



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPARACIÓN FARMACOLÓGICA
ENTRE MELATONINA Y ANÁLOGO EN
TEJIDO AISLADO”**

T E S I S

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

P R E S E N T A

HAYDÉE JIMÉNEZ PÉREZ



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



*A mis padres
Con todo mi amor, respeto y admiración, deseando que donde
quiera que estén se sientan orgullosos de lo que hemos logrado y
que algún día podamos celebrarlo juntos.*



AGRADECIMIENTOS:

Se agradece al programa UNAM – PAPIIT – Facultad de Química, el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al Ing. Jorge Zamorano Velasco, por el apoyo brindado para el manejo del software.

GRACIAS:

A Dios, por estar conmigo siempre que necesité fuerza para seguir adelante, apoyo para poder levantarme y compañía para compartir mis alegrías y tristezas. Gracias por no abandonarme.

A mis tíos, Evangelina y Jerónimo, por su ayuda, amor y entrega para brindarme la oportunidad de alcanzar mi sueño más alto, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis hermanos, Octavio y Gonzalo, por creer en mí. Octa, te agradezco con toda el alma por apoyarme en el último estirón, este logro también es tuyo.

A mi tía, Enriqueta, por su amor y apoyo siempre que acudí a usted, por sus palabras y sus consejos, por todas sus atenciones, por creer en mí.

A Carmen, por tu paciencia, apoyo, amistad, compañía y cariño desde que te conocí. Por estar conmigo en mis tropiezos, en mis aciertos, en mis alegrías y en mis momentos de dolor y tristeza, por saber que puedo contar contigo siempre. Por levantarme y animarme a seguir adelante cuando pensé que no podría dar un paso más.

A dos de mis más queridos ángeles, Otilia Pérez y Silverio García, por dar sin recibir nada a cambio más que mi cariño, respeto y admiración. Gracias por no dejarme caer, por ser un motivo para conseguir esto y más. Toda mi vida le agradeceré a Dios por haber tenido la dicha y la oportunidad de haberlos conocido, de que se unieran nuestros caminos.

A Clara, Gilberto y Cris, por ayudarme y animarme a seguir siempre adelante, por ser un ejemplo a seguir para mí. Clarita, tengo mucho que agradecerte, pues me tendiste la mano cuando más lo necesitaba y me ayudaste a conseguir mi objetivo, eres uno más de esos angelitos que Dios ha puesto en mi camino, gracias. Cris, gracias por tu paciencia y apoyo, por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A todas mis amigas que he conocido durante mi vida y que ocupan un lugar muy especial en mi corazón, gracias por su amistad: Montse, Olga, Esme, Xóchitl, Isabel, Lourdes, Gaby Pineda, Claudia, Sarita, Margarita López Martínez, Luz María, Gaby, Alejandra, Diana, Paloma, Areli, Joselin, Gisela, Andrea, Karina, Ileana, Lucina, Maricela, Graciela, Blanca, Zeila, Ana Lilia, Carina, Alejandra, Grisel, Karina, Gabriela.

A mis profesoras: Ceyde Silva, Gabriela Hernández, Rosa Laura Jara y Beatriz Zurita.

A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez, por sus enseñanzas, por sus consejos y por su confianza. Por haberme dado la oportunidad y la vía de llevar a buen término mi carrera profesional.

Al Dr. Alfonso S. Lira Rocha, por tener siempre la mejor disposición de escucharme y ayudarme en todo lo que necesité, por sus valiosos comentarios siempre dirigidos a enriquecer mi trabajo.

A mi Universidad, la mejor de México, por tener siempre las puertas abiertas para todos aquellos que buscan la oportunidad de crecer académica y culturalmente. A mi Facultad de Química, mi segunda casa y en ocasiones la única durante todos estos años, gracias!

“Por mi raza hablará el espíritu”

“México, Pumas, Universidad, Goya, Goya, Cachún Cachún Ra Ra, Cachún Cachún Ra Ra, Goya, Universidad”

ÍNDICE	Página
Abreviaturas	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iii
Índice de gráficas	iv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
2.1 Glándula Pineal	2
2.1.1 Estructura de La Glándula Pineal	3
2.1.2 Inervación de La Glándula Pineal	5
2.1.3 Función Endocrina	5
2.1.4 Histoquímica y Bioquímica	6
2.2 MELATONINA	6
2.2.1 Estructura Química	6
2.2.2 Biosíntesis de la Melatonina	7
2.2.3 Unión de la Melatonina y sus Funciones Fisiológicas	11
2.2.4 Melatonina, ingesta de alimentos y digestión	14
2.3 ANÁLOGOS DE MELATONINA	15
2.3 EL MÚSCULO LISO INTESTINAL	16
2.3.1 Anatomía del Intestino delgado	16
2.3.2 Histología	17
2.3.3 Tipos celulares de la mucosa del Intestino delgado	19
2.3.4 Secreción Intestinal	20
2.3.5 Procesos Digestivos Intestinales	21
2.3.6 Motilidad del Intestino delgado	22
2.3.7 Control Nervioso de la Motilidad del Intestino delgado	23
2.3.8 Actividad Eléctrica Del Músculo Liso Intestinal	24
2.3.9 Patrón de Motilidad postingesta	29
2.3.10 Vaciamiento del Intestino delgado	29
CAPÍTULO II	
3.1 HIPÓTESIS	31
3.2 OBJETIVOS	31
CAPÍTULO III	
MATERIAL Y METODOLOGÍA	
4.1 Material	32
4.2 Método	33
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS	41

DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73
ANEXO	78

ABREVIATURAS

Adenilatociclasa	AC
Adenosin monofosfato cíclico	AMPc
Aminoácido	aa
Amplitud	AMP
Análisis de varianza	ANDEVA
Área Bajo la Curva	ABC
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃
Células enterocromafines	CE
Cloruro de calcio	CaCl ₂
Cloruro de potasio	KCl
Cloruro de sodio	NaCl
Colecistocinina	CCK
Columna Intermediolateral	CIL
Complejo Mioeléctrico Interdigestivo	CMI
Complejo Motor Migratorio	CMM
Concentración de Inhibición al 50%	CI _{50%}
Cromatografía líquida de alta resolución	CLAR
Curva dosis respuesta gradual	CDRG
Desviación estándar	DE
Dimetilsulfóxido	DMSO
Frecuencia	FREC
Ganglio Simpático Cervical Superior	GSCS
Glándula Pineal	GP
Gastrointestinal	GI
Glucosa monohidratada	GLU
Guanosin monofosfato cíclico	GMPc
Hidroxindol-oximetiltransferasa	HIOMT
6-hidroximelatonina	6-HMT
Inmunoglobulina A	IgA
Inmunoglobulina M	IgM
Intra peritoneal	i.p.
[¹²⁵ I]-iodomelatonina	I-MT
Líquido cefalorraquídeo	LCR
Luzindol	LUZ
Melatonina	MT
Monoaminoxidasa	MAO
N-acetiltransferasa	NAT
Noradrenalina	NA
Núcleo Paraventricular	NPV
Núcleo Supraquiasmático	NSQ
Pinealectomía	Px
Ritmo eléctrico basal	REB
Serotonina o 5-hidroxitriptamina	5-HT
Sistema Nervioso Central	SNC
Solución Fisiológica artificial Ringer-Krebs	SFARK
Sulfato de magnesio	MgSO ₄
Tracto Gastrointestinal	TGI
Triptofano	Trp

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. La glándula pineal (GP).	2
Figura 2. Ubicación de la glándula pineal en el ser humano.	3
Figura 3. Conexiones neurales entre la retina y la glándula pineal en los mamíferos.	4
Figura 4. (A) Los niveles de MT en plasma tanto diurnos como nocturnos muestran un pico máximo durante la escotofase y conforme avanza la edad la liberación de MT disminuye. 4. (B) Estructura de la Melatonina.	7
Figura 5. Biosíntesis de la MT.	8
Figura 6. Representación esquemática del perfil de secreción de melatonina durante días largos (verano) o cortos (invierno).	10
Figura 7. Anatomía del intestino delgado, en la cual se muestran los tres principales segmentos en los que se divide.	17
Figura 8. El intestino delgado y sus diferentes capas.	18
Figura 9. El epitelio intestinal.	19
Figura 10. Secuencia de relajación y contracción que facilitan la propulsión en los movimientos peristálticos.	22
Figura 11. El diagrama muestra las capas de la pared de intestino delgado.	24
Figura 12. Actividad eléctrica y mecánica del músculo liso que muestra la relación entre las fluctuaciones del potencial de membrana y la actividad contráctil.	25
Figura 13. Hipótesis para el mecanismo de las ondas lentas: <i>fase 1</i> , despolarización; <i>fase 2</i> , repolarización parcial; <i>fase 3</i> , meseta; <i>fase 4</i> , repolarización.	26
Figura 14. Registros de presión múltiple en el intestino delgado que demuestran el CMM. El CMM consta de cuatro fases diferentes, las cuales se detallan en el texto.	29
Figura 15. Calibración.	34
Figura 16. Cámara de vidrio para tejido aislado convencional.	35
Figura 17. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo 1, basal y post administración.	41
Figura 18. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo 2 basal y post administración.	43
Figura 19. Registro obtenido con la aplicación de MT basal y post administración.	45
Figura 20. Registro obtenido con la aplicación del análogo M1A basal y post administración.	49
Figura 21. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ basal y post administración.	53
Figura 22. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ + MT preincubado basal y post administración.	55
Figura 23. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ + el análogo M1A basal y post administración.	59
Figura 24. Registro obtenido con la aplicación del análogo M1A + MT basal y post administración.	63
Figura 25. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de escala.	78
Figura 26. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de la adquisición de datos	78
Figura 27. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de velocidad	79
Figura 28. Ventana principal de la pantalla de la computadora donde se	79

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparación entre la melatonina pineal y la melatonina gastrointestinal	11
Tabla 2. Tipos celulares presentes en la mucosa del intestino delgado y sus características	20
Tabla 3. Las diferentes secreciones intestinales y sus características	21
Tabla 4. Volúmenes utilizados para la curva del vehículo 1	36
Tabla 5. Volúmenes utilizados para la curva del vehículo 2	37
Tabla 6. Concentraciones utilizadas para la curva correspondiente a MT	37
Tabla 7. Porcentaje de relajación máxima con la administración del vehículo 1 y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	42
Tabla 8. Porcentaje de relajación máxima con la administración del vehículo 2 y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	43
Tabla 9. Porcentaje de relajación máxima con la administración de MT y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	46
Tabla 10. Porcentaje de relajación máxima con la administración del análogo M1A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	50
Tabla 11. Porcentaje de relajación máxima con la administración del antagonista LUZ y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	53
Tabla 12. Porcentaje de relajación máxima con la administración de MT + el antagonista LUZ y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	55
Tabla 13. Porcentaje de relajación máxima con la administración del antagonista LUZ + el análogo M1A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	59
Tabla 14. Muestra el % de relajación máxima con la administración del análogo M1A + MT y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Valores del % de respuesta promedio de la FREC, AMP y ABC con la administración del vehículo 1 en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	42
Gráfica 2. Valores del % de respuesta promedio de la FREC, AMP y ABC con la administración del vehículo 2 en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	44
Gráfica 3. Valores del % de respuesta promedio de la FREC con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	46
Gráfica 4. Valores del % de respuesta promedio de la AMP con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	47
Gráfica 5. Valores del % de respuesta promedio del ABC con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	47
Gráfica 6. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones de MT	48
Gráfica 7. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones de MT	48
Gráfica 8. Valores del % de respuesta promedio de FREC con la administración de M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	50
Gráfica 9. Valores del % de respuesta promedio de AMP con la administración de M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	51
Gráfica 10. Valores del % de respuesta promedio de ABC con la administración de M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	51
Gráfica 11. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones de M1A	52
Gráfica 12. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones de M1A	52
Gráfica 13. Valores del % de respuesta promedio de la FREC, AMP y ABC con la administración del antagonista LUZ en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	54
Gráfica 14. Valores del % de respuesta promedio de la FREC con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	56
Gráfica 15. Valores del % de respuesta promedio de la AMP con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	56
Gráfica 16. Valores del % de respuesta promedio del ABC con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	57
Gráfica 17. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + MT	57
Gráfica 18. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + MT	58
Gráfica 19. Valores del % de respuesta promedio de FREC con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	60
Gráfica 20. Valores del % de respuesta promedio de AMP con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	60

Gráfica 21. Valores del % de respuesta promedio de ABC con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	61
Gráfica 22. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + M1A	61
Gráfica 23. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + M1A	62
Gráfica 24. Valores del % de respuesta promedio de la FREC con la administración del análogo M1A + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	64
Gráfica 25. Valores del % de respuesta promedio de AMP con la administración de MT + el análogo M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	64
Gráfica 26. Valores del % de respuesta promedio de ABC con la administración de MT + el análogo M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%	65
Gráfica 27. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del análogo M1A + MT	65
Gráfica 28. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del análogo M1A + MT	66

INTRODUCCIÓN

La Melatonina (MT) participa en diversos procesos fisiológicos, los cuales permiten a las diferentes especies comportarse de forma específica. La MT (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), un compuesto indólico derivado de triptofano, es una hormona sintetizada y secretada, siguiendo un patrón circadiano (mayoritariamente durante la escotofase), por la glándula pineal (GP) y tejidos periféricos tales como la retina, la glándula Harderiana y el tracto gastrointestinal (TGI) de especies vertebradas, ⁽¹⁻⁹⁾ los cuales han sido útiles para estudiar el efecto de MT. Por ejemplo, el músculo liso intestinal aislado es un modelo experimental "*In Vitro*" que se ha utilizado desde 1965 para estudiar el efecto de la MT, ⁽¹⁰⁾ demostrando así que la MT participa en la motilidad de este tejido, es decir, en el proceso contracción-relajación. También, se sabe que este efecto puede producirse por la presencia de receptores a MT en este tejido, lo cual es de gran utilidad para poder estudiar el mecanismo de acción de la MT. Por otro lado, debido a que la MT es una sustancia que se metaboliza rápidamente y que se secreta en ínfimas cantidades, se planteó la posibilidad de estudiar análogos a ella con los cuales sea posible determinar el tipo de interacción farmacológica que existe entre la MT, su análogo, y el músculo liso intestinal, así como la posible vía de acción de ambas sustancias en dicho tejido. Para determinar lo anterior, fue utilizado un modelo convencional para tejido aislado, se obtuvo la respuesta electrofisiológica considerando los siguientes parámetros: Amplitud (AMP), Frecuencia (FREC) y Área bajo la curva (ABC) y los datos obtenidos se capturaron mediante el acoplamiento del sistema de registro a una computadora, en donde además de la captura y el almacenamiento se realizó el análisis de los mismos.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.**1.1 GLÁNDULA PINEAL.**

La Glándula Pineal (GP) o epífisis cerebrii (Figura 1) ⁽¹¹⁾ fue descrita por primera vez en el siglo III por Herophilus, quien pensaba que era la encargada de regular el flujo entre el sistema ventricular y el cerebro; Descartes estudió extensamente esta glándula durante el siglo XVII. Describía la GP como el “tercer ojo” (por ser el lugar del cuerpo donde el alma ejerce su control); la consideraba “el asiento del alma”, el “alma racional” que rige al cuerpo. Además, fue el primero en proponer una explicación “fisiológica” del funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), incluyendo a la GP. A finales del siglo XIX se describe la anatomía, histología, innervación y embriología de la GP de mamíferos, encontrándose semejanzas entre ésta y la epífisis de los vertebrados inferiores. A principios del siglo XX, Heubner establece la influencia de la pineal sobre la reproducción. Bargman, en 1943, sugiere que la función endocrina de la GP se encuentra regulada por la luz, vía el SNC. ⁽¹²⁾

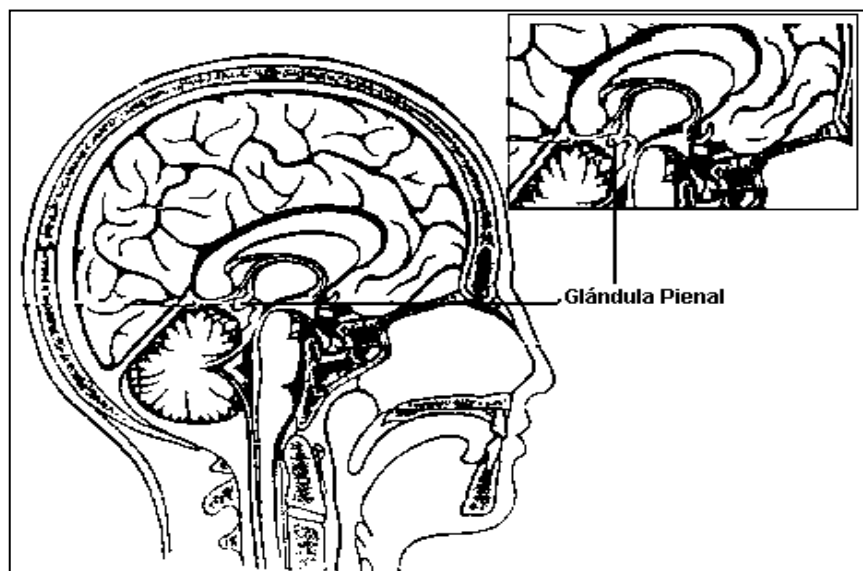


Figura 1. La glándula pineal (GP). ⁽¹¹⁾

1.1.1 Estructura de la glándula pineal.

La GP recibe su nombre por su forma de cono truncado, en particular en el caso del hombre; los griegos la denominaron *konareion* (en forma de cono), denominación que después fue latinizada a *conarium*.⁽¹³⁾ La GP fue descrita en numerosas especies vertebradas. En la mayoría de los mamíferos, forma una masa sólida localizada entre las comisuras habenular y posterior, pero en los roedores, durante la ontogénesis, migra dorso-caudalmente permitiendo la formación de una glándula pineal con tres zonas características: profunda, stalk (tallo) y superficial.⁽¹²⁾ En los peces, anfibios y reptiles tiene estructuras fotorreceptoras semejantes a las de la retina, mientras que en los mamíferos tiene estructura típicamente endocrina. En el ser humano adulto, pesa entre 100 y 200 mg, tiene una longitud y anchura de 8 y 5 mm respectivamente,⁽¹⁴⁾ se encuentra “bañada” por el líquido cefalorraquídeo (LCR) y situada por debajo de la parte posterior del cuerpo calloso⁽¹³⁾ (Figura 2).⁽¹⁵⁾

