



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO NICTEMERAL DE LA MELATONINA SOBRE EL
RITMO DE CONTRACCIÓN DEL DUODENO AISLADO DE
*Mus musculus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARISOL RODRIGUEZ TAFOYA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Manuel Miranda Anaya
2009**



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Rodríguez
Tafoya
Marisol
56372740
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300079027

2. Datos del tutor
Doctor
Manuel
Miranda
Anaya

3. Datos del Sinodal 2
Doctor
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

4. Datos del Sinodal 3
Doctora
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

5. Datos del Sinodal 4
Doctor
Baltasar
Barrera
Mera

6. Datos del sinodal 5
Doctora
Silvia
Arteaga
Hernández

7. Datos del trabajo escrito

Efecto nictemeral de la melatonina sobre el ritmo de contracción del duodeno aislado del ratón *Mus musculus*.

53p
2009

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por proyecto PAPIIT IN202808.

- ❖ A mis sinodales por el tiempo por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y a sus recomendaciones para mejorarlo.**
- ❖ A mis compañeros del taller con quienes compartí ratos muy agradables y quienes aguantaron mis quejas cuando los registros no salían como esperaba, además e compartir sus conocimientos conmigo.**
- ❖ Al M. en C. Enrique Moreno, gracias por el tiempo, por enseñarme, apoyarme y ayudarme en mi trabajo, para mí fue muy importante aprender de ti.**
- ❖ Al Dr. Manuel Miranda, no alcanzan las palabras para darte las gracias por todo lo que aprendí de ti, lo paciente que fuiste conmigo, todo tu apoyo en todo momento, sobre todo por que tuviste que aguantarme en mis malos momentos. Gracias por ser un excelente tutor.**
- ❖ A mis amigos (Toni, Nadia, Pao, Mari, Aravid) que estuvieron ahí cuando más los necesitaba, gracias por consolarme, por aguantarme, por compartir los momentos felices y más que nada por hacer mis problemas suyos para poder entenderme mejor y ayudarme en lo que fuera, saben cuanto significa para mi que sean parte de mi vida. Yo se lo difícil que es convivir conmigo y el que ustedes me aguanten ya dice mucho de verdad los amo. Ya se que se merecen más que un simple gracias, pero mientras no trabaje no puedo ofrecerles otra cosa.....GRACIAS!!!**
- ❖ A mis amigas de la prepa (Shei, Liz, Normita, Ale, Jorge), ya se que durante todo este tiempo no los he visto mucho pero siempre he sabido que están ahí apoyándome y para cuando yo los necesite. Más que nada gracias Liz.**
- ❖ A todas las personas con las que compartí mi vida durante estos más de cinco años, gracias por dejarme conocerlos y aprender de ustedes, por dejarme ser parte de su vida y por ser parte de la mía.**
- ❖ En general gracias a todos mis amigos por todos los buenos ratos y por que no también por los malos.**

- ❖ **A mis súper hermanos con los que me peleo todo el tiempo pero que se que me quieren, y los cuales yo también quiero muchísimo:**
 - **German aunque estés lejos yo se que me apoyas, te extrañamos.**
 - **Isela te quiero mucho aunque a veces parezca que y gracias cuando me ayudas a que me dejen irme de vaga**
 - **Mauri yo se que piensas a veces lo peor de mi pero créeme que me esfuerzo mucho por que no lo pienses. Te quiero mucho.**

- ❖ **Finalmente, por que lo mejor se deja para el final, GRACIAS a mis amados padres, por todo su esfuerzo para que yo llegara hasta donde me encuentro, por levantarme cada vez que me caí, por secar mis lágrimas, por reprenderme y enseñarme a hacer las cosas de la mejor manera, por amarme tal cual soy, por enseñarme el valor de amor y esforzarme y luchar por lo que quiero. Este trabajo es para ustedes, ni trabajando toda mi vida podría pagarles todo lo que han hecho por mi, solo tengo esto y mucho amor para ustedes.**

INDICE

	RESUMEN	1
1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1	Generalidades sobre tracto digestivo	2
1.2	Regulación de la Motilidad del tracto digestivo	5
1.3	Mecanismos moleculares de la Contracción del músculo liso	8
2.	La regulación circadiana de la hormona Melatonina	9
2.1	Melatonina extrapineal	11
3.	ANTECEDENTES	19
4.	JUSTIFICACIÓN	22
5.	HIPÓTESIS	22
6.	OBJETIVOS	23
6.1	General	23
6.2	Objetivos Particulares	23
7.	Materiales y Método	24
7.1	Animales	24
7.2	Obtención del tejido	24
7.3	Registro mecánico de la fuerza y frecuencia de contracción peristáltica	25
8.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	28
9.	ANÁLISIS DE DATOS	29
10.	RESULTADOS	30
10.1	Dosis- respuesta a diferentes concentraciones de melatonina	30
10.1.1	Observaciones generales	30
10.1.2	Cambios en la frecuencia de contracción.	35
10.1.3	Cambios en la fuerza de contracción.	36
10.2	Efecto estimulante de la melatonina en dos fases del nictémero.	38
11.	Discusión	43
12.	Conclusiones	48
13.	Bibliografía	49

RESUMEN

Los efectos que la melatonina tiene dentro del organismo es muy variado, uno de ellos es el efecto sobre la contracción del músculo liso dentro de tracto gastrointestinal, sin embargo existe poca información al respecto. En este trabajo se realizaron experimentos para observar el efecto que tiene la melatonina sobre el duodeno de ratón, mediante la evaluación de distintas dosis, y si existen diferencias en el efecto en horas opuestas del ciclo de luz y oscuridad tanto en la frecuencia como en la fuerza de contracción del músculo liso. La melatonina es producida en la glándula pineal pero también en las células enterocromatofinas de la mucosa intestinal, por lo tanto, los experimentos realizados se hicieron con la finalidad de conocer los efectos de la melatonina en las dos diferentes fases del nictémero; se utilizaron dos lotes de ratones para cada fase manteniendo a estos en fotoperiodo normal e invertido respectivamente; se hicieron registros a las 12 am y las 12 pm del ciclo LO, a esta variante se agregó el hecho de probar tres diferentes dosis de melatonina a la muestra de duodeno que se tomó de cada individuo, 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, luego de 1.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y finalmente de 2.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La respuesta contráctil del duodeno, se evaluó mediante un transductor de fuerza, acoplado a un sistema de adquisición de datos. Los resultados obtenidos muestran que en cada una de las fases el tejido y su actividad peristáltica es dosis dependiente, y que tales efectos pueden variar aumentando o disminuyendo la fuerza de contracción y la frecuencia además dependiendo si la muestra se toma en fase oscura o fase luminosa del ciclo LO.

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre tracto digestivo

Los sistemas digestivos desempeñan un papel esencial en la digestión y la absorción de nutrientes, a la vez que eliminan los productos tóxicos de la digestión y de los materiales no digeribles. Desde una perspectiva anatómica, hay una gran cantidad de diseños de los sistemas digestivos. Sin embargo, desde un punto de vista fisiológico, los sistemas digestivos son clasificados en tres categorías: 1) Reactores por lotes, que son tubos ciegos o cavidades que reciben el alimento y reciben los desechos, es decir que procesa un lote y se elimina antes de que llegue el siguiente; 2) reactores en flujo continuo, donde el tubo digestivo es una cavidad tubular hueca que se extiende a lo largo del organismo y se abre en ambos extremos, el procesado tiene lugar de forma continua; y 3) reactor de bolo en flujo en el que un bolo de alimento es digerido progresivamente conforme avanza a través de un reactor largo en forma de tubo. La organización general del tubo digestivo es eficiente ya que permite que el material ingerido viaje en una sola dirección, y que pase a través de diferentes regiones que pueden estar especializadas en tareas digestivas.

El tubo digestivo puede regionalizarse bajo una base estructural así como funcional en cuatro zonas: tracto cefálico, tracto anterior, tracto medio y tracto posterior; regiones especializadas en recepción, conducción, almacenamiento, digestión, absorción de nutrientes y defecación. El tracto cefálico está compuesto por las piezas de la boca, la cavidad bucal, la faringe y las estructuras asociadas, como los picos, los dientes, la lengua que sirven para la captura y las glándulas salivales que facilitan la deglución e inician la digestión. En la mayoría de las especies de animales, el tracto anterior consiste en un esófago, el cual es un tubo que lleva el alimento desde la región oral hasta la región digestiva

del tracto digestivo y un estómago. El esófago conduce el alimento desde el tracto cefálico hasta las áreas digestivas. En los cordados y en algunos invertebrados, el esófago conduce el bolo mediante movimientos peristálticos. La digestión tiene lugar principalmente en el estómago y el tracto medio; en la mayoría de los vertebrados el estómago inicia la digestión de las proteínas por medio de la secreción de la enzima pepsinógeno y ácido clorhídrico.

En los vertebrados, el tracto medio es la zona principal de digestión química de las proteínas, grasas y carbohidratos; el alimento es liberado al tracto medio a través del esfínter pilórico, que se relaja conforme los movimientos peristálticos del estómago presionan el contenido ácido en el duodeno. El intestino delgado o tracto medio se divide en tres porciones distintas: el duodeno cuyo epitelio secreta moco y fluidos y recibe secreciones mediante conductos que proceden del hígado y el páncreas; en seguida se encuentra el yeyuno que también secreta fluido y finalmente esta el íleon que actúa principalmente para absorber los nutrientes (Randall et al, 1997) (ver figura 1).

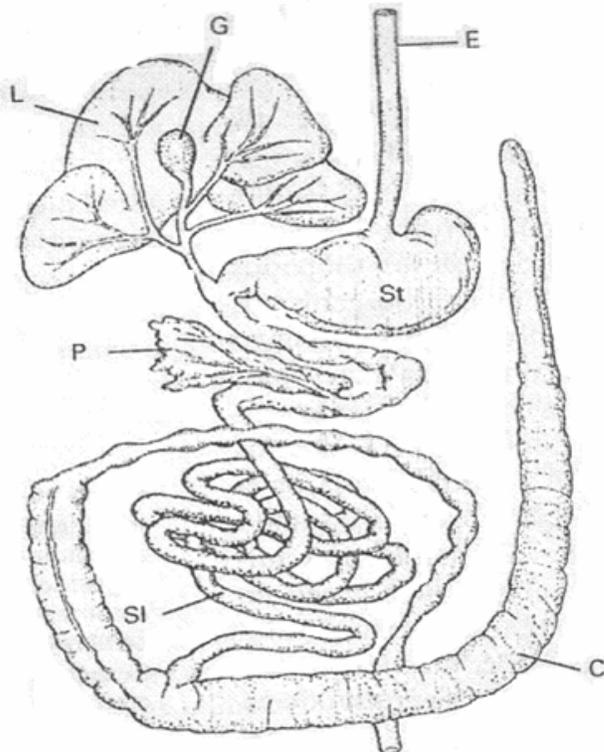
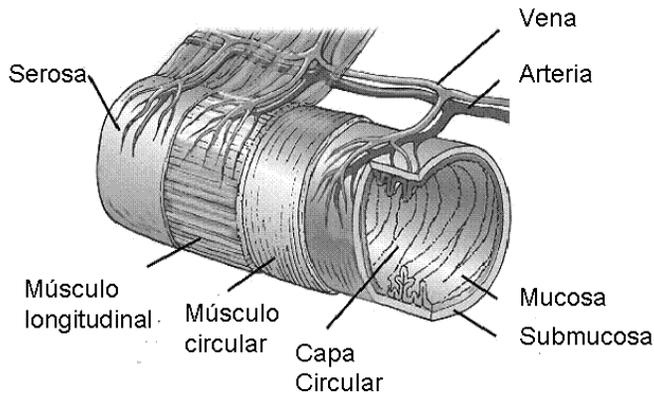


Fig. 1 Sistema digestivo de un roedor con un plan básico de organización, C, ciego; E, esófago; G, vesícula biliar; L, hígado; LI, intestino grueso; P, páncreas; SI, intestino delgado; St, estómago. (De Randall *et al* 1996).

El intestino está formado por una capa serosa que se superpone a una capa externa de músculo liso longitudinal y a una capa interna de músculo liso circular que rodea la capa epitelial formada por la submucosa y la mucosa. En proyección hacia el interior y rodeando la luz hay numerosos pliegues de mucosa denominados pliegues de Kerckring. Las células del epitelio digestivo consiste en células caliciformes diseminadas entre células absortivas donde se encuentran estructuras denominadas micro vellosidades que tiene filamentos de actina que forman puentes cruzados con filamentos de miosina lo que ayuda a producir movimientos rítmicos de las micro vellosidades. La superficie de las microvellosidades está cubierta por el glucocálix.

a)



b)

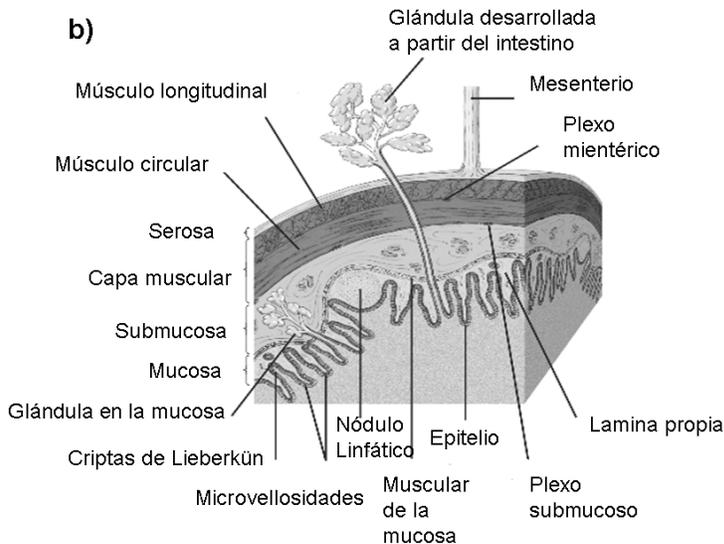


Fig. 2 a) Capas que componen la pared del intestino que cuenta de cuatro capas: serosa (tejido conectivo), capas de músculo longitudinal y transversal, la mucosa y la submucosa. (Tomado de Moog, 1981)

b) Corte transversal que muestra las múltiples capas con el tejido muscular. (Adaptado de Ham, 1957).

El tracto posterior sirve para almacenar los restos del alimento digerido. En muchas especies es este el que consolida el material no digerido y las bacterias que se desarrollan en el mismo para formar las heces las cuales pasan al recto y son expulsadas a través del ano, además de la absorción de líquidos empleados en la digestión. La capacidad del tubo digestivo para contraerse e impulsar el material ingerido a lo largo del mismo es importante para la función digestiva para permitir: el paso del alimento, el tratamiento mecánico por trituración y la mezcla del contenido (Randall et al, 1997).

1.2 Regulación de la Motilidad del tracto digestivo.

La motilidad del tubo digestivo se consigue mediante la contracción de las paredes de músculo liso del sistema digestivo y está presente en todos los grupos de animales excepto en los artrópodos. En los vertebrados consiste en una capa circular interna y una capa longitudinal externa. La contracción de la capa circular en conjunto con la relajación de la capa longitudinal produce una constricción con una elongación. El acortamiento activo de la capa longitudinal, junto con la relajación de la capa circular produce distensión. La peristálsis tiene lugar al avanzar una onda de constricción producida por la contracción de la musculatura circular y está precedida en toda la longitud por la contracción simultánea del músculo longitudinal y la relajación del músculo circular. (Randall et al, 1997).

