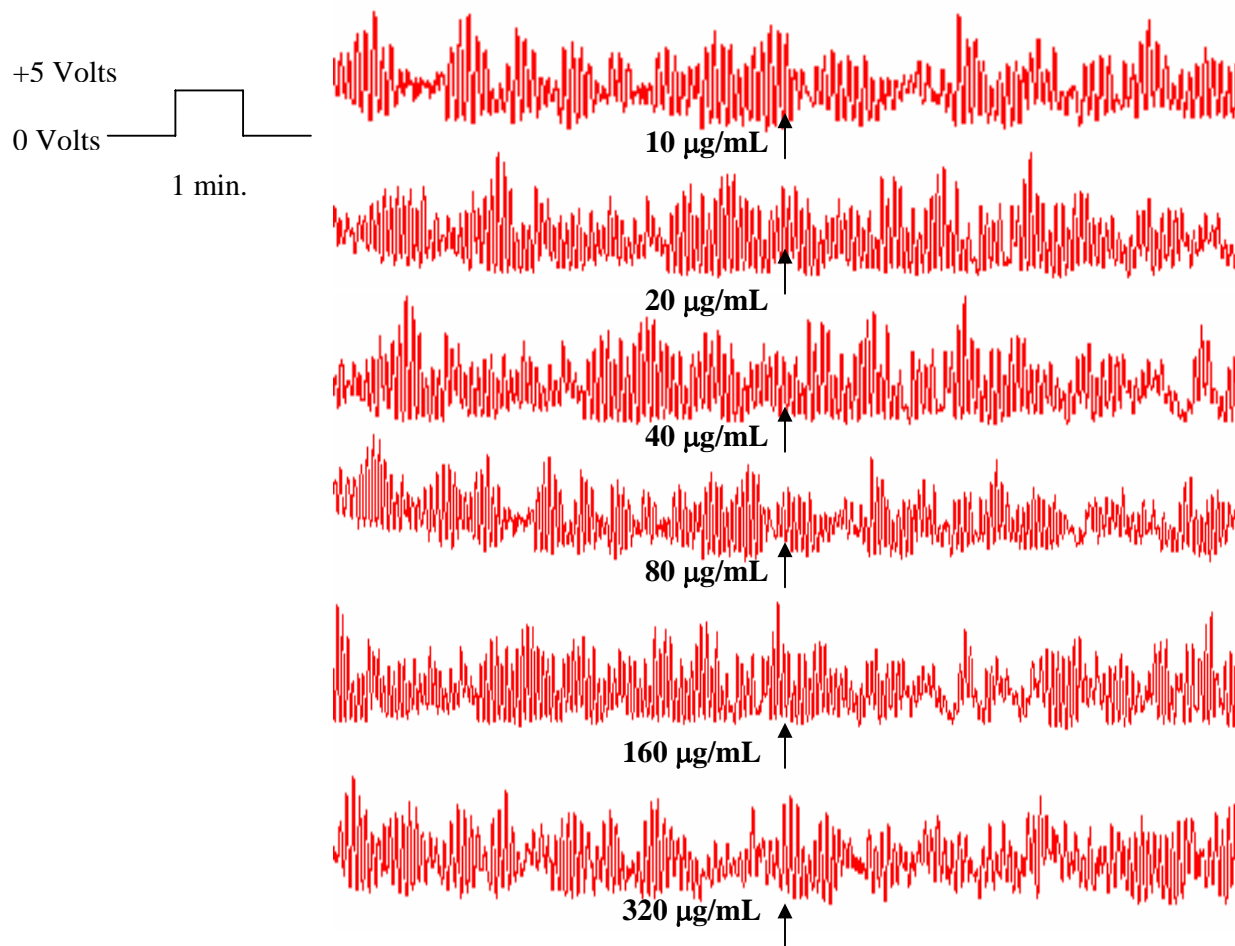


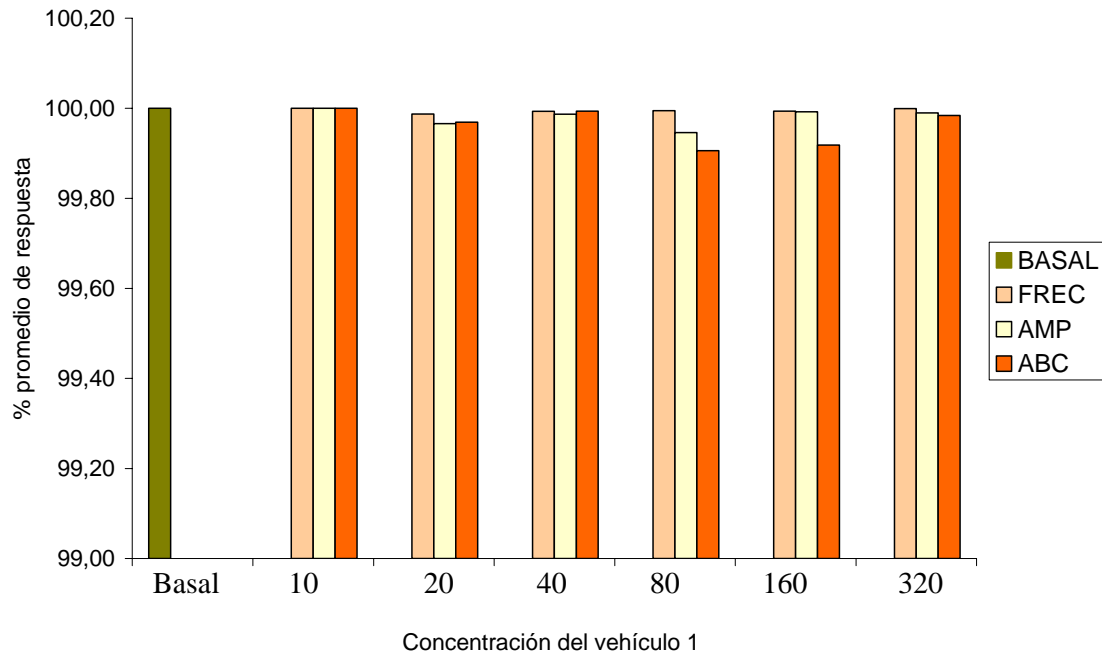
Fig. 31. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo₁ pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas.



Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 1 y Gráfica No 1.

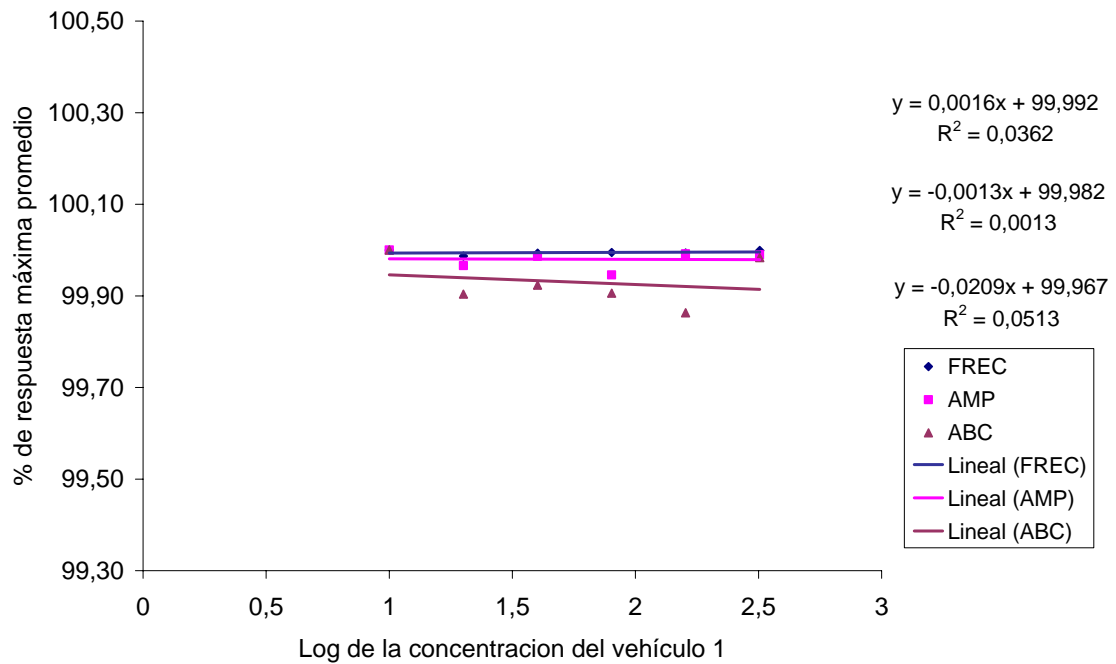
Tabla No. 1. Muestra el % de relajación máxima con la administración de Vehículo₁ y los valores promedios de cada registro basales y post- aplicación.

Porcentajes promedio con aplicación del vehículo 1									
Concentración en µg/ mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,36	0,36	100.00	0.26	0.26	100.00	0,24	0,24	100.00
20	0,33	0,33	99.99	0.24	0.24	99.97	0,38	0,38	99.95
40	0,31	0,31	99.99	0.29	0.29	99.99	0,36	0,36	99.92
80	0,34	0,34	99.99	0.26	0.26	99.95	0,38	0,38	99.96
160	0,32	0,32	99.99	0.25	0.25	99.99	0,36	0,36	99.93
320	0,33	0,33	100.00	0.39	0.39	99.99	0,36	0,36	99.99



Gráfica. 1. Valores del % de respuesta promedio de la FREC, AMP y ABC con la administración de Vehículo₁ en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%

Con base a los datos expuestos en la tabla 1 se obtuvieron la regresión lineal, para el parámetro de frecuencia y se muestra en la grafica 2.



Gráfica. 2. Curva dosis-respuesta gradual para FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada parámetro, y el coeficiente de correlación lineal.

No se calculó la concentración de inhibición al 50% ($CI_{50\%}$), ya que éste vehículo no muestra ninguna actividad.

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración del vehículo₂ se observa en la **Fig.32**.

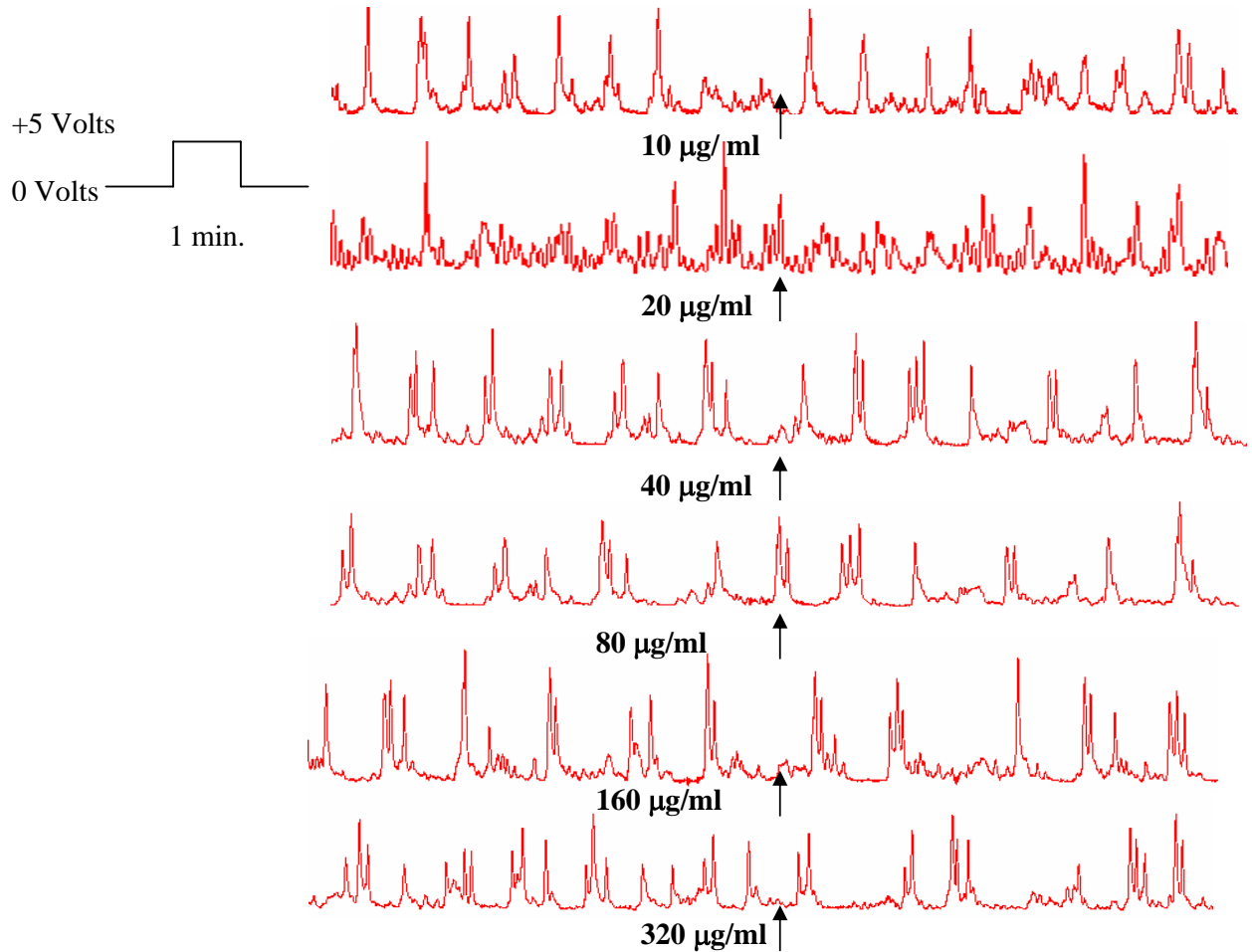
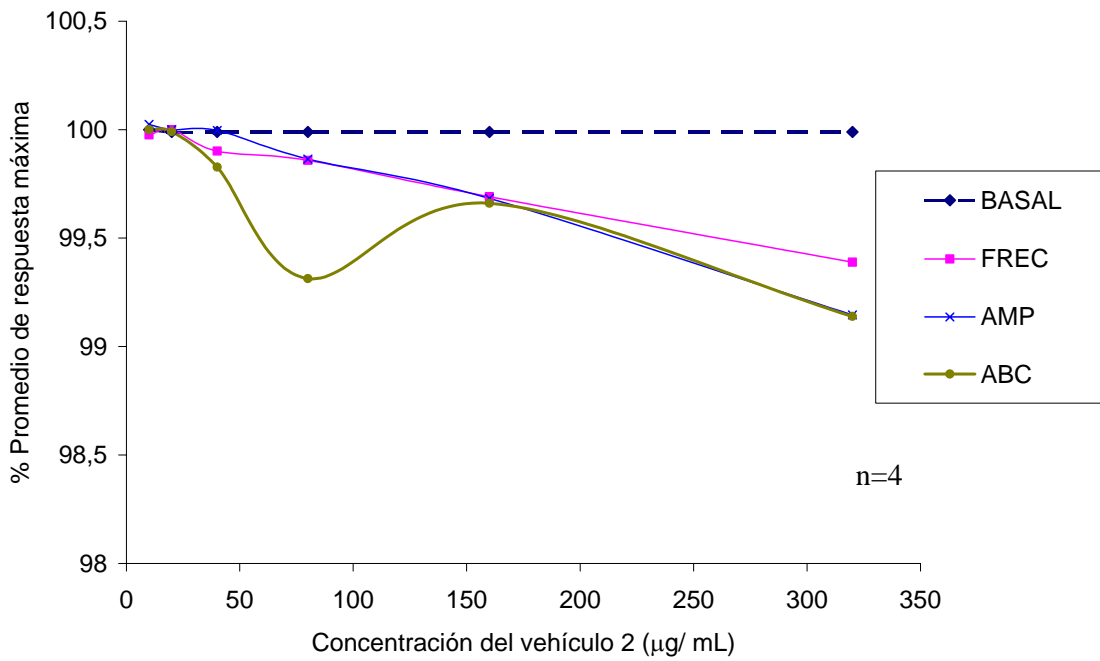


Fig. 32. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo₂ pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas.