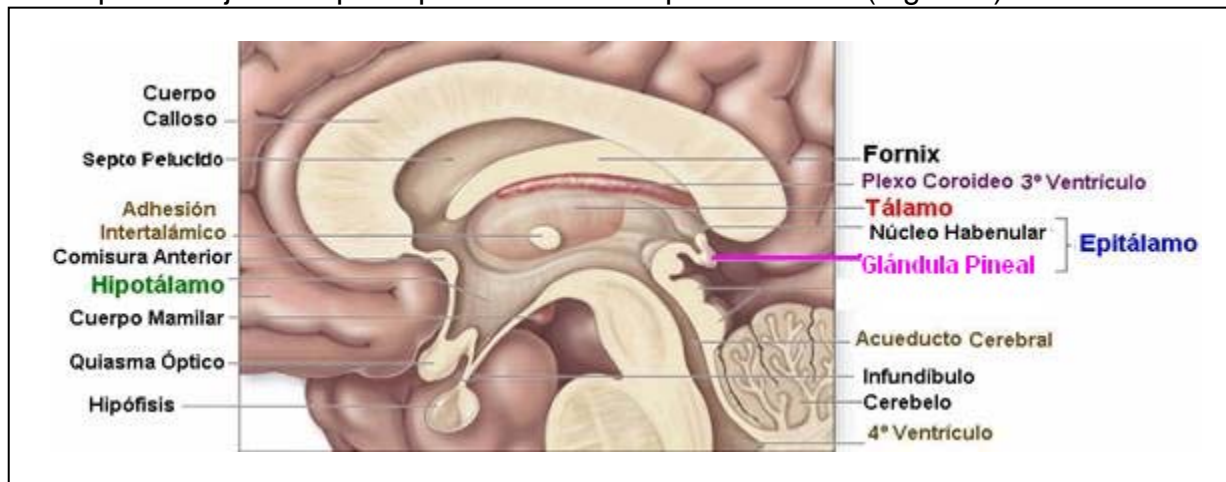


Figura 2. Ubicación de la glándula pineal en el ser humano.⁽¹⁵⁾

La GP está constituida por células parenquimatosas, que son los pinealocitos, que representan un 85% de los componentes celulares, mientras que el 15% restante son células gliales, en su mayoría astrositos fibrosos y terminaciones nerviosas.⁽¹³⁾ Las conexiones neuronales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluida la

especie humana (Figura 3). ⁽¹⁶⁾ La señal neuronal procesada por la retina es enviada al hipotálamo a través de los axones de las células ganglionares, constituyendo el tracto retinohipotalámico. En el quiasma, estas fibras se separan del tracto óptico principal para dirigirse al núcleo supraquiasmático (NSQ), de donde parte una vía multisináptica que hace escalas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y la columna intermediolateral (CIL) de la médula espinal torácica. Desde ahí los axones preganglionares, procedentes de las neuronas simpáticas espinales, abandonan la médula por la raíz ventral y establecen conexiones con las neuronas del ganglio simpático cervical superior (GSCS). Finalmente, fibras posganglionares se introducen en el parénquima pineal y alcanzan los pinealocitos en una relación anatómica que recuerda a una estructura sináptica. ⁽¹⁴⁾

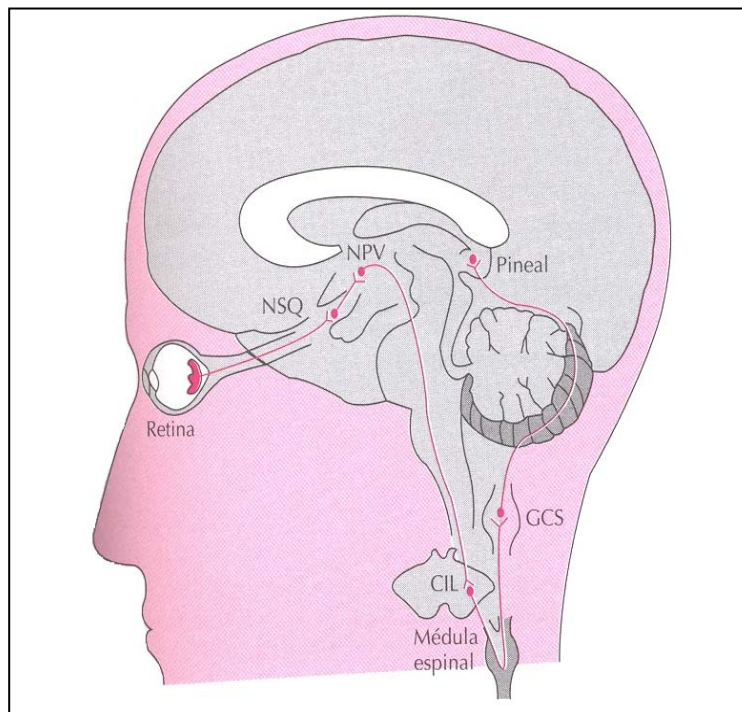


Figura 3. Conexiones neurales entre la retina y la glándula pineal en los mamíferos. ⁽¹⁶⁾

1.1.2 Inervación de la glándula pineal.

Studnicka ^(17, 18) fue el primero en describir fibras nerviosas en la GP a principios del siglo XX. Santiago Ramón y Cajal, en 1911, describió la inervación simpática en el ratón. Desde entonces, la inervación de la GP de mamíferos se ha descrito a partir de varias estructuras neuronales centrales y periféricas. ⁽¹²⁾ La actividad secretora de la GP de los mamíferos y su adaptación a un patrón circadiano requieren la integridad de su inervación. El flujo sanguíneo pineal es muy elevado (4mL/min/g) y está suministrado por una amplia red capilar a partir de arteriolas procedentes de las arterias coroideas posteriores. En la rata y en el ser humano, la glándula pineal parece encontrarse claramente fuera de la barrera hematoencefálica, pero esta situación es diferente en otras especies. ⁽¹⁴⁾ La pineal se encuentra inervada por el sistema nervioso autónomo (SNA); recibe fibras posganglionares del GSCS, a través de dos nervios simétricos, los nervios coronarios, pero también a través de fibras que acompañan a los vasos sanguíneos. ⁽¹³⁾ En los mamíferos, el principal neurotransmisor utilizado por las fibras posganglionares simpáticas es la noradrenalina (NA), aunque diversos neuropéptidos pueden actuar como cotransmisores en algunas especies. ^(13, 14)

1.1.3 Función endocrina.

Kitay y Altschule, en 1954, demostraron la influencia de la GP en la función reproductiva. La relación que existe entre el metabolismo de la GP y el ciclo de luz-oscuridad, permitió explicar la función endocrina de la GP, siendo ésta el principal componente del sistema endocrino, permitiendo a las diferentes especies responder a los cambios anuales en el fotoperíodo mediante alteraciones adaptativas de su estado fisiológico. ⁽¹²⁾ La pineal humana

se calcifica progresivamente con la edad, pero esto no significa que sus funciones disminuyan. ⁽¹³⁾

1.1.4 Histoquímica y bioquímica.

Con el trabajo de McCord y Allen, en 1917, ⁽¹⁹⁾ se asumió que una sustancia contenida en la GP era la responsable de blanquear la piel de los anfibios. Lerner y cols., en 1958, ⁽²⁰⁾ identificaron esta sustancia como *N*-acetil-5-metoxitriptamina y la llamaron Melatonina (MT); posteriormente, se identificaron las diferentes enzimas que participan en la síntesis de MT y su regulación, a cargo de varios transmisores pineales que se encuentran todavía en investigación. ⁽¹²⁾

1.2 MELATONINA.

1.2.1 Estructura Química.

La Melatonina (MT), un indol formado enzimáticamente a partir de L-triptofano (Trp), fue descubierta en un principio por Lerner et al en 1958, ⁽²⁰⁾ en extractos de glándula pineal bovina. Es secretada principalmente por la GP en respuesta a los ciclos de luz-oscuridad del medio ambiente, activados por el NSQ del hipotálamo, regulando así los ciclos circadianos de numerosas funciones biológicas las cuales son atenuadas por la edad y varias enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares ⁽⁹⁾ (Figura 4A). ⁽²¹⁾ La MT (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina (Figura 4B) ⁽²²⁾ así como un compuesto lipofílico que, como tal, difunde a través de las membranas biológicas y rápidamente cruza la barrera hematoencefálica. ⁽²³⁾

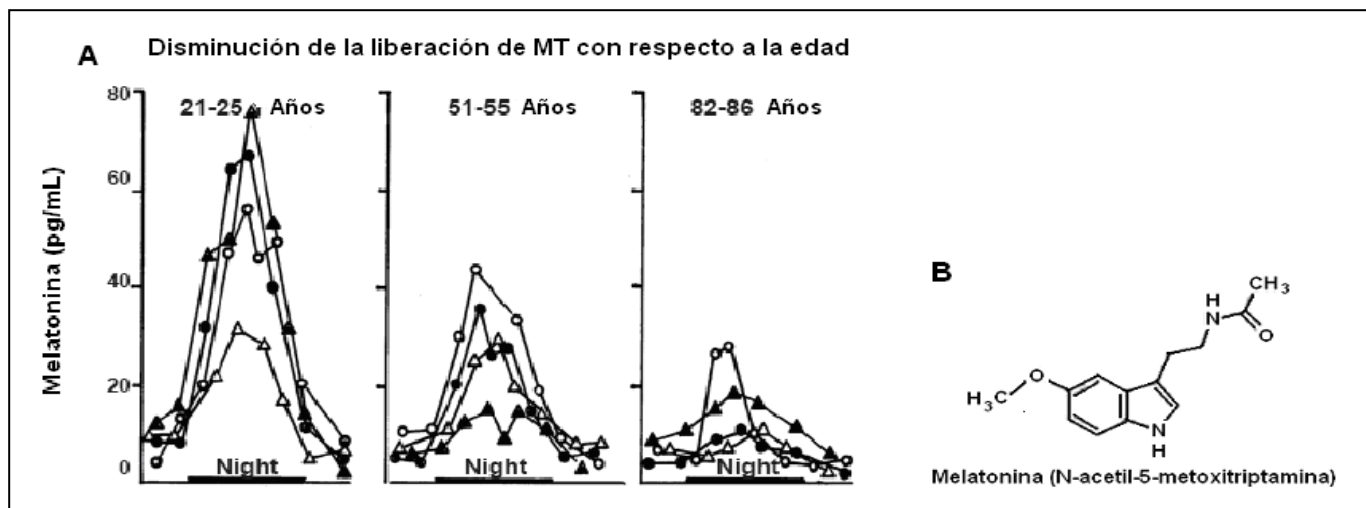


Figura 4. (A) Los niveles de MT en plasma tanto diurnos como nocturnos muestran un pico máximo durante la escotofase y conforme avanza la edad la liberación de MT disminuye. ⁽²¹⁾
 (B) Estructura de la Melatonina. ⁽²²⁾

1.2.2 Biosíntesis de la Melatonina.

La principal ruta de biosíntesis de la MT consiste, para cualquier organismo o tipo de célula estudiada, en la 5-hidroxilación, descarboxilación, *N*-acetilación y *O*-metilación del triptofano, en este orden. Alternativamente, aunque en tasas de flujo más bajo, la MT puede formarse vía *O*-metilación de la serotonina y la subsiguiente *N*-acetilación de la 5-metoxitriptamina, o bien por *O*-metilación del triptofano seguida por una descarboxilación y una *N*-acetilación. Usualmente, el paso limitante para la formación de MT es la *N*-acetilación ^(7,23) (Figura 5). ⁽²⁴⁾

La GP de los mamíferos es uno de los órganos más ricos en serotonina, sustancia que se localiza en las terminaciones nerviosas y en los pinealocitos y que participa en la síntesis de la MT. Los pasos detallados de la biosíntesis de MT son los siguientes:

1. El aminoácido (aa) triptofano es convertido en 5-hidroxitriptofano por hidroxilación, mediante la acción de la triptofano-hidroxilasa.

2. El 5-hidroxitriptofano es convertido en 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina por descarboxilación, por acción de la L-aminoácido aromático-descarboxilasa.
3. Parte de la 5-HT es oxidada a ácido 5-hidroxiindolacético por la monoaminoxidasa (MAO); otra parte es captada por las terminaciones simpáticas en la glándula, y el resto de la serotonina es *N*-acetilada en los pinealocitos a *N*-acetilserotonina, por la acción de la enzima serotonina-*N*-acetiltransferasa (NAT).
4. La *N*-acetilserotonina se transforma en MT por la acción de una enzima metilante, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

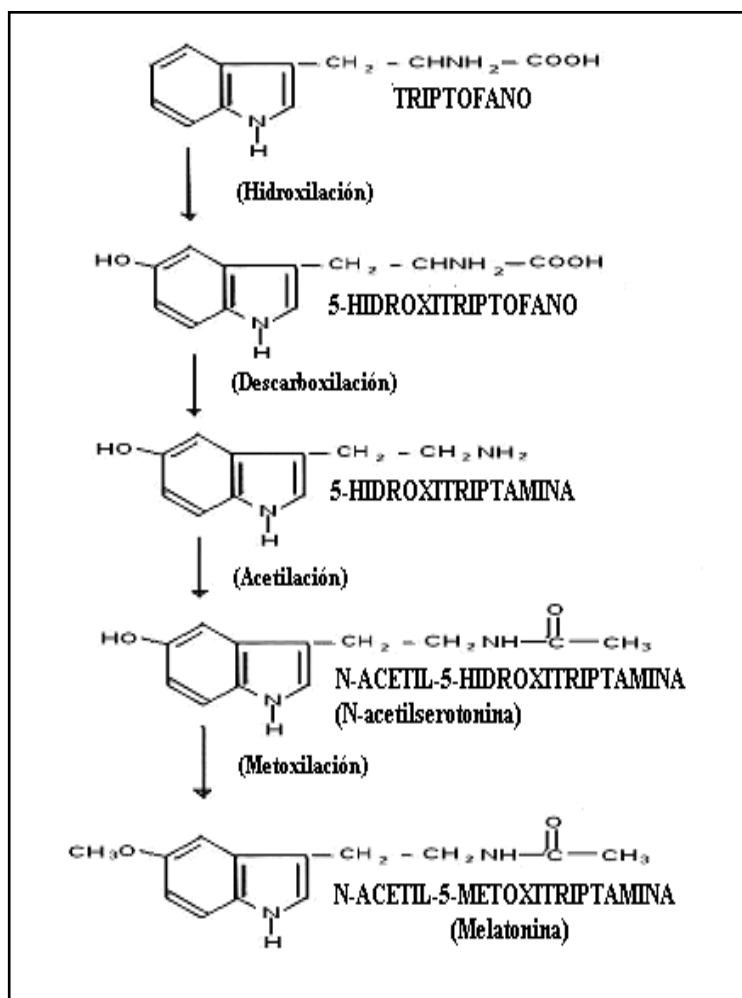


Figura 5. Biosíntesis de la MT. ⁽²⁴⁾

Por otro lado, la GP de los mamíferos y de muchas aves muestra una variación rítmica en la producción de 5-HT y MT dependiente de la cantidad de luz y de la oscuridad. Estas fluctuaciones se denominan *ritmos circadianos pineales* (Axelrod y Wuortman) ⁽²⁵⁾ y son las principales formas de adaptación a nuestro entorno. ⁽²⁶⁾

Tanto en animales de mayor actividad nocturna como en aquellos con mayor actividad diurna, la concentración máxima de 5-HT en la GP se observa al mediodía (entre las 12-18 h) y es mínima a la media noche, y existe un ritmo inverso en cuanto a la producción de MT. ⁽⁹⁾

Estos ritmos circadianos están relacionados con las variaciones de la actividad de la NAT en la GP. La actividad de esta enzima es regulada por la inervación adrenérgica de la glándula a través de los receptores β , con estimulación de la adenilatociclasa (AC) y aumento del AMP cíclico (AMPC) intracelular. Existen factores endógenos y ambientales que modulan la secreción de MT, tales como el fotoperíodo, de tipo estacionales, de edad y desarrollo, y secreciones endógenas, entre otros. La MT producida en la GP es segregada al torrente sanguíneo, principalmente, y al LCR, encontrándose en plasma, LCR, líquido amniótico, saliva, leche y orina. ^(8, 9) La concentración plasmática de MT en seres humanos es de 10 a 300 pg/mL. ⁽¹³⁾ Circula unida a la albúmina. En todos los vertebrados estudiados la concentración de MT en sangre, LCR, orina y saliva exhibe un ritmo circadiano, con valores nocturnos mucho más elevados que los diurnos. Durante la escotofase aumenta la concentración de MT en el LCR y en el plasma (Figura 6). ⁽²⁷⁾ La MT se metaboliza principalmente en el hígado y en el cerebro. En el hígado se transforma en 6-hidroximelatonina (6-HMT), que es conjugada como sulfato o glucurónido. La 6-HMT conjugada representa un 80% de la excreción urinaria de derivados de MT. En el cerebro la MT es oxidada a N-acetil-5-metoxiquinurenina. ⁽¹³⁾