Las contracciones de las capas musculares que proporcionan la motilidad del tubo digestivo están reguladas por una combinación de distintos factores como son:

- Control intrínseco: El tejido muscular liso de la pared del tubo digestivo es miogénico, es decir, capaz de producir un ciclo intrínseco de actividad eléctrica que conduce a la contracción muscular sin estimulación nerviosa externa. Son despolarizaciones y repolarizaciones rítmicas denominadas Ritmo Eléctrico Básico (REB). Algunas de estas ondas dan lugar a potenciales de acción (PA) producidos por una corriente de

entrada debido a iones Ca^{2+} , las cuales provocan la contracción de las células musculares lisas. La amplitud de la onda lenta REB está modulada por influencias locales tales como el estiramiento del tejido muscular. Estos estiramientos se presentarán cuando una cámara del tubo digestivo sea tensada por el contenido de su lumen.

- Control extrínseco (nervioso, hormonal): Los patrones intrínsecos del REB están modulados por hormonas peptídicas gastrointestinales liberadas localmente. Por lo que un estimulante químico puede dar lugar a la liberación de una hormona y ésta a su vez modular la motilidad del tejido muscular. La motilidad está influida por la inervación difusa procedente de las divisiones simpáticas y parasimpáticas y peptidérgica del sistema nervioso autónomo. Las neuronas postganglionares simpáticas y parasimpáticas forman redes dispersas en todas las capas de musculatura lisa, a lo que se le conoce como Sistema Nervioso Entérico. La red parasimpática está constituida por neuronas colinérgicas que se divide en el mientérico y el plexo submucoso, los cuales reciben sus aferencias principalmente a través de las ramas del nervio vago, mediante acciones excitadoras del tracto digestivo. Por el contrario la inervación procedente de la división simpática es principalmente inhibidora. Las neuronas postganglionares inervan de forma directa todos los tejidos de la pared intestinal, así como las neuronas de los plexos mientérico y submucoso. La actividad de estas eferentes inhibe la motilidad del estómago y del intestino.

Las células musculares lisas son inhibidas por la noradrenalina liberadas desde las terminales nerviosas simpáticas y son excitadas por la acetilcolina (ACh), liberada en respuesta a la actividad de los nervios parasimpáticos.

Lo anterior contrasta con los movimientos peristálticos del reflejo de deglución, en el que los movimientos del esófago están bajo el control directo del sistema nervioso central.

El músculo liso del tubo digestivo de los vertebrados también está regulado por neuronas distintas a las adrenérgicas o colinérgicas, que liberan distintos péptidos y nucleótidos purínicos. Se han identificado neuronas que liberan ATP, 5-HT, dopamina, GABA, y neuronas peptidérgicas que liberan encefalinas, péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P, bombesina/ péptido liberador de gastrina, neurotensina, colecistoquinina (CCK) y neuropéptido Y/ polipéptido pancreático. Estas sustancias permiten el control sobre las numerosas funciones que interactúan en el tubo digestivo (Randall et al; 1997).

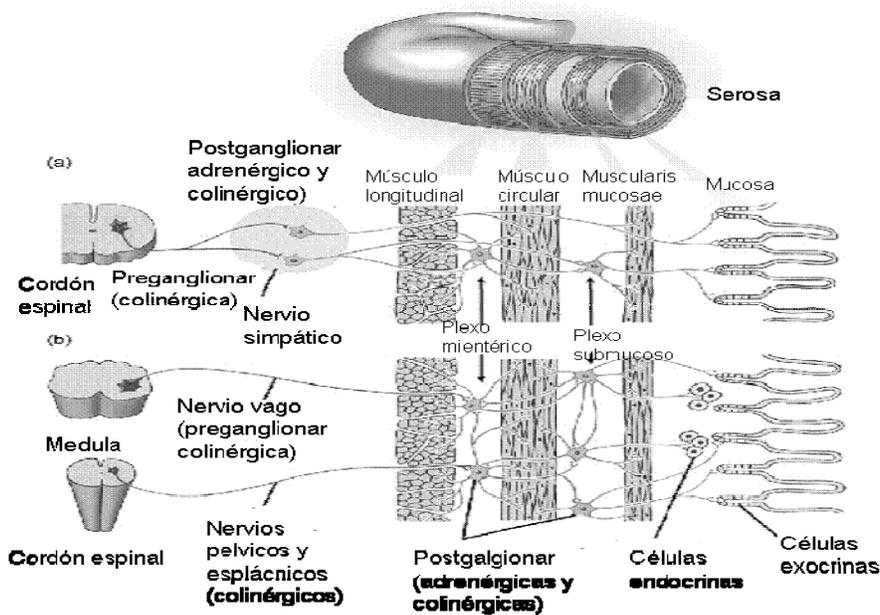


Fig. 3 El tracto gastrointestinal (TGI) tiene una excelente inervación simpática y parasimpática (a) inervación eferente simpática. (b) inervación parasimpática. Todas las terminales nerviosas sobre los tejidos blanco gastrointestinal son postganglionares. (Davenport, 1985)

1.3 Mecanismos moleculares de la contracción de músculo liso

El músculo liso de los vertebrados está generalmente bajo un control autónomo y hormonal y no es voluntario.

La contracción y relajación del músculo liso es más lenta que la del músculo estriado y generalmente es capaz de sostener la contracción por más tiempo. Esto es reflejado en la duración y la amplitud del pulso Ca^{2+} citosólico, el cual inicia la contracción en el músculo liso. La lenta producción del Ca^{2+} en las células del músculo liso está asociada con un pobre desarrollo del retículo sarcoplasmico.

En las células del músculo liso, el Ca^{2+} siempre es bombeado hacia afuera a la superficie de la membrana, quedando los niveles internos de Ca^{2+} muy bajos. Cuando la membrana es despolarizada, esta se vuelve más permeable a los iones de Ca^{2+} , permitiendo el flujo de estos, lo cual activa la contracción. La relajación ocurre cuando la permeabilidad al calcio regresa a un nivel bajo mientras que la membrana bombea el Ca^{2+} fuera de la célula. Largas despolarizaciones de la membrana generan potenciales de acción en los cuales el Ca^{2+} lleva la energía interna. Los potenciales de acción producen grandes flujos de Ca^{2+} lo que lleva a una gran contracción, ya que la tensión generada es proporcional al nivel de Ca^{2+} intracelular.

La excitación- contracción del músculo liso ocurre por diferentes mecanismos. A diferencia del músculo estriado en el que los iones calcio se unen a la proteína troponina, en el músculo liso no existe esta proteína por lo tanto se une a la proteína calmodulina formando un complejo Ca^{2+} / calmodulina; este complejo se vuelve a unir a una elongada proteína llamada caldesmon. En ausencia de Ca^{2+} , caldesmon se une a los delgados filamentos de actina, restringiendo las interacciones actina- miosina e inhibiendo la contracción muscular. Sin embargo, el caldesmon que ha sido fosforilado por la proteincinasa C no puede unirse a los delgados filamentos y por lo tanto no inhibe las interacciones actina- miosina. Así la

fosforilación del caldesmon o la unión Ca^{2+} / calmodulina a caldesmon activa la contracción del músculo liso.

Existen otros mecanismos para regular la contracción del músculo liso conocidos como “Regulación de fases de la cadena de miosina”. En el músculo liso, la unión del Ca^{2+} directamente a la regulación de las fases de cadena induce un cambio conformacional directamente a la cadena de la miosina que está unida a la actina, entonces el músculo se contrae. La fosforilación en algún otro sitio de la cadena por proteincinasa C, induce un cambio conformacional que impide las interacciones actina- miosina, resultado en la relajación. La lentitud en las acciones de la proteincinasa, junto con los bajos cambios de los niveles de Ca^{2+} , contribuye al bajo índice de contracción en el músculo liso (Lodish et al, 1995).

2.0 La regulación circadiana de la hormona Melatonina

La Melatonina (5- methoxy- N- acetilriptamina) es una hormona que fue descubierta en la glándula pineal de ovejas (Lerner et al, 1958). Quince años después, a través de cromatografía e inmunohistología, la melatonina fue descubierta en la retina, en la glándula Harderiana (glándula retro- orbital complementaria al lacrimal que no esta presente en humanos) y en todo el tracto gastrointestinal (Bubenik, 2006).

La melatonina exhibe una multitud de funciones fisiológicas, como la inducción de sueño y la adaptación a los fotoperiodos circanales y circadianos. La melatonina también es un poderoso antioxidante, pues elimina los radicales libres; también afecta la ingesta de comida y la absorción de macronutrientes en peces y varios mamíferos. Además, la restricción de alimento influencia significativamente las concentraciones de melatonina en la sangre, la glándula pineal y el tracto gastrointestinal (TGI).

La maquinaria enzimática para la biosíntesis de la melatonina en los pinealocitos fue primero identificada por Axelrod (1974). Su precursor, el triptofano proviene de la sangre y es transformado, vía 5- hidroxitriptofano a serotonina, la serotonina al ser acetilada forma N-acetilserotonina por arilasilamina N- acetiltransferasa (AA- NAT), el cual, en la mayoría de los casos, representa el índice limitante de la enzima. N- acetilserotonina es transformada en melatonina por hidroxindol O- metiltransferasa. La producción de melatonina pineal exhibe un ritmo circadiano, con un bajo nivel durante el día y altos niveles durante la noche. Este ritmo circadiano persiste en la mayoría de los vertebrados, sin importar si son de hábitos diurnos o nocturnos (Pandi- Perumal et al, 2006). Las enzimas de la biosíntesis de la melatonina han sido identificadas en los linfocitos en humanos, y la síntesis local de melatonina está probablemente involucrada en la regulación del sistema inmune.

En mamíferos, la regulación de la biosíntesis de la melatonina pineal está mediada por el tracto retinohipotalámico que se proyecta desde la retina hasta el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), el mayor oscilador circadiano. Las células fotorreceptivas especiales del ganglio retinal contienen melanopsina como un fotopigmento involucrado en esta proyección. Las fibras del NSQ pasan a través del núcleo paraventricular, del cerebro medio y de la formación reticular, lo que influencia las células de la médula espinal, donde las células del ganglio simpático inervan el ganglio simpático superior. Las fibras postganglionares simpáticas del ganglio superior cervical terminan en los pinealocitos y regulan la síntesis de melatonina por liberación de norepinefrina (NE). La liberación de la NE de estas terminales nerviosas ocurre durante la noche. La unión de NE con los receptores β -adrenérgicos en los pinealocitos, activan la adenilato ciclasa vía subunidad α de las proteínas G. El incremento de cAMP promueve la síntesis de proteínas entre ellas las enzimas sintetizadoras de melatonina, y en particular de la enzima limitante de AA- NAT. Durante la

fase luminosa del fotoperiodo, la actividad eléctrica del NSQ es alta y, bajo estas condiciones, la liberación de NE pineal es lenta. Durante la fase oscura, la actividad del NSQ es inhibida y la síntesis de melatonina pineal es estimulada por el incremento en NE. La síntesis de la melatonina en la glándula pineal también es influenciada por neuropeptidos, como el neuropeptido intestinal vasoactivo, la activación del adenilato ciclasa en la pituitaria y el péptido y neuropeptido Y, el cual está parcialmente correlacionado con la respuesta potencial de NE. Una vez formada, la melatonina no es acumulada en la glándula pineal sino que se difunde a través de los capilares sanguíneos y del fluido cerebroespinal (Pandiperalum et al, 2006).

La melatonina baña todos los tejidos del cuerpo en un muy corto periodo de tiempo. La vida media de la melatonina es biexponencial, con la primera distribución su vida media es de dos minutos y en la segunda de 20 minutos. Estas concentraciones, sin embargo rápidamente disminuyen con el incremento de la distancia de la pineal, lo que sugiere que la melatonina es tomada del tejido cerebral. La producción de melatonina muestra considerables diferencias interindividuales. Algunos sujetos producen más melatonina durante toda su vida que otros, pero el significado de esta variación no es conocido.

2.1 Melatonina extrapineal

La melatonina es producida en los tejidos extrapineales, pues contienen sus enzimas de síntesis, la N-acetiltransferasa e hidroxindole- O- methyltransferasa. En 1993, Hueter calculó que la cantidad de melatonina en el tracto gastrointestinal (TGI) es al menos 400 veces mayor en los tejidos del sistema digestivo que en la glándula pineal. La melatonina fue postulada como un inhibidor natural de la serotonina (5- hidroxitriptamina), un precursor de la melatonina, especialmente en TGI además de que puede actuar como una hormona luminal, sincronizando los procesos digestivos. Esto nos enseña que la melatonina influencia

la motilidad intestinal y regula el transporte transmembranal de los electrolitos. La secreción luminal de melatonina puede ayudar a sincronizar la actividad digestiva de varios segmentos de TGI.

La melatonina en tracto gastrointestinal, fue detectada inmunohistológicamente en las células enterocromafinas (EC) de la mucosa digestiva (Raikhlin y Kvetnoy 1975, 1976 y 1978). La melatonina ha sido identificada en el tubo digestivo de los mamíferos en varias concentraciones. Se cree que los niveles de melatonina localizados en el intestino representan la síntesis y quizás la acumulación de la indolamina. Esta hipótesis es sustentada por la presencia de la enzima hidroxindole- O- methyltransferasa. La concentración de melatonina en tejidos gastrointestinales sobrepasa los niveles sanguíneos de 10- 100 veces más y es al menos 400 veces mayor en el tracto gastrointestinal que en la glándula pineal (Bubenik, 2002). Por ejemplo, mientras la pinealectomía decrementa los niveles de melatonina en el plasma durante la noche cerca de un 20% de los valores control, los niveles diurnos no son afectados significativamente. Por lo tanto, el tracto gastrointestinal contribuye significativamente a la circulación de la melatonina, especialmente durante el día y la melatonina puede servir como una hormona endocrina, paracrina o autocrina influenciando la regeneración y función del epitelio, mejorando el sistema inmune del intestino y reduciendo el tono de los tejidos gastrointestinales. Mientras que las concentraciones nocturnas de melatonina en suero de ratas se encuentra alrededor de 40pg/ ml, los niveles correspondientes en el yeyuno y el ileón exceden los 50 pg/ ml. Parece ser que la regulación de la melatonina gastrointestinal está relacionada con la ingesta de comida (Bubenik, 2001).

Como un inhibidor de serotonina (5- HT), la melatonina fue encontrada activa en el espasmo del tracto gastrointestinal causado por 5- HT y fue eficiente en la restauración de la motilidad intestinal *in vitro*. La melatonina *In vivo*, acorta el tiempo de transito de la comida y el movimiento transmembranal de los electrolitos (Bubenik, 2001).

La acción de la melatonina en el músculo liso es probablemente a través de receptores ML2. La participación del sistema nervioso central (SNC) en la motilidad del intestino fue mostrada por Benouali- Pellisier (Benouali- Pellisier, 1994) quien demostró que la melatonina está involucrada en la modulación de la colesistocinina y la regulación de la motilidad del Íleon. La localización de la melatonina en el intestino apoya las conclusiones de Legris y colaboradores, quién demostró que la melatonina está involucrada en el transporte transmembranal de electrolitos e iones, que puede actuar como una hormona paracrina, la melatonina del SNC está involucrado con la motilidad del duodeno (Legris et al, 1982), además inhibe la contracción de músculo liso en el estómago, íleon y colon. Tiene un fuerte efecto en la actividad mitótica, reduce la velocidad de la proliferación del epitelio en el yeyuno de ratón. Altas concentraciones de melatonina inhiben la contracción espontánea de los músculos gastrointestinales e inducen la elongación gastrointestinal (Bubenik, 2002).