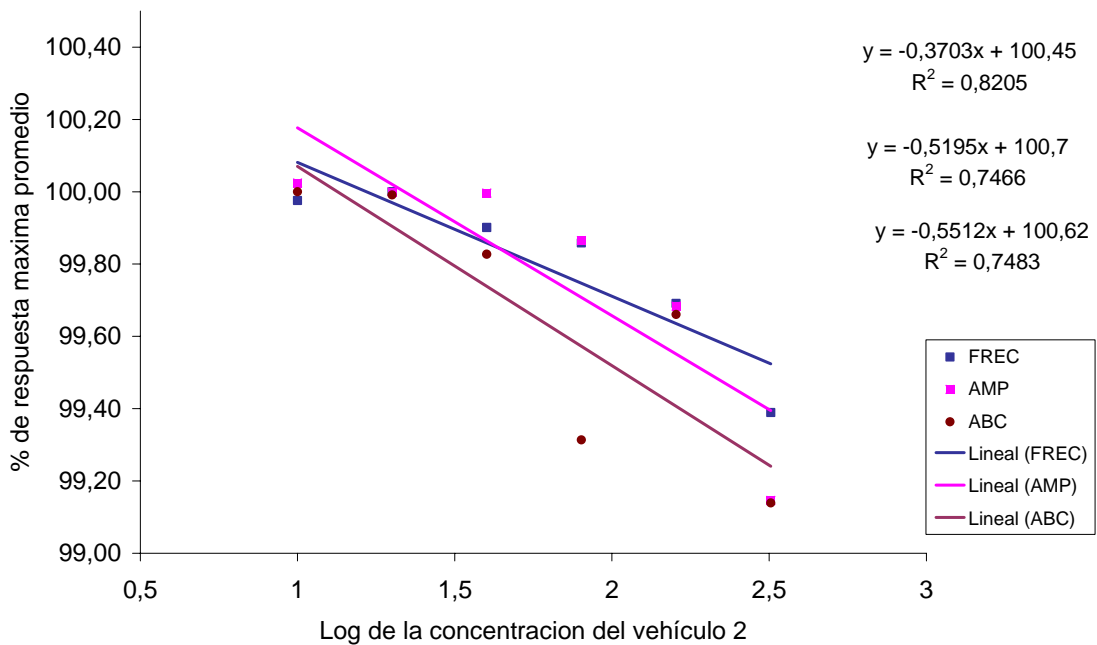
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 2 y Gráfica No 3.

Tabla No. 2. Muestra el % de relajación máxima con la administración de Vehículo₂ y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

Porcentajes promedio con aplicación del vehículo 2									
Concentración en µg/ mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,40	0,40	99,98	0,16	0,16	100,02	0,15	0,15	100,00
20	0,37	0,37	100,00	0,16	0,16	100,00	0,62	0,62	99,99
40	0,39	0,39	99,90	0,06	0,06	100,00	0,36	0,36	99,83
80	0,39	0,39	99,86	0,08	0,08	99,86	0,78	0,77	99,31
160	0,44	0,44	99,69	0,17	0,17	99,68	0,62	0,62	99,66
320	0,38	0,38	99,39	0,40	0,40	99,15	0,54	0,53	99,14



Gráfica. 3. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la aplicación de Vehículo₂ en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%



Gráfica. 4. Curva dosis-respuesta gradual para FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para este parámetro, y el coeficiente de correlación lineal.



No se calculó $CI_{50\%}$, ya que éste vehículo no muestra ninguna actividad.

➤ EFECTO DE MEL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO.

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de MEL se observa en la **Fig. 33**.

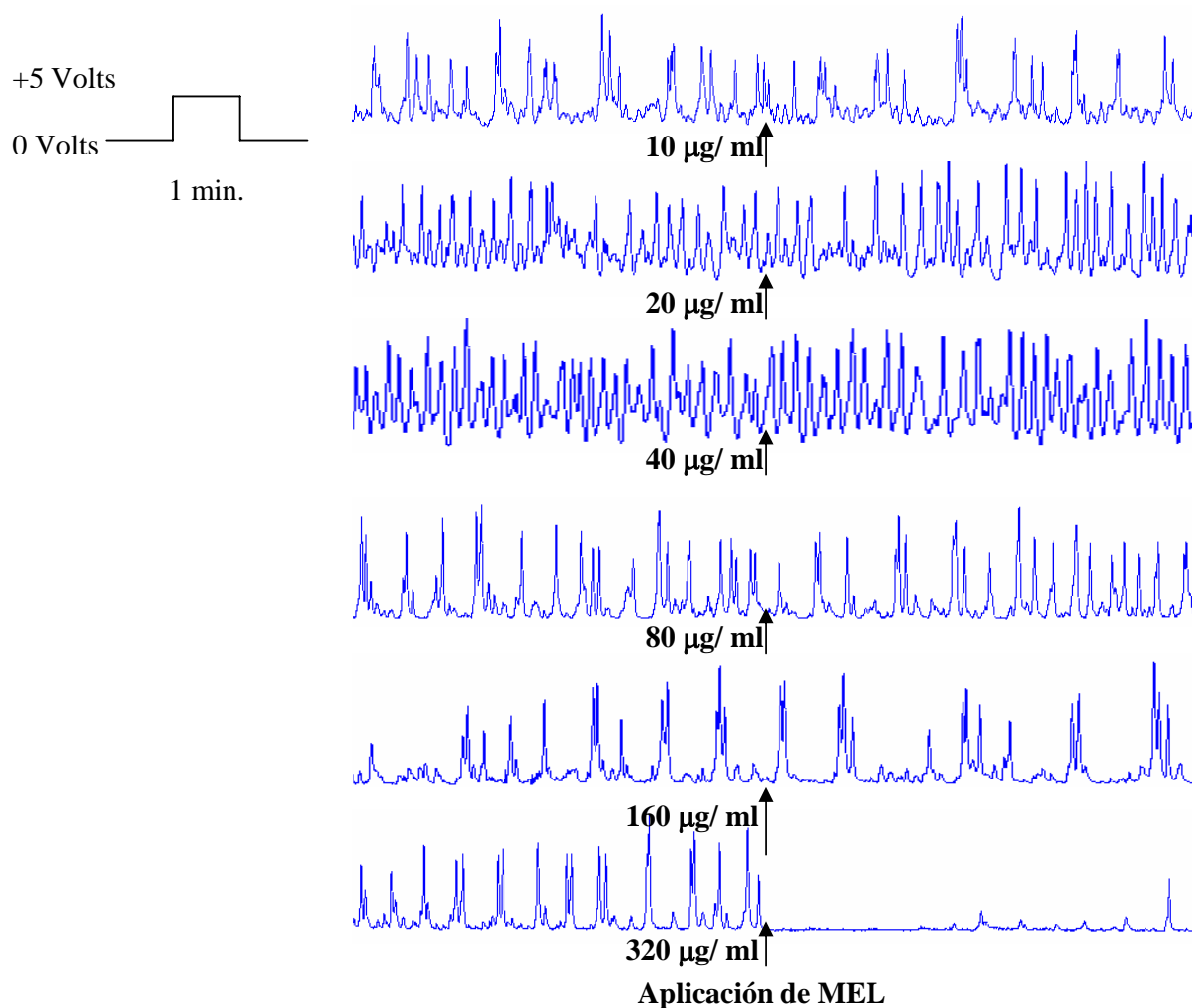


Fig. 33. Registro obtenido con la aplicación de la solución de MEL pre y post aplicación por 5 minutos. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas.

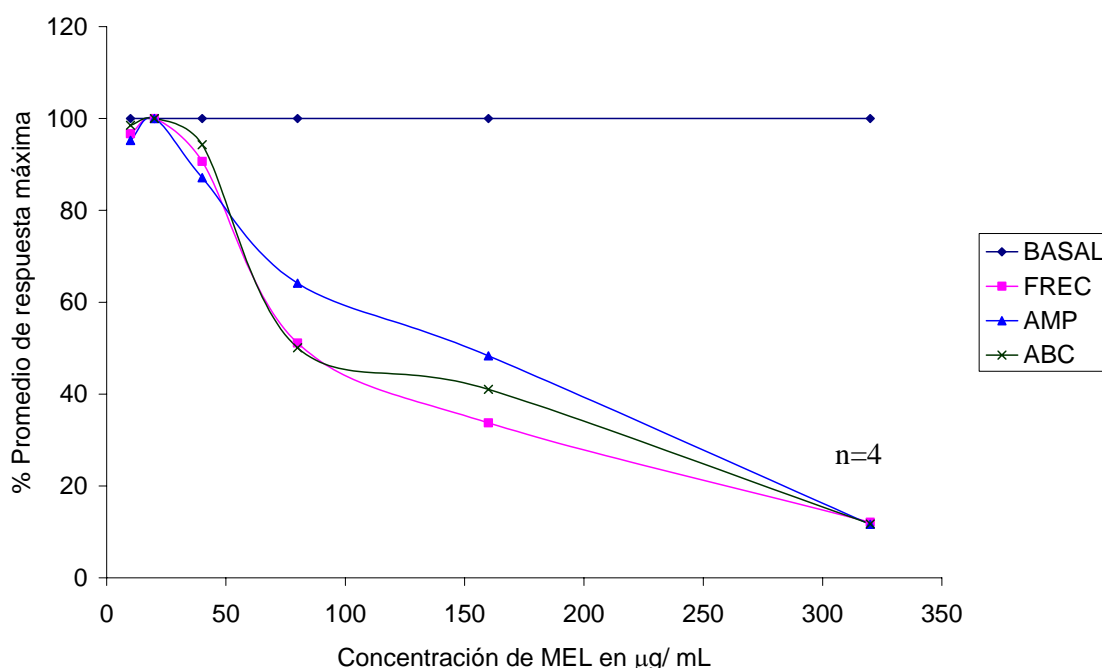
En esta figura se observa la respuesta basal y conforme se aplican las diferentes concentraciones la actividad disminuye en forma gradual, en los tres parámetros (FREC, AMP y ABC), lo que nos indica que este efecto es dependiente de la concentración de MEL.



Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 3 y Gráfica No 5.

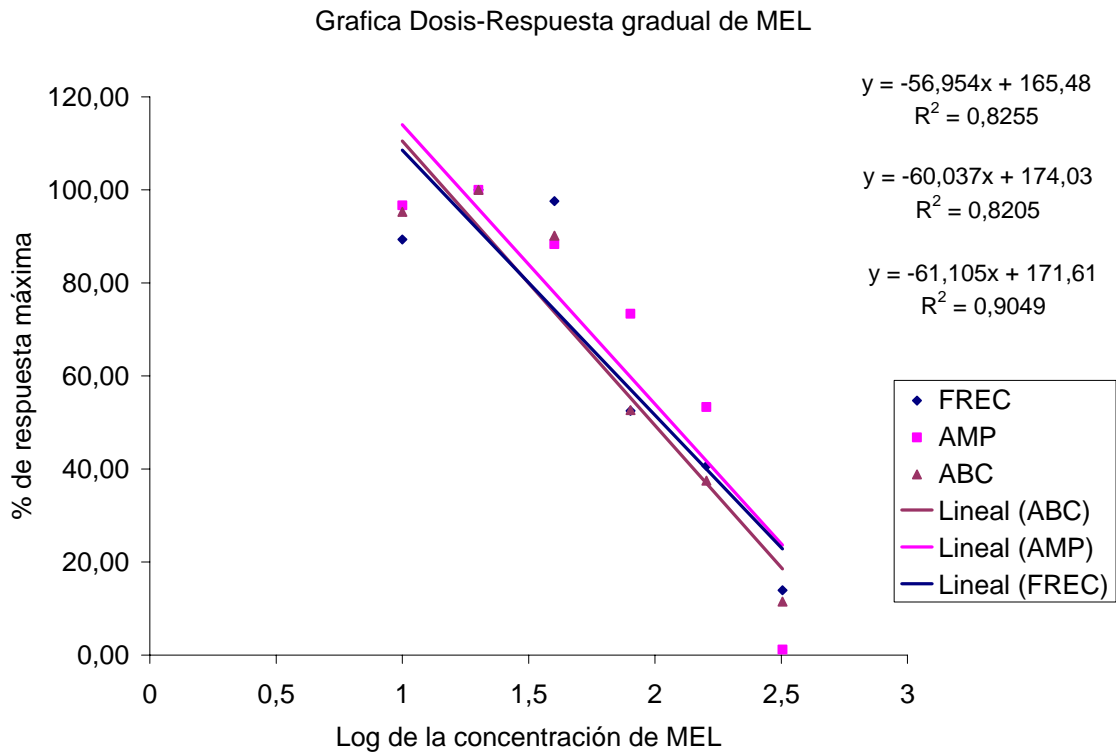
Tabla. 3. Muestra el % de relajación máxima con la administración de MEL y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

Porcentajes promedios con la aplicación de MEL									
Concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,10	0,10	96,69	0,27	0,28	95,26	0,28	0,26	98,51
20	0,29	0,28	100,00	0,09	0,10	100,00	0,59	0,57	100,00
40	0,39	0,35	90,67	0,06	0,06	87,12	0,12	0,11	94,30
80	0,24	0,12	51,09	0,08	0,06	64,15	0,63	0,30	50,08
160	0,28	0,09	33,75	0,17	0,09	48,31	0,37	0,15	41,03
320	0,26	0,03	12,09	0,27	0,03	11,65	0,11	0,01	12,23



Gráfica. 5. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la aplicación de MEL en el tejido duodenal. La línea basal representa los resultados del registro al 100% mientras que las respuestas post-aplicación representan el % correspondiente según la línea basal.