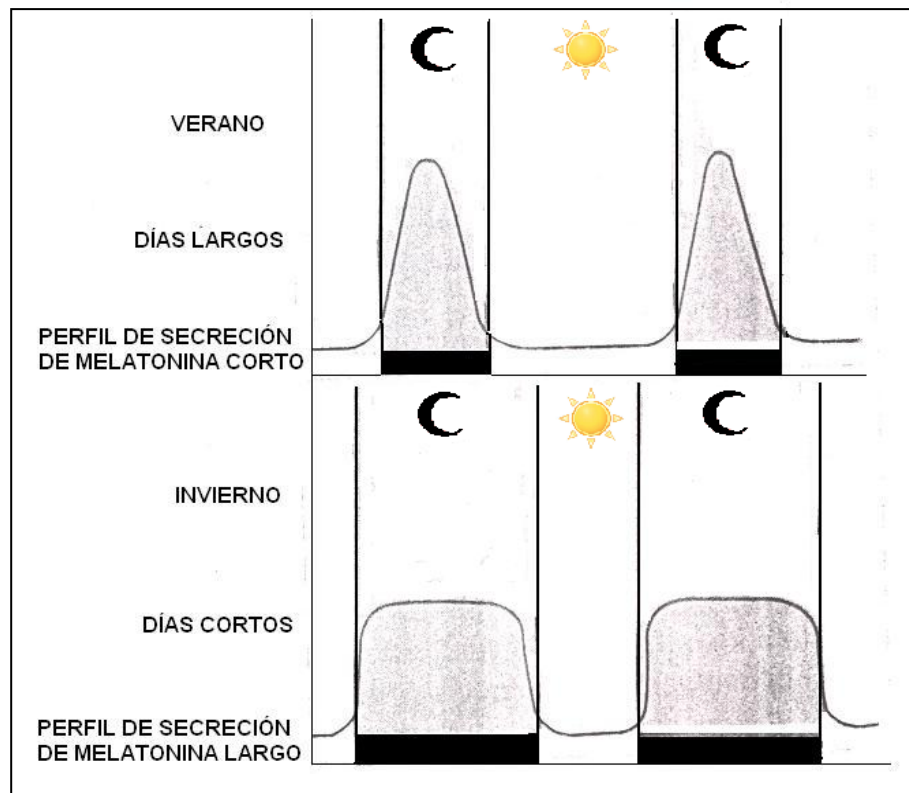


Figura 6. Representación esquemática del perfil de secreción de melatonina durante días largos (verano) o cortos (invierno). ⁽²⁷⁾

En los vertebrados, no sólo en la GP, en el órgano parietal y en la retina se forma la MT, sino también en otros órganos y células, incluidas la glándula Harderiana, los leucocitos mononucleares, la piel y el TGI, el cual contiene varios cientos de veces más MT que la GP. ^(7, 23) La MT fue encontrada y reportada en el TGI a mediados de los años 70 por Raikhlin y Kvetnoy. ⁽²⁾ Posteriormente, se demostró mediante inmunohistoquímica, que la MT es sintetizada por las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal. ^(2, 3, 28) Esta información se confirmó años más tarde con técnicas como el Radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). La concentración de MT en el TGI supera por 10-100 veces la encontrada en la circulación sanguínea y su secreción en ese sitio se ha propuesto que es mediada por la ingesta y ausencia de alimento.

A diferencia de la GP, el mecanismo de síntesis y secreción de la MT por el TGI no ha sido completamente dilucidado. En estudios previos se ha establecido que la MT pineal es producida e inmediatamente secretada en la circulación periférica, de manera circadiana, con concentraciones máximas durante la escotofase; sin embargo, esta secreción fotoperiódica no se ha observado en el TGI. En la Tabla 1 ⁽²⁹⁾ se resumen las diferencias en la localización y mecanismo de acción de la MT entre la GP y el TGI.

Tabla 1. Comparación entre la melatonina pineal y la melatonina gastrointestinal. ⁽²⁹⁾

MT	GP	TGI
Sitio de producción	Pinealocitos	Células enterocromafinas del TGI
Modo de secreción	Circadiano	Continuo o episódico
Modo de acción	Endocrino	Endocrino, paracrino o luminal
Modo de liberación	Inmediata	En demanda (ingesta de alimentos)
Sobreingesta	Decremento	Incremento
Respuesta a la ingesta de alimentos	Sin respuesta	Incremento

Los niveles de MT en sangre, durante la escotofase, son atenuados si se realiza una pinealectomía (Px), mientras que los niveles durante la fotofase no se ven alterados. Numerosos estudios indican que la mayor concentración de MT en sangre durante la fotofase es probablemente de origen GI. Además, la Px en ratas no inhibe los niveles diurnos de MT en sangre, siempre y cuando los animales se mantengan con acceso libre al alimento, pero cuando el alimento es retirado, las concentraciones detectables desaparecen. Esta relación entre la ingesta de alimento y la producción de MT en el TGI ha sido demostrada en numerosos estudios. ^(29, 30-33) Pero también, deben considerarse las fuentes alternativas de MT gastrointestinal como son los microorganismos gastrointestinales o la bilis. ⁽²⁹⁾

1.2.3 Unión de la MT y sus Funciones Fisiológicas.

Los efectos de MT son mediados por receptores específicos a MT de alta afinidad. Estos receptores han sido identificados y caracterizados en varios tejidos por autoradiografía in

vitro y ensayos de afinidad convencional utilizando [¹²⁵I]-iodomelatonina como ligando. ^(34, 35)

La constante de disociación de los receptores para I-MT es del rango de 20-200pM. ⁽³⁴⁾

Como ya se mencionó, la MT produce sus efectos vía receptores. A la fecha, tres receptores de MT (mamíferos) se han clonado, MT₁, ⁽³⁶⁾ MT₂, ⁽³⁷⁾ o purificado por afinidad, MT₃. ⁽³⁸⁾ Los dos primeros receptores están acoplados a proteína-G, los cuales se caracterizan por un dominio de siete hélices transmembranales, mientras que la proteína MT₃ pertenece a la familia de la quinona reductasas. ⁽³⁹⁾ Estos receptores modulan varios mensajeros intracelulares, entre los cuales tenemos el AMPc, GMPc y el [Ca²⁺]. ⁽⁸⁾ El receptor de melatonin MT₁ que se expresa en el NSQ del hipotálamo y en los vasos cardíacos participa en la modulación de los ritmos circadianos y en la constricción de los vasos cardíacos. Además de estas regiones específicas, el receptor MT₁ se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos. ⁽³⁹⁾ El papel de los receptores de melatonina MT₂ en la fisiología de los mamíferos, así como sus propiedades de señalización, se han hecho más claras con el reciente desarrollo de ligandos selectivos a MT₂. Se sabe que estos receptores participan en la fisiología de la retina en la modulación de los ritmos circadianos, en la dilatación de los vasos cardíacos y en las respuestas inflamatorias en la microcirculación. ⁽³⁹⁾ Recientemente, una proteína que muestra un perfil de unión similar al del receptor ML₂, ahora denominado MT₃, fue purificada por afinidad del riñón de hámster Sirio. Esta proteína comparte un 95% de homología con la quinona reductasa humana 2, una enzima que participa en la desintoxicación. Esta proteína y su actividad, revelada mediante ensayos de unión con radioligandos y de tipo enzimático, muestran que se expresa en numerosos tejidos tales como el hígado, riñón, cerebro, corazón e intestino. De manera funcional, se ha demostrado

que la proteína MT₃ puede estar involucrada en la regulación de la presión intraocular del conejo y en las respuestas inflamatorias de la microvascularización. ⁽³⁹⁾

Estudios realizados utilizando el radioligando [¹²⁵I]-iodomelatonina han revelado la distribución de los sitios de unión a MT en tejidos de diversas especies, incluyendo ratones, ratas y humanos. ⁽⁸⁾ En el estómago, duodeno, yeyuno e íleo así como en colon distal esta unión es alta, mientras que en la mucosa oral y el esófago es baja. La MT se acumula, en su mayoría, en el TGI por administración oral o sistémica, particularmente en el estómago y el colon. A nivel subcelular, la unión de MT es fuerte en la fracción nuclear, seguida de las fracciones microsomal, mitocondrial y citosólica. Algunos otros sitios de unión, aunque baja con respecto a los ya mencionados, de MT se encuentran en las capas submucosa y muscularis del músculo liso. Estos hallazgos indican que la MT es producida por las células enterocromafines (CE) en la mucosa pero puede actuar como hormona paracrina en otras partes del TGI, por ejemplo en la muscularis. ^(29, 40) La acción de MT en el músculo intestinal puede ser directa o puede actuar vía el sistema nervioso mientérico. ⁽⁴¹⁾ Además de que Bernoualli-Pellissier en 1994 observó la participación del sistema nervioso central (SNC) en la motilidad muscular, demostrando que la MT proveniente del SNC modula la acción de la colecistocinina (CCK) en la motilidad ileal. Diez años antes del descubrimiento de la MT en el sistema digestivo, Quastel y Rahamimoff ⁽¹⁰⁾ reportaron que, *in Vitro*, la MT inhibe las contracciones espontáneas o inducidas por la 5-HT en el duodeno de rata. Estudios posteriores confirmaron que la MT también inhibe la contracción del músculo liso en el estómago, íleo y colon. Los estudios de Barajas-López también permitieron conocer que la MT relaja el músculo GI por el bloqueo específico de los canales nicotínicos. Además de que MT puede interactuar con canales sensibles a apamina, posiblemente con canales activados

por Ca^{2+} , así como con canales de potasio (K^+). Pero la MT no solo inhibe la contracción del músculo intestinal, sino también la estimula. Particularmente en el intestino delgado, Kachi y cols., en 1999, ⁽⁴²⁾ reportaron que altas dosis de MT inhiben la contracción espontánea o inducida por la 5-HT del músculo GI e inducen la elongación de éste; sin embargo, bajas dosis de MT estimulan la contracción intestinal, que resulta en el “acortamiento” (shortening) del músculo. ⁽²⁹⁾

Por otra parte, la MT se encuentra implicada en una gran variedad de funciones fisiológicas aparte de las ya mencionadas, tales como la inducción del sueño, la acción antioxidante, la prevención de úlceras en la mucosa GI, la inducción en la regeneración del epitelio y la estimulación del sistema inmune, ^(8, 9, 43) solo por mencionar algunas. Cabe mencionar que gracias a que dicha hormona reduce la latencia del sueño, especialmente cuando el ciclo circadiano es alterado, es particularmente efectiva en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer y el Parkinson, las cuales, como muchas otras, están bajo investigación constante. ⁽⁷⁾

1.2.4 Melatonina, ingesta de alimentos y digestión.

Se ha observado un cambio en los ritmos biológicos (como locomoción, temperatura y el ritmo de cortisol en sangre) después de la ingesta de los alimentos, debido posiblemente a la repentina liberación de MT proveniente del intestino, la cual no es mediada por la GP. En humanos, la elevación posprandial transitoria en la concentración de MT en sangre puede ser la causa de anestesia experimentada después de comer. Además, debido a que se ha encontrado que la MT produce una disminución en la temperatura corporal, puede explicarse el por qué la siesta se realiza principalmente en las áreas cálidas del mundo. Por otro lado,

tanto en animales (roedores) como en humanos se ha observado que una dieta baja en calorías incrementa la actividad antioxidante de la MT, reduciendo así los efectos producidos por la edad. ⁽²⁹⁾

1.3 ANÁLOGOS DE MELATONINA.

Actualmente, la MT no se administra a las personas como profiláctico para diversas enfermedades. Las posibilidades de la melatonina como agente terapéutico en la práctica médica son muy amplias, sin embargo, la vida media de esta sustancia es corta (15-30 min), hasta el momento no se cuenta con sustancias que puedan diferenciar los receptores a melatonina que se han identificado hasta el momento (MT₁, MT₂, MT₃), se desconoce el mecanismo de acción por el cual la MT transmite su mensaje de duración del día, siendo éste el responsable de las respuestas fotoperiódicas y, hasta ahora, no se han obtenido compuestos que actúen *in vivo* de manera semejante o mejor que la MT. ⁽²³⁾

Por lo anteriormente expuesto y en un intento de dar solución a los inconvenientes que posee la MT, se sintetizan compuestos con propiedades biológicas similares a las de la hormona. Una táctica para la obtención de estos compuestos consiste, inicialmente, en la identificación de los átomos o conjunto de átomos causantes de la actividad biológica para, posteriormente, modificar algún o algunos de estos átomos con el fin de mejorar las propiedades biológicas de la sustancia prototipo. ⁽²³⁾

En un estudio realizado con análogos de MT se observó que para la interacción de la hormona con su sitio receptor son esenciales los grupos 5-metoxilo, el grupo acetamido y el anillo aromático de tipo indólico, dependiendo la actividad biológica de la MT de estos componentes farmacofóricos. Se realizaron modificaciones en la posición 1 del anillo

indólico de la estructura de MT mediante la incorporación de sustituyentes bencilo, benzoilo y fenilo sustituidos. El análogo utilizado en este estudio está basado en esta investigación previa. ⁽²³⁾

1.4 EL MÚSCULO LISO INTESTINAL.

Como se puede ver y de acuerdo a la gran cantidad de estudios que se han realizado de la MT, los modelos experimentales en tejido aislado han sido de gran utilidad para los investigadores. El músculo liso intestinal se ha utilizado como modelo experimental desde 1965 hasta la fecha para estudiar el efecto de MT “In-Vitro”.

1.4.1 Anatomía del intestino delgado.

El intestino delgado en humanos es un tubo que mide alrededor de 3-4 metros de longitud. Se divide en tres partes, la primera que continúa directamente al estómago y rodea la cabeza del páncreas se llama duodeno (por su longitud de doce pulgadas). Las $\frac{2}{5}$ partes siguientes es el yeyuno y las $\frac{3}{5}$ partes finales constituyen el íleo (Figura 7). ⁽⁴⁴⁾ Esta división obedece a criterios morfológicos, histológicos y funcionales: 1) El duodeno es retroperitoneal y está fijo a la pared posterior del abdomen, mientras que el resto del intestino delgado se encuentra libre en la cavidad abdominal, sujeto únicamente por el peritoneo, 2) El diámetro intestinal es mayor en la parte proximal que en la distal, siendo doble en el duodeno y el yeyuno que en el íleo terminal, 3) Las capas mucosa y submucosa del intestino poseen unos pliegues llamados válvulas conniventes que son mayores y más abundantes en el duodeno y el yeyuno, desapareciendo prácticamente en el íleo terminal, y 4) En el íleo existen unos agregados de

tejido linfoide (placas de Peyer) que no están presentes en el intestino proximal. Tienen carácter “defensivo” y se van atrofiando con la edad.

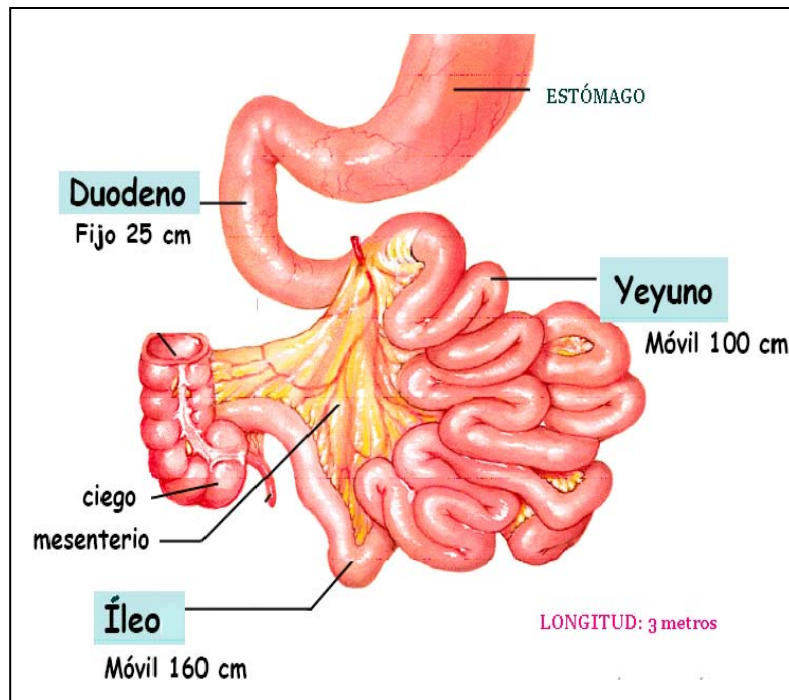


Figura 7. Anatomía del intestino delgado, en la cual se muestran los tres principales segmentos en los que se divide. ⁽⁴⁴⁾

1.4.2 Histología.

El intestino delgado está constituido por varias capas ⁽⁴⁵⁾ (Figura 8) ⁽⁴⁴⁾:

1. Serosa externa, formada por el peritoneo, que recubre el yeyuno y el íleo y sólo en la parte anterior al duodeno.
2. Capa muscular doble, longitudinal en la parte externa y circular en la interna. Entre ambas se encuentra el plexo nervioso de Auerbach.
3. Capa submucosa de tejido conectivo, infiltrada de linfocitos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y células plasmáticas. En esta capa se encuentran los vasos sanguíneos y linfáticos y el plexo nervioso de Meissner. En la zona proximal de esta capa se

encuentran las células de Brunner, cuya secreción mucosa y alcalina protege al duodeno del quimo ácido que sale del estómago.

4. Capa mucosa, que se divide en tres zonas: a) *muscularis mucosae* (muscular de la mucosa), que es una fina lámina de músculo liso que separa la mucosa de la submucosa; b) lámina propia, que es el tejido conectivo que actúa como soporte estructural de las vellosidades intestinales, de los vasos y de los nervios; c) epitelio, que cubre interiormente todo el intestino y tiene la función fundamentalmente de absorción.