1.3 Mecanismos moleculares de la contracción de músculo liso

El músculo liso de los vertebrados está generalmente bajo un control autónomo y hormonal y no es voluntario.

La contracción y relajación del músculo liso es más lenta que la del músculo estriado y generalmente es capaz de sostener la contracción por más tiempo. Esto es reflejado en la duración y la amplitud del pulso Ca^{2+} citosólico, el cual inicia la contracción en el músculo liso. La lenta producción del Ca^{2+} en las células del músculo liso está asociada con un pobre desarrollo del retículo sarcoplásmico.

En las células del músculo liso, el Ca^{2+} siempre es bombeado hacia afuera a la superficie de la membrana, quedando los niveles internos de Ca^{2+} muy bajos. Cuando la membrana es despolarizada, esta se vuelve más permeable a los iones de Ca^{2+} , permitiendo el flujo de estos, lo cual activa la contracción. La relajación ocurre cuando la permeabilidad al

calcio regresa a un nivel bajo mientras que la membrana bombea el Ca^{2+} fuera de la célula. Largas despolarizaciones de la membrana generan potenciales de acción en los cuales el Ca^{2+} lleva la energía interna. Los potenciales de acción producen grandes flujos de Ca^{2+} lo que lleva a una gran contracción, ya que la tensión generada es proporcional al nivel de Ca^{2+} intracelular.

La excitación- contracción del músculo liso ocurre por diferentes mecanismos. A diferencia del músculo estriado en el que los iones calcio se unen a la proteína troponina, en el músculo liso no existe esta proteína por lo tanto se une a la proteína calmodulina formando un complejo Ca^{2+} / calmodulina; este complejo se vuelve a unir a una elongada proteína llamada caldesmon. En ausencia de Ca^{2+} , caldesmon se une a los delgados filamentos de actina, restringiendo las interacciones actina- miosina e inhibiendo la contracción muscular. Sin embargo, el caldesmon que ha sido fosforilado por la proteincinasa C no puede unirse a los delgados filamentos y por lo tanto no inhibe las interacciones actina- miosina. Así la fosforilación del caldesmon o la unión Ca^{2+} / calmodulina a caldesmon activa la contracción del músculo liso.

Existen otros mecanismos para regular la contracción del músculo liso conocidos como "Regulación de fases de la cadena de miosina". En el músculo liso, la unión del Ca^{2+} directamente a la regulación de las fases de cadena induce un cambio conformacional directamente a la cadena de la miosina que está unida a la actina, entonces el músculo se contrae. La fosforilación en algún otro sitio de la cadena por proteincinasa C, induce un cambio conformacional que impide las interacciones actina- miosina, resultado en la relajación. La lentitud en las acciones de la proteincinasa, junto con los bajos cambios de los niveles de Ca^{2+} , contribuye al bajo índice de contracción en el músculo liso (Lodish et al, 1995).

2.0 La regulación circadiana de la hormona Melatonina

La Melatonina (5- methoxy- N- acetilriptamina) es una hormona que fue descubierta en la glándula pineal de ovejas (Lerner et al, 1958). Quince años después, a través de cromatografía e inmunohistología, la melatonina fue descubierta en la retina, en la glándula Harderiana (glándula retro- orbital complementaria al lacrimal que no esta presente en humanos) y en todo el tracto gastrointestinal (Bubenik, 2006).

La melatonina exhibe una multitud de funciones fisiológicas, como la inducción de sueño y la adaptación a los fotoperiodos circanuales y circadianos. La melatonina también es un poderoso antioxidante, pues elimina los radicales libres; también afecta la ingesta de comida y la absorción de macronutrientes en peces y varios mamíferos. Además, la restricción de alimento influencia significativamente las concentraciones de melatonina en la sangre, la glándula pineal y el tracto gastrointestinal (TGI).

La maquinaria enzimática para la biosíntesis de la melatonina en los pinealocitos fue primero identificada por Axelrod (1974). Su precursor, el triptofano proviene de la sangre y es transformado, vía 5- hidroxitriptofano a serotonina, la serotonina al ser acetilada forma N- acetilserotonina por arilasilamina N- acetiltransferasa (AA- NAT), el cual, en la mayoría de los casos, representa el índice limitante de la enzima. N- acetilserotonina es transformada en melatonina por hidroxindol O- metiltransferasa. La producción de melatonina pineal exhibe un ritmo circadiano, con un bajo nivel durante el día y altos niveles durante la noche. Este ritmo circadiano persiste en la mayoría de los vertebrados, sin importar si son de hábitos diurnos o nocturnos (Pandi- Perumal et al, 2006). Las enzimas de la biosíntesis de la melatonina han sido identificadas en los linfocitos en humanos, y la síntesis local de melatonina está probablemente involucrada en la regulación del sistema inmune.

En mamíferos, la regulación de la biosíntesis de la melatonina pineal está mediada por el tracto retinohipotalámico que se proyecta desde la retina hasta el Núcleo

Supraquiasmático (NSQ), el mayor oscilador circadiano. Las células fotoreceptivas especiales del ganglio retinal contienen melanopsina como un fotopigmento involucrado en esta proyección. Las fibras del NSQ pasan a través del núcleo paraventricular, del cerebro medio y de la formación reticular, lo que influencia las células de la médula espinal, donde las células del ganglio simpático inervan el ganglio simpático superior. Las fibras postganglionares simpáticas del ganglio superior cervical terminan en los pinealocitos y regulan la síntesis de melatonina por liberación de norepinefrina (NE). La liberación de la NE de estas terminales nerviosas ocurre durante la noche. La unión de NE con los receptores β -adrenérgicos en los pinealocitos, activan la adenilato ciclasa vía subunidad α de las proteínas G. El incremento de cAMP promueve la síntesis de proteínas entre ellas las enzimas sintetizadoras de melatonina, y en particular de la enzima limitante de AA- NAT. Durante la fase luminosa del fotoperiodo, la actividad eléctrica del NSQ es alta y, bajo estas condiciones, la liberación de NE pineal es lenta. Durante la fase oscura, la actividad del NSQ es inhibida y la síntesis de melatonina pineal es estimulada por el incremento en NE. La síntesis de la melatonina en la glándula pineal también es influenciada por neuropeptidos, como el neuropeptido intestinal vasoactivo, la activación del adenilato ciclasa en la pituitaria y el péptido y neuropeptido Y, el cual está parcialmente correlacionado con la respuesta potencial de NE. Una vez formada, la melatonina no es acumulada en la glándula pineal si no que se difunde a través de los capilares sanguíneos y del fluido cerebroespinal (Pandi-Perumal et al, 2006).

La melatonina baña todos los tejidos del cuerpo en un muy corto periodo de tiempo. La vida media de la melatonina es biexponencial, con la primera distribución su vida media es de dos minutos y en la segunda de 20 minutos. Estas concentraciones, sin embargo rápidamente disminuyen con el incremento de la distancia de la pineal, lo que sugiere que la

melatonina es tomada del tejido cerebral. La producción de melatonina muestra considerables diferencias interindividuales. Algunos sujetos producen más melatonina durante toda su vida que otros, pero el significado de esta variación no es conocido.

2.1 Melatonina extrapineal

La melatonina es producida en los tejidos extrapineales, pues contienen sus enzimas de síntesis, la N-acetiltransferasa e hidroxindole- O- methyltransferasa. En 1993, Hueter calculó que la cantidad de melatonina en el tracto gastrointestinal (TGI) es al menos 400 veces mayor en los tejidos del sistema digestivo que en la glándula pineal. La melatonina fue postulada como un inhibidor natural de la serotonina (5- hidroxitriptamina), un precursor de la melatonina, especialmente en TGI además de que puede actuar como una hormona luminal, sincronizando los procesos digestivos. Esto nos enseña que la melatonina influencia la motilidad intestinal y regula el transporte transmembranal de los electrolitos. La secreción luminal de melatonina puede ayudar a sincronizar la actividad digestiva de varios segmentos de TGI.

La melatonina en tracto gastrointestinal, fue detectada inmunohistológicamente en las células enterocromafinas (EC) de la mucosa digestiva (Raikhlin y Kvetnoy 1975, 1976 y 1978). La melatonina ha sido identificada en el tubo digestivo de los mamíferos en varias concentraciones. Se cree que los niveles de melatonina localizados en el intestino representan la síntesis y quizás la acumulación de la indolamina. Esta hipótesis es sustentada por la presencia de la enzima hidroxindole- O- methyltransferasa. La concentración de melatonina en tejidos gastrointestinales sobrepasa los niveles sanguíneos de 10- 100 veces más y es al menos 400 veces mayor en el tracto gastrointestinal que en la glándula pineal (Bubenik, 2002). Por ejemplo, mientras la pinealectomía decrementa los

niveles de melatonina en el plasma durante la noche cerca de un 20% de los valores control, los niveles diurnos no son afectados significativamente. Por lo tanto, el tracto gastrointestinal contribuye significativamente a la circulación de la melatonina, especialmente durante el día y la melatonina puede servir como una hormona endocrina, paracrina o autocrina influenciando la regeneración y función del epitelio, mejorando el sistema inmune del intestino y reduciendo el tono de los tejidos gastrointestinales. Mientras que las concentraciones nocturnas de melatonina en suero de ratas se encuentra alrededor de 40pg/ ml, los niveles correspondientes en el yeyuno y el íleon exceden los 50 pg/ ml. Parece ser que la regulación de la melatonina gastrointestinal está relacionada con la ingesta de comida (Bubenik, 2001).

Como un inhibidor de serotonina (5- HT), la melatonina fue encontrada activa en el espasmo del tracto gastrointestinal causado por 5- HT y fue eficiente en la restauración de la motilidad intestinal *in vitro*. La melatonina *In vivo*, acorta el tiempo de transito de la comida y el movimiento transmembranal de los electrolitos (Bubenik, 2001).

La acción de la melatonina en el músculo liso es probablemente a través de receptores ML2. La participación del sistema nerviosos central (SNC) en la motilidad del intestino fue mostrada por Benouali- Pellisier (Benouali- Pellisier, 1994) quien demostró que la melatonina está involucrada en la modulación de la colesistocinina y la regulación de la motilidad del Íleon. La localización de la melatonina en el intestino apoya las conclusiones de Legris y colaboradores, quién demostró que la melatonina está involucrada en el transporte transmembranal de electrolitos e iones, que puede actuar como una hormona paracrina, la melatonina del SNC está involucrado con la motilidad del duodeno (Legris et al, 1982), además inhibe la contracción de músculo liso en el estómago, íleon y colon. Tiene un fuerte efecto en la actividad mitótica, reduce la velocidad de la proliferación del epitelio en el yeyuno de ratón. Altas concentraciones de melatonina inhiben la contracción espontánea de los músculos gastrointestinales e inducen la elongación gastrointestinal (Bubenik, 2002).

3. ANTECEDENTES

La melatonina produce una supresión de la motilidad del íleon de rata cuando la contracción es estimulada por serotonina (Kappers, 1962). La melatonina es un antagonista de la contracción espontánea del duodeno de la rata, (Quasteketl y Rahamimoff 1965), Estos autores plantearon la idea de que la melatonina no inhibía la frecuencia de la contracción, que esta acción no afecta el marcapasos rítmico de la musculatura intestinal (Harlow and Weekley, 1986).

El principal mecanismo de acción de la melatonina en el músculo liso es desconocido, pero sugiere un efecto depresivo en la excitabilidad del músculo (Davis 1971). Se ha localizado melatonina por todo el tracto gastrointestinal y su distribución corresponde a la de la serotonina, producidas en las EC. El colon y el duodeno tienen un alta inmunofluorescencia a la melatonina, mientras que el íleon y el yeyuno tienen una baja actividad (Bubenik et al, 1977); la alteración en la concentración de melatonina intestinal diurna y nocturna en mamíferos puede funcionar como un supresor del movimiento de la comida dentro y fuera de los intestinos y maximizar la reabsorción (Harlow and Weekley, 1986). La melatonina podría actuar vía GMPc para regular la translocación intracelular de calcio y consecuentemente influir en las contracciones musculares (Vesely 1980). Durante 1976 se observó que la pinealectomía no suprime los niveles diurnos de melatonina en el plasma (Ozaki- Lynch 1976). En 1981 se reporto que la melatonina actúa como un agonista competitivo de los receptores inhibidores de serotonina (Peroutka et al, 1981).

Vakkuri et al, al igual que Bubenik observaron las alteraciones de las concentraciones de melatonina como un supresor del movimiento del alimento y la maximización de la reabsorción de los nutrientes, a diferencia de Bubenik, Vakkuri lo hizo en aves (Harlow and Weekley, 1986). Durante el siguiente año, se sugirió que el papel inhibitorio de la melatonina en el tubo y la contracción intestinal del músculo liso podrían ser vía la inhibición de los

neuroreceptores para la serotonina (Bubenik 1986). Sin embargo, también se aseguró que era una posibilidad que la melatonina pudiera estar sujeta a receptores inhibidores de serotonina, de esa forma influyen la fuerza de las contracciones intestinales (Bubenik, 2001).

Mediante un experimento *in vitro* se observó que las dosis de melatonina arriba de $1\mu\text{g}/\text{ml}$ no producen una respuesta medible, mientras que las dosis de $2\mu\text{g}/\text{ml}$ resultan en una inhibición de fuerza y amplitud en las contracciones del músculo liso del duodeno (Harlow y Weekley, 1986). El tratamiento con melatonina no produce ninguna alteración significativa de la frecuencia de las contracciones espontáneas en ningún segmento del intestino. Sin embargo, todos los segmentos exhibieron una depresión en la amplitud de las contracciones. El área duodenal exhibe gran respuesta a la melatonina con un 94% de depresión en la fuerza y un 92% en la motilidad; este fue seguido por el colón con un 52% y un 53% en la fuerza y la motilidad respectivamente. El íleon fue el siguiente, seguido por el yeyuno, los cuales exhibieron solo el 22% de depresión en fuerza y 26% en motilidad. Y en todos los tejidos se observa una respuesta a la melatonina en menos de ocho minutos. (Harlow and Weekley, 1986).

Tiempo después fueron caracterizados los receptores de melatonina encontrados en el intestino de diferentes animales (Pontoire et al, 1993). Más tarde se reportó que la melatonina podía interactuar con apamina sensitiva y posiblemente activar canales de Ca^{++} y K^{+} (Reyes- Vásquez et al, 1997). En el año de 1999, nuevamente se observó que la melatonina puede actuar como hormona luminal, participando en la actividad secuencial del proceso digestivo (Bubenik et al, 1999). También fue posible observar a la melatonina como un potenciador para la amplitud y frecuencia de las contracciones espontáneas del músculo liso (Brasov- Poon, 1999).

Por otra parte, también se concluyó que el efecto inhibitorio de la melatonina en las células del músculo liso del estómago de una rata es por la vía de participación de pequeñas conductancias de canales de potasio (Storr et al 2000). Finalmente a través de pruebas con inyecciones intraperitoneales de pequeñas dosis de melatonina (1 a 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) se observó un incremento sostenido de la motilidad intestinal, mientras que con dosis más altas se inhibió la motilidad (Drago et al 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los antecedentes, se conoce que la melatonina es un inhibidor de la motilidad intestinal, sin embargo se desconoce si existe una relación nictémeral en su efecto, debido a que la melatonina pineal se sintetiza y libera principalmente durante la noche. Al momento no se tienen reportes de su actividad en intestino delgado de ratón, por lo que en el presente proyecto se desea analizar la respuesta mecánica del intestino delgado a diferentes dosis de melatonina. Lo que implica elaborar una curva de dosis respuesta y el tiempo en que se mantuvo el efecto de la misma.