Con base a los datos expuestos en la tabla 3 y a la grafica 5 se hicieron las regresiones lineales, para cada una de las variables y se muestran en la grafica 6.



Gráfica. 6. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%}$ = 106.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la FREC. Para la AMP y ABC la $CI_{50\%}$ es 116.32 y 97.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

➤ EFECTO DE M6A SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M6A se puede observar en la **Fig. 34**.

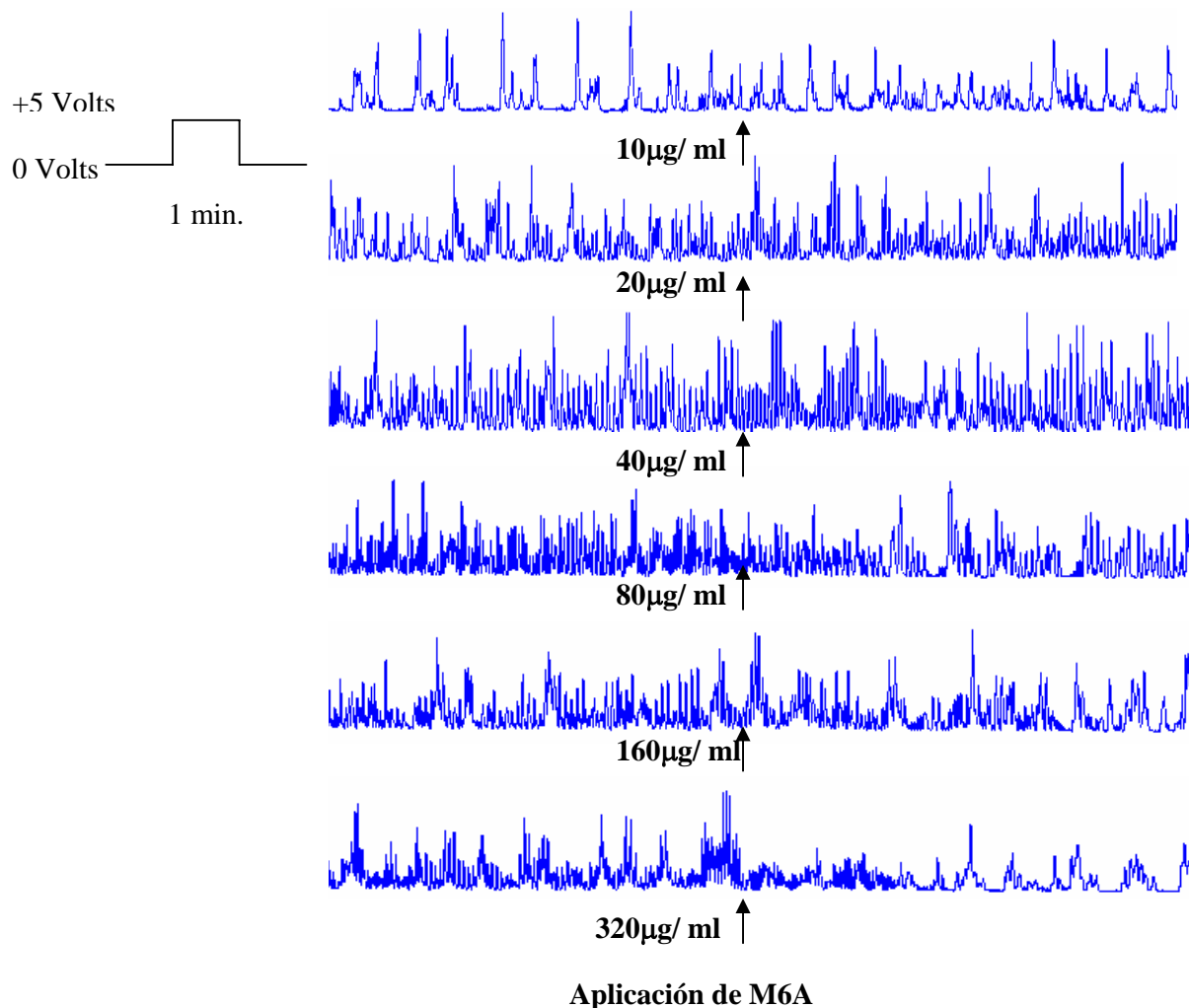


Fig. 34. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M6A pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

En esta figura se observa la respuesta basal y conforme se aplican las diferentes concentraciones la actividad disminuye en forma gradual, en los tres parámetros (FREC, AMP y ABC), lo que nos indica que este efecto es dependiente de la concentración de M6A.

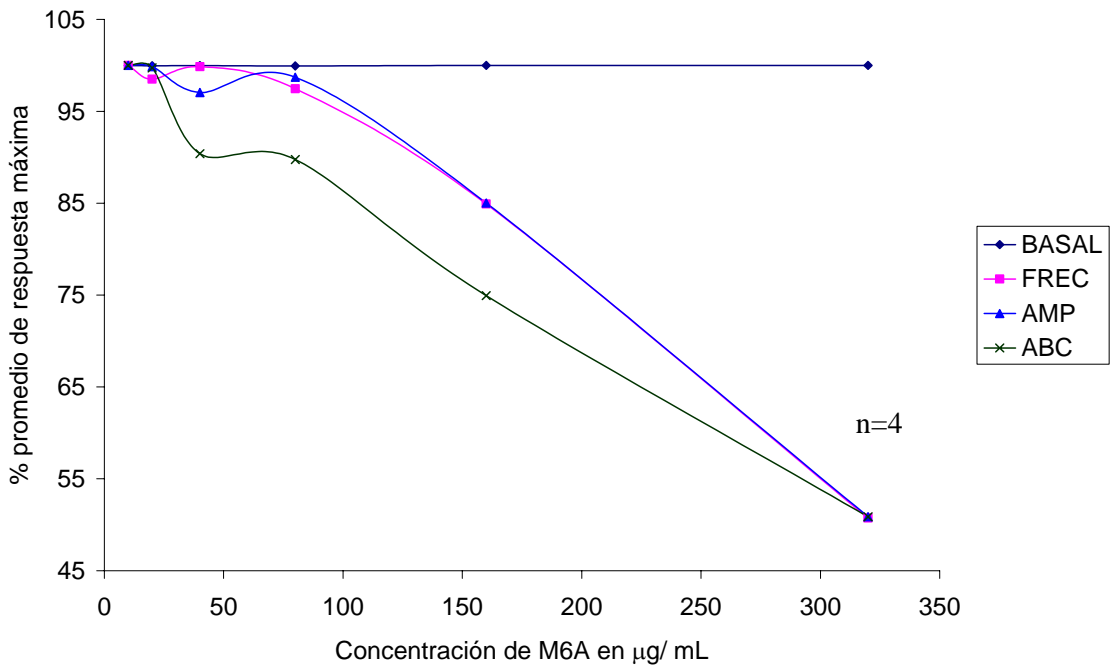
Los resultados promediados para el análogo M6A se mostraran en la tabla 4 y la grafica 7.



Tabla. 4. Muestra el % de relajación máxima con la aplicación de M6A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

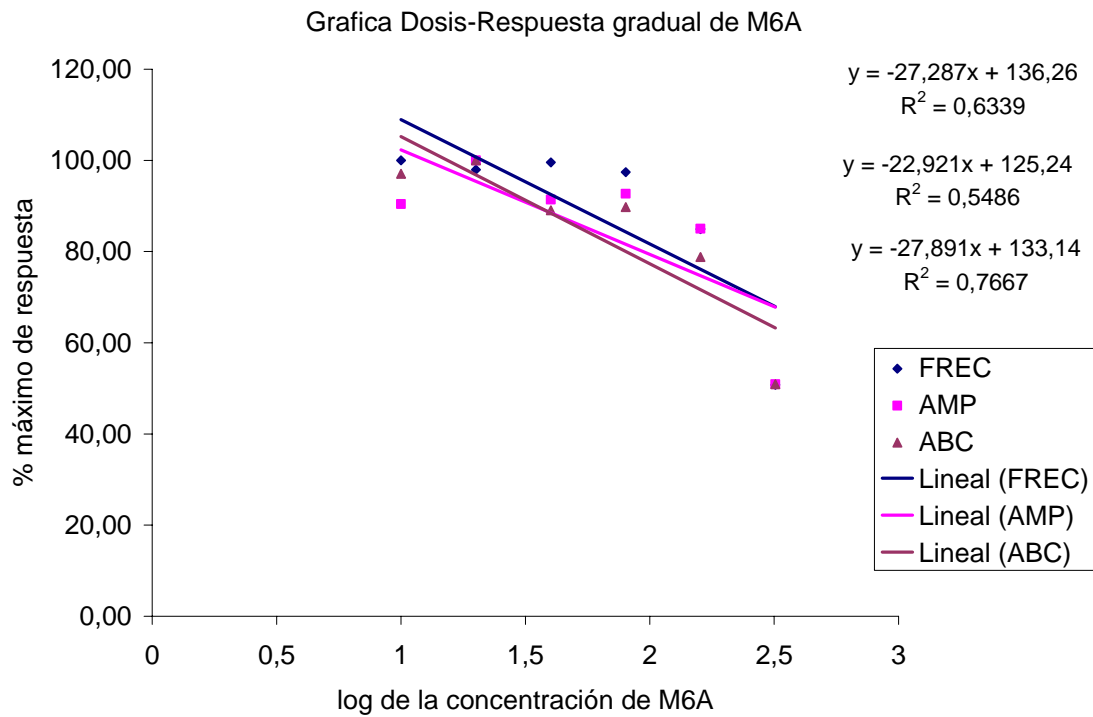
Porcentajes promedios con la aplicación de M6A									
Concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,23	0,23	100,00	0,05	0,05	100,00	0,24	0,24	100,00 *
20	0,37	0,37	98,50	0,03	0,03	99,86	0,05	0,05	99,73*
40	0,42	0,42	99,86	0,03	0,03	97,04	0,04	0,04	90,38*
80	0,44	0,44	97,45	0,02	0,02	98,71	0,03	0,02	89,75*
160	0,46	0,44	84,92	0,02	0,02	85,02	0,03	0,02	74,93*
320	0,47	0,33	50,74	0,03	0,02	50,88	0,03	0,02	50,85

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 7. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la aplicación de M6A en el tejido duodenal La línea basal representa los resultados del registro al 100% mientras que las respuestas post-aplicación representan el % correspondiente según la línea basal.

Con base a los datos expuestos en la tabla 5 se obtuvieron las curvas dosis respuesta gradual, para cada una de las variables y se muestran en la gráfica 8.



Gráfica. 8. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%}$ = 1450.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la FREC mientras que para la AMP y ABC la $CI_{50\%}$ es de 1916.81 y 956.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

➤ EFECTO DE M6B SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M6B se puede observar en la **Fig. 35**.

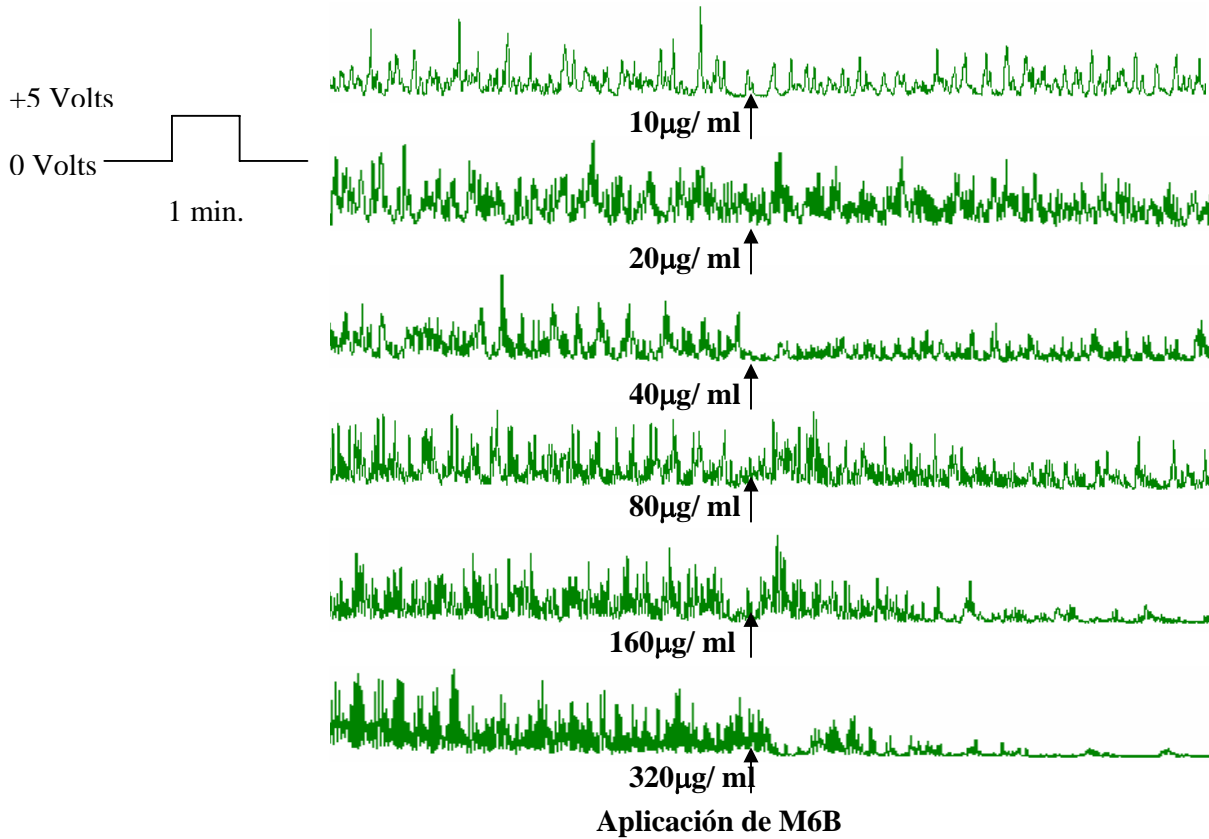


Fig. 35. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M6B pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

Se observa en la figura una respuesta bifásica, donde primero hay un incremento en la actividad eléctrica para la concentración de 20 µg/ml y posteriormente una disminución de forma gradual a la contracción de M6B.