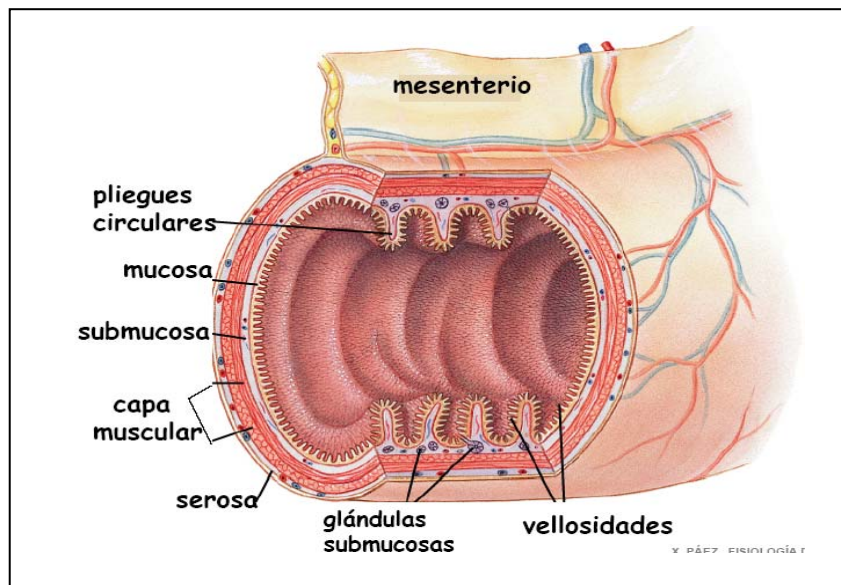


Figura 8. El intestino delgado y sus diferentes capas. (44)

El intestino dispone de varios mecanismos (válvulas conniventes, vellosidades intestinales y microvellosidades) para aumentar su superficie interna y lograr de este modo una mayor área de absorción. Mediante estos mecanismos, posee una superficie de aproximadamente 200-300 m². Además, el tejido intestinal posee uno de los mayores índices mitóticos y metabólicos de nuestro organismo. Por estas características los procesos de absorción tienen lugar fundamentalmente en las zonas apicales del enterocito, mientras que los

procesos de secreción son más abundantes en el fondo de las criptas. El riego sanguíneo llega al intestino delgado por la arteria mesentérica superior (duodeno), en el tronco celíaco y la mesentérica inferior (íleo terminal), que se ramifican en finos capilares en la zona subepitelial de las vellosidades intestinales. También, existe una rica red de vasos linfáticos que comienzan en las propias vellosidades intestinales y que participan en el transporte de varias sustancias (Figura 9). ⁽⁴⁴⁾

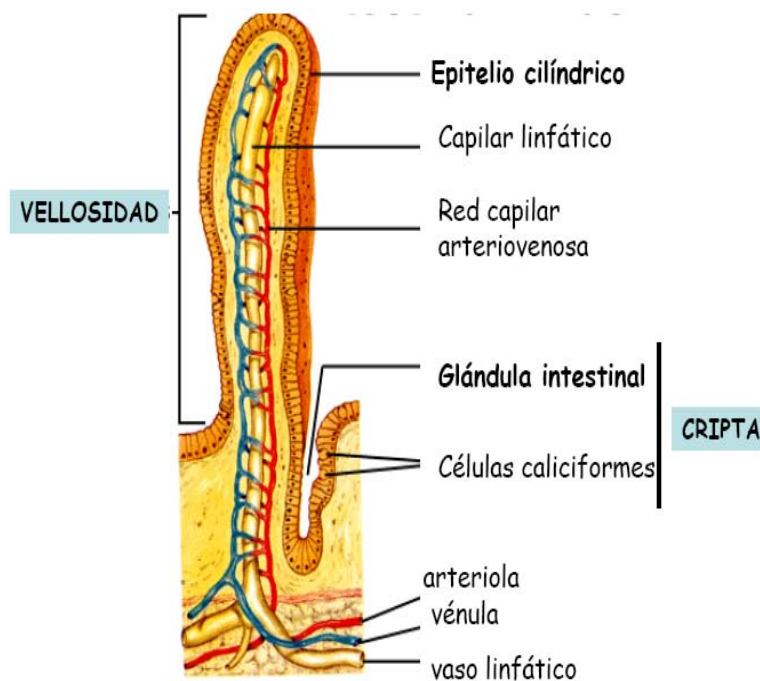


Figura 9. El epitelio intestinal. ⁽⁴⁴⁾

1.4.3 Tipos celulares de la mucosa del intestino delgado.

Los tipos de células que se encuentran formando la mucosa del intestino delgado se muestran a continuación ⁽⁴⁵⁾ (Tabla 2) ⁽⁴⁵⁾:

Tabla 2. Tipos celulares presentes en la mucosa del intestino delgado y sus características.
(45)

Tipos celulares	Características
Células epiteliales.	Tienen fundamentalmente una función de absorción y reciben el nombre de enterocitos.
Células de Paneth.	Son también células epiteliales, pero tienen menos microvellosidades que las anteriores. Segregan lisozima y son además células fagocitarias, regulando la población bacteriana intestinal.
Células calciformes.	Son sintetizadoras y secretoras de moco. Están repartidas a lo largo de todo el tubo digestivo. En el duodeno, las células de Brunner también segregan moco.
Células endocrinas.	También llamadas sistema endocrino intestinal, en el que se encuentran diferentes tipos de células que sintetizan todo tipo de hormonas: gastrina, secretina, glucagon, somatostatina, histamina, serotonina, sustancia P, calcitonina, prostaglandinas, péptido natriurético, etc. En general, las células endocrinas y nerviosas actúan como censores, mientras que las hormonas y los neurotransmisores secretados por ellas lo hacen como mensajeros. Se puede decir que las células endocrinas en las criptas intestinales, las células nerviosas en los plexos submucoso y mientérico y los nervios vagos, permiten la función perfectamente coordinada, actuando mediante mecanismos de naturaleza paracrina, neurocrina o endocrina.
Células pertenecientes al sistema inmunológico.	Como los linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, monocitos, eosinófilos, macrófagos especializados denominados células M, etc. Están dispersas por todo el tubo digestivo.

1.4.4 Secreción intestinal.

Todas las células descritas anteriormente intervienen en la función del aparato digestivo, bien mediante sus secreciones, o bien gracias a sus facultades de absorber o digerir el contenido intestinal. En condiciones normales se segregan alrededor de 1-2 L al día de este fluido hídrico que es isotónico y alcalino, y que procede fundamentalmente del epitelio de la base de la vellosidad, que se invagina y forma unas bolsas que se abren a la luz mediante poros: son las criptas intestinales de Lieberkühn, éstas tienen varias funciones: facilitan el tránsito intestinal al diluir el quimo y actuar como un vehículo acuoso donde se diluyen las partículas

alimenticias; además, hace posible el acceso de las enzimas digestivas al quimo. A continuación se presentan las principales secreciones que encontramos en el intestino (Tabla 3) ⁽⁴⁵⁾.

Tabla 3. Las diferentes secreciones intestinales y sus características. ⁽⁴⁵⁾

Secreción intestinal	Características
Moco	Son glucoproteínas que forman geles en disolución. Su función es proteger la mucosa intestinal y facilitar el tránsito intestinal.
Enzimas	No se segregan a la luz intestinal, sino que permanecen ancladas a la membrana celular con sus lugares activos expuestos al quimo.
Hormonas	Regulan la secreción, la absorción y la motilidad intestinal.
Inmunoglobulinas	Regulan la flora intestinal y actúan sobre los posibles agentes patógenos invasores. Son especialmente importantes la inmunoglobulina M (IgM) y la inmunoglobulina A (IgA).

También deben considerarse las secreciones pancreática y biliar, que, aunque es elaborada fuera del intestino, son vertidas en él y colaboran en la digestión. ⁽³⁸⁾

1.4.5 Procesos digestivos intestinales.

La digestión y la absorción intestinales son procesos muy rápidos, ya que una comida compleja puede ser digerida y absorbida en aproximadamente 3-4 horas (aunque esto depende de las características de los nutrientes). Los alimentos sufren el efecto de la saliva, el jugo gástrico y, en el duodeno, el de las secreciones pancreática y biliar, de forma que el quimo intestinal está compuesto por: agua, derivados de los hidratos de carbono, compuestos proteicos y sus derivados, sustancias derivadas de las grasa, iones (tanto procedentes de la dieta como segregados en los jugos digestivos), vitaminas hidrosolubles y liposolubles, y fibra. El 85-90% de las sustancias que atraviesan el aparato digestivo son absorbidas. De éste porcentaje, el 80% se absorbe en el intestino delgado. ⁽⁴⁵⁾

1.4.6 Motilidad del intestino delgado.

La motilidad del intestino delgado tiene dos finalidades: 1) facilitar la digestión y la absorción de los alimentos favoreciendo la propulsión del quimo, y 2) una función defensiva, impidiendo la proliferación bacteriana y reduciendo el tiempo de contacto de algunos componente agresivos de la dieta. Durante la fase digestiva, la actividad motora garantiza la mezcla, la absorción y la propulsión del alimento y las secreciones gastrointestinales. ⁽⁴⁶⁾ La mezcla se realiza mediante contracciones que parecen dividir al intestino en segmentos (movimientos segmentarios), durante las cuales el contenido intestinal se desplaza a ambos lados de la contracción para volver a quedar en el mismo lugar cuando se produce la relajación. La frecuencia de estos movimientos es la que determina las ondas lentas. La propulsión se favorece por la contracción de la pared intestinal, la cual disminuye el radio y aumenta la presión intraluminal, y por la relajación de la zona contraída, que expande la luz y reduce la presión intraluminal durante el paso de la masa propulsada ⁽⁴⁷⁾ (Figura 10).⁽⁴⁸⁾

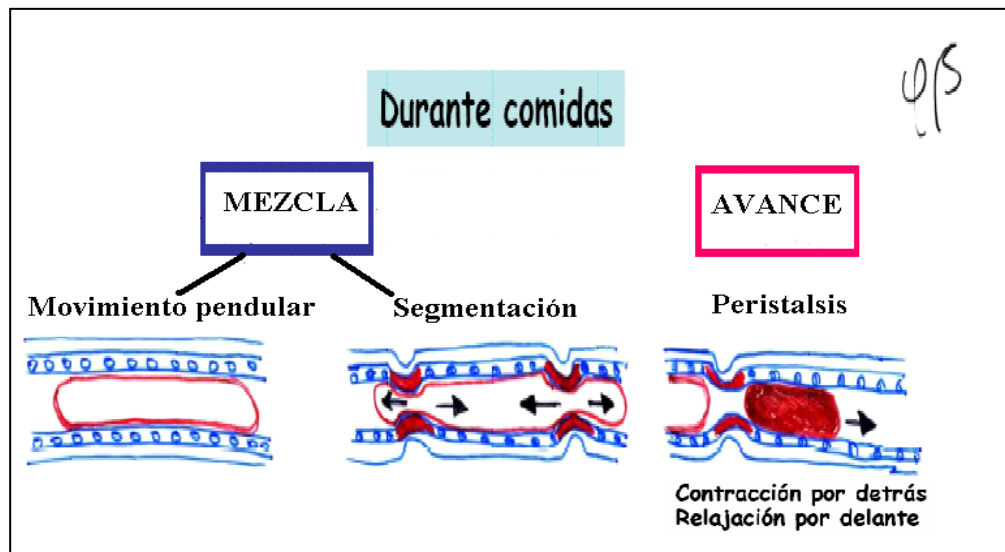


Figura 10. Secuencia de relajación y contracción que facilitan la propulsión en los movimientos peristálticos. ⁽⁴⁸⁾

Durante la fase interdigestiva, el intestino delgado, que debe mantener la luz intestinal vacía, no está en reposo, sino que mantiene contracciones periódicas que progresan distalmente, propulsando los residuos y evitando así el estacionamiento de secreciones y una excesiva proliferación bacteriana. ^(46, 47)

1.4.7 Control nervioso de la motilidad del intestino delgado.

El tracto digestivo se caracteriza por contener en sus paredes una compleja red nerviosa que constituye el *sistema nervioso entérico*. Los plexos *mientérico* (dispuesto entre las capas circular y longitudinal del músculo liso) y *submucoso* (situado entre la muscular de la mucosa y la capa circular del músculo liso) forman parte de este sistema. Así como las denominadas células de Cajal, que se encuentran dispuestas en forma de dos plexos poco densos asociados con el plexo mientérico y las fibras lisas circulares, respectivamente. Las fibras nerviosas extrínsecas están representadas por fibras parasimpáticas y simpáticas, en su mayoría posganglionares. Estas fibras forman sinapsis con los plexos intramurales, a los que conectan entre sí (Figura 11). ⁽⁴⁸⁾ La pared del tracto digestivo también posee receptores que detectan cambios mecánicos o químicos, y que transmiten dicha información a través de vías aferentes sensitivas. De esa forma se organizan circuitos reflejos que viajan en su mayor parte a través de nervios mixtos constituidos por fibras aferentes sensitivas y eferentes motoras, como los nervios vagos, los esplácnicos y otros nervios autónomos. Así, el SNC es informado permanentemente sobre los cambios que se producen en el tracto digestivo y que influyen en la conducta motora de éste, además de que puede modificar las funciones digestivas a través del circuito reflejo vagovagal y originar respuestas motoras que resultan de la inhibición o la activación de impulsos colinérgicos o de la activación de vías no adrenérgicas-no colinérgicas, las cuales son generalmente inhibitorias. ⁽⁴⁷⁾

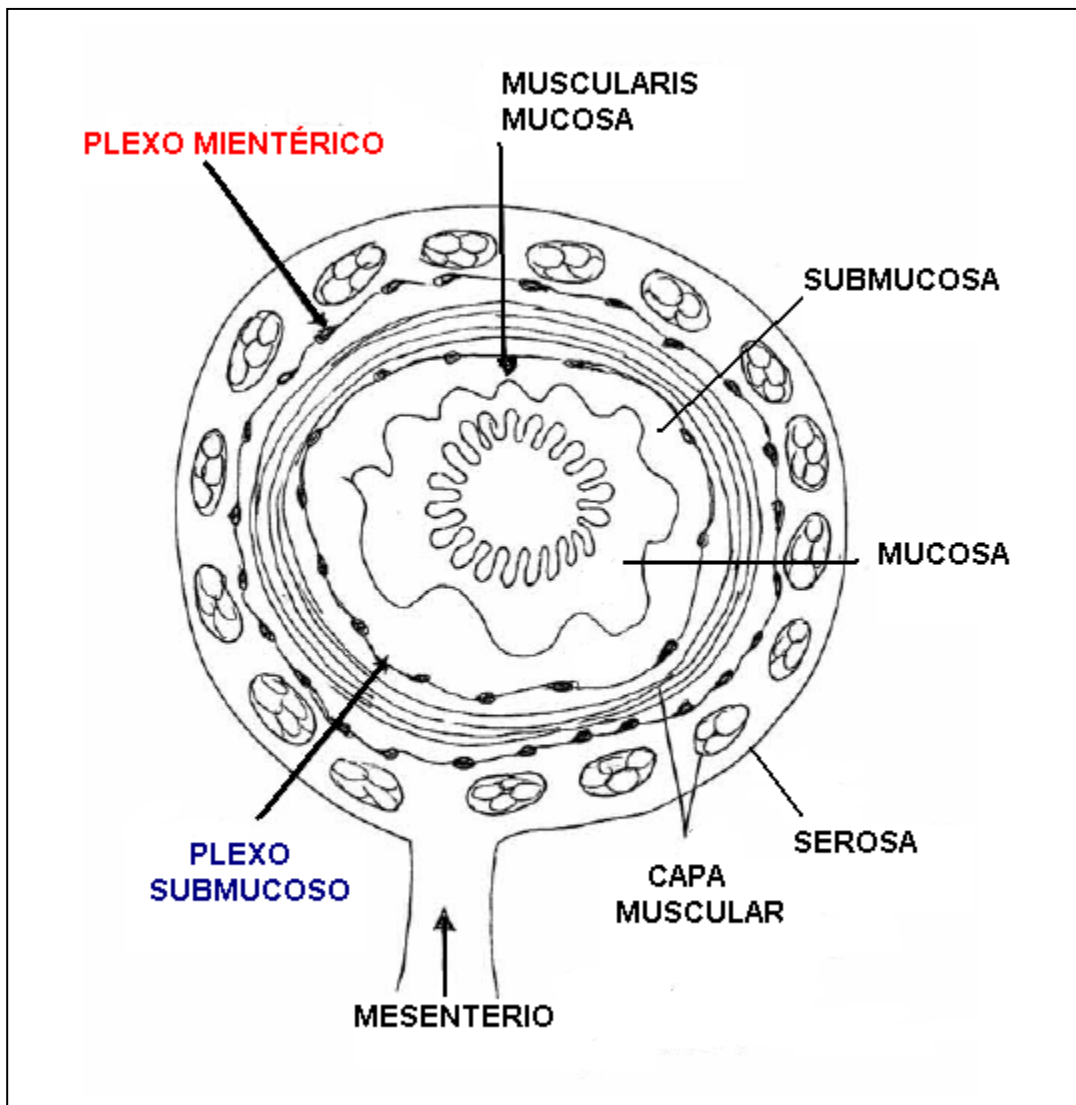


Figura 11. El diagrama muestra las capas de la pared de intestino delgado. La capa mucosa tiene el epitelio y el tejido conectivo subepitelial con capilares y glándulas. La capa submucosa tiene vasos y el plexo nervioso submucoso de Meissner y una delgada capa de músculo liso longitudinal que es la *muscularis mucosa*. La capa muscular constituida por una capa circular interna y una longitudinal externa. Entre las dos capas se encuentra el plexo mientérico de Auerbach, la capa externa es la serosa peritoneal. Por el mesenterio entran y salen las arterias, venas, los vasos linfáticos y los nervios. ⁽⁴⁸⁾

1.4.8 Actividad eléctrica del músculo liso intestinal.

El músculo liso intestinal presenta una actividad eléctrica en forma de *ondas lentas* y descargas de potenciales de acción o *potenciales de espiga* (Figura 12) ⁽⁴⁸⁾.