Por otra parte se comparo el efecto de la melatonina en la actividad peristáltica entre segmentos intestinales obtenidos de ratones a mitad de la fase luminosa y comparar los resultados con los obtenidos a mitad de la fase oscura del fotoperiodo, lo que nos permitirá conocer si la respuesta a la melatonina es diferente a fases opuestas del nictémero.

5. HIPÓTESIS

Si la melatonina reduce la amplitud y la frecuencia de las contracciones peristálticas, y si la melatonina pineal se sintetiza durante la noche, la respuesta de inhibición de la contracción peristáltica será mayor en la noche que durante el día ante la misma dosis, lo que indicaría una sensibilización diferencial a la melatonina en el ciclo diario del animal.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Conocer los efectos de la melatonina dosis dependientes en la motilidad intestinal causados por la aplicación en duodeno de ratón y si existen diferencias fase dependiente del nictémero.

6.2 Objetivos Particulares

- ♣ Observar los efectos dosis dependiente de melatonina sobre el movimiento peristáltico del intestino delgado de ratón en fuerza y frecuencia de contracción.
- ♣ Conocer si la relación dosis dependiente es diferente en dos horas opuestas del ciclo LO, en animales previamente sincronizados a ciclos de LO opuestos.
- ♣ Conocer el tiempo de recuperación de la dosis menor.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

El manejo de los animales usados en este trabajo, fue acorde las observaciones recomendadas para el manejo de animales de laboratorio publicado por la Norma Oficial Mexicana 062ZOO (Norma Oficial Mexicana NOM- 062- ZOO- 1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 34 ratones machos de la especie *Mus musculus* variedad NIH, que se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias, estos ratones se dividieron en 2 lotes; uno de los lotes con una n= 14 ratones se mantuvo en un fotoperiodo de LO 12:12 de (fotofase de 6:00 a 18:00); el segundo lote con n= 20 ratones, se mantuvo en un fotoperiodo invertido 12:12 (fotofase de 18:00 a 6:00), durante al menos dos semanas a fin de que los animales que se encontraran en fotoperiodo invertido y se sincronizaran completamente. Ambos lotes fueron alimentados con nutricubos Rodent Lab Chow y agua simple *ad libitum*. La jaula en la que eran mantenidos, se cambiaba dos veces por semana o cuando fuera necesario.

7.2 Obtención del tejido

Inicialmente, cada ratón fue anestesiado con vapores de éter y posteriormente sacrificado por ruptura de cervicales, este fue colocado boca arriba sobre la charola de disección y se hizo una incisión de aproximadamente 4 cm en la cavidad abdominal, una vez abierta, se localizó la base del estómago y a partir del inicio del duodeno se tomaron dos centímetros de tejido para realizar el registro. El segmento de intestino que se seleccionó fue el duodeno y éste una vez obtenido, se colocó dentro de una caja de Petri con solución fisiológica Tirode (8 gr de cloruro de sodio , 0.2 gr de cloruro de potasio, 0.2 gr de cloruro de calcio , 0.05 gr de

cloruro de magnesio , 1 gr de bicarbonato de sodio y 0.04 gr de fosfato de sodio monobásico en un litro de solución, a temperatura ambiente); después de ser colocado en la solución se procedió al manejo de la muestra, se limpió el contenido del tubo con Tirode aplicado por medio de una pipeta Pasteur para eliminar los restos de alimento. Para mantener la muestra de tejido en condiciones adecuadas, el segmento de intestino se sumergió en solución Tirode a una temperatura de 37° C. La cantidad de melatonina, inicialmente se diluyó en 1 ml de etanol al 100%, y una vez en solución, se llevó a 40 ml de Tirode, donde se mantuvieron tres distintas concentraciones finales de melatonina: 0.24 µg/ ml, 1.21 µg/ml y 2.43 µg/ml.

7.3 Registro mecánico de la fuerza y frecuencia de contracción peristáltica

La preparación experimental se realizó en una cámara de vidrio que se muestra en la figura 2 y 3. Se usó una doble cámara de vidrio, donde tanto la poza interna como la externa permiten la circulación de fluidos. La poza interna presentaba en el fondo externo una llave de tres conexiones que permitían cambiar el contenido del medio cuando es necesario, así como el burbujeo de aire a la muestra. La poza externa permitía mantener un baño caliente que ayudaba a mantener el medio fisiológico en la poza interna a la temperatura adecuada. La cámara cuenta con una salida a la cual se conectaba una manguera de látex para hacer el cambio de baño térmico cada vez que se requiriera.

La cámara fue elaborada artesanalmente por los talleres de reparación de vidrio de la Facultad de Química, UNAM. La cámara fue sujeta a un soporte circular, de una base de microscopio estereoscópico, lo que permitía ajustar su altura respecto al transductor de fuerza, y poder regular la tensión del tejido. Una vez limpio el tejido, se ató en ambos extremos con una aguja curva e hilo normal, uno de los hilos se sujetó a una armella pequeña que se encontraba en el tapón del fondo de la poza interna después se llenó con 40 ml de solución Tirode a 37- 38° C. Para mantener esta temperatura era necesario que con

un baño térmico de la poza externa se mantuviera a una temperatura aproximada de 42° C. Al extremo opuesto del tejido, la sutura se sujetó directamente al ojal del transductor de fuerza FORT 10 (WPI, Illinois, USA), a 4 cm de distancia. El tejido estuvo totalmente sumergido durante cada una de las fases de los experimentos. La señal del transductor fue colectada por un amplificador-puente BRIDGE8 de WPI y los datos de contracción y fuerza fueron colectados mediante el Sistema de Adquisición de Datos de BIOPAC MP100, y el software Acqknowledge 3.8.1, a una frecuencia de 100 datos por segundo.

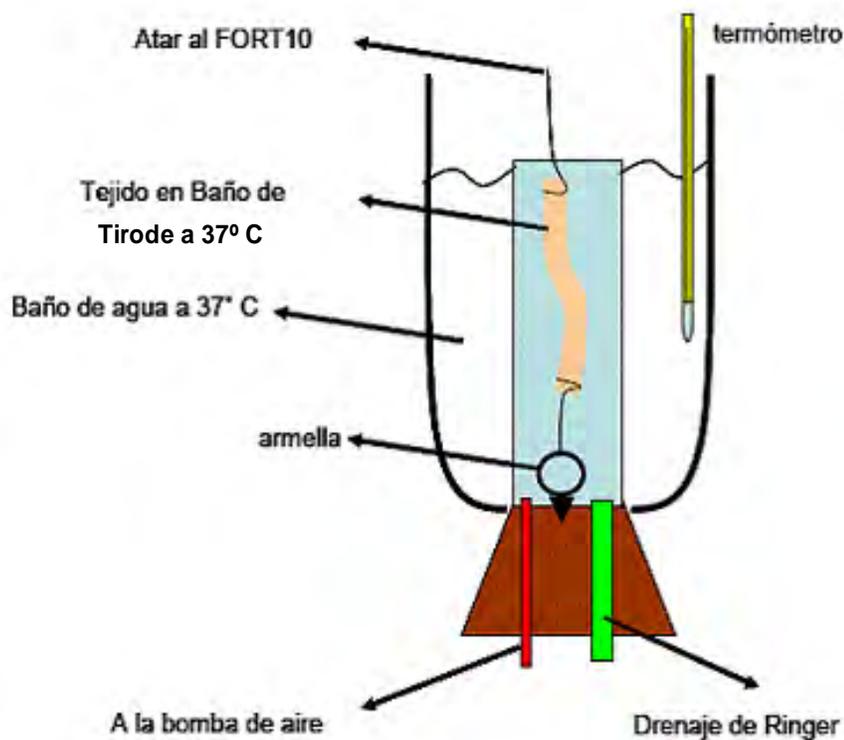


Fig. 4 Cámara de órganos aislados que se utilizó para hacer los registros de peristálsis en muestra de duodeno

Antes del inicio de cada registro, el sistema fue calibrado con una pesa de 9 gr, el filtro del amplificador se mantuvo entre los valores de 1khz y 5khz, mientras que la ganancia fue de x10 y x50. Cuando el material, el sistema y el tejido se encontraron listos se procedió al registro de la actividad peristáltica del tejido en diversas condiciones.

Al Inicio del registro de la actividad del tejido, la tensión del tubo digestivo fue regulada mediante una plataforma para microscopio estereoscópico que sujetaba la cámara para el tejido. Lo anterior permitió registrar actividad dentro de la resolución del transductor.

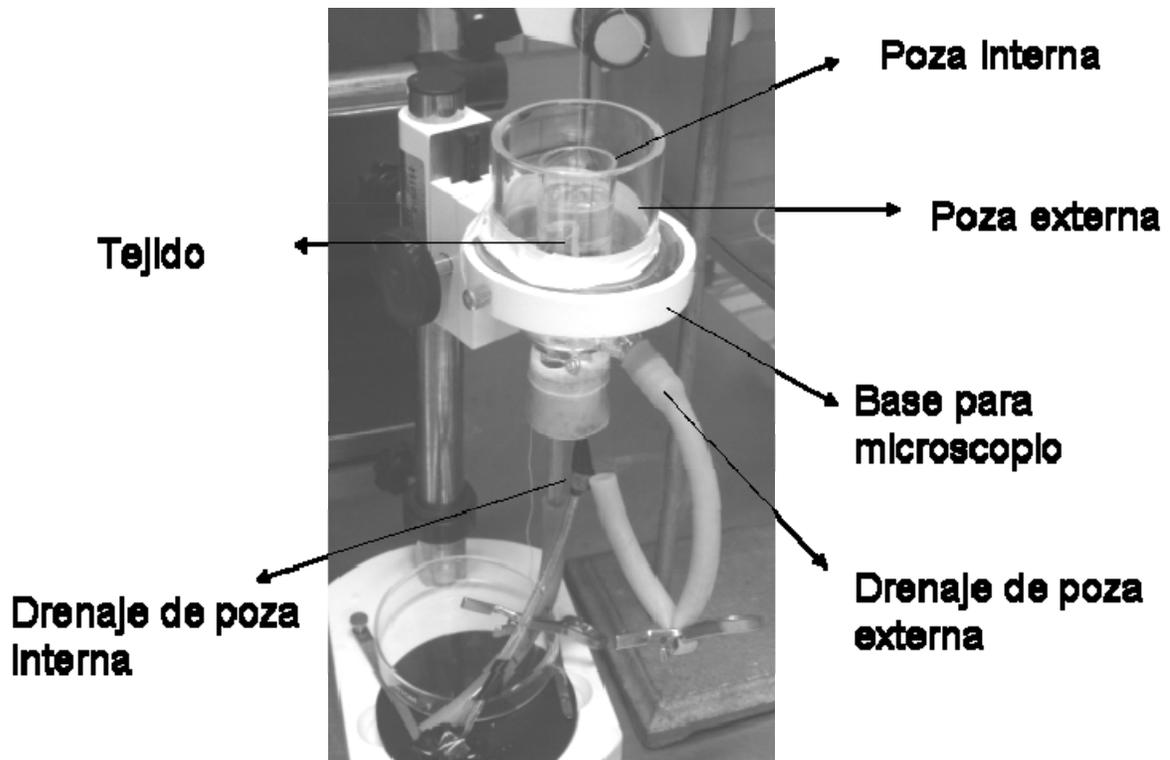


Figura 5. Fotografía del sistema de aislamiento y montaje del segmento del intestino. El tejido se mantenía en la cámara interna, de un extremo era sujetado al transductor y de otro al fondo de la poza interna que estaba llena de solución fisiológica.

8. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La figura 6, presenta los dos protocolos experimentales usados en el presente trabajo. En A, se muestra una variación sucesiva de concentraciones de melatonina y entre cada una de ellas, un tiempo de lavado con Tirode.

Cada estadio en el procedimiento consistió de 10 minutos. La evaluación cuantitativa del efecto se hizo en segmentos intermedios del muestreo (al minuto 5). Cada protocolo fue desarrollado en animales colectados a mitad de la fase diurna (n= 9) y de la fase nocturna (n= 15). En el protocolo B, se utilizó únicamente la primera concentración, pero la preparación fue mantenida durante 30 minutos en ambas fases del nictémero (n= 5 y 5 respectivamente). Las dosis que fueron elegidas de acuerdo a la literatura y a los resultados obtenidos durante la primera fase de experimentación.

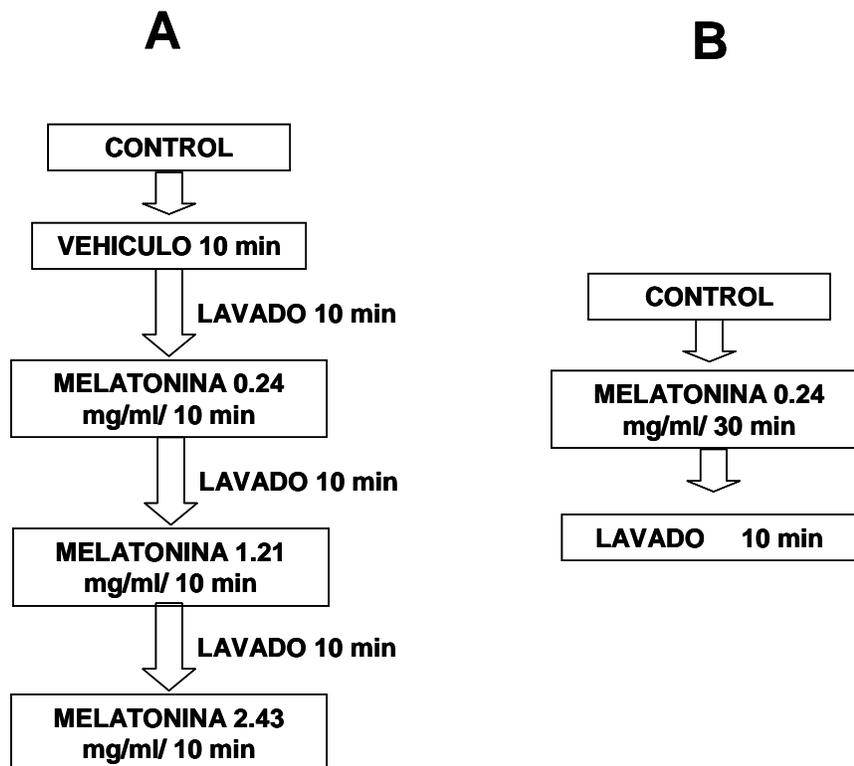


Figura 6. Diagrama del diseño experimental. En B se muestra un experimento diseñado a partir de los resultados del primer diseño experimental. Cada procedimiento experimental se desarrolló tanto a mitad de la fase luminosa como de la fase oscura.

9. ANÁLISIS DE DATOS

La colecta y el análisis de datos se hicieron mediante el uso del programa Acknowledge ver 8.3 de BIOPAC (EEUU).

Para el análisis de datos se utilizó el criterio de la fuerza y la frecuencia de contracción, en una muestra de tres ondas por minuto de registro, es decir que en un registro de 10 minutos se midieron al rededor de 30 ondas.