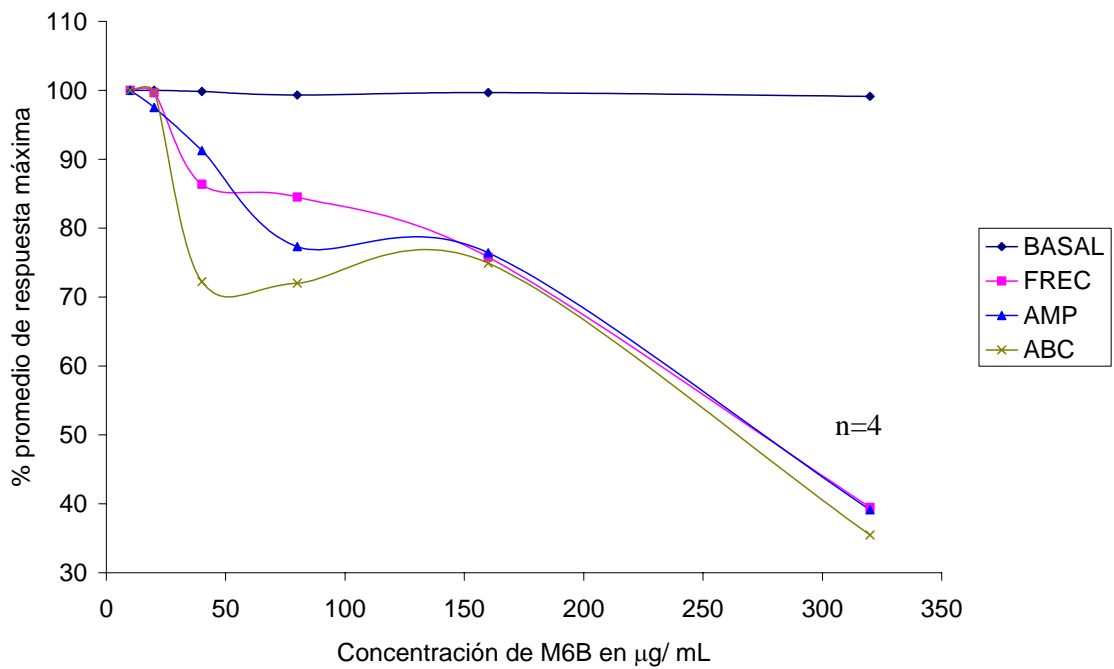
Los resultados promediados para el análogo M6B se mostraran en la tabla 5 y la grafica 9.



Tabla. 5. Muestra el % de relajación máxima con la administración de M6B y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

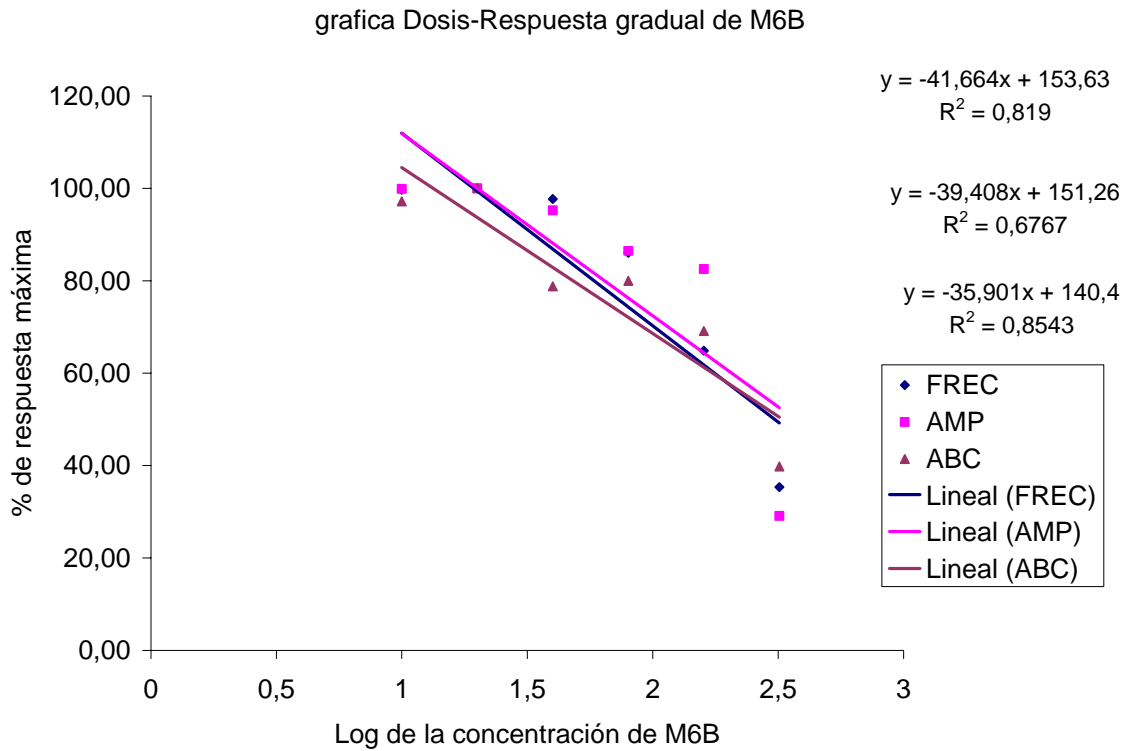
Concentración	Porcentajes promedios con la aplicación de M6B								
	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,34	0,34	100,00	0,06	0,05	100,00	0,15	0,14	100,00
20	0,40	0,40	99,63	0,05	0,04	97,51	0,07	0,06	99,74
40	0,45	0,38	86,37	0,03	0,02	91,26	0,04	0,03	72,23*
80	0,48	0,40	84,50	0,03	0,02	77,31	0,04	0,03	72,02*
160	0,47	0,36	75,80	0,10	0,07	76,41	0,12	0,08	74,91*
320	0,48	0,19	39,49	0,03	0,01	39,13	0,03	0,01	35,47*

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 9. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la administración de M6B en el tejido duodenal La línea basal representa los resultados del registro al 100% mientras que las respuestas post-aplicación representan el % correspondiente según la línea basal.

Con base a los datos expuestos en la tabla 5 se obtuvieron las curvas dosis respuesta gradual, para cada una de las variables y se muestran en la grafica 10.



Gráfica. 10. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%} = 307.1 \mu\text{g/ mL}$ para la FREC mientras que para la AMP y ABC la $CI_{50\%}$ es de 371.1 y $329.6 \mu\text{g/ mL}$ respectivamente.

➤ EFECTO DE M6C SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M6C se puede observar en la **Fig. 36**.

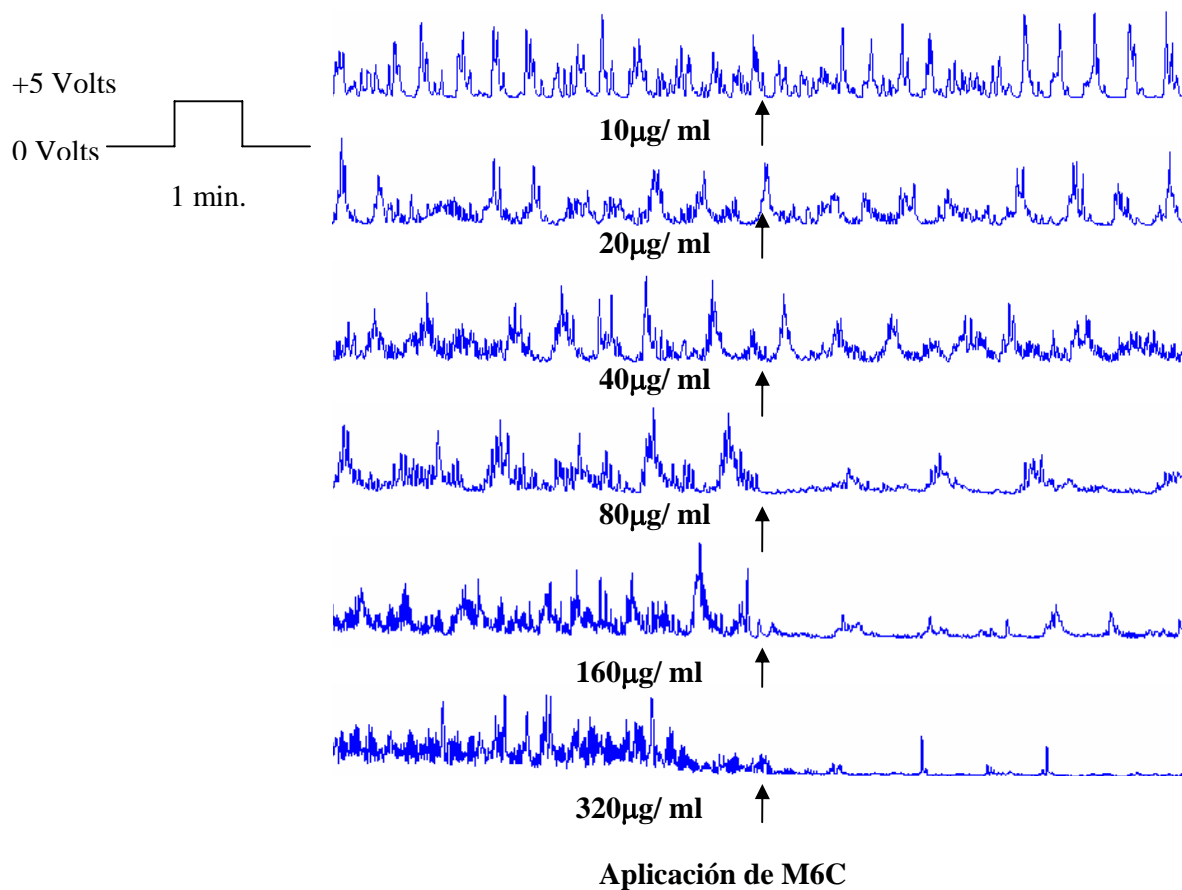


Fig. 36. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M6C pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

Se observa en la Figura que la actividad eléctrica disminuye en forma gradual a la concentración de M6C.

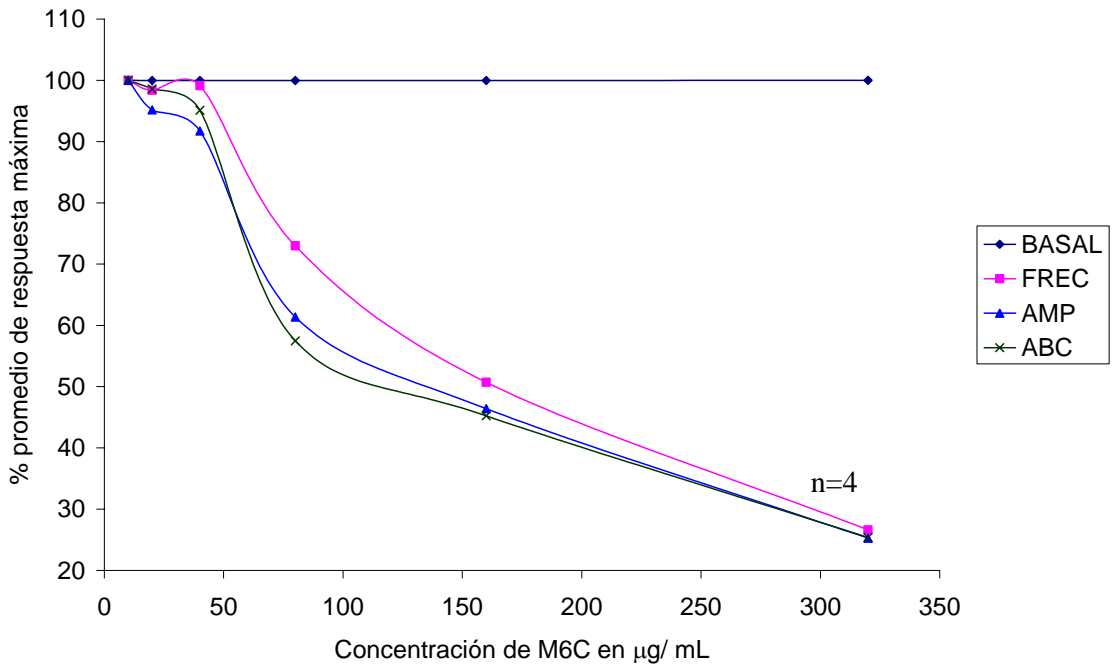
Los resultados promediados para el análogo M6C se mostraran en la tabla 6 y la grafica 11.



Tabla. 6. Muestra el % de relajación máxima con la administración de M6C y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación .

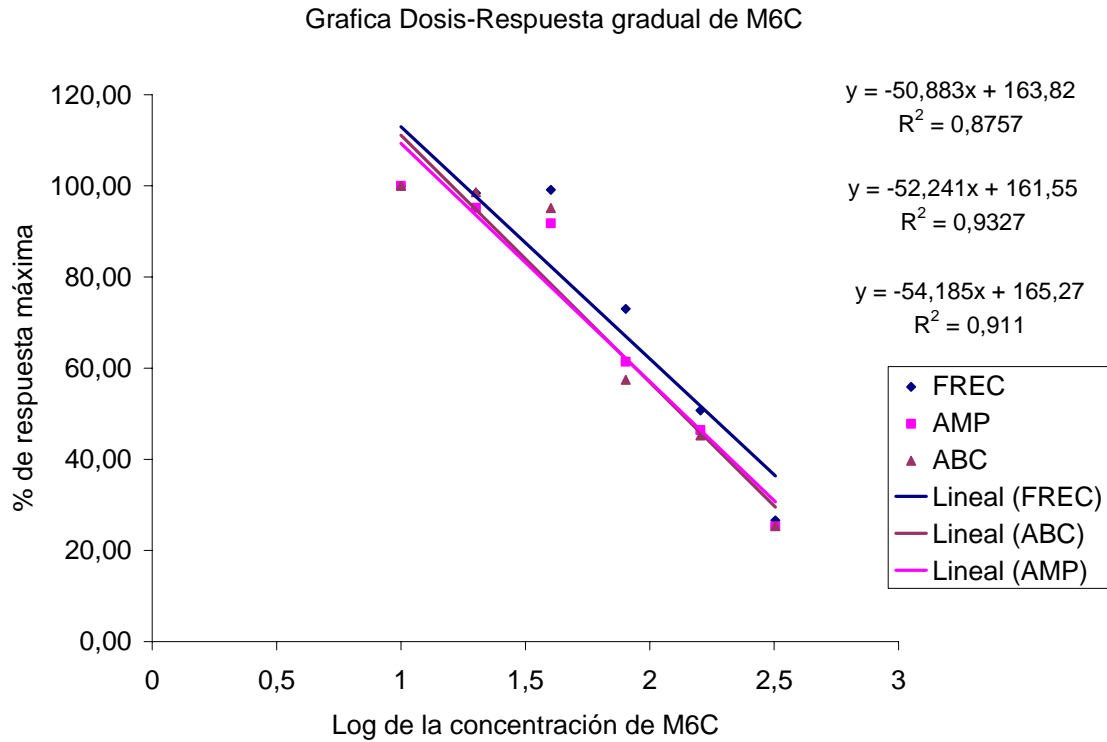
Porcentajes promedios con la aplicación de M6C									
Concentración en µg/ mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,29	0,28	100,00	0,09	0,09	100,00	0,48	0,45	100,00*
20	0,36	0,35	98,39	0,03	0,03	95,18	0,04	0,04	98,61*
40	0,33	0,33	99,12	0,03	0,03	91,76	0,03	0,03	95,13*
80	0,46	0,41	73,00	0,04	0,02	61,39	0,03	0,02	57,47*
160	0,47	0,31	50,71	0,03	0,01	46,40	0,03	0,01	45,23*
320	0,44	0,12	26,61	0,03	0,01	25,26	0,03	0,01	25,38*

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 11. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la administración de M6C en el tejido duodenal

Con base a los datos expuestos en la tabla 6 se obtuvieron las curvas dosis respuesta gradual, para cada una de las variables y se muestran en la gráfica 12.



Gráfica. 12. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%} = 172.54 \mu\text{g/ mL}$ para la FREC mientras que para la AMP y ABC la $CI_{50\%}$ es de 136.55 y 134.07 $\mu\text{g/ mL}$ respectivamente.

➤ EFECTO DE M7A SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO.

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M7A se puede observar en la **Fig. 37**.

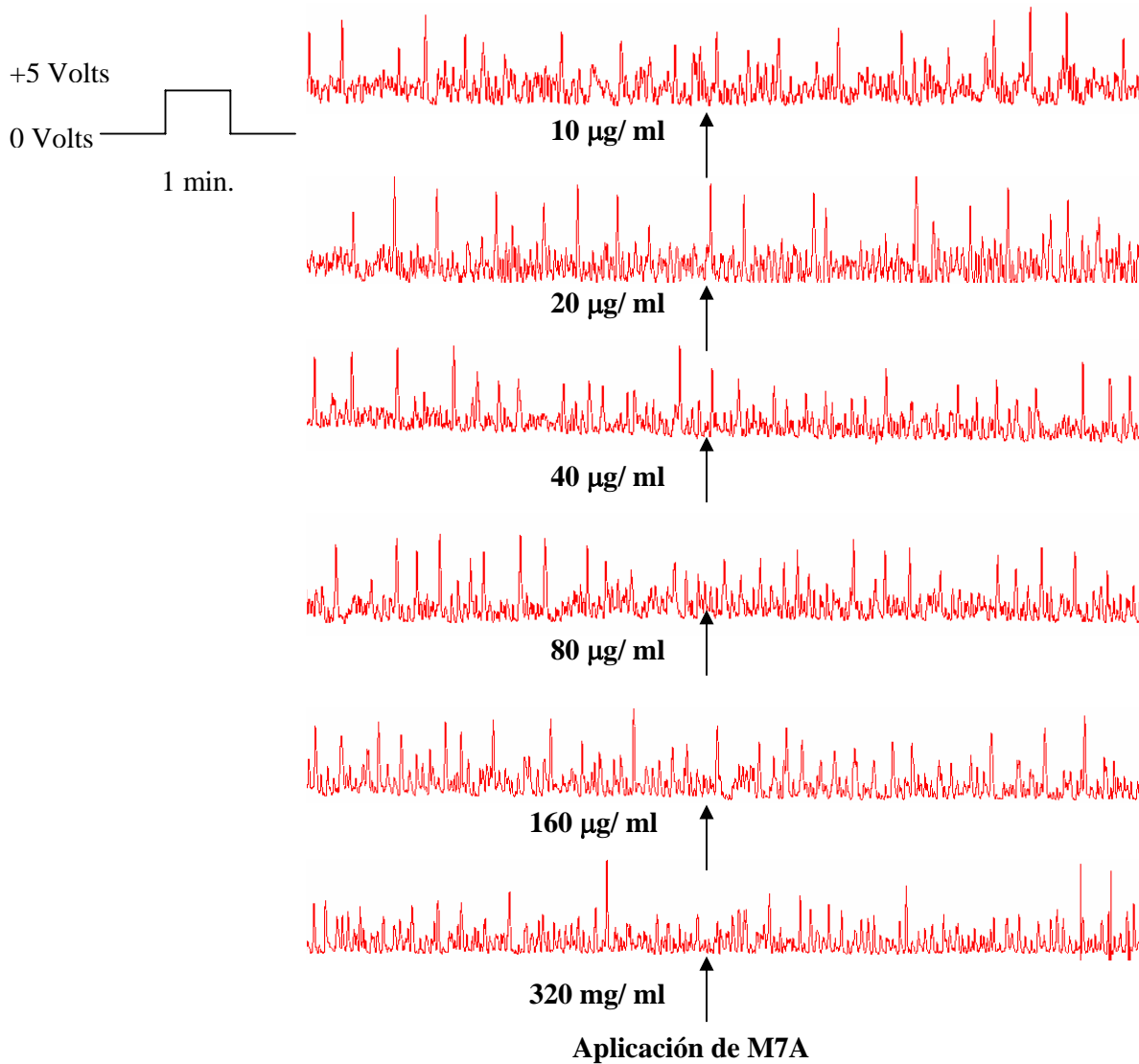


Fig. 37. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M7A pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

En esta figura se observa la respuesta basal y conforme se aplican las diferentes concentraciones la actividad no presenta una ninguna alteración, en ninguno de los tres parámetros (FREC, AMP y ABC), lo que nos indica que no hay un efecto con la aplicación de este análogo (M7A).

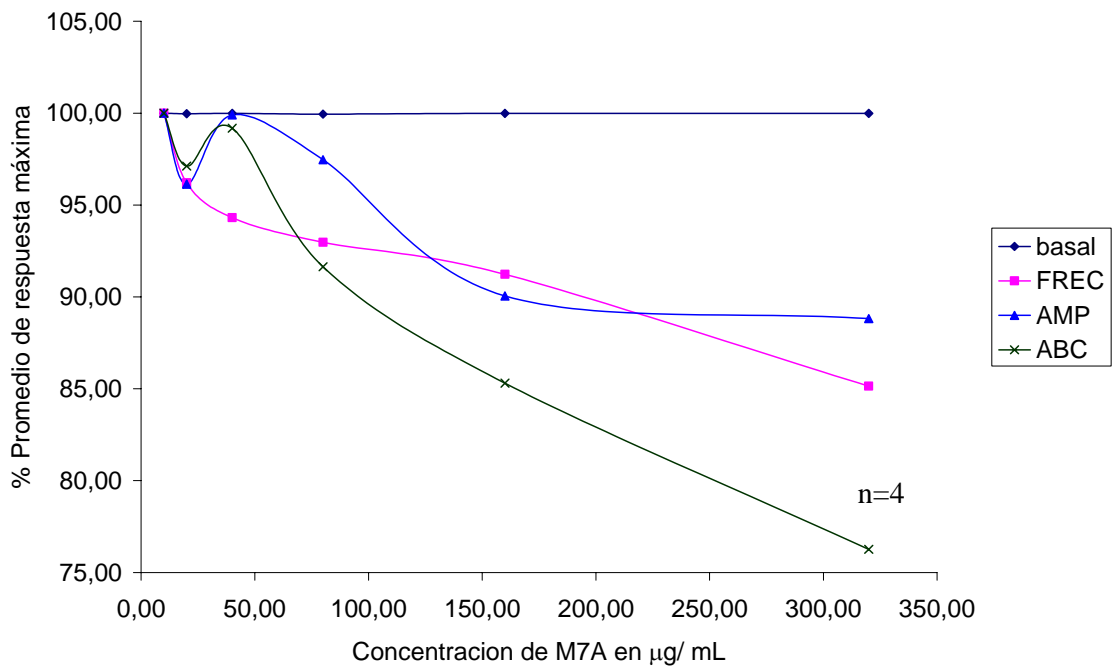
Los resultados promediados para el análogo M7A se mostraran en la tabla 7 y la grafica 13.



Tabla. 7. Muestra el % de relajación máxima con la administración de M7A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

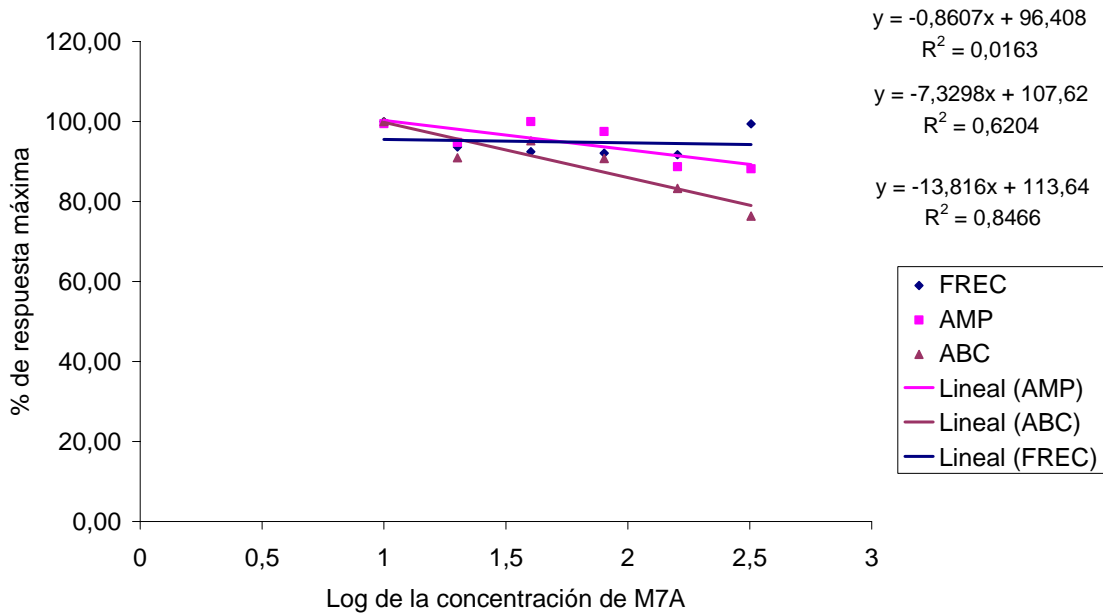
Porcentajes promedios con la aplicación de M7A									
Concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10,00	0,34	0,34	100,00	0,08	0,08	100,00	0,13	0,13	100,00*
20,00	0,40	0,38	96,21	0,09	0,08	96,14	0,06	0,07	97,12*
40,00	0,25	0,23	94,32	0,12	0,12	99,91	0,24	0,25	99,18
80,00	0,20	0,19	92,97	0,10	0,10	97,46	0,22	0,22	91,64
160,00	0,26	0,23	91,23	0,11	0,09	90,05	0,19	0,18	85,31
320,00	0,20	0,17	85,15	0,06	0,05	88,82	0,15	0,12	76,26

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 13. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la administración de M7A en el tejido duodenal

Con base a los datos expuestos en la tabla 7 y a la grafica 13 se hicieron las regresiones lineales, para cada una de las variables y se muestran en la gráfica 14.



Gráfica. 14. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%}$ no pudo ser calculada ya que ninguna concentración llegó a tener el 50 % de inhibición.

➤ EFECTO DE M7B SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M7A se puede observar en la **Fig. 38**.

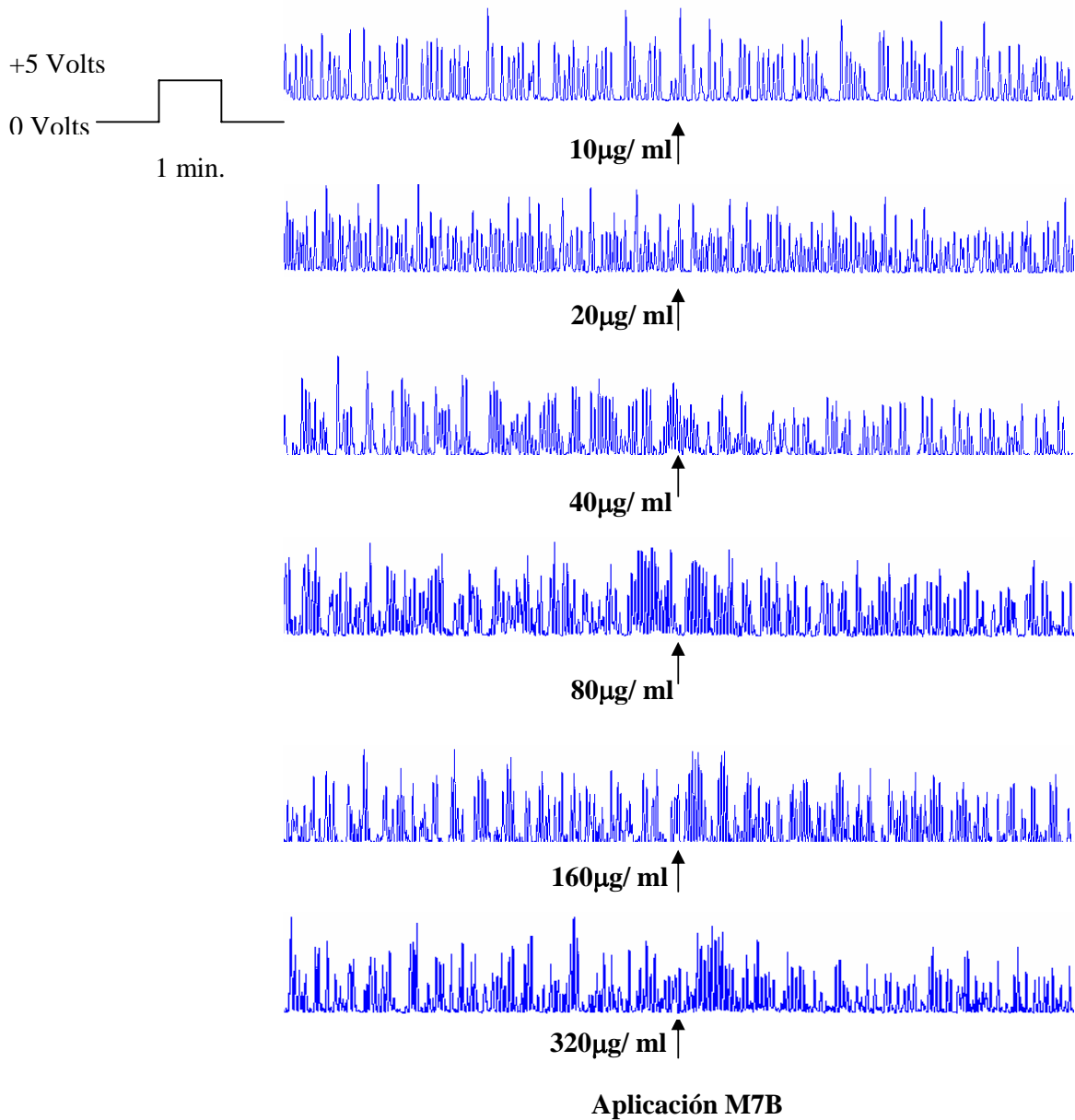


Fig. 38. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M7B pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

Se observa en la figura no hay ningún efecto aparente en el músculo liso duodenal o bien de la actividad eléctrica espontánea, a ninguna concentración de solución de M7B adicionada.