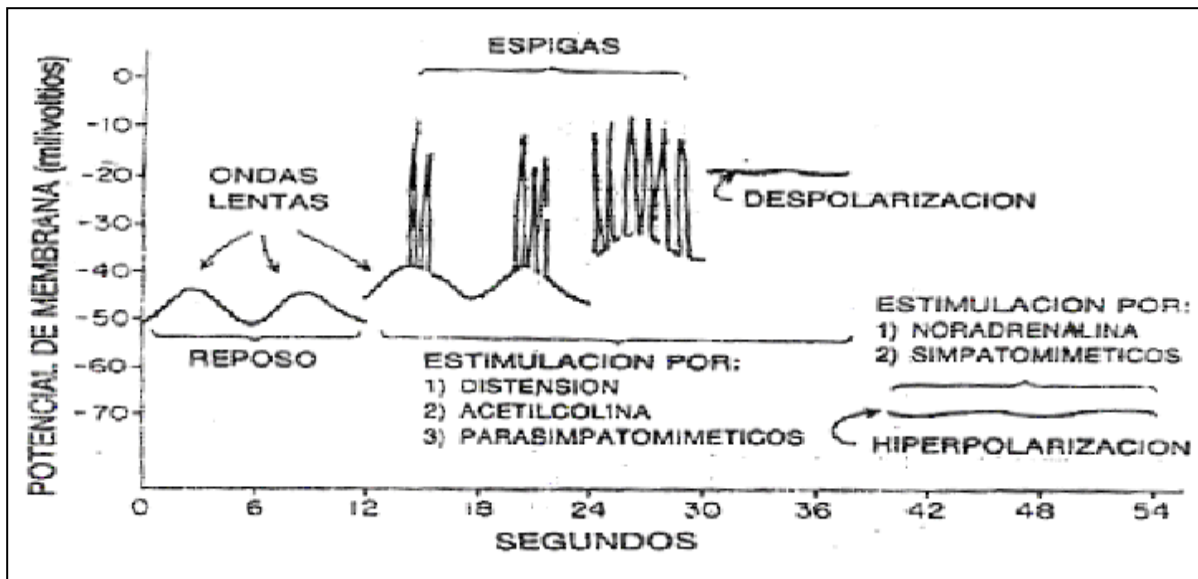


Figura 12. Actividad eléctrica y mecánica del músculo liso que muestra la relación entre las fluctuaciones del potencial de membrana y la actividad contráctil. ⁽⁴⁸⁾

Las ondas lentas son oscilaciones del potencial de membrana que están presentes aún en ausencia de actividad motora. Estas ondas han sido registradas en muchas especies animales, y recibieron distintas denominaciones, como ritmo eléctrico basal (REB), potencial de marcapaso o actividad de control eléctrico. Son responsables de la *actividad eléctrica espontánea* del músculo liso del tracto digestivo. Están constituidas en cuatro fases (Figura 13) ⁽⁴⁹⁾:

- Fase 1, de *despolarización rápida*, indica la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con el cual se produce su ingreso al interior celular.
- Fase 2, de *repolarización parcial*, se debe a la inactivación transitoria de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje y a la activación de una corriente de salida de K^+ , que sería también dependiente de voltaje.

- Fase 3, de *meseta*, es producida por la activación sostenida de la corriente de entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje y de la corriente de salida de K^+ dependiente de voltaje, con lo cual se produce un balance entre ambas.
- Fase 4, de *repolarización*, es ocasionada por la inactivación lenta de la corriente de entrada de Ca^{2+} y el aumento de la conductancia del K^+ provocado por la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} .

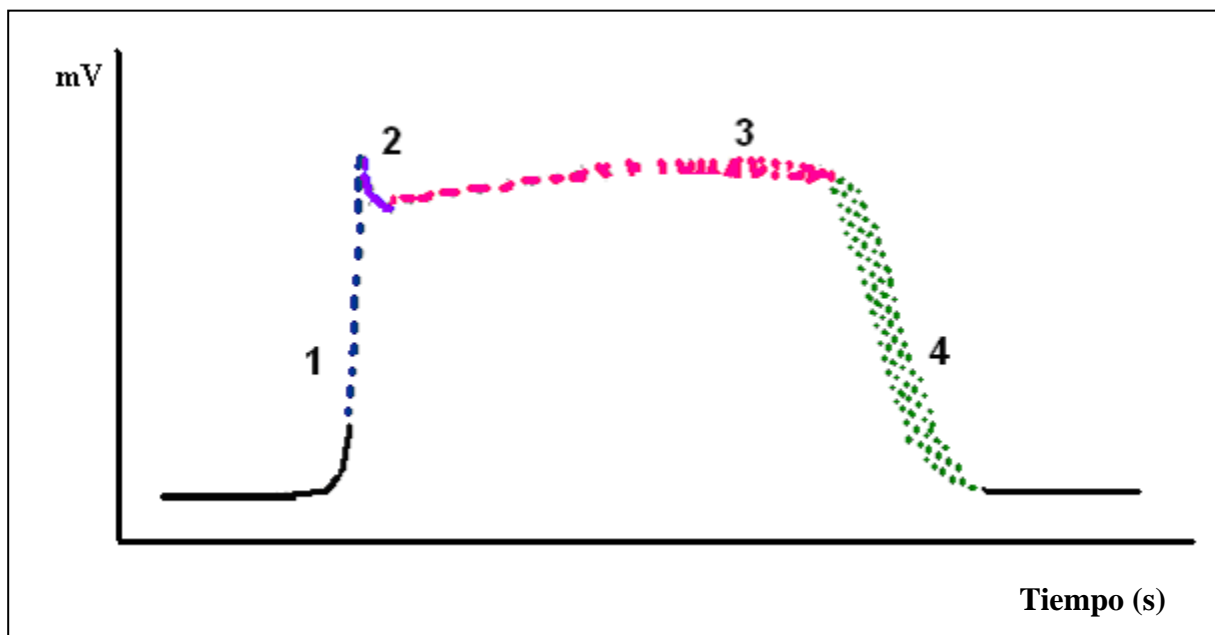


Figura 13. Hipótesis para el mecanismo de las ondas lentas: *fase 1*, despolarización; *fase 2*, repolarización parcial; *fase 3*, meseta; *fase 4*, repolarización. ⁽⁴⁹⁾

Los potenciales de espiga se producen espontáneamente cuando las oscilaciones del potencial de membrana se hacen menos negativas y, cuanto más se eleva éste, mayor es la frecuencia de descarga. Durante estos potenciales aumenta considerablemente el ingreso de Ca^{2+} , lo cual inicia los fenómenos que determinan la contracción muscular. ⁽⁴⁷⁾

En términos eléctricos la actividad cíclica intestinal se denomina complejo mioeléctrico interdigestivo (CMI), y presenta su equivalente mecánico. El CMI está constituido por 4 fases

que se repiten periódicamente cada 90-120 min y se diferencian entre si por el porcentaje de ondas lentas que van seguidas de potenciales de acción:

- Fase I. Es un período de reposo, donde las espigas están ausentes. Su duración es de aproximadamente 50 min y ocupa el 40-60% del CMI.
- Fase II. En esta fase se registran espigas esporádicas o intermitentes. Dura alrededor de 30 min y ocupa el 20-30% del complejo.
- Fase III. Es la fase más característica, donde las ondas lentas se acompañan de potenciales de acción y éstos alcanzan su máxima frecuencia. Su duración es de 6-10 min, y ocupa el 50% del CMI. La velocidad de migración media de la actividad de esta fase es de 4-6 cm/min en la primera parte del intestino delgado y desciende a 1-2 cm/min en el íleo terminal.
- Fase IV. Constituye un período transitorio de reposo; es una fase irregular, su duración es de alrededor de 2-4 min y ocupa el 0.5% del CMI.

La duración de la fase III es relativamente constante, pero la de las otras varía de ciclo a ciclo.

Por otro lado, la actividad motora cíclica (complejo motor migratorio interdigestivo o CMM) en cualquier nivel del intestino delgado tiene cuatro fases bien definidas, que se reciclan continuamente, hasta que son interrumpidas por las comidas. Se correlaciona con las fases de actividad eléctrica o CMI (Figura 14): ⁽⁵⁰⁾

- Fase I. Es una fase quiescente, con poca o nula actividad.
- Fase II. Se caracteriza por una actividad motora irregular e intermitente, que se torna más intensa cerca del final de esta fase. Durante ella se han visto dos patrones

diferentes de motilidad. Uno consiste en ráfagas de una o pocas contracciones que alternan períodos cortos de reposo. Esta actividad se repite a intervalos periódicos de 1 ó 2 min. Las contracciones de estas ráfagas pueden ser segmentarias o progresivas. El segundo patrón consiste en contracciones peristálticas sencillas que se propagan a la misma velocidad de las ondas lentas.

- Fase III. También, llamada frente de actividad, consiste en una actividad rítmica a ráfagas, que dura varios min y migra distalmente. Las ondas de contracción del frente de actividad son altamente propulsivas y se propagan a la frecuencia de las ondas lentas (2 cm/s).
- Fase IV. Con un corto período desigual de contracciones intermitentes que da paso a la fase I. Muchos autores ignoran esta fase IV por su inconstancia, y consideran el ciclo dividido en las tres fases restantes.

En el intestino delgado, el complejo motor o actividad mioeléctrica comienza en el duodeno y lentamente migra a lo largo del mismo, con lo que un nuevo ciclo comienza en el estómago. El mecanismo de iniciación y migración es complejo, pero parece estar controlado por mecanismos entéricos neuronales. ⁽⁴⁶⁾

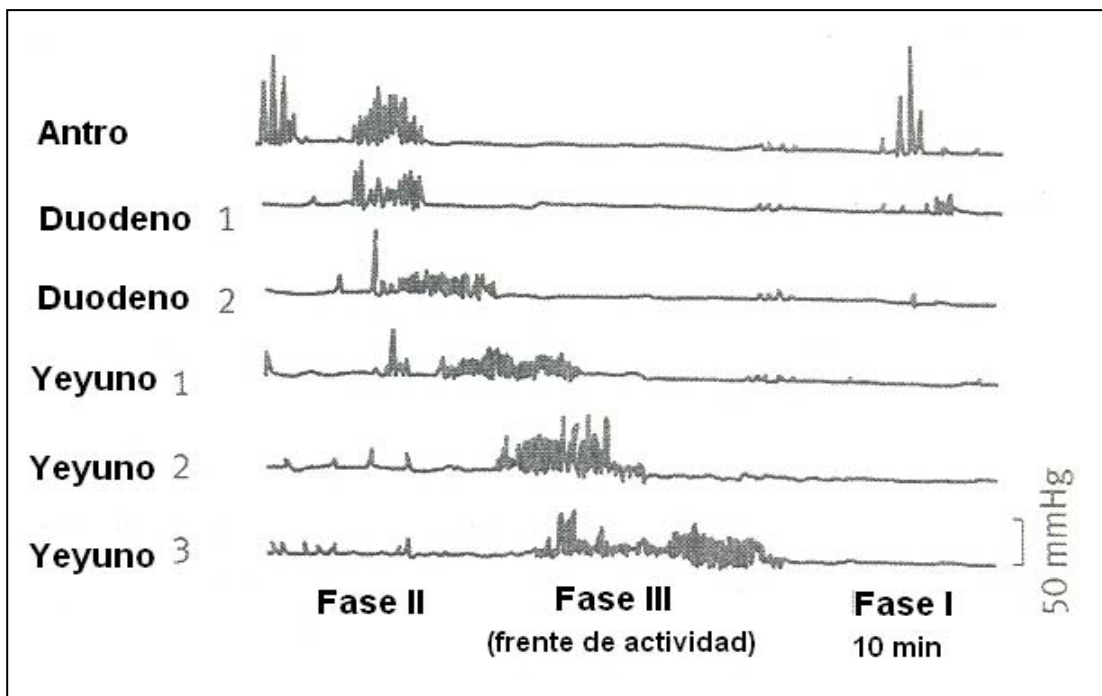


Figura 14. Registros de presión múltiple en el intestino delgado que demuestran el CMM. El CMM consta de cuatro fases diferentes, las cuales se detallan en el texto. ⁽⁵⁰⁾

1.4.9 Patrón de motilidad postingesta.

La comida interrumpe el ciclo interdigestivo, siendo éste remplazado por un patrón de actividad eléctrica y mecánica irregular y sin relación. La duración y la intensidad de esta interrupción dependen y son proporcionales al valor calórico, la composición química y las propiedades físicas del alimento. Después de una comida, cuando el CMM reaparece, transcurridas pocas horas, la actividad de la fase III generalmente empieza en el yeyuno o el íleo, y los ciclos subsiguientes empiezan ya normalmente en el duodeno proximal. Durante esta fase pueden ocurrir contracciones intermitentes, pero no existe ningún ritmo cíclico. ⁽⁴⁶⁾

1.4.10 Vaciamiento del intestino delgado.

La unión entre el intestino delgado y el colon es el esfínter ileocecal o válvula de Bahuin, que regula la entrada del quimo en el intestino grueso. Normalmente este esfínter está cerrado,

pero las contracciones peristálticas del íleo terminal hacen que se relaje, y pase al colon parte del quimo. También existen reflejos de largo alcance que hacen que el contenido del intestino delgado pase al intestino grueso, como el reflejo gastroileal, que hace que después de una ingesta, se estimule el vaciamiento del íleo. ⁽⁴⁶⁾

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Una vez que conocemos los antecedentes del trabajo, y con base en esto, la hipótesis y los objetivos son los siguientes:

3.1 HIPÓTESIS

Si la MT y el análogo M1A disminuyen la contracción del músculo liso duodenal y en este evento participan los receptores a MT, entonces, este comportamiento será revertido por un antagonista de receptores a MT, como lo es el LUZ.

3.1.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. La MT y el análogo M1A inhiben los movimientos espontáneos del músculo liso duodenal de forma dosis dependiente.
2. El LUZ revierte los efectos de MT y M1A.
3. El efecto de MT y M1A se inhibe en presencia de LUZ.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Comparar y evaluar el efecto de MT y del análogo M1A en el músculo liso duodenal.

3.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Registrar la actividad eléctrica espontánea del duodeno.
2. Registrar la actividad eléctrica del duodeno con aplicación de MT, Luzindol (LUZ) y el análogo 1-N-benzilmelatonina (M1A) en forma independiente.
3. Comparar el efecto de MT en presencia de LUZ en duodeno.
4. Comparar el efecto de M1A en presencia de LUZ en duodeno.
5. Comparar el efecto de MT en presencia de M1A en duodeno.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL

- REACTIVOS.

Cloruro de sodio (Merck)

Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich)

Cloruro de potasio (J.T. Baker)

Sulfato de magnesio (Mallinckrodt)

Cloruro de calcio (Merck)

Fosfato de potasio (Mallinckrodt)

Glucosa monohidratada (Sigma-Aldrich)

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

Melatonina (Sigma-Aldrich)

Tween 80 (Merck)

Análogo M1A de Melatonina (Departamento de Farmacia, Facultad de Química)

Luzindol (Sigma-Aldrich)

- MATERIAL ADICIONAL Y EQUIPO.

Cajas Petri y Pirex

Equipo de disección marca Miltex

Micropipetas de 10µl, 20-200µl y de 100-1000µl (Transferpette)

Frasco de doble pared con chaqueta (2L)

Agujas e hilo

MP 100 BIOSYSTEMS – BIOPAC con su respectivo software

1 Computadora (PC) (Dell)

Tres cámaras de baño

Recirculador de agua (Circon)

3.2. MÉTODO.

I. Preparación de las sustancias:

- Solución Fisiológica Artificial Ringer-Krebs (SFARK):

Las soluciones stock se prepararon como sigue:

Se preparó 1 L de solución de NaCl a 1 M, 1 L de NaHCO₃ a 0.1 M, 100 mL de KCl a 1 M, 100 mL de KH₂PO₄ a 1 M, 100 mL de MgSO₄ a 1 M y 100 mL de CaCl₂ a 1 M.

Consecutivamente se tomaron alícuotas de cada una de las soluciones stock para obtener una solución final que contenía: Glucosa a 11 mM, NaCl a 20 mM, NaHCO₃ a 120 mM, KCl a 4.6 mM, KH₂PO₄ a 1.2 mM, MgSO₄ a 1.2 mM y CaCl₂ a 1.5 mM.

- Solución vehículo:

Como vehículos para los compuestos a estudiar, es decir, la MT, el Luzindol (LUZ) y el análogo M1A se utilizaron Tween 80 al 5% (vehículo 1) y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% (vehículo 2). Para realizar la curva de cada uno de los vehículos se utilizaron 2 mL de solución, en el caso del Tween 80 al 5% ésta se preparó con 100 µL de Tween 80 y el resto de agua destilada.

- Sustancias:

La solución stock de MT se preparó a una concentración de 43.05 mM y la del análogo M1A a 31.06 mM. La solución stock de LUZ se preparó a una concentración de 34.2 mM.

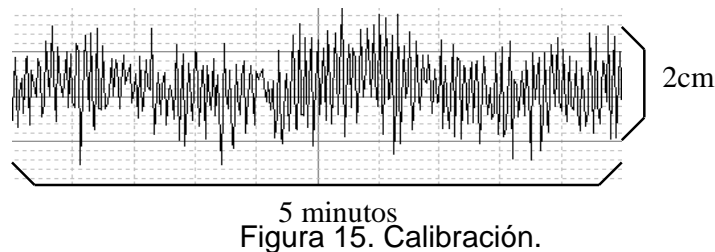
II. Material biológico:

Los experimentos a realizar fueron en tejido duodenal. Se utilizaron 9 ratas macho adultas cepa Wistar, adquiridas en Harlan México, S.A. de C.V., con un peso aproximado de 180-230g, las cuales permanecieron en cajas de policarbonato (de 40 x 30 x 20 cm) transparentes, con alimento y agua de forma libre e ininterrumpida, y por un periodo aproximado de una semana para su adaptación y posterior utilización. Se obtuvieron 27 tejidos duodenales en condiciones de ayuno por 8 horas.

III. Experimentos:

Previo a la disección de las ratas, se inician el equipo, el recirculador de agua y el baño maría. Se fija la temperatura del baño maría de tal manera que el agua contenida en las cámaras del sistema convencional “In vitro” para tejido aislado y que estará en contacto con la SFARK se encuentre a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se verifica que el agua recircule de manera adecuada sin formación de burbujas en el interior de las chaquetas que recubren las cámaras.