El análisis de frecuencia por cada minuto de registro se obtuvo mediante la función BPM (Bits por Minuto). Una vez obtenidos los promedios se procedió a realizarse la porcentualización de los datos con respecto al registro control anterior (cada lavado), calcular la desviación y el error estándar y se graficaron para comparar los cambios en la fuerza de contracción y en la frecuencia, mediante una hoja de cálculo en Excel de Microsoft Office 2003.

Los datos obtenidos fueron comparados mediante una T de Student para muestras no pareadas, las diferencias obtenidas con una $P < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

10. RESULTADOS

10.1 Dosis– respuesta a diferentes concentraciones de melatonina

10.1.1 Observaciones generales

Durante el protocolo de dosis-respuesta a distintas concentraciones de melatonina, se observó que existen respuestas diferenciales de acuerdo a la dosis y de acuerdo a la fase del nictémero en que se desarrolló el protocolo.

Los cambios observados en la frecuencia y fuerza de contracción entre cada condición a las que fue expuesto el tejido, son mostrados en un ejemplo típico en la figura 7, tanto para la fase diurna (7a) como para la fase nocturna (7b).

Cada recuadro indica un segmento de 20 segundos de registro y la amplitud está expresada en gramos, mediante la escala presentada en forma de barra.

Se observó que la amplitud de las ondas peristálticas es variable, aún en el segmento control. Sin embargo, cuando se aplica una solución con la cantidad correspondiente de 100 μ l de alcohol en 40 ml de Tirote (vehículo, fig. 7a y 7b), se observó una reducción en la amplitud de las contracciones peristálticas. El efecto del vehículo por si mismo implica una reducción en la amplitud de la respuesta. Sin embargo, las diferencias normalizadas para los distintos registros obtenidos, no arrojaron diferencias significativas.

Las figuras 7 a y b muestran también, la parcial recuperación de las ondas de contracción durante el lavado al final de los 10 minutos, sin embargo la amplitud original no se reestablece en este registro. Cabe indicar que la respuesta de la preparación a los lavados fue variable, de tal forma que en algunas preparaciones, el lavado recupera por más del 100% la respuesta original, mientras que en otros, como en este caso en particular, se observa una recuperación parcial. Por lo que las comparaciones del efecto de las siguientes

dosis se hacen respecto a la amplitud que presenta la respuesta peristáltica en el lavado previo.

La figura 7b, muestra que la solución de melatonina de 1.21 $\mu\text{g/ml}$ incrementa la amplitud en la fase oscura, y que en comparación con el lavado intermedio, la solución 2.43 $\mu\text{g/ml}$, muestra una reducción de amplitud; mientras que la dosis más pequeña de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ hay un fuerte aumento en la fuerza de contracción.

La figura 7b, muestra también un registro de un segmento de intestino que fue colectado a mitad de la fase oscura, proveniente de un animal sincronizado a un ciclo LO invertido. A diferencia del registro de medio día, el mayor efecto se observó cuando se usa la mayor concentración de melatonina (2.43 $\mu\text{g/ml}$). En ambos casos se puede observar la disminución de la fuerza de contracción al ser sometidos a un medio con etanol e incluso la frecuencia disminuye; sin embargo, también se puede observar una diferencia entre ambos registros, ya que en la fase luminosa es más notorio el cambio entre el registro control y el registro con vehículo que en la fase oscura.

Tanto la primera y la segunda dosis de melatonina aumentan la frecuencia con respecto al registro hecho con el vehículo, por el contrario la mayor dosis de melatonina tiene un efecto inhibitorio en la frecuencia de las contracciones durante la fase luminosa del nictémero.

Por otra parte, la fuerza de contracción se ve claramente afectada tanto por el vehículo como por las dosis más altas de melatonina disminuyendo entre el 25 y 50%. Aunque no es muy evidente con la dosis de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ de melatonina, la fuerza de contracción parece mantenerse igual.

Durante la fase oscura es claro que la inhibición se presenta tanto en la fuerza de contracción como en la frecuencia sobre todo con el etanol, en el caso de la fuerza de

contracción la mayor inhibición la presenta la dosis más alta de melatonina disminuyendo en un 58%, al contrario de la más baja que muestra un aumento incluso mayor al de los lavados es decir que aumenta en un 20%, pero no en comparación con el registro control; mientras que la frecuencia muestra un aumento con la segunda dosis de melatonina de 22%, no así con la menor y la mayor con una disminución de 9 y 22% en la frecuencia respectivamente.

Fotofase VS Escotofase

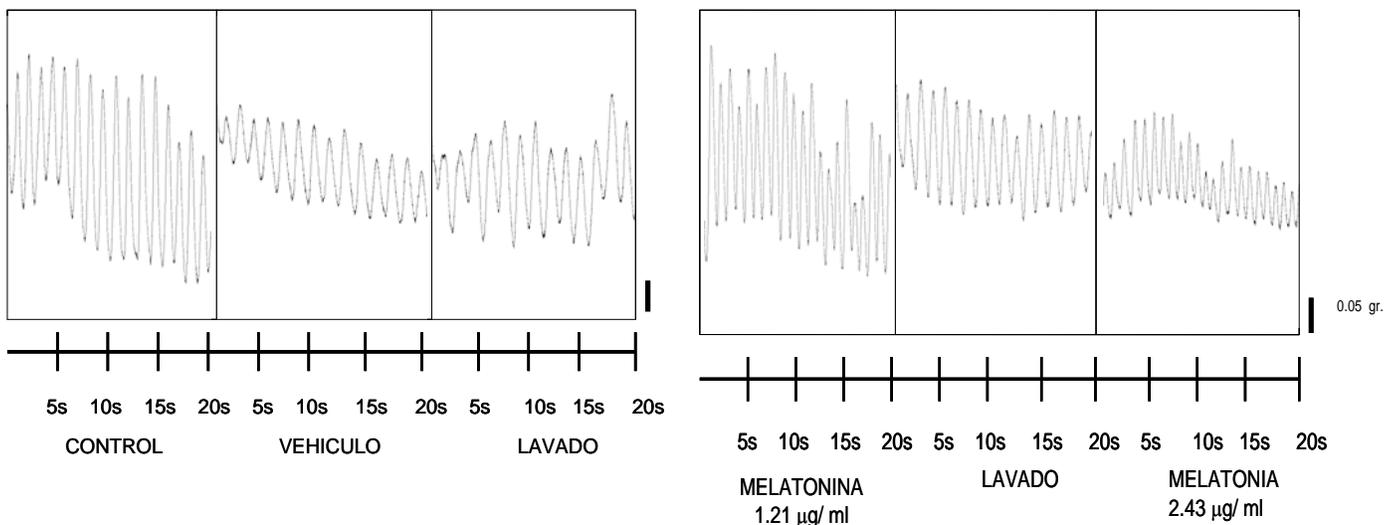
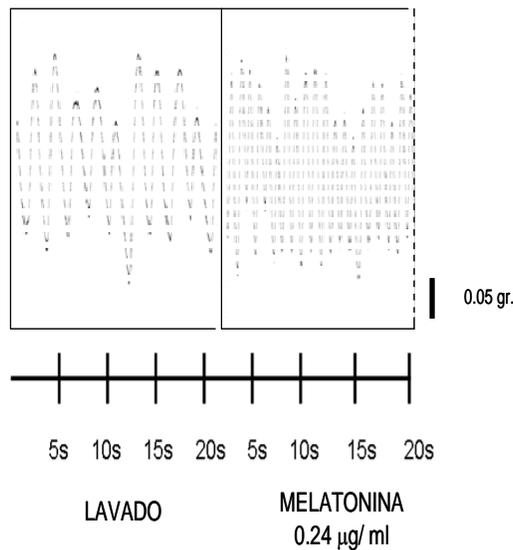


Figura 7a Cambios en la contracción peristáltica del duodeno de ratón obtenido a mitad de la fase luminosa y su respuesta a distintas concentraciones de melatonina en el medio fisiológico (20 segundos de cada registro).

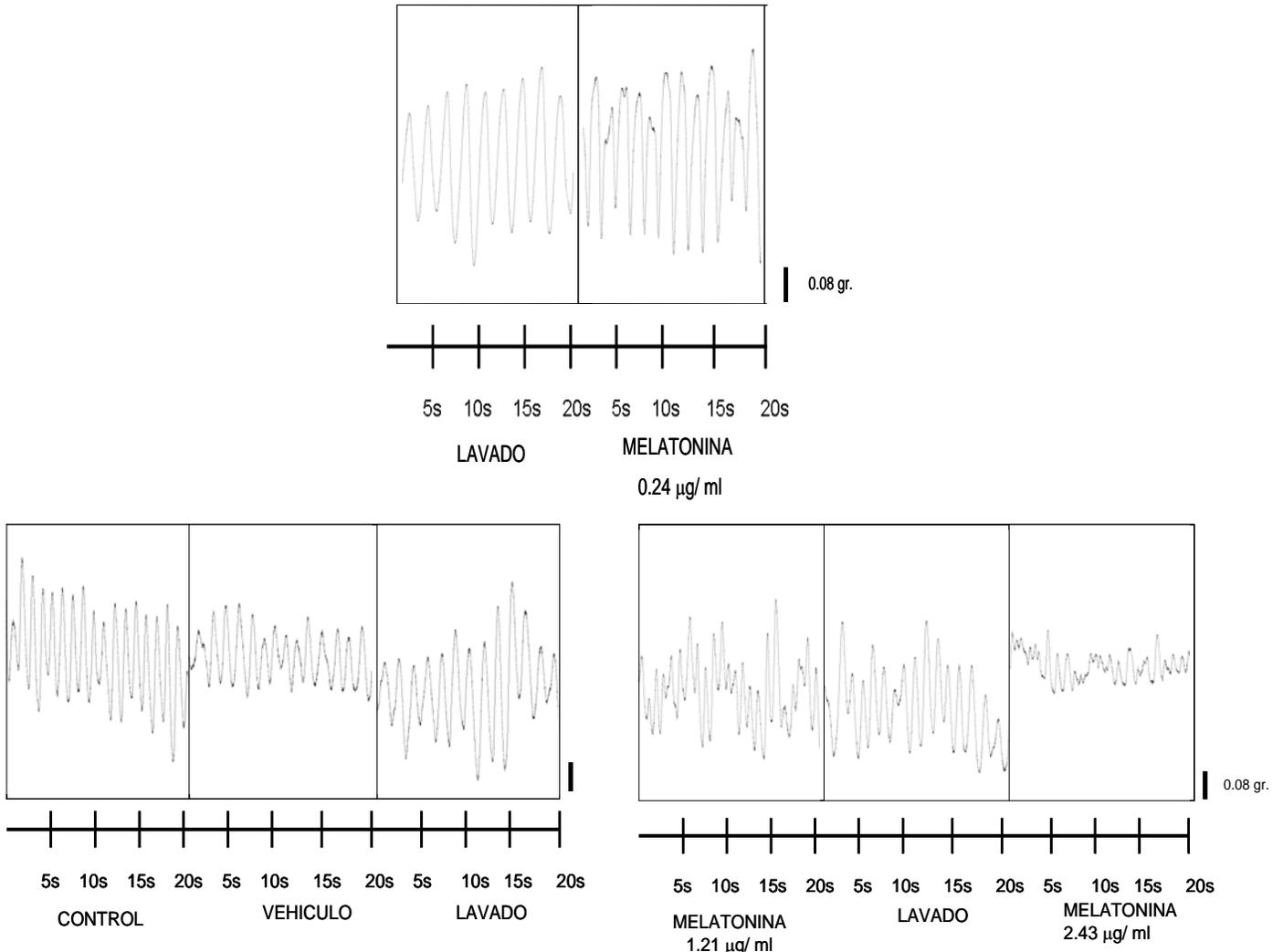
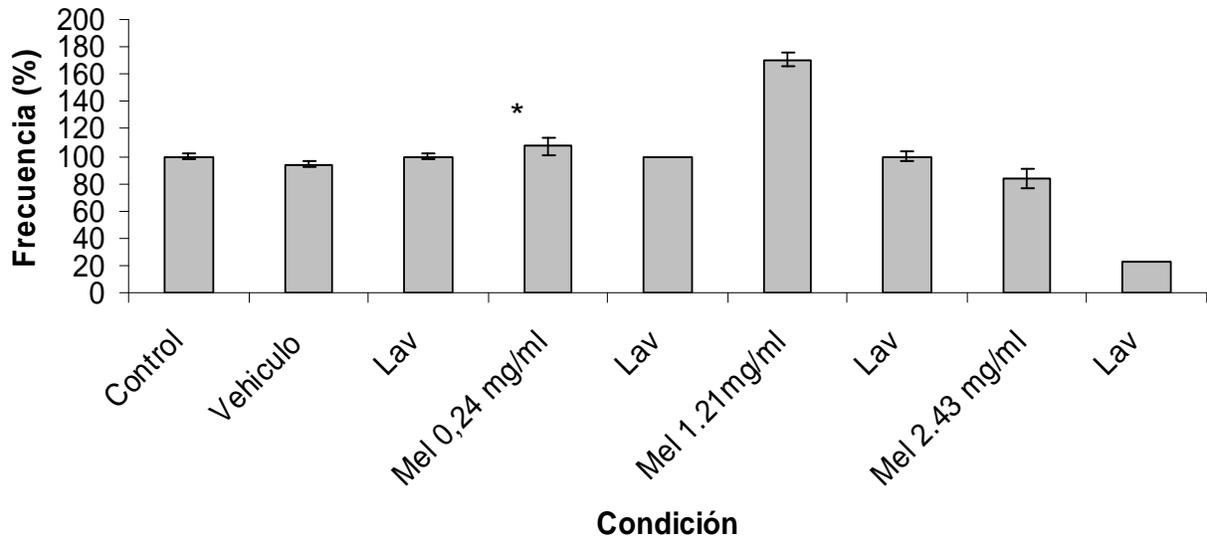


Figura 7b Cambios en la contracción peristáltica del duodeno de ratón obtenido a mitad de la fase oscura y su respuesta a distintas concentraciones de melatonina en el medio fisiológico.

La figura 8, muestra los cambios porcentuales de la frecuencia observados entre la condición control respecto a las distintas dosis de melatonina y sus respectivas condiciones de lavado. El asterisco indica los grupos en los cuales existe diferencia significativa con el control mediante un análisis no pareado de T de Student. La gráfica muestra que la única dosis que tiene una respuesta significativa durante el día subjetivo (medio día), es ante la aplicación de la concentración de 0.24 µg/ml. La misma tendencia se presenta durante la noche subjetiva pero el cambio porcentual del efecto es mayor.