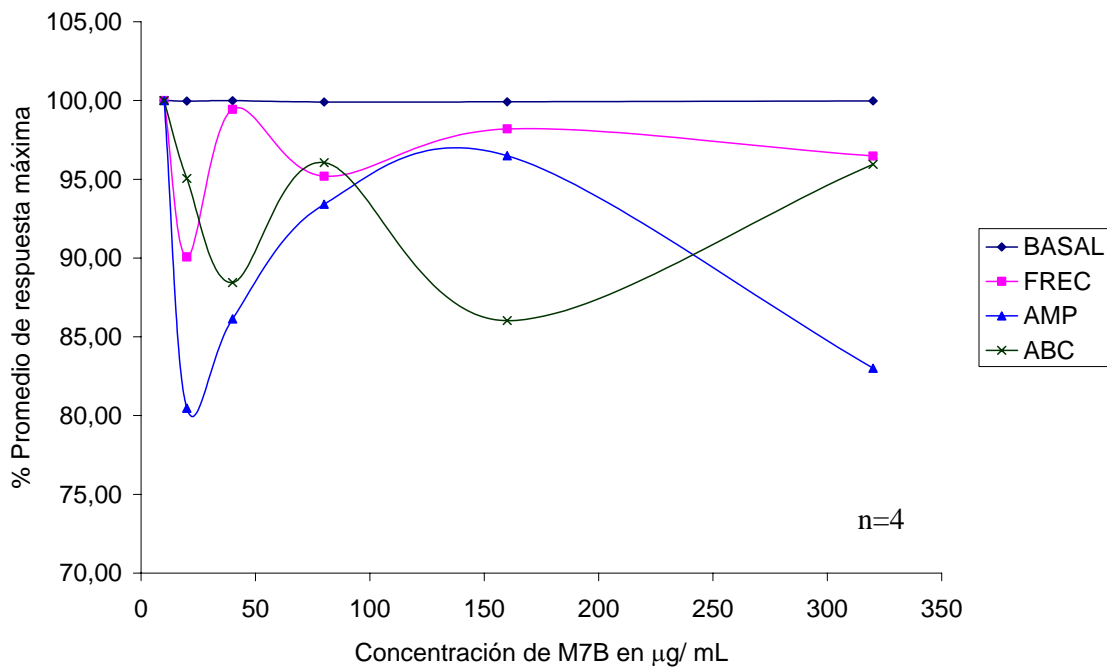
Los resultados promediados para el análogo M7B se muestran en la tabla 8 y la gráfica 15.



Tabla. 8. Muestra el % de relajación máxima con la administración de M7B y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

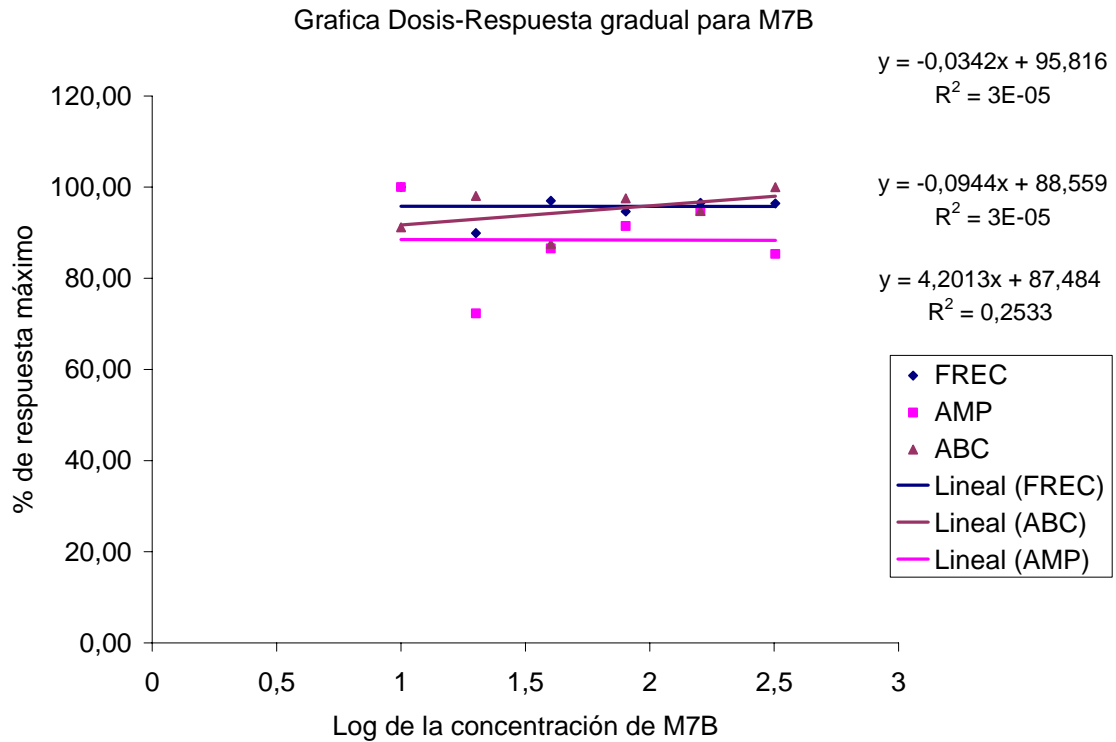
Porcentajes promedios con la aplicación de M7B									
Concentración en $\mu\text{g/ mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,25	0,25	100,00	0,09	0,08	100,00	0,22	0,21	100,00*
20	0,29	0,26	90,06	0,11	0,09	80,47	0,19	0,17	95,06*
40	0,30	0,29	99,44	0,07	0,06	86,13	0,20	0,17	88,44*
80	0,34	0,32	95,20	0,07	0,06	93,41	0,10	0,09	96,06
160	0,35	0,34	98,20	0,06	0,05	96,51	0,10	0,08	86,03
320	0,31	0,30	96,48	0,06	0,05	83,00	0,11	0,10	95,95

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 15. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la aplicación de M7B en el tejido duodenal.

Con base a los datos expuestos en la tabla 8 y la gráfica 15 se obtuvieron las curvas dosis respuesta gradual, para cada una de las variables y se muestran en la gráfica 16.



Gráfica. 16. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%}$ no pudo ser calculada ya que ninguna concentración llegó a tener el 50 % de inhibición.

➤ EFECTO DE M7C SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA EN DUODENO

El registro de la actividad en el tejido duodenal con la administración de M7C se puede observar en la **Fig. 39**.

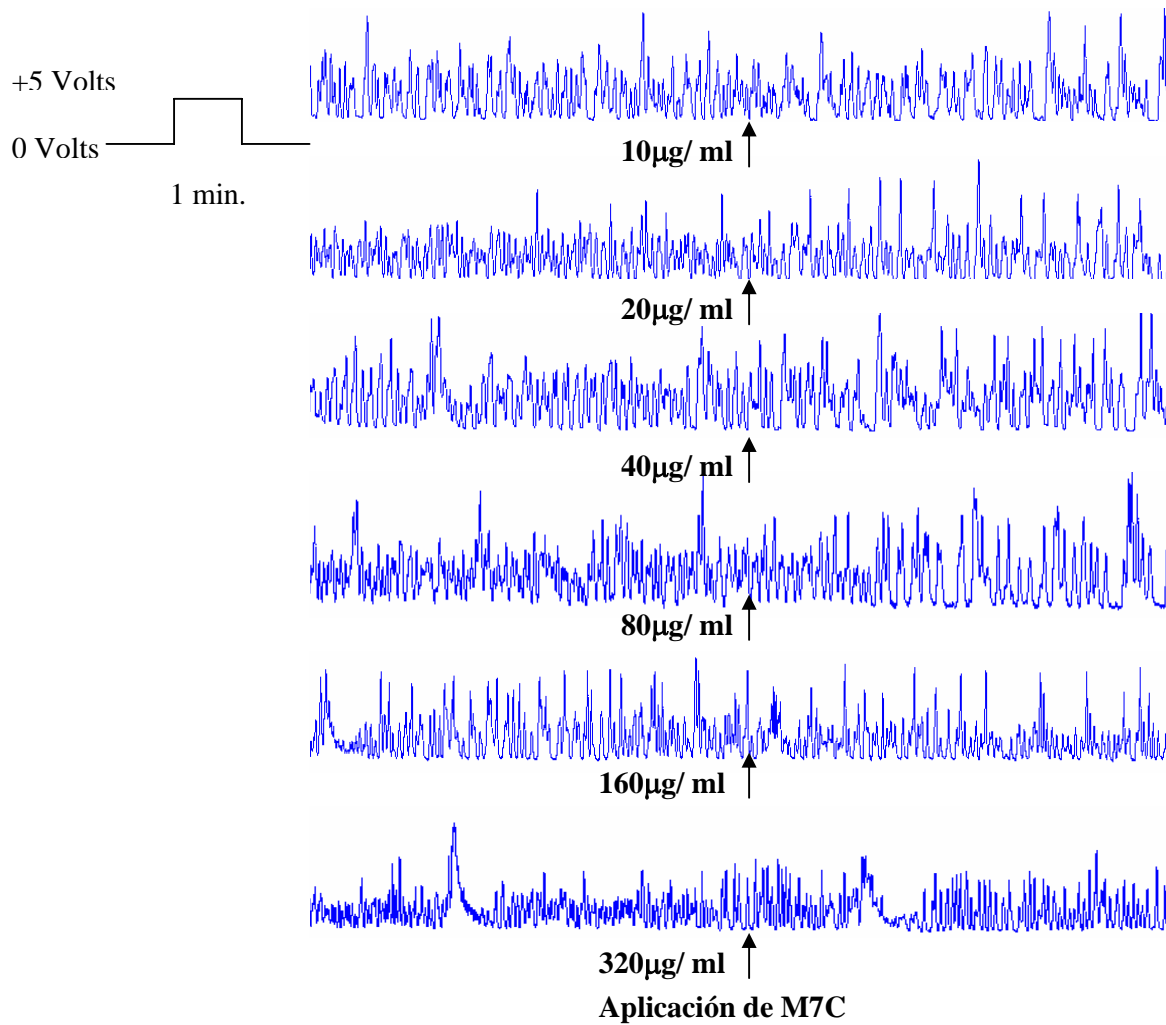


Fig. 39. Registro obtenido con la aplicación de la solución de M7C pre y post aplicación. La flecha indica el momento de la aplicación a las diversas concentraciones señaladas

Se observa en la figura no hay ningún efecto aparente en el músculo liso duodenal o bien de la actividad eléctrica espontánea, a ninguna concentración de M7C adicionada.

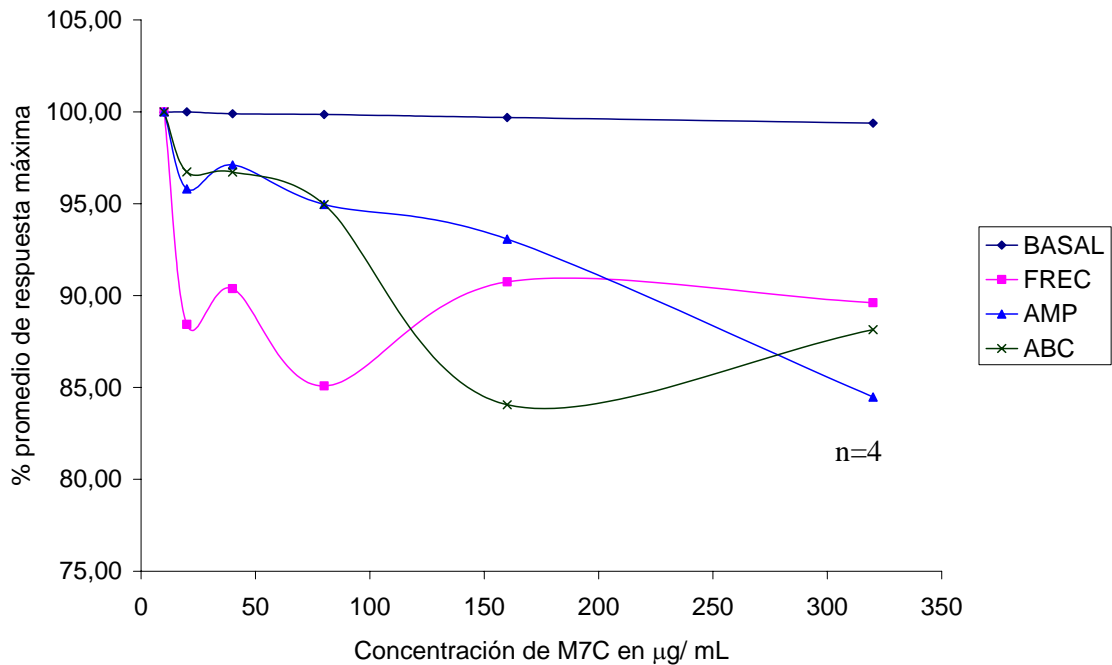
Los resultados promediados para el análogo M7C se mostraran en la tabla 9 y la gráfica 17.