En lo que se estabiliza la temperatura, se procede a preparar la SFARK, como se menciona arriba. Los registros digitales de actividad de los segmentos de tejido se obtienen y analizan utilizando el software *AcqKnowledge* del Sistema BIOPAC. La escala de calibración es de 1cm de desplazamiento y 5 min de registro (Figura 15).



5 minutos
Figura 15. Calibración.

Se deben calibrar los canales a utilizar antes de cada registro (Anexo). Posteriormente, se pesan y marcan las ratas. Se sacrifican por dislocación cervical para obtener el tejido a utilizar. Se cortan aproximadamente 5 cm de tejido intestinal, partiendo del duodeno hacia adelante, es decir el segmento próximo al estómago, para obtener de ahí segmentos de 1 cm. A cada uno de los segmentos se le realizan dos suturas, equidistantes, con ayuda de hilo y aguja, sin perder de vista la parte proximal al estómago. Las suturas nos sirven para sujetar el tejido en la cámara de vidrio y en un ganchillo que se encuentra ubicado en el transductor del equipo. Se colocan los tejidos inmediatamente en el interior de las cámaras que deben contener un volumen de 10 mL de SFARK a 37°C (Figura 16). La parte proximal al estómago se coloca hacia la parte superior de la cámara, sujetándola al transductor, y la parte inferior se

sujeta a la base de la misma. El transductor se encuentra montado previamente sobre un soporte de bronce el cual cuenta con un tensor milimétrico y con el que se puede controlar la tensión ejercida al tejido, el transductor a su vez está conectado a un módulo de interfase universal (BIOPAC Systems) el cual está acoplado a la unidad de adquisición de datos (BIOPAC Systems). La tensión que se aplica a los tejidos es de 1 g. En estas condiciones deben mantenerse los tejidos para que se estabilicen, alrededor de 45 min antes de iniciar el experimento y realizando varios lavados durante este tiempo.



Figura 16. Cámara de vidrio para tejido aislado convencional.

Una vez transcurrido ese tiempo se registran 5 min previos a la administración del fármaco, es decir el tiempo basal, y 5 min post – administración de las sustancias a estudiar, con los parámetros de calibración, oprimiendo el botón de “Start” en la PC (el cual debe estar en color verde, y una vez que se inicia el registro cambia a “Stop” y color gris). En el caso particular de las curvas en las cuales se estudian dos fármacos, uno preincubado y otro añadido al término de dicha incubación, el primero se añade al sistema 15 min antes (preincubación) de los 5 min correspondientes al tiempo basal y el segundo al término de esos 15 min y registrándose 5 min de post-aplicación (se va a tener un total de 20 min de registro para este tipo de curvas). Al término del registro se toma nota de las

señales obtenidas (la forma de las ondas) y se guarda el registro como archivo en la memoria interna de la PC. Los datos de frecuencia (FREC), amplitud (AMP) y área bajo la curva (ABC) generados por el experimento son registrados en tiempo real para su posterior análisis en la PC mediante la utilización del software *AcqKnowledge V3.8.1* (BIOPAC Systems). Posteriormente, los datos se vierten en una hoja de cálculo (Microsoft-Excel) para obtener los promedios y con éstos calcular el porcentaje de respuesta máxima de cada uno de los parámetros para poder graficarlos y así obtener una CDRG. Con esta curva se calcula la concentración de inhibición al 50% (CI₅₀).

Experimento 1. Efecto del vehículo 1 (Tween 80 al 5%) sobre la actividad espontánea del duodeno. En este experimento se utiliza el vehículo 1 al 5% ya que en pruebas piloto se determinó que a ésta concentración dicho vehículo no influye en la respuesta del tejido y las sustancias de estudio se disuelven óptimamente en él. En la Tabla 4 se muestran los volúmenes ocupados de dicho compuesto para la realización de la curva correspondiente, para la cual, se registran 5 minutos basales y 5 min post-aplicación del vehículo.

Tabla 4. Volúmenes utilizados para la curva del vehículo 1.

Concentración del vehículo 1	Volumen [µL]
5%	10
	20
	40
	80
	160
	320

Experimento 2. Efecto del vehículo 2 (DMSO al 100%) sobre la actividad espontánea del duodeno. En este experimento se utiliza el vehículo 2 al 100%, ya que a una concentración más baja del mismo, el LUZ no se disuelve completamente, tiende a precipitarse. En la Tabla 5 se muestran los volúmenes ocupados de dicho compuesto para la realización de la curva correspondiente, para la cual, se registran 5 min basal y 5 min post-aplicación del vehículo.

Tabla 5. Volúmenes utilizados para la curva del vehículo 2.

Concentración del vehículo 2	Volumen [μL]
5%	5
	20
	80

Experimento 3. Efecto de la Melatonina (MT) sobre la actividad espontánea del duodeno. En este experimento se utilizan concentraciones bajas de MT (0.65 μg/mL – 7.5 μg/mL), ya que se ha reportado que a dichas concentraciones la hormona causa contracción del tejido duodenal, y altas (10.0 μg/mL – 320 μg/mL), pues con éstas se consigue la relajación del tejido ^(10, 54). En la tabla 6 se muestran las concentraciones utilizadas de dicho compuesto para la realización de la curva correspondiente, para la cual se registran 5 min basal y 5 min post-administración del compuesto. La MT se disolvió en el vehículo 1.

Tabla 6. Concentraciones utilizadas para la curva correspondiente a MT.

Concentración de MT [μg/mL]
0.65
1.25
2.5
5.0
7.5
10
20
40
80
160
320

Experimento 4. Efecto del análogo M1A sobre la actividad espontánea del duodeno. En este experimento se utilizan las mismas concentraciones del análogo M1A que se probaron con MT, bajas (0.65 μg/mL – 7.5 μg/mL) y altas (10.0 μg/mL – 320 μg/mL), ya que se desea comparar el efecto de dicho compuesto con el de MT. Se registraron 5 min basal y 5 min post-administración del compuesto. El análogo M1A se disolvió en el vehículo 1.

Experimento 5. Efecto del antagonista Luzindol (LUZ) sobre la actividad espontánea del duodeno. En este experimento se utiliza el antagonista a MT, el LUZ. Para este experimento y los siguientes se emplean solo tres concentraciones de prueba: 5 µg/mL, 20 µg/mL y 80 µg/mL, para realizar la curva correspondiente, en la cual se registran 5 min basal y 5 min post-administración del compuesto. El LUZ se disolvió en el vehículo 2.

Experimento 6. Efecto del antagonista LUZ + MT sobre la actividad espontánea del duodeno (LUZ preincubado). En un estudio realizado por Drago y col., ⁽⁵⁴⁾ en el cual se desea conocer la actividad de la MT en el intestino, el LUZ se administra al roedor 15 min antes de administrar la MT. Por lo que en este experimento se realiza algo similar al añadir al baño donde se encuentra el tejido aislado el LUZ 15 min antes de añadir la MT y así observar qué es lo que sucede con la actividad de la hormona en presencia de dicho antagonista y compararla con aquella que presenta cuando se añade sola en el sistema. Se utilizan las mismas concentraciones para ambos compuestos: 5 µg/mL, 20 µg/mL y 80 µg/mL.

Experimento 7. Efecto del antagonista LUZ + el análogo M1A sobre la actividad espontánea del duodeno. Aquí se procede igual que en el experimento anterior. Se desea conocer qué es lo que sucede con la actividad del análogo en presencia de LUZ, para compararla con aquella que presenta cuando se añade solo al sistema.

Experimento 8. Efecto del análogo M1A + MT sobre la actividad espontánea del duodeno. Nuevamente se procede como en los experimentos anteriores, solo que en este caso el análogo M1A es el que se preincuba 15 min antes de añadir la MT al sistema convencional aislado. De esta manera se conocerá la actividad de la MT en presencia del análogo M1A y se comparará con aquella que presenta cuando se añade sola en el sistema.

IV. Método estadístico para el análisis de datos.

La prueba de hipótesis se basa en los valores estimados de parámetros como la desviación estándar (DS) y/o promedio poblacional. En ésta se manejan dos hipótesis conocidas como nula y alterna. Las pruebas de hipótesis se dividen en pruebas paramétricas, que se aplican a variables continuas con una distribución normal dentro de las cuales podemos mencionar el análisis de varianza o ANDEVA, y pruebas no paramétricas, las cuales no utilizan los valores de promedio o desviación estándar. ⁽⁵¹⁾

Análisis de Varianza (ANDEVA).

En ocasiones es necesario poner a prueba la hipótesis en donde se consideran más de dos poblaciones simultáneamente y comparar las medias de más de dos poblaciones cuando se trabaja con una variable que se distribuye normalmente. El método que permite hacer estas comparaciones, llamado análisis de varianza o ANDEVA, es de hecho una colección de métodos para la prueba de hipótesis sobre dos o más medias. El tipo de análisis de varianza que se aplica en cada caso depende de cómo estén relacionados los elementos de cada muestra con los de otras. Por ejemplo, si se desea aplicar el análisis de varianza al caso de dos medias, se debe usar un método de la colección si las muestras son independientes y otro si son pareadas. Para nuestro fin, se utilizó el análisis de varianza en dos vías o Diseño en Bloques Aleatorizados Completos, el cual nos permite averiguar si hay diferencias entre más de dos medias poblacionales comparando la variabilidad entre muestras (explicada por la hipótesis de investigación H_{inv}) con la variabilidad dentro de muestras (no explicada por H_{inv}) y, además, toma en cuenta todas las variables externas (también llamada exógenas o extrínsecas) que puedan influir fuertemente sobre el resultado del experimento. La prueba de ANOVA fue empleada para los parámetros correspondientes a los resultados de FREC, AMP y ABC, con un nivel de significancia de 5% o $P = 0.05$, ya que en los estudios de grupos múltiples es deseable conocer si hay o no una indicación de significancia. Posteriormente al cálculo del

ANDEVA, se empleó una prueba complementaria al análisis, que en este caso fue la prueba de Tuckey, la cual se aplica cuando se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se afirma que por lo menos dos de las medias difieren entre sí, pero no se sabe cuáles son, entonces aplicamos esta prueba para saber cuáles parejas de medias son significativamente distintas. También, en algunos casos puede aplicarse esta prueba cuando, antes de efectuar el ANDEVA se cree que vale la pena comparar entre sí algunos pares de medias muestrales para ver si difieren en forma significativa. ⁽⁵¹⁾

CAPÍTULO IV. RESULTADOS.

Una vez obtenidos los registros de la actividad eléctrica espontánea del tejido duodenal aislado en la PC, se cuantificaron los siguientes parámetros: Frecuencia (FREC en Hz.), Amplitud (AMP en cm.) y Área Bajo la Curva (ABC, en cm^2) por medio del software *AcqKnowledge* del Sistema Biopac, obteniendo así sus datos cuantitativos.

Experimento 1. Efecto del vehículo 1 (Tween 80 al 5%) sobre la actividad espontánea del duodeno.

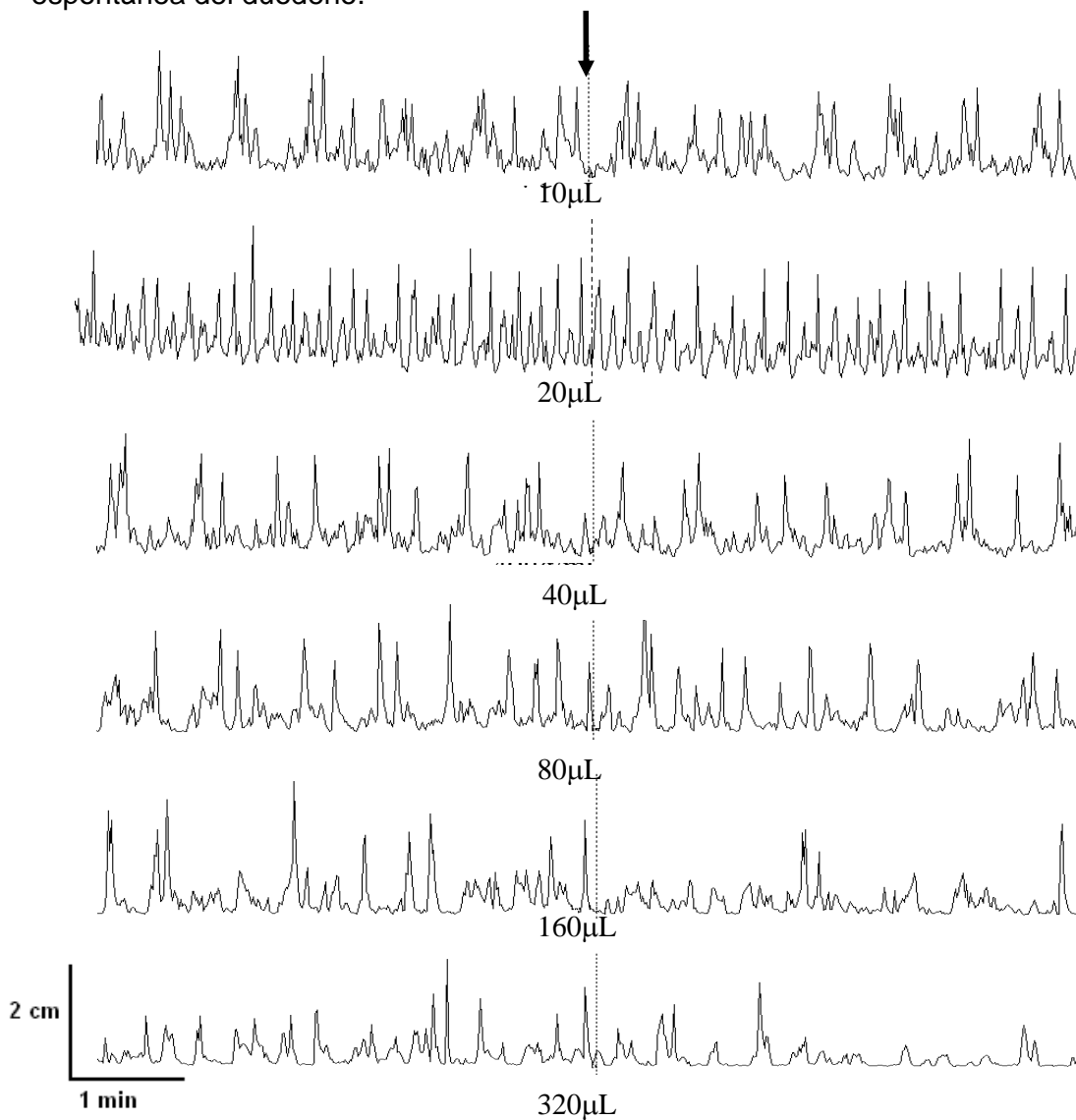
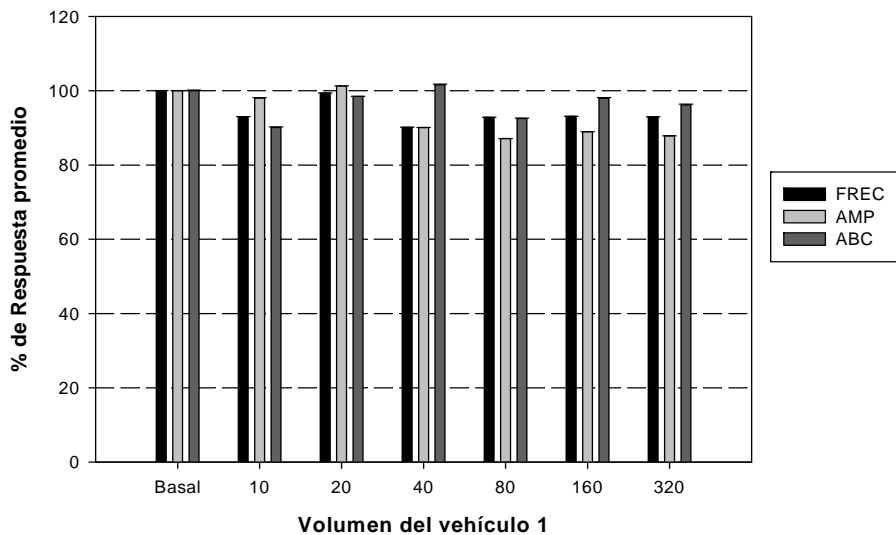


Figura 17. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo 1, basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 7 y Gráfica 1.

Tabla 7. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del vehículo 1 y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3)

Porcentajes promedio con aplicación del vehículo 1									
Volumen en μL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
10	0.3055	0.2753	90.10	0.1560	0.1529	98.04	0.4872	0.4532	93.01
20	0.2744	0.2702	98.47	0.1954	0.1980	101.33	0.6112	0.6074	99.37
40	0.2911	0.2957	101.60	0.1836	0.1703	92.78	0.4093	0.3690	90.15
80	0.2989	0.2766	92.52	0.1611	0.1468	91.12	0.3423	0.3178	92.84
160	0.3041	0.2978	97.93	0.1428	0.1326	92.85	0.2673	0.2489	93.10
320	0.3095	0.2976	96.17	0.1352	0.1248	92.34	0.2496	0.2320	92.97



Gráfica 1. Valores del % de respuesta promedio (n=3 \pm D.S.) de la FREC, AMP y ABC con la administración del vehículo 1 en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%

De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 7, el vehículo 1 no influye significativamente ($p = 0.05$) en la actividad muscular espontánea del tejido. Por lo tanto, no se realizaron las curvas dosis-respuesta gradual para este compuesto y no se calculó, por la misma razón, la concentración del vehículo 1 a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la contracción del tejido.

Experimento 2. Efecto del vehículo 2 (DMSO al 100%) sobre la actividad espontánea del duodeno.