FOTOFASE



ESCOTOFASE

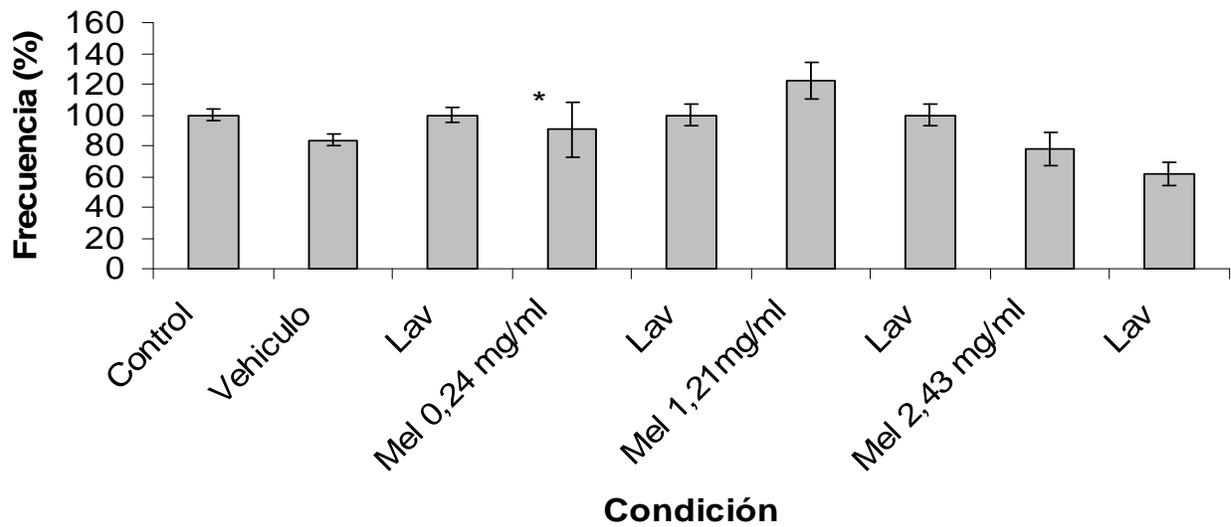


Fig. 8 Porcentaje de frecuencia de contracción de duodeno durante la fotofase del nictémero y la escotofase. Se pueden observar las variaciones de la frecuencia de contracción de acuerdo a la condición en la que se encuentra (* $P < 0.05$, entre melatonina 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el control).

10.1.2 Cambios en la frecuencia de contracción.

La comparación entre el efecto de las diferentes condiciones a las que fue sometido el tejido, mostrando el efecto tanto inhibitorio como excitatorio de éstas, se muestra en la figura 9. La primera dosis de melatonina tiene un efecto opuesto entre la fase luminosa y la fase oscura del nictémero, las principales diferencias se observan entre los efectos causados por la melatonina a 1.21 $\mu\text{g/ml}$ en la fase luminosa y la misma dosis de la melatonina en la fase oscura. De esa misma manera se observa una diferencia entre la menor dosis de melatonina (0.24 $\mu\text{g/ml}$) en comparación con el control (*).

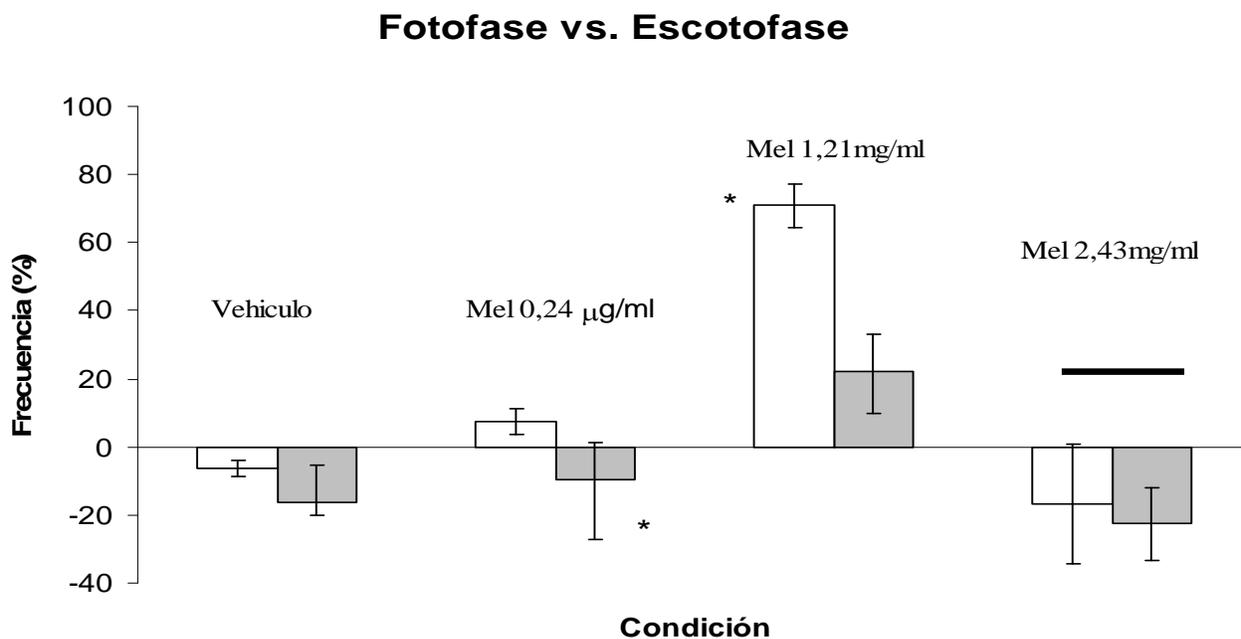


Fig. 9 Grafica comparativa del efecto neto porcentual en la frecuencia de contracción de duodeno en ratones tanto en escotofase (gris) como durante la fotofase (blanco), sometidos a las mismas condiciones, (*) diferencias significativas entre melatonina y control, (—) diferencias significativas entre la misma dosis de melatonina (en diferentes fases del nictémero).

10.1.3 Cambios en la fuerza de contracción.

La figura 10 muestra los cambios porcentuales en la fuerza de contracción. El asterisco indica diferencias ($p < 0.05$) respecto a su control. Durante la noche subjetiva se observa un incremento de la fuerza de contracción cercana a un 40%, por efecto de la melatonina a 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (100 %) mientras que durante el día subjetivo, se observa un decremento significativo en la fuerza de contracción a la mayor concentración (2.43 $\mu\text{g/ml}$).

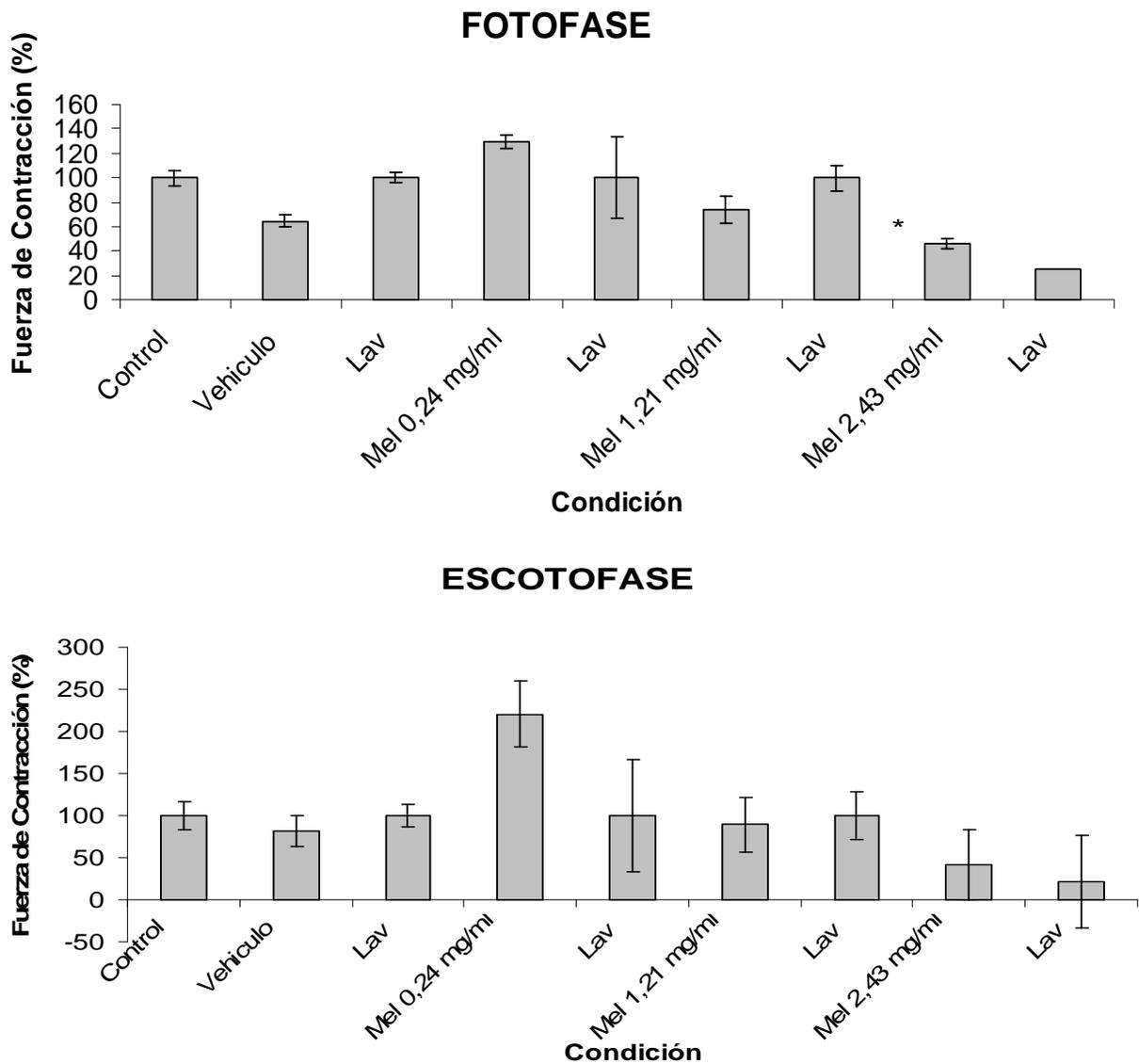


Fig. 10 Porcentaje de cambio en la fuerza de contracción del duodeno durante la fotofase (grafica superior) y la escotofase (grafica inferior) del nictemero (* $P < 0.05$ entre melatonina de dosis 2.43 $\mu\text{g/ml}$ y el control durante la fotofase).

Las diferencias netas que se observan entre el día y la noche en la fuerza de contracción, son presentados en la figura 11. Existe un efecto distinto a la menor concentración de melatonina, entre la fase diurna y la fase nocturna de los registros. El efecto fue principalmente estimulador con 0.24 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, es mayor el efecto durante la noche que durante el día. Para mayores dosis, el efecto fue básicamente inhibitor, excepto en la concentración 1.21 $\mu\text{g/ml}$ donde tuvo ambos efectos para la fase nocturna.

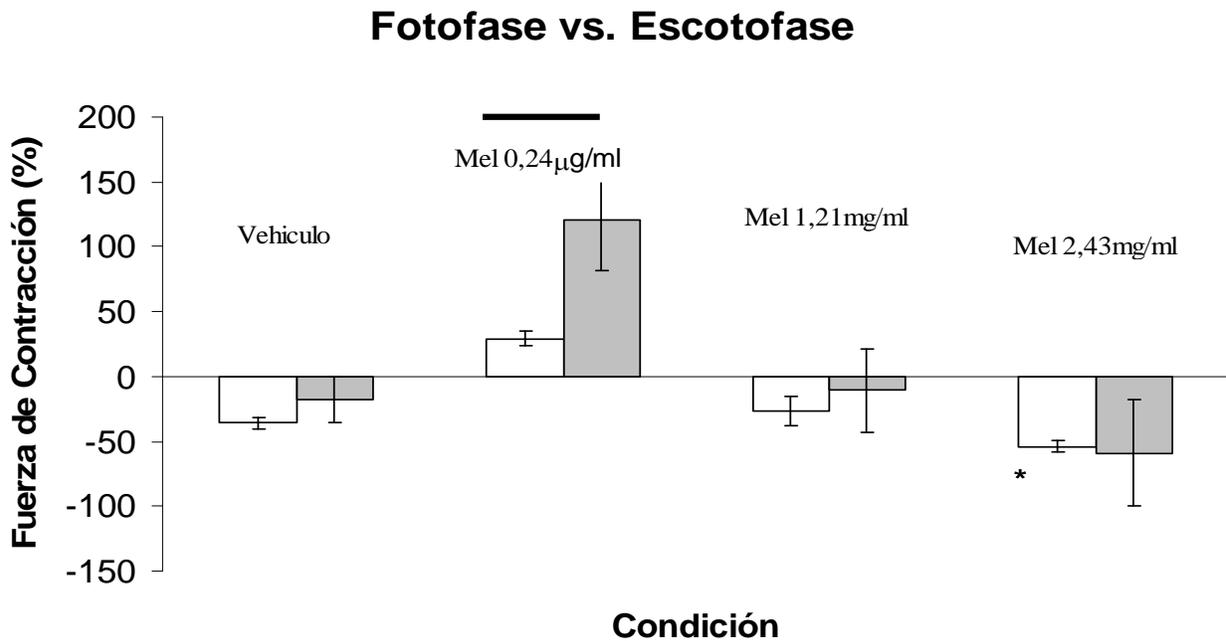
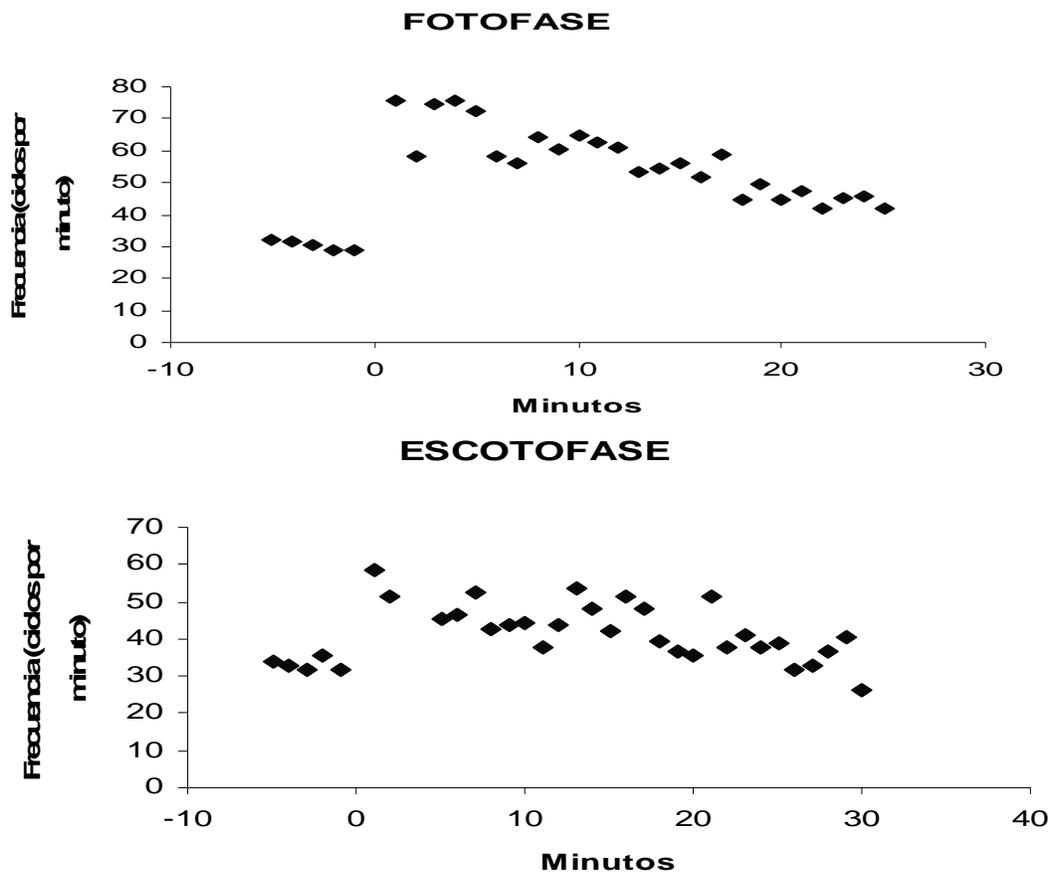


Fig. 11 Grafica comparativa del efecto neto porcentual en la fuerza de contracción de duodeno en ratones tanto en escotofase (gris) como en fotofase (blanco), sometidos a las mismas condiciones (*) diferencias significativas entre melatonina y control, (— diferencias significativas entre la misma dosis de melatonina en diferentes fases del nictémero).