Tabla. 9. Muestra el % de relajación máxima con la administración de M7C y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación.

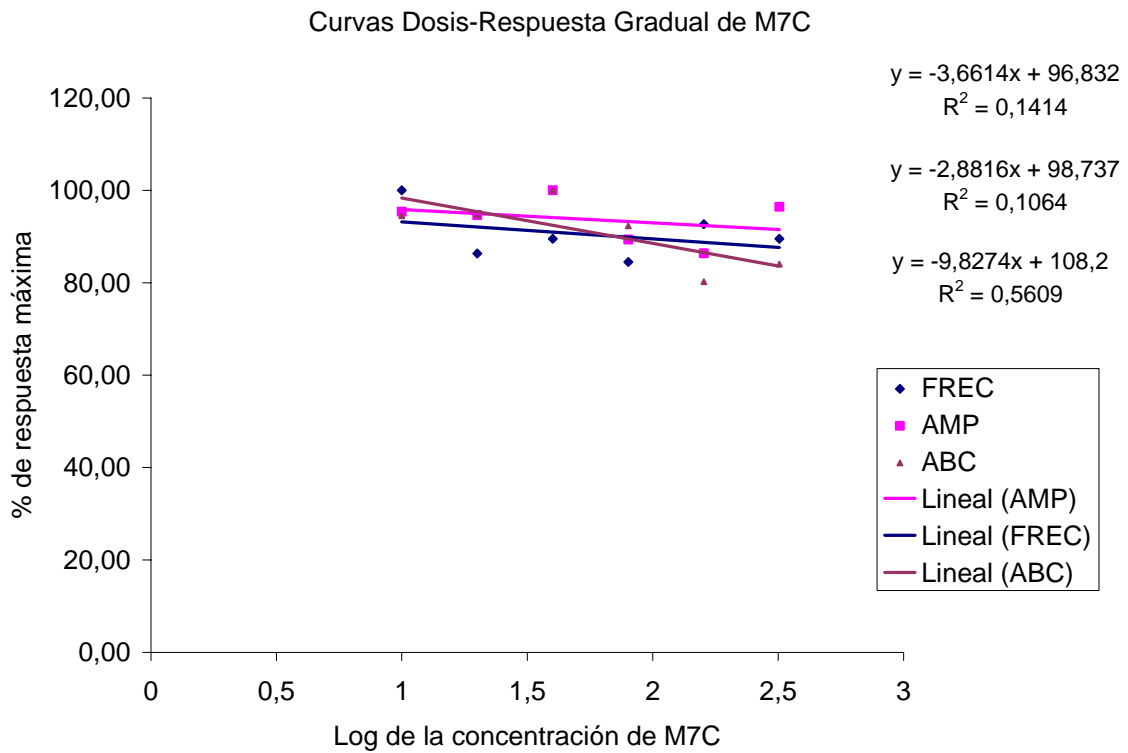
Porcentajes promedios con la aplicación de M7C									
Concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0,32	0,34	100,00	0,03	0,03	100,00	0,07	0,07	100,00*
20	0,25	0,23	88,43	0,05	0,05	95,81	0,32	0,31	96,73*
40	0,34	0,33	90,38	0,04	0,04	97,11	0,07	0,07	96,73
80	0,34	0,31	85,09	0,02	0,02	94,96	0,04	0,04	94,96
160	0,26	0,25	90,75	0,02	0,02	93,07	0,07	0,06	84,06
320	0,29	0,28	89,61	0,02	0,02	84,48	0,03	0,03	88,15

El * muestra los datos significativos en la prueba de χ^2 con una $P < 0.05$.



Gráfica. 17. Porcentaje promedio de la FREC, AMP y ABC, con la administración de M7C en el tejido duodenal.

Con base a los datos expuestos en la tabla 9 se obtuvieron las curvas dosis respuesta gradual, para cada una de las variables y se muestran en la grafica 18.



Gráfica. 18. Curva dosis-respuesta gradual de FREC, AMP y ABC. Se muestra la ecuación de la recta para cada uno de los parámetros, y el coeficiente de correlación lineal.

La $CI_{50\%}$ no pudo ser calculada ya que ninguna concentración llegó a tener el 50 % de inhibición.



VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, los resultados mostraron que la aplicación de diferentes dosis de MEL, provocó una disminución de la actividad eléctrica espontánea del segmento de duodeno en todas las concentraciones aplicadas, excepto en la concentración de 20mg/ mL donde la actividad aumento como se ha reportado en experimentos in Vitro que la administración de MEL a bajas concentraciones (0.001-100mg/ Kg) aumenta la motilidad GI y a altas concentraciones de MEL hay un efecto de inhibición en la actividad contráctil (28, 6).

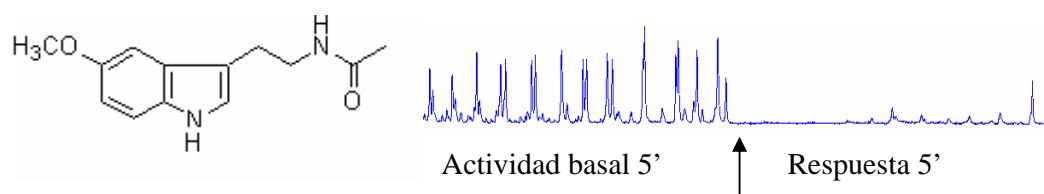


Fig. 40. A la izquierda la molécula de MEL y a la derecha el registro de la actividad con la concentración más alta.

La respuesta de los tejidos con la aplicación de los 6 análogos utilizados fue similar a la de MEL, solo con el análogo M6C

El análogo M6A no muestra la respuesta bifásica que es la que se obtiene con MEL y su $C_{150\%}$ es de aproximadamente 10 veces más grande para los tres parámetros. En el estudio previo se señala que la incorporación de un grupo electroattractor y polar como es el grupo cianobenzoil incorporado en el anillo indólico disminuye en menor grado la región del volumen del potencial molecular electrostático, interfiriendo en menor proporción a la afinidad con los receptores. En el presente estudio no se puede saber cual es la cantidad de unión a receptores de este derivado del grupo cianobenzoil sin embargo, no se obtuvo una actividad significativa con respecto a MEL.

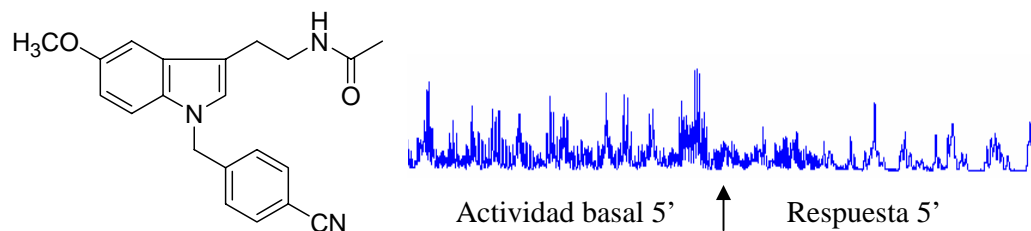


Fig. 41. A la izquierda la molécula de M6A y a la derecha el registro de la actividad con la concentración más alta.

Con el análogo M6B tampoco se obtuvo la respuesta bifásica de MEL y su $CI_{50\%}$ es de aproximadamente 3 veces más grande que la de MEL en los tres parámetros medidos. Este análogo mostró una disminución en forma gradual hasta la tercera aplicación (40 mg/mL) y en las aplicaciones posteriores se encontró una fase estática para el ABC, mientras que para la AMP y la FREC hubo una disminución de la actividad en forma gradual. Para la concentración más alta se obtuvieron los mismos resultados en los tres parámetros. Al contrario de la respuesta con MEL, con la aplicación de esta sustancia la respuesta no parecía recuperarse dentro de los 5 minutos post-aplicación. Como se esperaba con el grupo cianobenzoil se obtuvo una respuesta significativa con respecto a MEL que tal vez se debe a la unión con los receptores.

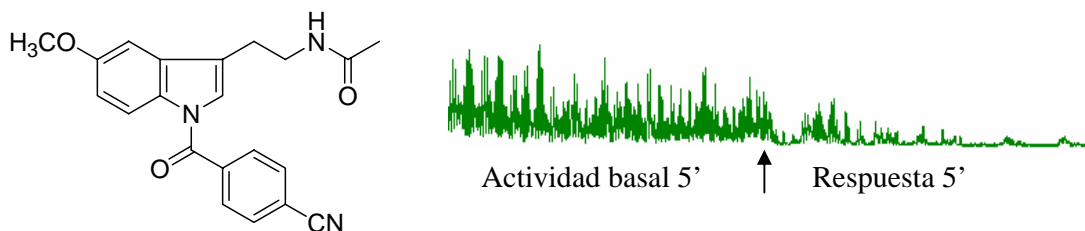


Fig. 42. A la izquierda la molécula de M6B y a la derecha el registro de la actividad con la concentración más alta.

Con el análogo M6C se obtuvo la respuesta similar a la de MEL, excepto por la respuesta bifásica en concentraciones bajas. La $CI_{50\%}$ es de aproximadamente 1.3 veces mayor que la de MEL. Al parecer con el grupo cianofenil la respuesta del análogo no se afectó como en los otros compuestos, obteniendo una inhibición significativa ($P < 0.05$) en la



actividad eléctrica del tejido aislado. $CI_{50\%}$ = 172.54, 136.55 y 134.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FREC, AMP y ABC respectivamente.

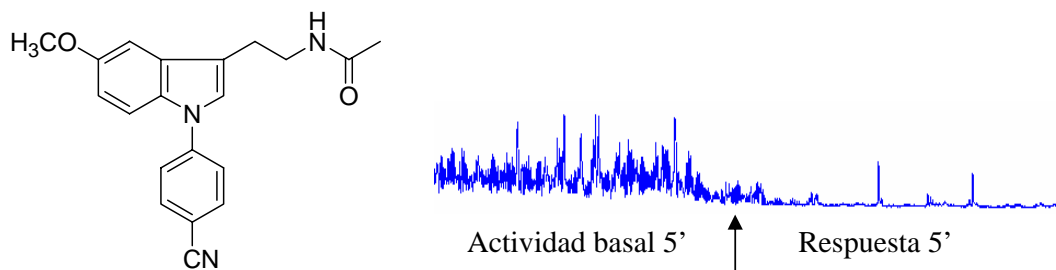


Fig. 43. A la izquierda la molécula de M6C y a la derecha el registro de la actividad con la concentración más alta.

La respuesta que se observó para los análogos M7A, M7B y M7C no fue significativa por lo que no se pudieron calcular las $CI_{50\%}$ para ninguno de estos análogos. Todos estos análogos tienen un grupo clorobenzoil y sus derivados, que posiblemente afectan a la afinidad al sitio receptor.

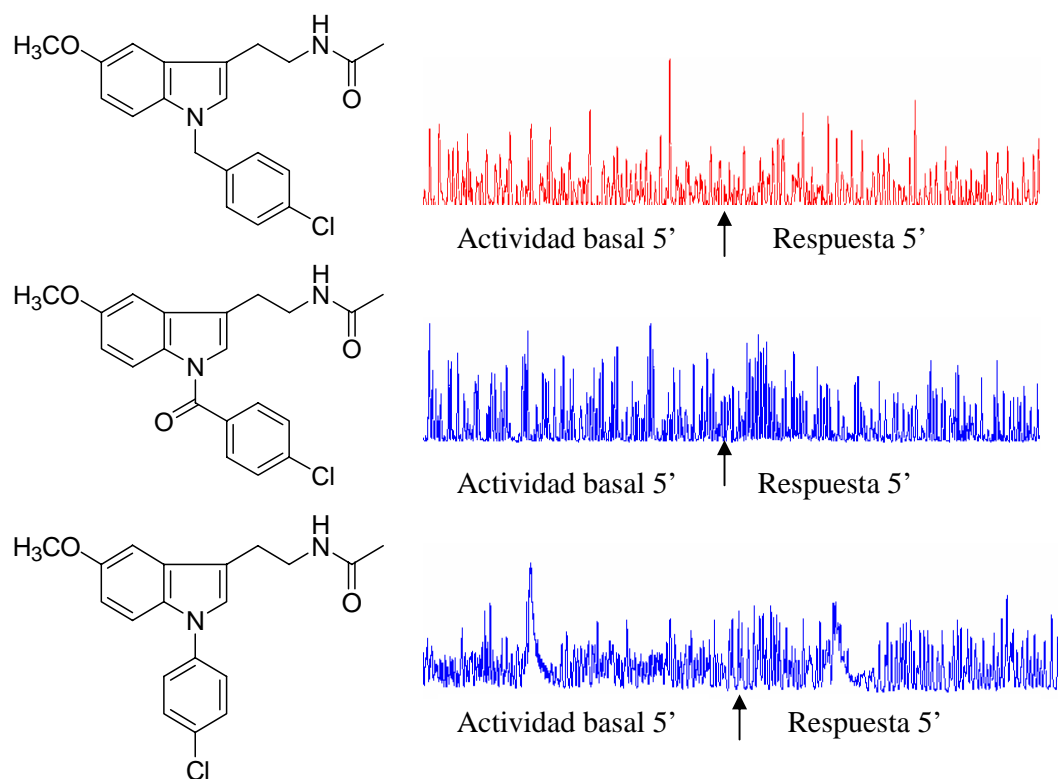


Fig. 44. A la izquierda las moléculas de M7A, M7B y M7C y a la derecha el registro de la actividad con la concentración más alta.



Otros estudios hechos con análogos de MEL 7-substituidos sugieren que los sitios de unión a receptores MT1 tiene una región electropositiva en la región del carbono 7, llegaron a esta conclusión ya que el grupo que se agregó al carbono 7 era electronegativo (12). En otro estudio anterior se encontró que el receptor MT1 puede ser más selectivo que el receptor MT2 en Humanos (59). Esto no es contrario a los resultados aquí encontrados ya que las respuestas obtenidas pudieron variar debido a la afinidad de estos análogos a los receptores MT1 del intestino y a la variación en las densidades de cargas eléctricas que brindan estos grupos ciano y cloro benzoilo unidos a la región 1-N del indol.