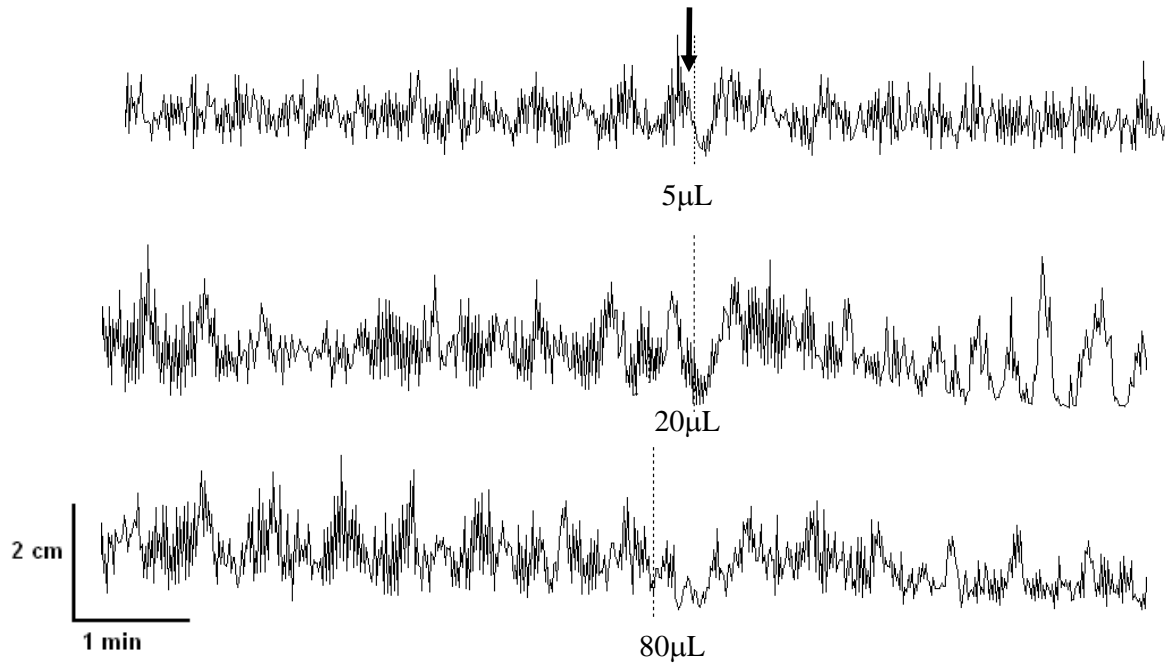
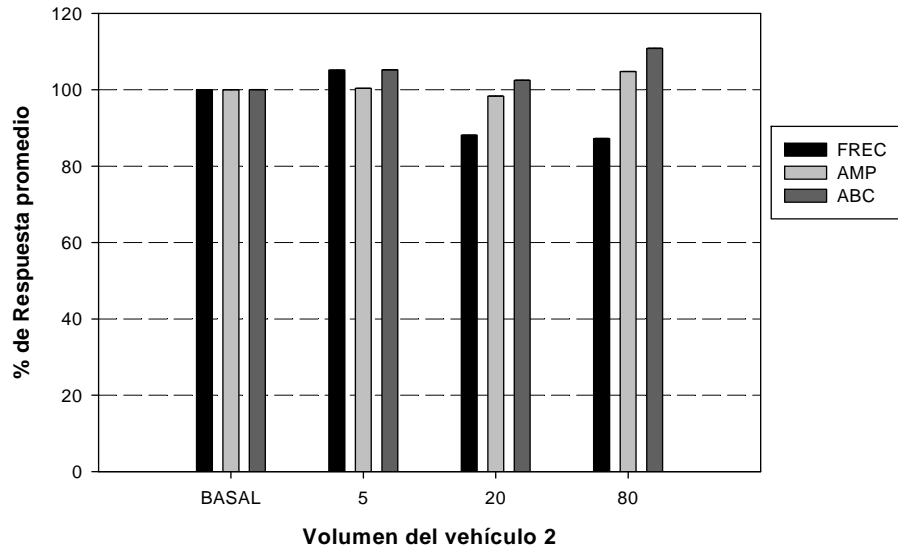


Figura 18. Registro obtenido con la aplicación de la solución vehículo 2 basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 8 y Gráfica 2.

Tabla 8. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del vehículo 2 y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3)

Porcentajes promedio con aplicación del vehículo 2									
Volumen en $\mu\text{g/mL}$	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
5	0.4262	0.4482	105.16	0.1383	0.1388	100.40	0.2230	0.2346	105.20
20	0.4325	0.3810	88.10	0.1121	0.1103	98.35	0.2317	0.2374	102.48
80	0.4126	0.3599	87.24	0.1290	0.1351	104.77	0.3063	0.3395	110.84



Gráfica 2. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de la FREC, AMP y ABC con la administración del vehículo 2 en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%

De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 8, el vehículo 2 no influye significativamente ($p = 0.05$) en la actividad muscular espontánea del tejido. Por lo tanto, no se realizaron las curvas dosis-respuesta gradual para este compuesto y no se calculó, por la misma razón, la concentración del vehículo 1 a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la contracción del tejido.

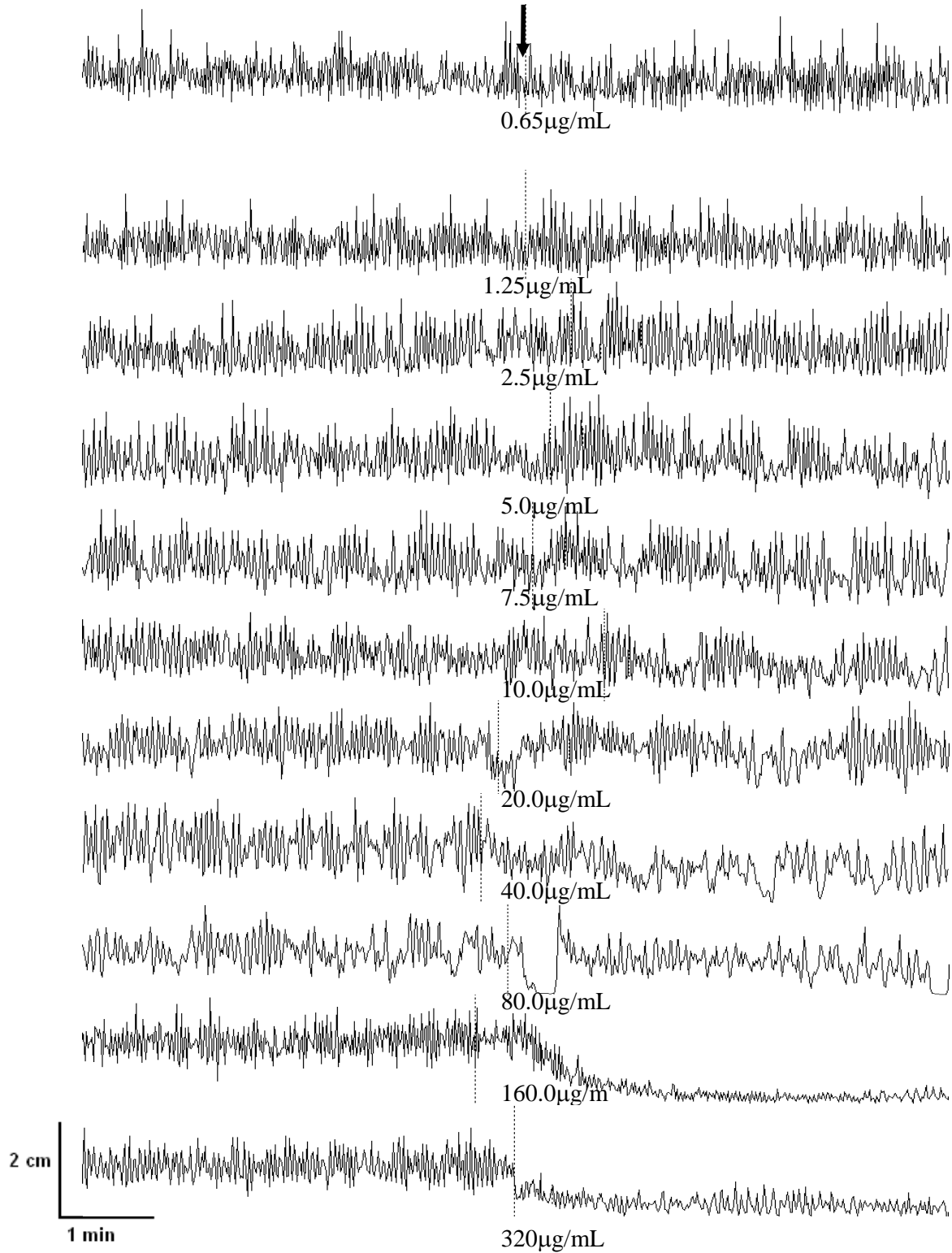
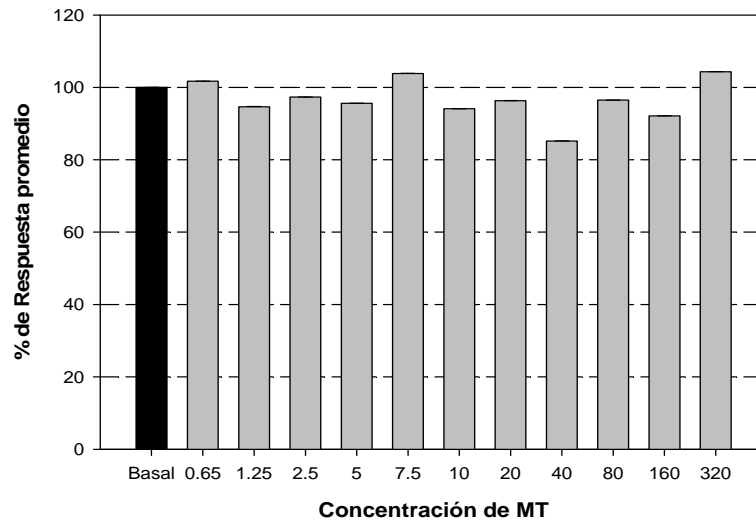
Experimento 3. Efecto de la Melatonina (MT) sobre la actividad espontánea del duodeno.

Figura 19. Registro obtenido con la aplicación de MT basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

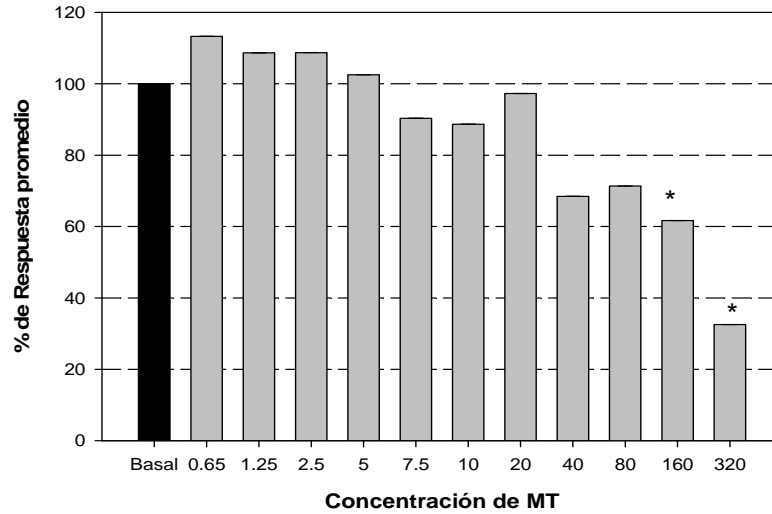
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 9 y Gráficas 3, 4 y 5.

Tabla 9. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración de MT y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3)

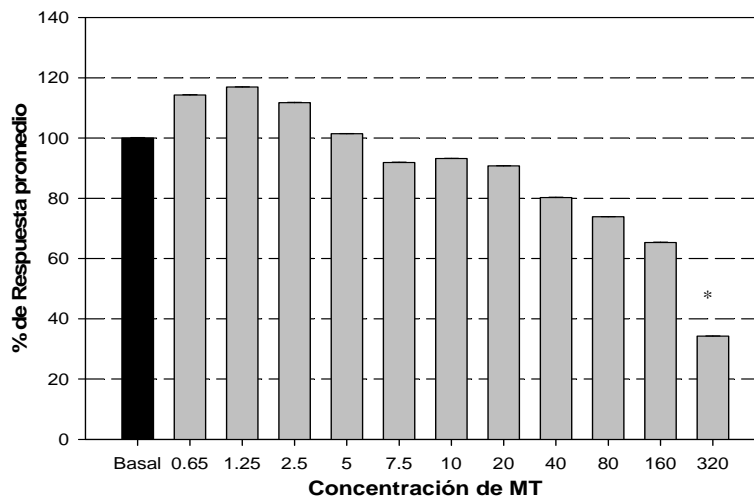
Porcentajes promedio con aplicación de MT									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	% resp.	basal	post-aplicación	% resp.	basal	post-aplicación	% resp.
0.65	0.3975	0.4042	101.69	0.0640	0.0725	113.28	0.1524	0.1742	114.30
1.25	0.3918	0.3708	94.64	0.0751	0.0816	108.66	0.1814	0.2121	116.92
2.5	0.3618	0.3521	97.32	0.0826	0.0898	108.72	0.2290	0.2559	111.75
5.0	0.3486	0.3332	95.58	0.0964	0.0988	102.49	0.2718	0.2757	101.43
7.5	0.3325	0.3452	103.82	0.1002	0.0905	90.32	0.2830	0.2600	91.87
10	0.3632	0.3418	94.11	0.1004	0.0890	88.65	0.2650	0.2470	93.21
20	0.3345	0.3223	96.35	0.0942	0.0916	97.24	0.2535	0.2300	90.73
40	0.3293	0.2806	85.21	0.1036	0.0709	68.44	0.2953	0.2371	80.29
80	0.2970	0.2865	96.46	0.0956	0.0682	71.34	0.3069	0.2267	73.87
160	0.3488	0.3213	92.12	0.0754	0.0465	61.67	0.2066	0.1350	65.34
320	0.2834	0.2957	104.34	0.1833	0.0596	32.52	0.5220	0.1789	34.27



Gráfica 3. Valores del % de respuesta promedio (n=3 ± D.S.) de la FREC con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%

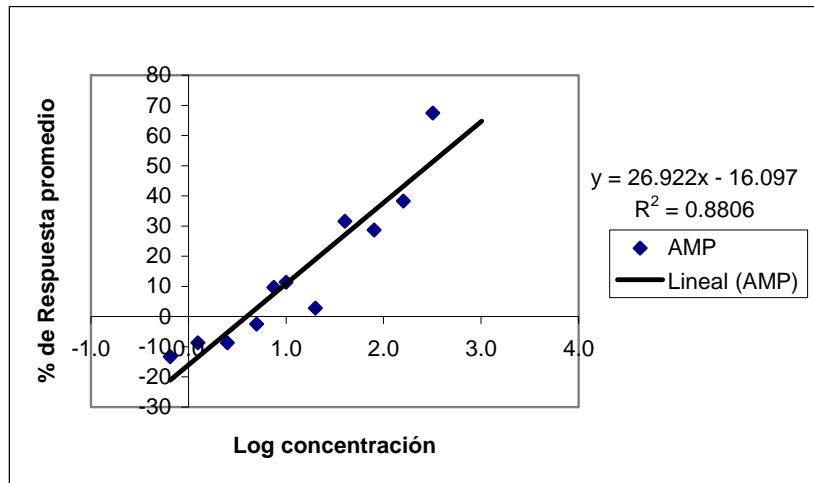


Gráfica 4. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de la AMP con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. * denota diferencia significativa a $p = 0.05$

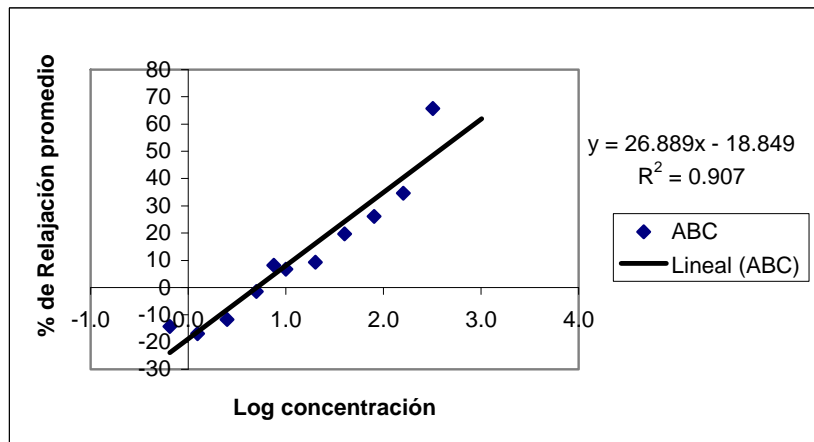


Gráfica 5. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) del ABC con la administración de MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. * denota diferencia significativa a $p = 0.05$

A partir de los datos expuestos en la Tabla 9, se obtuvieron las CDRG para los parámetros de AMP y ABC, graficando el logaritmo de la concentración vs el porcentaje de respuesta. Con esta gráfica se calculó la concentración de MT a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido.



Gráfica 6. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones de MT.



Gráfica 7. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones de MT.

Con las gráficas de CDRG para los datos de AMP y ABC se calculó la concentración de MT a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido. Para la AMP se obtuvo un valor de $CI_{50} = 285.18\mu\text{g/mL}$ y para el ABC fue de $CI_{50} = 363.48\mu\text{g/mL}$.