10.2 Efecto estimulante de la melatonina en dos fases del nictémero.

La figura 12 muestra dos ejemplos de los valores de frecuencia observados a la dosis de 0.24 $\mu\text{g/ml}$. Se muestran los valores de los datos por cada minuto, hasta que se obtiene nuevamente el valor basal. Se observa que el efecto sobre la frecuencia es mayor durante el día subjetivo y que el efecto dura hasta aproximadamente 30 minutos, mientras que la misma dosis durante la noche subjetiva tiene un efecto menor y los valores basales se recuperan cerca de 5 minutos después de la aplicación de la dosis.

La figura 13 Muestra los efectos de la melatonina a baja dosis sobre la fuerza de contracción. La fuerza de contracción aumentó con la menor dosis de melatonina para ambas fases del nictémero y disminuyó su efecto con las siguientes dosis.



ig. 12 Cambios por minuto en la frecuencia de contracción del duodeno de un ratón en fotofase (figura superior) y en escotofase (figura inferior) sometido a solución fisiológica (control los primeros 5 minutos) para después pasar a solución fisiológica con una dosis de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ de melatonina.

Protocolo B para determinar la duración del efecto de la menor dosis de elatonina sobre la frecuencia de contracción. Se nota que el efecto es mayor y más duradero en la fase luminosa respecto a la frecuencia control previa a la aplicación de melatonina (indicada por el tiempo 0 en cada gráfica).

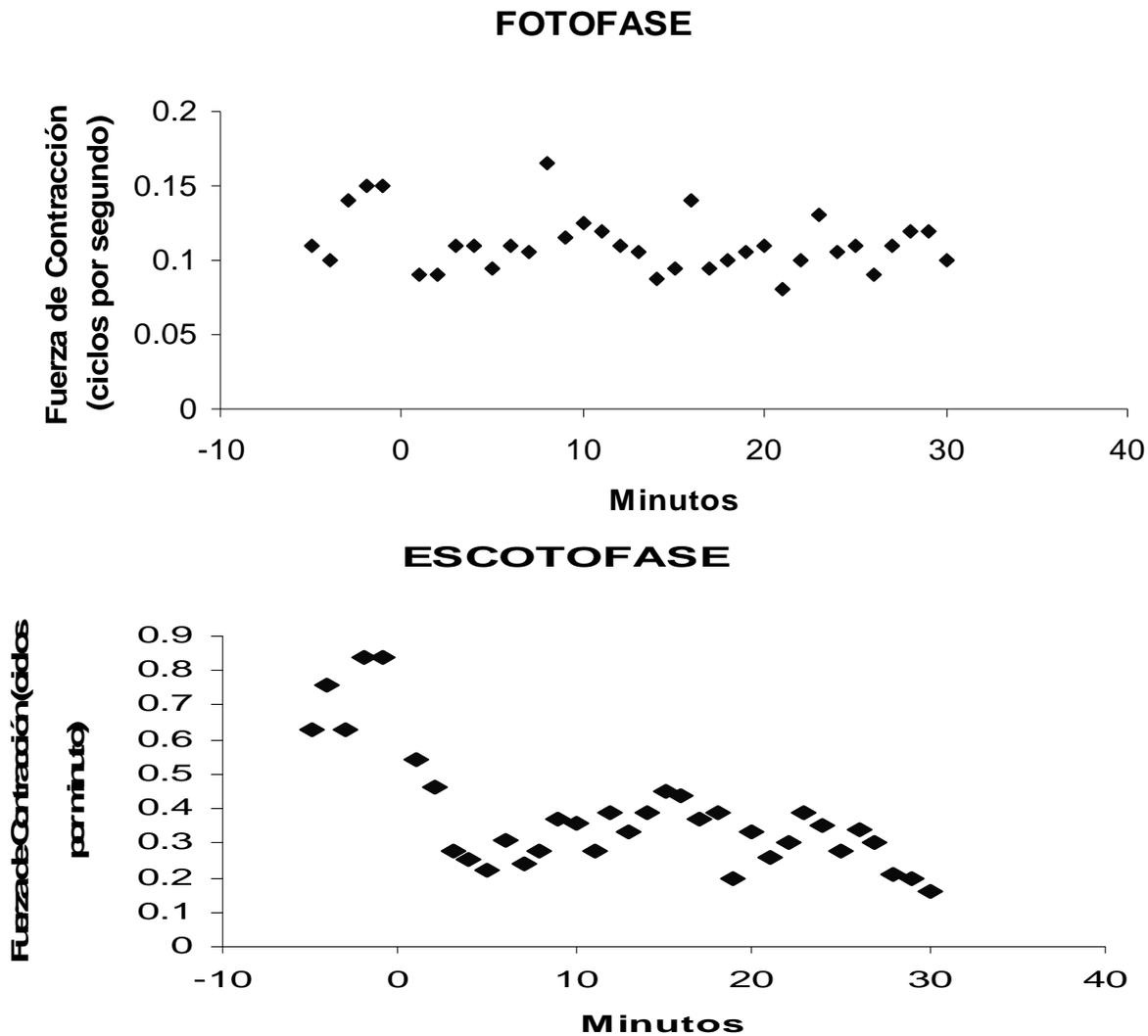


Fig. 13 Cambios por minuto en la fuerza de contracción del duodeno de un ratón en fotofase (figura superior) y en escotofase (figura inferior) sometido a solución fisiológica (control los primeros 5 minutos) para después pasar a solución fisiológica con una dosis de 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de melatonina durante 30 minutos.

Las diferencias significativas se pueden observar a simple vista en la dosis más baja del registro si se comparan ambas fase del nictémero, ya que en la figura anterior se observa como es que durante la fotofase la melatonina tiene un efecto mucho mayor que durante la escotofase; de esta misma manera la dosis más alta durante la fase luminosa tiene un efecto inhibitorio de manera opuesta al registro control.

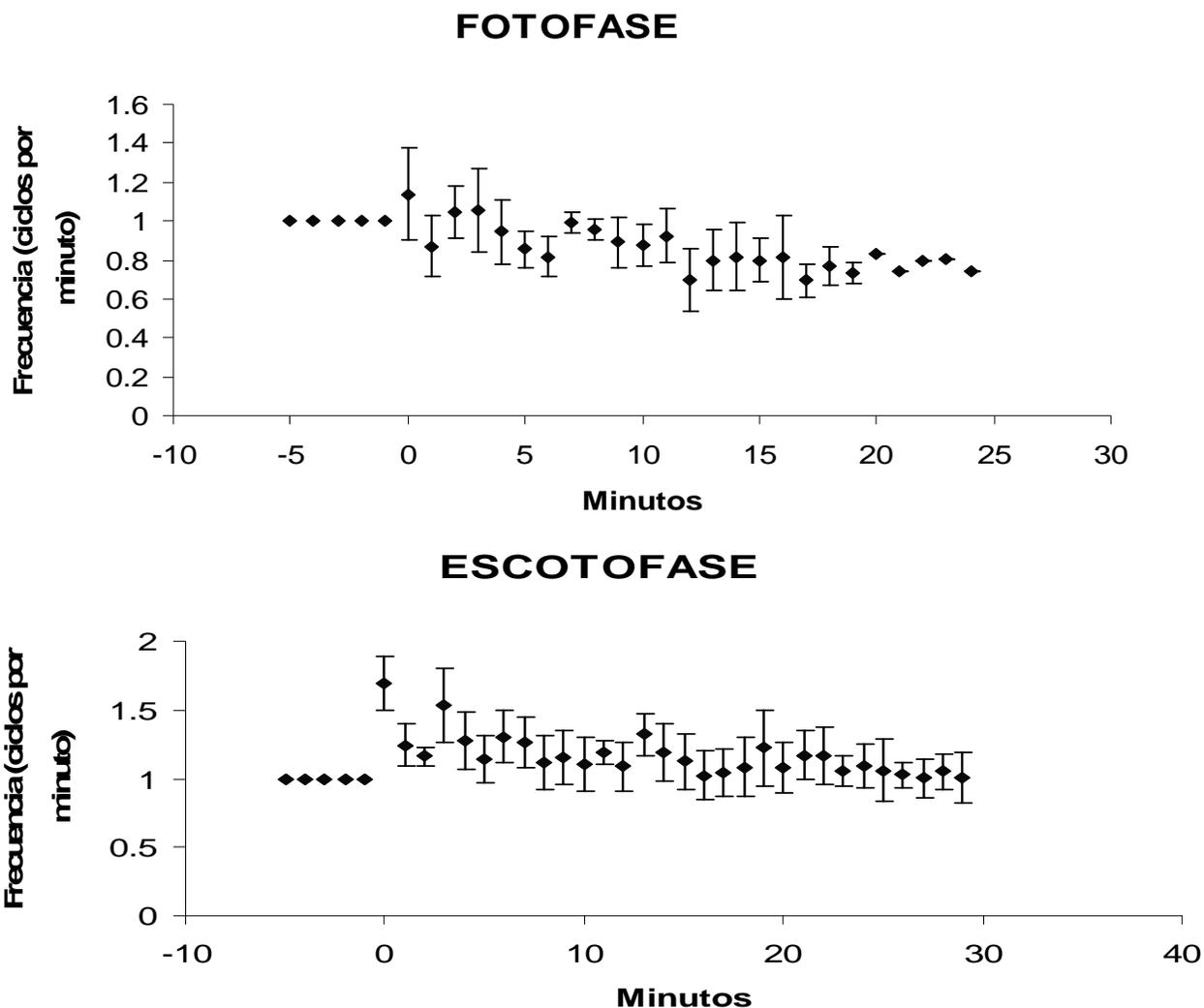


Fig. 14 Promedio del efecto causado por la melatonina en la frecuencia de las contracciones por minuto de la población para la fotofase (grafica superior) y la escotofase (grafica inferior)

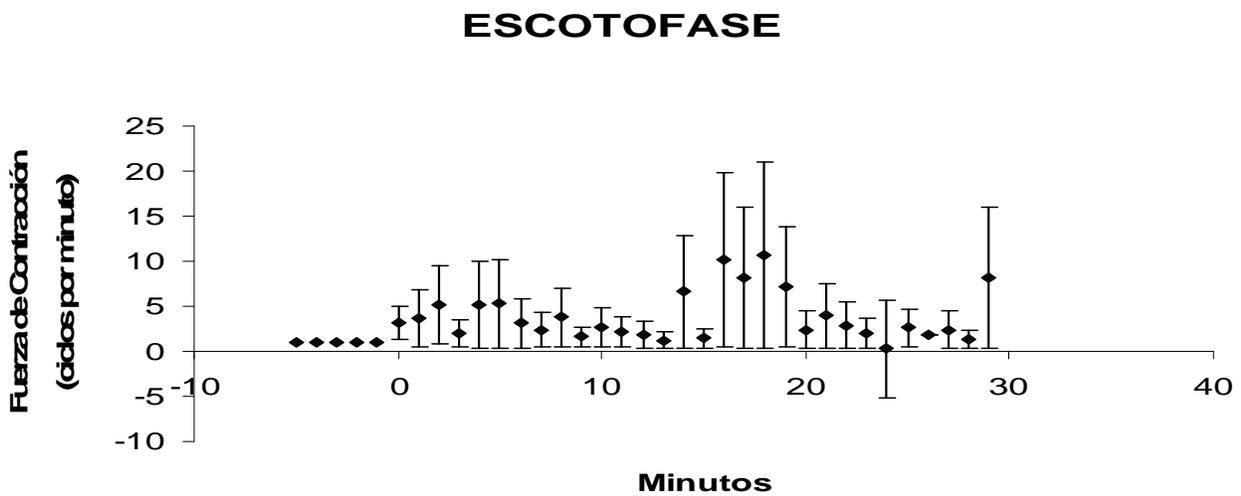
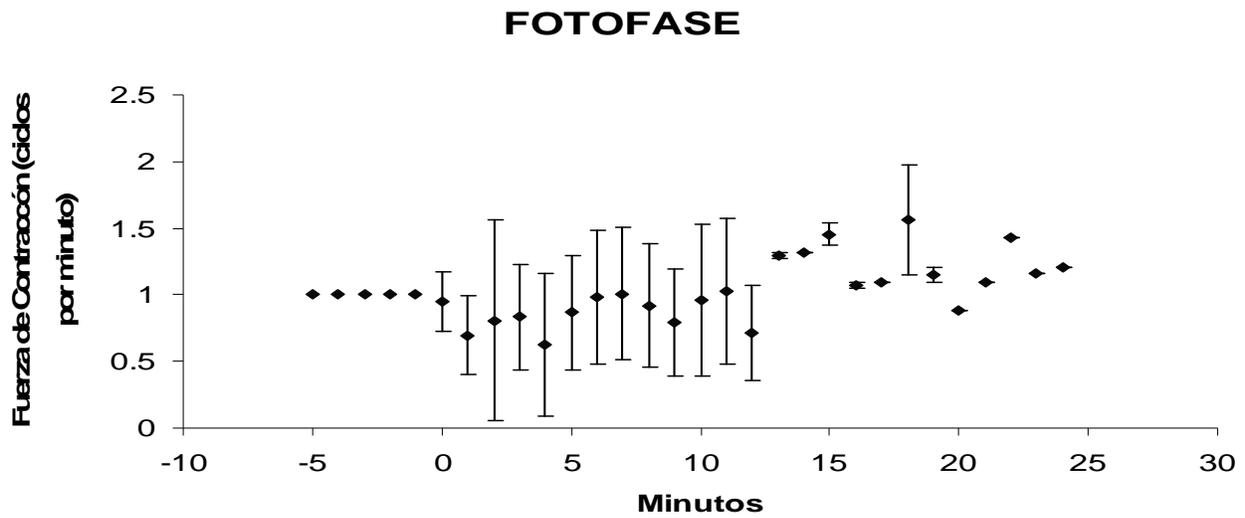


Fig. 15 Grafica del promedio del efecto provocado por la menor dosis de melatonina en la fuerza de contracción del duodeno de ratón por minuto de una población en fotofase (grafica inferior) y durante la escotofase (grafica superior).

Por lo tanto se puede deducir que para aumentar la fuerza de contracción en ambas fases del nictémero es necesaria una dosis igual o menor a la mas baja usada en este estudio ya que las dos dosis mayores provocan una inhibición de la actividad. Por otra parte, el vehiculo utilizado para la dilución de la melatonina, podría mermar el efecto excitatorio a la dosis mas baja, y potenciar el efecto inhibitorio en las dos siguientes dosis.