VIII. CONCLUSIONES

- Se evaluó el efecto de MEL y de los análogos en el tejido aislado obteniendo diversas respuestas donde algunos de los análogos (M6B y M6C) parecían mostrar un mayor tiempo de recuperación en comparación a MEL. Esto puede dar pauta a hacer más estudios sobre estos analogos.
- La actividad eléctrica del duodeno con la aplicación de MEL disminuyo al igual que con la aplicación de tres de los análogos (M6A, M6B y M6C).
- EL efecto provocado por la aplicación de MEL y de los análogos cambió de acuerdo a los resultados obtenidos de las CI_{50} . La C_{150} más cercana a la de MEL la presentó el análogo M6C.
- El efecto que produjeron las sustancias (M6A, M6B y M6C) fue similar al efecto producido por MEL.

**IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ardura J., Gutierrez R., Andrés J., Agapito T. Emergence and evolution of the circadian rhythm of melatonin in children. *Horm. Res.* 59 (2), 66-72 ,2003.
 2. Bargmann W. Neurosecretion. *Int. Rev. Cytol.* 19:183-201,1966.
 3. Binkley S., Muller G. and Hernández T. Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase shifting by light pulses (I) *J. Neurochem.* 37,798-800, 1981.
 4. Binkley S.A. Circadian rhythm of pineal function in rats. *Endocrine Rev.* 43, 255-270 1983.
 5. Bittman E.L. Karsch F.J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *J. Biol. Reprod.* 30, 585-593, 1984.
 6. Bubenik G.A. Gastrointestinal Melatonin. Localization, Function, and Clinical Relevance. *Digestiv. Dis. Sci.*, 47(10),2336-2348, 2002.
 7. Cassone V.M. y Natesan A. K. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J. Biol. Rhythms.* 12: 489-497, 1997.
 8. Claustrat B., Brun J. and Chazot G. Melatonin in humans, neuroendocrinological and pharmacological aspect. *Nucl Med Biol.* 27, 265-32, 1990.
 9. Collin J.P. Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri. En Wolsthenhome, G.E.W., Knight, J. (eds.): *The pineal gland*, Edimburg and London, Churchill Livingstone.1971, pp : 79-125.
 10. Collin J.P., Calas A., Juillard, M.T. The avian pineal organ. Distribution of exogenous indoleamines: a qualitative study of the rudimentary photoreceptor cells by electron microscopic radioautography. *Exp. Brain Res.*, 25, 15-33, 1976.
 11. Cockrem J.F. and Follett B.K. Circadian rhythm of melatonin in the pineal gland of the Japanese quail (*Coturnix coturnixjaponica*). *J Endocrinol.* 107(3), 317-24,1985.
 12. Davison K. Teh M.T., Sugden D.,/-sustituted-melatonin and 7-substituted-1-methylmelatonin analogues; effect of substituents on poteny and binding affinity. *Bioorg. Med. Chem.* 10,1116-1125, 2007.
-



13. Diaz B., Colmenero M.D., Marin B. Capacidad antioxidante de la melatonina: su papel defensivo contra afecciones relacionadas con la edad. *Med. Clin.* 110(17),668-676, 1998.
 14. Durantes A.Y. Martínez C. Gómez B. A. *Endocrinología Clínica*. Editorial El Manual Moderno 2^a Ed. México,2005 pp. 93-99.
 15. Dubocovich M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. Elsevier Sci. Ltd.16. 50-56, 1995.
 16. Falcón J., Thibault C., Martin C., Brun-Marmillon J., Claustrat B. and Collin J.P. Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An in vitro study in the pike and the trout. *J Pineal Res.* 11(3-4), 123-134, 1991.
 17. Falcón J., Van Camp G. and Collin J.P. Adenosine A2 receptor-mediated stimulation of cyclic AMP in cultured chicken pineal cells. *J Pineal Res.*19(2),72-8, 1995.
 18. Furness J.B. y Costa M. Types of Nerves in the Enteric Nervous System. *Neuroscience.* 5: 1-30, 1980.
 19. Ganong W.F. *Fisiología médica* editorial Manual Moderno México,2006 pp: 328-335.
 20. Gardner W.D. *Anatomía humana* ed. Interamericana,1971 pp:29-32.
 21. Gerdin M.J. Masana M. I. Dubocovich M.L. Melatonin-mediated regulation of human MT₁ melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacology* 67., 2023-2030, 2004.
 22. Goodman A. and Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a. Edición. Edit. Interamericana- Mc Graw-Hill. México, 1996, Vol. 1. pp.31-45.
 23. Grady R.K., Jr. Caliguri A., Mefford and I.N. Day/night differences in pineal indoles in the adult pigeon (*Columba livia*). *Comp Biochem. Physiol.* 78(1),141-3, 1984.
 24. Guyton A.C. *Tratado de Fisiología Médica*. 8^a. Edición. Edit. Interamericana- Mc Graw-Hill. México,1992, pp:719-729.
 25. Hadley M.E. Papel endocrino de la glándula pineal. En: *Endocrinología*. Ed. Prentice Hall, 1997, pp: 535-557.
-



-
26. Harlow H.J. Weekl y B.L. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in Vitro rat small and large intestine. *J Pineal Res.*3 (3), 277-284, 1986.
 27. Holloway W.R., Grota L.J., Brown G.M. Determination of immunoreactive melatonin in the colon of the rat by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 255-262, 1980.
 28. Jojich L., Pourcho R.G. Glutamate immunoreactivity in the cat retina: a quantitative study. *Vis Neurosci.* 13(1), 117-33, 1996.
 29. Kasymay O., Çakir B., Devseren E., Yegen B. Ç. Exogenous Melatonin Delays Gastric Emptying rate in rats: role of CCK₂ and 5-HT₃ Receptors. *J.Physiol. Pharmacol.* 56 (4)543-553, 2005.
 30. Katzung B.G. MD, PHD. Farmacología básica y clínica editorial El Manual Moderno. 1999 pp: 328-329.
 31. Kennaway D., Stamp G. Development of melatonin production in infant and impact of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab.* 75.376-369, 1992.
 32. Klein D.C. and Moore R.Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-Omethyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*;174(2).245-62, 1979.
 33. Konturek S.J., Konturek P.C., Brzozowski T. Melatonin Gastroprotection against Stress-induced acute gastric lesions and in Healing of Chronic Gastric ulcers. *J. Physiol. Pharmacol.* 57.51-56, 2006.
 34. Kvetnoy I.M. Ingel I.E. Kyetnaia V. Malinovskaya N.K. Rapoport I.S. Raikhlin T.N. Trofimov A.V. Yuzhakov V.V. Gastrointestinal melatonin Cellular Identification and Biological Role. *Neuroendocrinol. Lett.* ISSN 0172-780X, 2002.
 35. Lee P.N.P. and Pang S.F. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol. Signals* 2, 181-193, 1993.
 36. Legris, G.J., Will P.L., Hopfer U. Inhibition of amiloride-sensitive sodium conductance by indolamines. *Proc. Natl. Acad. Sci* 79, 2046-2050, 1982.
 37. Lewinski A., Rybicka I., Wajs E., Szkudlinski M., Pawlikowski M. Influence of pineal indolamines on the mitotic activity of gastric and colonic mucosal epithelial cells in rat: Interaction with omeprazole. *J. Pineal Res.* 10, 104-108, 1991.
 38. Lira R.A., Espejo G.O., Naranjo R.E., Receptor-binding of 1-N-substituted melatonin analogues. *European J. Med.Chem.*37, 945-951, 2002.
 39. Malacara J.M. Fundamentos de endocrinología. La glándula pineal, 1991 4ª ed. México, Editorial Salvat. 1991 pp: 113-121.
-



40. Matúš Soták, Libor Mrnka, Jiří Pácha Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1 mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J. Pineal Res.* 41 (2).183–188, 2006.
 41. Merle A. Delagrangé P. Renard. Lesieur D. Cuber J.C. Roche M. Pellissier S. effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153 *J. Pineal Res.* 2. 116-124, 2000.
 42. Miguez J.M., Recio J., Vivien-Roels B. and Pevet P. Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J. Pineal Res.* 21.7-14, 1996.
 43. Miyamoto A, Oki J, Takahashi S, Okuno A. Serum melatonin kinetics and long-term melatonin treatment for sleep disorders in Rett syndrome. *Brain Dev.* 21(1):59-62, 1999.
 44. Molina-Carballo A., Muñoz-Hoyos A., Reiter R.J., Rufo-Campos M. Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in the child with severe myoclonic epilepsy: two years' experience. *J Pineal Res.* 23.97-105, 1997.
 45. Molina-Carballo A. Muñoz-Hoyos A. Macias M. Escames G. Ruiz-Cosano C. Acuña-Castroviejo D. effect of clonidine on plasma ACTH, cortisol and melatonin in children. *J Pineal Res.* 29 (6) 48-53, 2000.
 46. Molinari Sonia Lucy; Fernandes Carlos Alexandre; De Oliveira Larissa Renata; De Mello Gonçalves Sant'Ana Débora & Hubner de Miranda Neto Márcilio NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition *Rev. child. anat.* 20(1), 2002.
 47. Montgomery D.C., Runger G.C., Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. 1998, pp: 444-449.
 48. Moyer R.W., Firth B.T. and Kennaway D.J. Effect of variable temperatures, darkness and light on the secretion of melatonin by pineal explants in the gecko, *Christinus marmoratus*. *Brain Res.* 747.230-235, 1997.
 49. Ohshima K. and Matsuo S. Immunohistochemical localization of serotonin in the pineal gland of the chicken during post-hatching development in relation to light-dark cycle. *Anat. Anz.* 173.65-72, 1991.
 50. Penev P., Zee P. Melatonin: a clinical perspective. *Ann Neurol* 1997; 42.545-553, 1997.
 51. Petrie K. J., Conaglen V. Thompson L, Chamberlain K. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *Br Med J.* 298.705-7, 1989.
-



-
52. Pontoire C., Bernard M., Silvain C., Collin J.P., Voisin P. Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eu. J. Pharmacol.* 247,111-118. 1993.
 53. Poon A.M.S., Chow R.H., Mak A.S.Y., S.F. Pang .Autoradiographic localization of 2[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J.Pineal Res.* 23 (1), 5–14.1997.
 54. Quastel M.R., Rahaminoff R., Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.* 24, 455-461. 1965.
 55. Quay W.B. Volumetric and cytologic variation in the pineal body of *Peromyscus leucopus* (Rodentia) with respect to sex, captivity and day-length. *J.Morph.* 98.471-495. 1995.
 56. Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M. Tolkachev V.N. Extrapineal melatonin: Location and role within diffuse Neuroendocrine syst. *J. Histochem.* 31/1.1-12, 1999.
 57. Ralph C.L., Binkley S., MacBride S.E. and Klein D.C. Regulation of pineal rhythms in chickens: effects of blinding, constant light, constant dark, and superior cervical ganglionectomy. *Endocrinol.* 97(6).1373-8. 1975.
 58. Reference Manual Version 3.3.2 for MP100 Hardware and Acq Knowledge. Software. For Macintosh or PC with windows.1998.
 59. Reiter R J. Anatomy of the pineal gland of the mammals. En: *The pineal.* Reiter, R. J. Edit. Eden Press. 1981 Vol. 6 pp:14-40.
 60. Reiter R.J., Tan D-X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Bandyopadhyay D. Neurally-mediated and neurally-independent beneficial actions of melatonin in the gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, Suppl 4,113-125. 2003.
 61. Stalheim S., Greg K. *Understanding human anatomy and physiology* St Poul, West Minneapolis (1993)
 62. Schmitz Y. and Witkovsky P. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neurosci.* 78(4).1209-16. 1997.
 63. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland *Experientia.* 45. pp: 922-932 (1989).
 64. Terrón P., Shai J. M., Harley S., Lea R. W. and Rodríguez A. B. Melatonin: An antioxidant at physiological concentrations. *J. Pineal Res.* 31(1). 95-96. 2001.
-



-
65. Tsotinis A., Vlachou M., Papahadjis D.P., Calogeropoulou T., Nikas S.P., Garratt P.J., Davidson K, Teh M.T., Sugden D.J. Mapping The melatonin receptor. 7 subtype selective ligands based on beta-substituted N-acil-5-Metoxi-triptaminas and beta substituted N-acil-5-metoxi-1-metiltriptamina. *J. Med. Chem.* 49 (12)3509-3519. 2006.
 66. Underwood H., Binkley S., Siopes T. and Mosher K. Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of Japanese quail (*Conturnix conturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 56:70-81.1984.
 67. Van de graaff Human Anatomy. Sixth Edition. USA, 2002
 68. Vigh B., Debreceni K., Fejer Z. and Vigh-Teichmann I.I. Immunoreactive excitatory amino acids in the parietal eye of lizards, a comparison with the pineal organ and retina. *Cell Tissue Res.* 287(2).275-83. 1997.
 69. Wallace R.B., Altman J., Das G.D. An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal body. *Am. J. anat.*126.175-183. 1969.
 70. Wang X. L., Yuan H. and Pang S. F. Specific binding of [¹²⁵I] Iodomelatonin in pigeon and quail spleen membrane preparations and effect with hydrocortisone-treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* 14. 292-295. 1993.
 71. Wang X. T., Pappas G. D., Sagen J. and Unnerstall J. R. Cells expressing preproenkephalin mRNA in the rat pineal gland are not serotonin-producing pinealocytes: evidence using in situ hybridization combined with immunocytochemistry for serotonin. *Cell Mol. Neurobiol.* 16.73-84. 1996.
 72. Zachmann A., Falcon J., Knijff S.C., Bolliet V. and Ali M.A. Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Gen. comp. Endocrinol.* 86(1).26-33. 1992.
 73. Zatz y Mullen D. A. Norepinephrine, acting via adenylate cyclase, inhibits melatonin output but does not phaseshift the pacemaker in cultured chick pineal cells. *Brain Res*, 450: 137-143. 1988.
 74. www.bondisalud.com.ar/21html (29/enero/07)
 75. www.bondisalud.com.ar/23html (29/enero/07)
 76. www.Clc.cl/.../articulo_001.htm (16/abril/07)
 77. www.escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/FisiolSistemas/Bio256_Control_Digest.ppt#256,1,Controldelsistemadigestivo.Sistemanerviosoenterico. (29/enero/07)
 78. www.eswikipedia.org/wiki/intestino_delgado. (29/enero/07)
-



79. www.solvital.fr/index.asp?ID=404.(16 /abril/07)
 80. www.ehu.es/biomoleculas/PROT/PROT3.htm (16/abril/07)
 81. www.plato.stanford.edu/entries/pineal-gland.htm (16/abril/07)
-