11. Discusión

Algunos estudios realizados anteriormente, mostraron que la hormona melatonina no actúa como antagonista de los receptores estimulantes de 5-HT pero sí como un agonista de los receptores neurales que inhiben a ésta, en consecuencia inhibe la contracción espontánea del duodeno y la serotonina induce la contracción in vitro (Quastel y Rahamimoff, 1965). También se encontró que la melatonina modifica la inducción de contracciones por la serotonina in vivo, esto indica que los mecanismos de contracción extraintestinales están involucrados en esta regulación. Lo que indica que posiblemente existe un balance mutuo en el sistema entre la melatonina y la serotonina que regulan sus niveles en el TGI (Bubenik y Pang, 1994). La participación del SNC en la peristálsis del intestino podría ser quizás vía colecistoquinina (Benoualli- Pellicer, 1994).

Los resultados obtenidos a partir de los registros realizados mostraron que el efecto que tiene la melatonina sobre la motilidad intestinal es dosis-dependiente y que además varía de acuerdo a la fase del nictémero en la que se encuentre el organismo.

De acuerdo a lo anterior, la influencia de la melatonina en la fuerza de la contracción principalmente funciona como un inhibidor a dosis mayores a $1\mu\text{g/ml}$; en ambas fases del nictémero y lo que varió fue la intensidad del efecto (figura 11). De acuerdo a los estudios de Storr et al (2000) esto se debe a que la melatonina interactúa inhibiendo los canales de Ca^{2+} , en el músculo liso el cual induce la relajación de los músculos gástricos. En las células del músculo liso, el Ca^{2+} siempre es bombeado hacia afuera de la membrana, quedando los niveles internos de Ca^{2+} muy bajos. Cuando la membrana es despolarizada, esta se vuelve más permeable a los iones de Ca^{2+} , lo cual activa la contracción. La relajación ocurre cuando la permeabilidad al calcio regresa a un nivel bajo mientras que la membrana bombea el Ca^{2+} fuera de la célula. Largas despolarizaciones de la membrana generan potenciales de acción en los cuales el Ca^{2+} lleva la energía interna. Los potenciales de acción producen

grandes flujos de Ca^{2+} lo que lleva a una gran contracción, ya que la tensión generada es proporcional al nivel de Ca^{2+} intracelular.

De la misma manera, en los datos obtenidos se pudo observar que también hay efecto inhibitorio de la melatonina sobre la frecuencia de las contracciones; también dependientes de la dosis y horario del zeitgeber (ver figura 10), lo cual podría deberse en primer lugar a la cantidad de melatonina endógena presente en el tejido durante la fotofase y la escotofase, lo cual no fue verificado en el presente trabajo, o también a cambios en la sensibilidad del tejido a la melatonina a distintas horas del día. Algunos autores sugieren que la melatonina no tiene un efecto significativo en la inhibición de la frecuencia en las contracciones del músculo duodenal ya que sugerían que no afecta al marcapasos de la contracción rítmica del músculo intestinal (Quastel y Rahamimoff, 1965), lo que es contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que podemos pensar que la sensibilidad a la melatonina en la frecuencia es nuevamente dependiente de la dosis y del tiempo en que se revise la muestra.

La decisión acerca de las dosis que se utilizaron se debió a que en estudios anteriores se observaron resultados similares pero solo utilizando dosis mayores a los 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ya que según esos estudios dosis menores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no producían efecto visible alguno. Por lo tanto las dosis utilizadas se tomaron con el fin de observar los efectos menores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$), intermedias entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y mayor a los 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y así conocer si eran ciertas las teorías anteriores.

Por lo que se pudo observar en este trabajo, la menor dosis de melatonina tiene acción estimulante en la motilidad del músculo liso duodenal, y el aumento de la dosis tiene efecto inhibitorio. Comparado con los resultados de Harlow y Weekley (1986) que decían que las dosis de melatonina menores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no producen respuesta apreciable, mientras que dosis por encima de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ producen una inhibición consistente en la fuerza de

contracción. En el presente trabajo, observamos que dosis de (0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$) producen efecto potenciador. El efecto podría ser también especie específico y dependiente de género ya que los experimentos realizados por Harlow y Weekley se hicieron en ratas *Sprague- Dawley* de sexo femenino, no se tienen antecedentes de que el ciclo estral pueda afectar el efecto de la melatonina, al contrario de este trabajo en el cual se utilizaron ratones *Mus musculus* de sexo masculino.

En el presente trabajo se observó además que la inhibición en la frecuencia de contracción se da durante la escotofase y estimulación durante la fotofase, lo que indica una posible regulación circadiana de la sensibilidad a la melatonina en el tubo digestivo. Sin embargo, la fuerza de contracción aumenta en ambas fases, siendo el efecto mayor durante la escotofase. Con respecto a las dosis más altas que fueron utilizadas, ambas dieron resultados similares a los reportados, la dosis de 1.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dio como resultado estimulación en la frecuencia de la contracción para ambas fases y un efecto de disminución en la fuerza de contracción también para ambas fases, sin embargo el registro que se hizo con una dosis de melatonina mayor a los 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concuerda con los resultados obtenidos por Harlow y Weekley (1986), al dar como resultado una completa inhibición tanto para la frecuencia como para la fuerza de contracción en ambas fases del nictémero.

Las diferencias diarias observadas podrían deberse a la cantidad de melatonina endógena dentro del tracto gastrointestinal, debido a la fase en la que se encuentra, ya que la melatonina producida por las células EC durante el día es mayor que durante la noche. Aunque durante la noche la cantidad de melatonina pineal aumenta dentro del sistema, sin embargo se ha probado que la cantidad de melatonina es 400 veces mayor en el TGI que en la glándula pineal (Bubenik, 2002). Por otra parte el aumento de melatonina en el TGI también ha sido relacionado con la ingesta de alimento; por lo tanto podemos decir que el

efecto inhibitorio de la melatonina durante la fase diurna para la fuerza de contracción (ver figura 10) es mayor para las dos dosis arriba de $1\mu\text{g}/\text{ml}$ debido a que aumenta la cantidad de melatonina ya presente en el tejido, de la misma manera para la frecuencia (ver figura 8) con las dosis más altas de melatonina también se obtiene una reacción inhibitoria, no así con la dosis más baja, ya que esta no es suficiente para elevar los niveles de melatonina ya presentes en el tejido por lo que no produce un efecto inhibitorio por el contrario produce un efecto excitatorio.

En el efecto que tiene la melatonina sobre el tejido del intestino delgado, hay que considerar que esta hormona tiene un tiempo de vida medio dentro del tejido, el cual es de 2 minutos (ver figura 6) para el primer suministro y 20 minutos para el segundo (Pandi-Perumal et al, 2006), por lo tanto es posible que la respuesta del tejido a la exposición a la tercera dosis de melatonina, que en todos los casos fue inhibitoria, este influenciada por la anterior dosis de melatonina ya que entre la aplicación de la segunda y la tercera dosis de melatonina solo hay 10 minutos de diferencia; lo que indica que el lavado aplicado entre cada dosis pudiera haber sido insuficiente.

Finalmente el utilizar etanol como vehículo para diluir la melatonina que fue administrada al tejido para los registros fue un factor influyente por sus propiedades depresivas pero no de manera significativa; sin embargo, los antecedentes muestran que al hacer una prueba de vehículo disuelto en solución Tirode no ejerce efecto significativo en la actividad peristáltica del tejido muscular del intestino delgado (Harlow y Weekley, 1986)

Los experimentos realizados en este trabajo mostraron un efecto inhibitorio en la frecuencia y en la fuerza de contracción de la escotofase y de la fotofase, siendo un poco mayor en la fuerza de contracción de la fotofase que en la escotofase (ver figura 11), por el contrario la inhibición es mayor en la frecuencia de la fase oscura del nictémero (ver figura 9),

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son un antecedente interesante para continuar con el trabajo acerca del efecto que tiene la melatonina en la fisiología de la contracción peristáltica, ya que no hay mucha investigación al respecto. En este trabajo no se exploraron nuevas variables que deben ser probadas entre las cuales se encuentra el alimento, ya sea la cantidad o los horarios, además de restricción de estos, también podrían probarse animales pinealectomizados, entre otras cosas; incluso diferentes protocolos de exposición a la melatonina, ya que esta podría llevarse a cabo *in vivo*, mediante el uso de un vehículo diferente o con menores a diferentes tiempos de exposición.

Conclusiones

- La respuesta del músculo liso del duodeno es dosis dependiente es decir que varia con la cantidad de melatonina aplicada.
- Las respuestas encontradas son tanto de estimulo como de inhibición para la frecuencia y la fuerza de contracción, en el caso de la menor dosis para la fuerza de contracción esta actúa como un estimulador, al contrario de las otras dos dosis. Por otro lado para la frecuencia la dosis menor tiene un efecto de estimulador durante la fotofase y como inhibidor durante la escotofase, la dosis intermedia estimula la contracción y finalmente la dosis mayor la inhibe.
- Según la fase del nictémero, la respuesta del músculo liso del duodeno es dosis dependiente debido a las variaciones de melatonina endógena dentro del sistema.

Bibliografia

- ☞ Axelrod J., (1974): The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341–1348.
- ☞ Benouali- Pelliser S., (1994). Melatonin is involved in cholecystokinin induced changes of ileal motility in rats. *J Pineal Res*; 17: 79-85.
- ☞ Bortoff, A., (1976): Myogenic control of intestinal motility. *Physiol. Rev.* 56: 416 – 434
- ☞ Bubenik GA. Brown GM. Grota LJ., (1977): Immunohistological localization in the rat digestive tract. *Experientia*; 33: 662 – 663.
- ☞ Bubenik GA. Purtil RA. Brown GM. Grota LJ., (1978): Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Exp Eye Res*; 27: 323 – 333.
- ☞ Bubenik GA., (1980). Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res*: 12: 313 – 223.
- ☞ Bubenik GA., (1986); The effect of serotonin, N- acetylserotonin, and melatonin on spontaneous contraction of isolated rat intestine. *J Pineal Res*: 3: 41 – 54.
- ☞ Bubenik GA, Pang SF, (1994): The role of serotonin and melatonin in the gastrointestinal physiology: Ontogeny regulation of food intake and mutual 5- HT, melatonin feedbacks. *J Pineal Res*; 16: 91- 99.
- ☞ Bubenik GA, Brown GM., (1997): Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of the rat. *Biol Signals*, 6: 40 – 44.
- ☞ Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L., (1999): Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 29: 56 – 63,

- œ Bubenik, G., (2001): Localization, Physiological Significance and Possible Clinical Implication of Gastrointestinal Melatonin. *Biological Signals and Receptors* 10: 350-366.
- œ Bubenik, G., (2002): Gastrointestinal Melatonin, Localization, Function, and clinical Relevance. *Digestive Diseases and Sciences*, 47: 2336-2348.
- œ Bubenik, G., (2006): Treatment of Gastrointestinal Diseases with Melatonin. *Contemporary Perspectives on Clinical Pharmacotherapeutics* 32: 356- 365.
- œ Davenport, HW, (1985): *Physiology of the Digestive Tract*. 5th ed. Chicago: Chicago Yearbook Medical Publishers. (citado en Randall et al 1997)
- œ Davis, RH, McGowan L, Uroskie TW, (1971): Inhibition of pitocin- induced contractility by melatonin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*; 138:1002-1004.
- œ Draggo, F. Macaudo S. Salehi S., (2002): Small Doses of Melatonin Increase Intestinal Motility in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 47: 1969- 1974.
- œ Fioretti MC, Menconi E, Ricardi C., (1974): Study on the type of antiserotonergic antagonism exerted in vitro on rat's stomach by pineal indole derivatives. *Il Farmaco [Ed Prat]*; 29: 410 – 412.
- œ Harlow, H, Weekley, B, (1986): Effect of Melatonin on the Force of Spontaneous Contractions of In Vitro Rat Small and Large Intestine. *Journal of Pineal Research* 3: 277-284.
- œ Hoarr W, Hickman C, (1967): *General and Comparative Physiology*. Edit. Prentice Hall, New Jersey.
- œ Holloway WR, Grota LJ, Brown GM, (1980): Determination of immunoreactive melatonin in the colon of rat by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*; 28: 255– 262.

- œ Hueter G, (1994): Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann NY Acad Sci* 719: 146 – 158.
- œ Jaworek, J, (2006): Ghrelin and Melatonin in the Regulation of Pancreatic Exocrine Secretion and Maintaining of Integrity. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 57: 83- 96.
- œ Kappers, JA, (1962): Melatonin, a pineal compound. Preliminary investigations on its functions in the rats. *Gen. Comp. Endocrinol*; 2: 610-611
- œ Kvetnoy IM, Raikhlin NT, Tolcachev VN, (1975): Chromatographical detection of melatonin (5- methoxy- N- acetylserotonin) and its biological precursors in enterochromaffine cells. *Dokl Acad Nauk SSSR*; 221: 226 – 227.
- œ Legris GJ, Will PC, Hopfer U., (1982): Inhibition of amiloridesensitive sodium conductance by indoleamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2040 – 2050.
- œ Lerner AB, Case JD, Lee TH, (1958): Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*; 80: 2587.
- œ Lodish, H, D Baltimore (1995): *Molecular Cell Biology*. 3d ed. New York: Scientific American Books.
- œ López Villegas M, (2006): Efecto de la melatonina, agomelatonina y gaba en preparaciones de duodeno aislado de rata. Tesis de Maestría (Ciencias Biomédicas) Facultad de Medicina, UNAM, México, 82 pp.
- œ Moog, F, (1981): The lining of the small intestine. *Scientific American* 245: 154 – 176.
- œ Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO- 1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- œ Ozaki Y, Lynch HJ, (1976): Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology*; 99: 641- 644

- œ Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni MJG, Cardinali DP, Poeggeler and Hardeland R, (2006): Melatonin Nature's Most Versatile Biological Signal? The FEBS Journal, 273:2813-2838.
- œ Peroutka SJ, Lebovitz RM, Snyder SH, (1981): Two distinct control serotonin receptors with different physiological functions. Science; 212: 827- 829
- œ Pontoire C, Bernard M, Silvain C, Collin JP, Voisin P., (1993): Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. Eur J Pharmacol; 247: 111-118.
- œ Quastel R, Rahamimoff R, (1965): Effect of melatonin on spontaneous contraction and response to 5- hydroxytryptamine of rat isolate duodenum. Br J Pharmacol; 24: 455 – 461.
- œ Rakhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN., (1975): Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. Nature; 255: 344-345.
- œ Raikhlin NT, kvetnoy IM, (1976): Melatonin and enterochromaffin cells. Acta Histochem; 55: 19-25.
- œ Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Kadagidze ZG, Sokolov AV, (1978): Immunomorphological studies on synthesis of melatonin in enterocromaffin cells. Acta Histochem Cytochem; 11: 75- 77.
- œ Randall D, Burggren W, French K, (1997): Animal Physiology Mechanism and Adaptations. W.H. Freeman and Company. New York.
- œ Reyes- Vasquez C, Naranjo- Rodriguez EB, Garcia- Segoviano JA, Trujillo- Santana J, Prieto- Gomez B, (1997): Apamin blocas the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscles. J Pineal Res; 22: 1 – 8.
- œ Stevens, C. E., (1988): Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Cambridge; Cambridge University Press.

- ∞ Storr M, Schudziarra V, Allescher H- D, (2000): Inhibition of small conductance K⁺ channels attenuated melatonin- induced relaxation of serotonin- contracted rat gastric fundus. Can J Pharmacol Physiol; 78: 799- 806.
- ∞ Vakkuri, O, H. Rintamaki, y J. Leppaluoto., (1985): Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columbia livia*). Gen. Comp. Endocrinol.; 57: 69 – 75.
- ∞ Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J., (1985): Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight in the pigeon. J Endocrinol 105: 263 – 268.