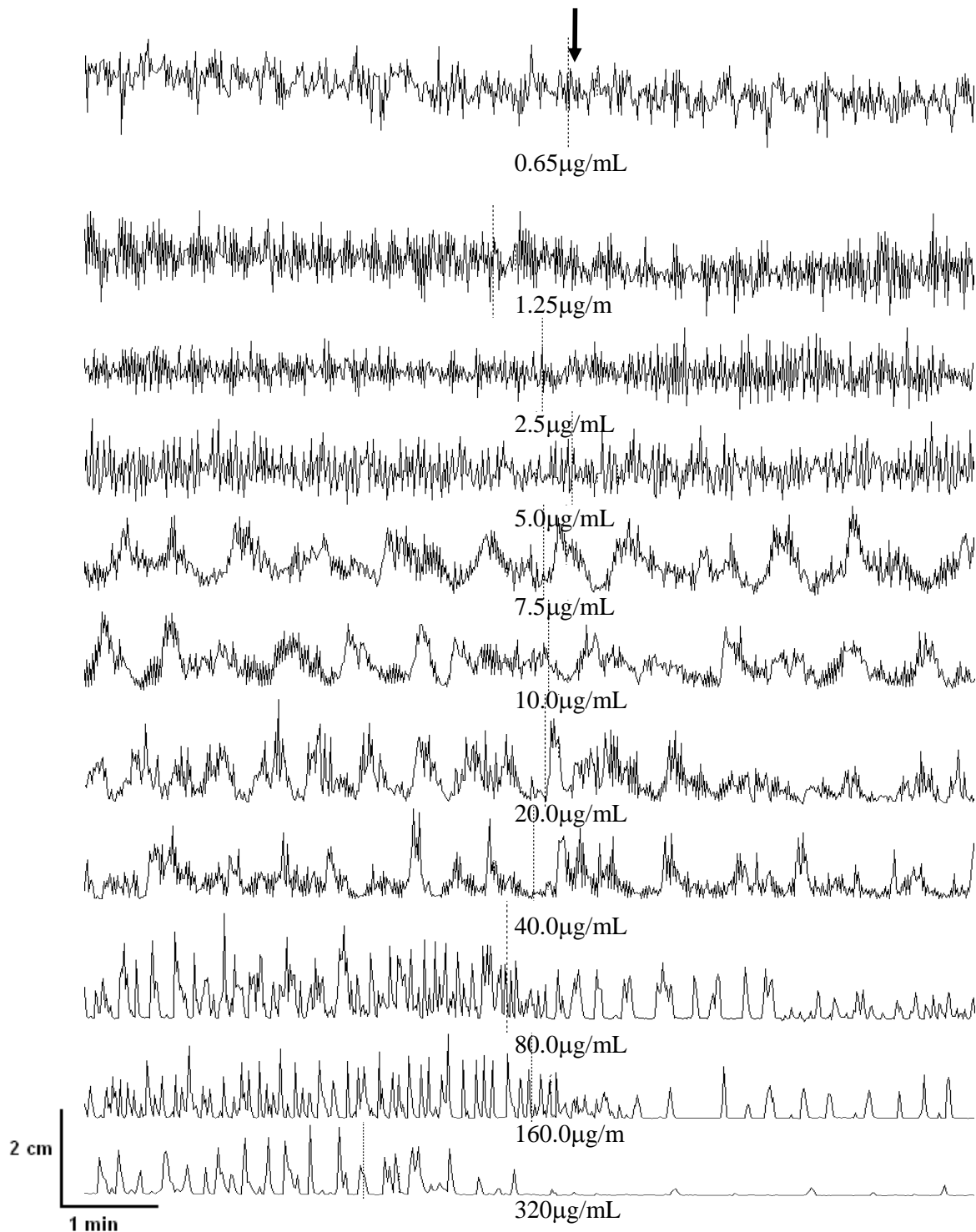
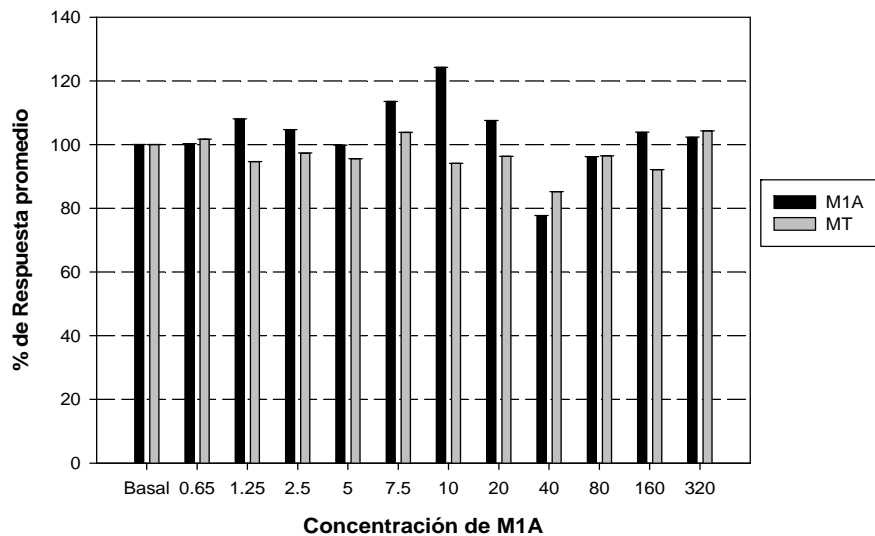
Experimento 4. Efecto del análogo M1A sobre la actividad espontánea del duodeno.

Figura 20. Registro obtenido con la aplicación del análogo M1A basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

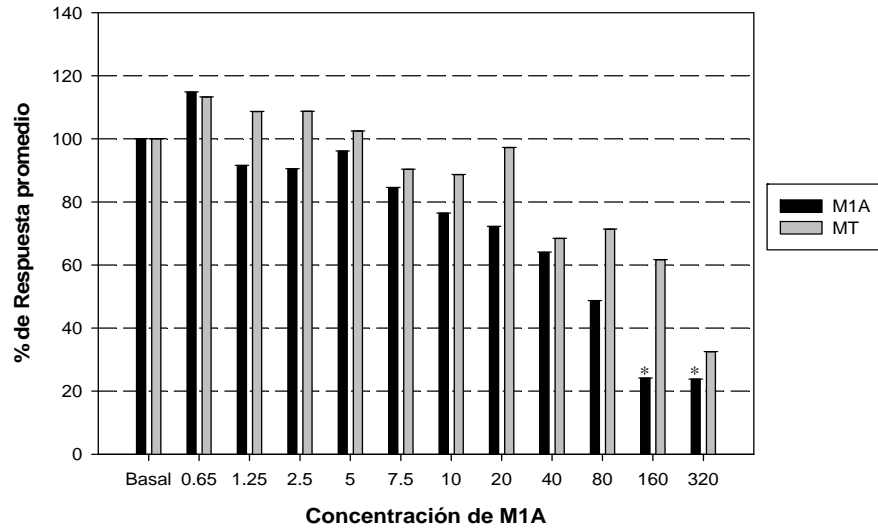
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 10 y Gráficas 8, 9 y 10.

Tabla 10. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del análogo M1A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3)

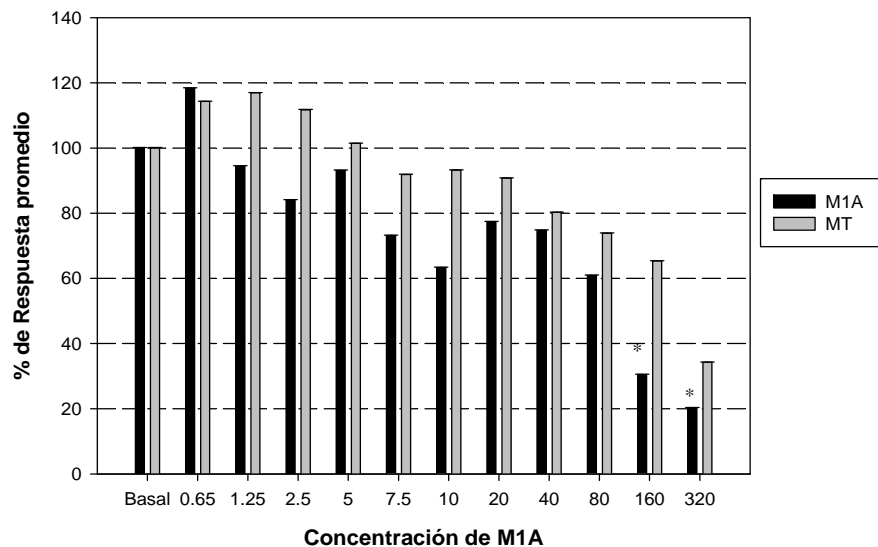
Porcentajes promedio con aplicación de M1A									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	% resp.	basal	post-aplicación	% resp.	basal	post-aplicación	% resp.
0.65	0.40	0.40	100.30	0.10	0.11	114.84	0.22	0.26	118.36
1.25	0.38	0.41	108.08	0.19	0.17	91.52	0.44	0.42	94.43
2.5	0.42	0.44	104.71	0.16	0.15	90.45	0.38	0.32	84.10
5.0	0.47	0.46	99.83	0.15	0.14	96.11	0.30	0.28	93.16
7.5	0.42	0.48	113.53	0.19	0.16	84.52	0.42	0.31	73.17
10	0.36	0.45	124.29	0.22	0.17	76.43	0.53	0.33	63.34
20	0.31	0.34	107.54	0.22	0.16	72.19	0.53	0.41	77.29
40	0.44	0.34	77.70	0.22	0.14	64.01	0.44	0.33	74.74
80	0.38	0.36	96.19	0.17	0.08	48.68	0.51	0.31	60.89
160	0.29	0.30	103.81	0.20	0.05	24.14	0.43	0.13	30.47
320	0.30	0.30	102.29	0.11	0.03	23.81	0.36	0.07	20.35



Gráfica 8. Valores del % de respuesta promedio (n=3 ± D.S.) de FREC con la administración del análogo M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se presenta la respuesta obtenida con la MT.

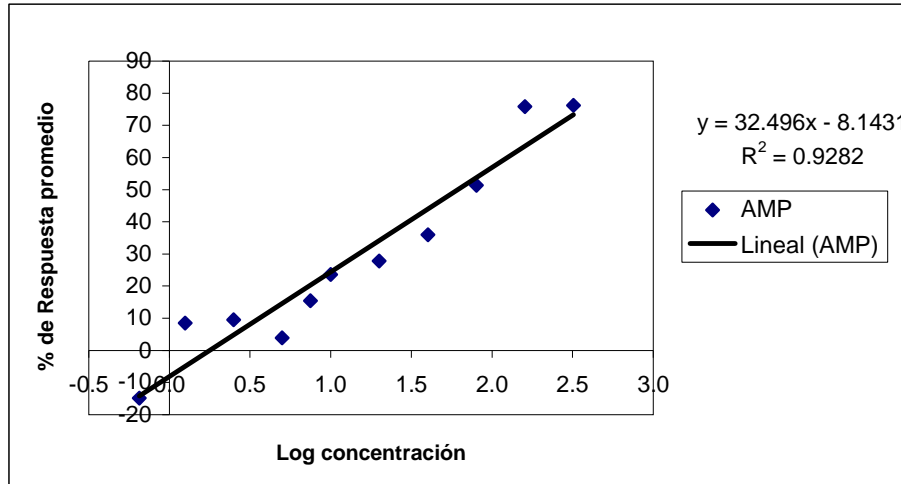


Gráfica 9. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de AMP con la administración del análogo M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se presenta la respuesta obtenida con la MT.

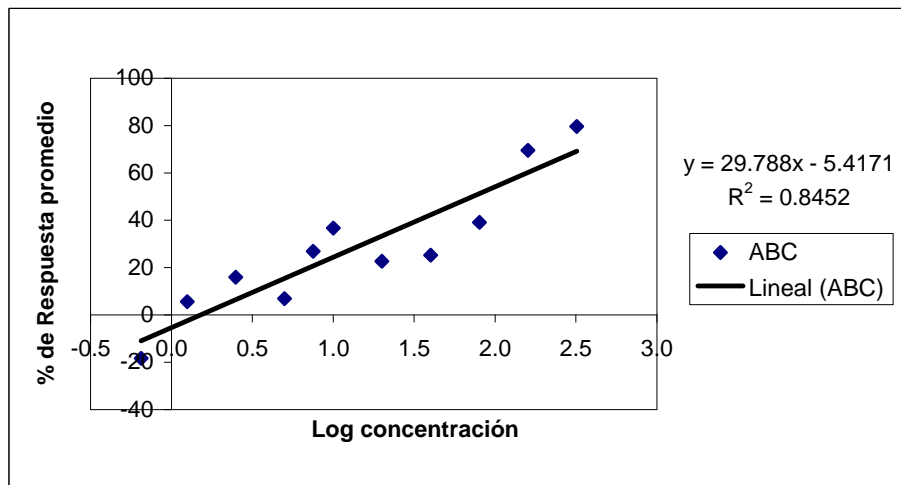


Gráfica 10. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de ABC con la administración del análogo M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se presenta la respuesta obtenida con la MT.

A partir de los datos expuestos en la Tabla 10, se obtuvieron las CDRG para los parámetros de AMP y ABC, graficando el logaritmo de la concentración vs el porcentaje de respuesta. Con esta gráfica se calculó la concentración del análogo M1A a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido.



Gráfica 11. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones de M1A.



Gráfica 12. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones de M1A.

Con las gráficas de CDRG para los datos de AMP y ABC se calculó la concentración de M1A a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido. Para la AMP se obtuvo como resultado un valor de $CI_{50} = 61.55\mu\text{g/mL}$ y para el ABC fue de $CI_{50} = 72.50\mu\text{g/mL}$.

Experimento 5. Efecto del antagonista Luzindol (LUZ) sobre la actividad espontánea del duodeno.

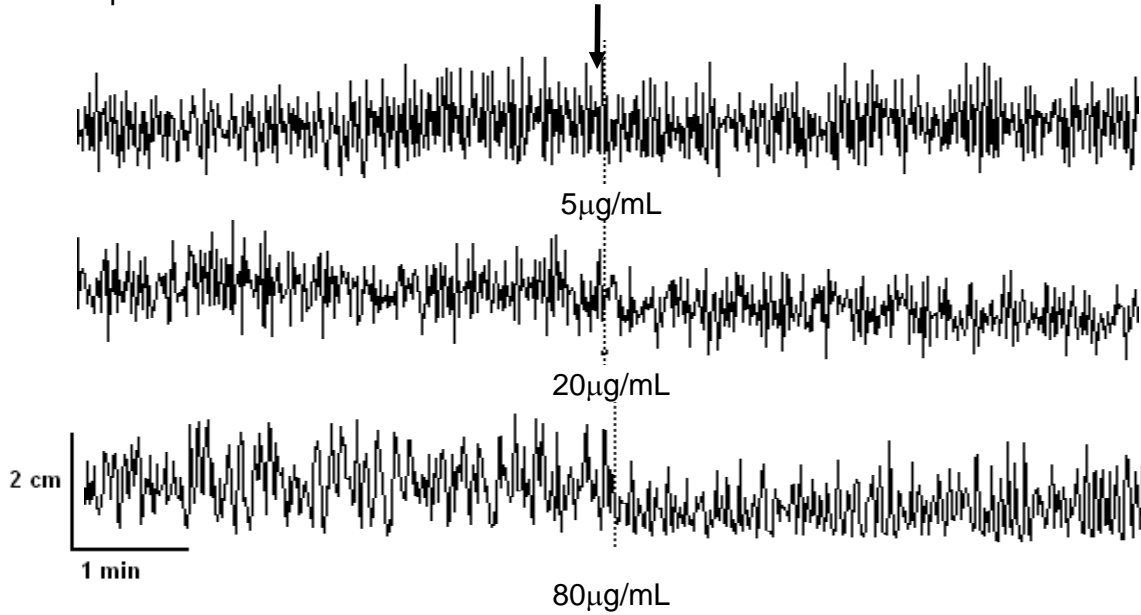
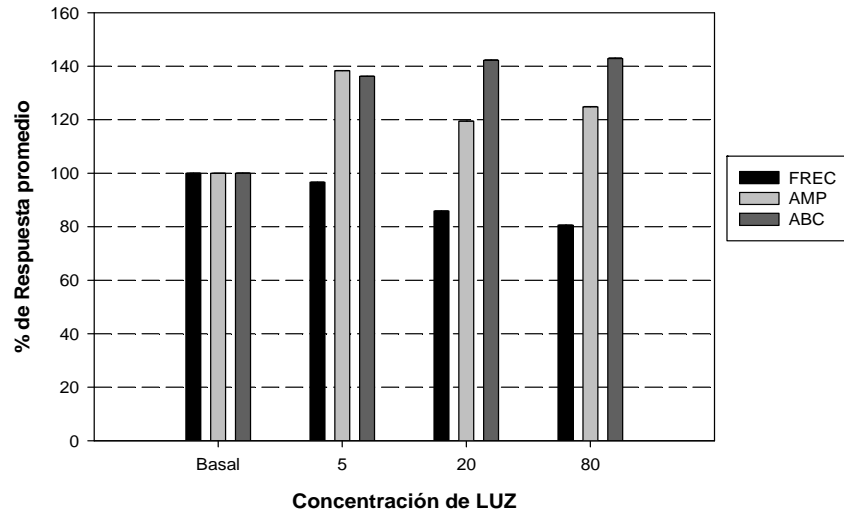


Figura 21. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 11 y Gráfica 13.

Tabla 11. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del antagonista LUZ y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3).

Porcentajes promedio con aplicación del antagonista LUZ									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
5	0.3751	0.3625	96.64	0.0853	0.1180	138.34	0.1990	0.2712	136.28
20	0.3645	0.3130	85.87	0.0910	0.1087	119.45	0.2157	0.3068	142.23
80	0.3161	0.2548	80.61	0.1046	0.1306	124.86	0.3081	0.4402	142.88



Gráfica 13. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de la FREC, AMP y ABC con la administración del antagonista LUZ en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%

De acuerdo a los datos presentados en la Tabla 11, el antagonista LUZ no influye de manera significativa ($P = 0.05$) en la actividad muscular espontánea del tejido. Por lo tanto, no se realizaron las curvas dosis-respuesta gradual para este compuesto y no se calcularon, por la misma razón, la concentración del antagonista LUZ a la que se inhibe el 50% (CI_{50}) de la contracción del tejido.

Experimento 6. Efecto del antagonista Luzindol (LUZ) + Melatonina (MT) sobre la actividad espontánea del duodeno (LUZ preincubado):

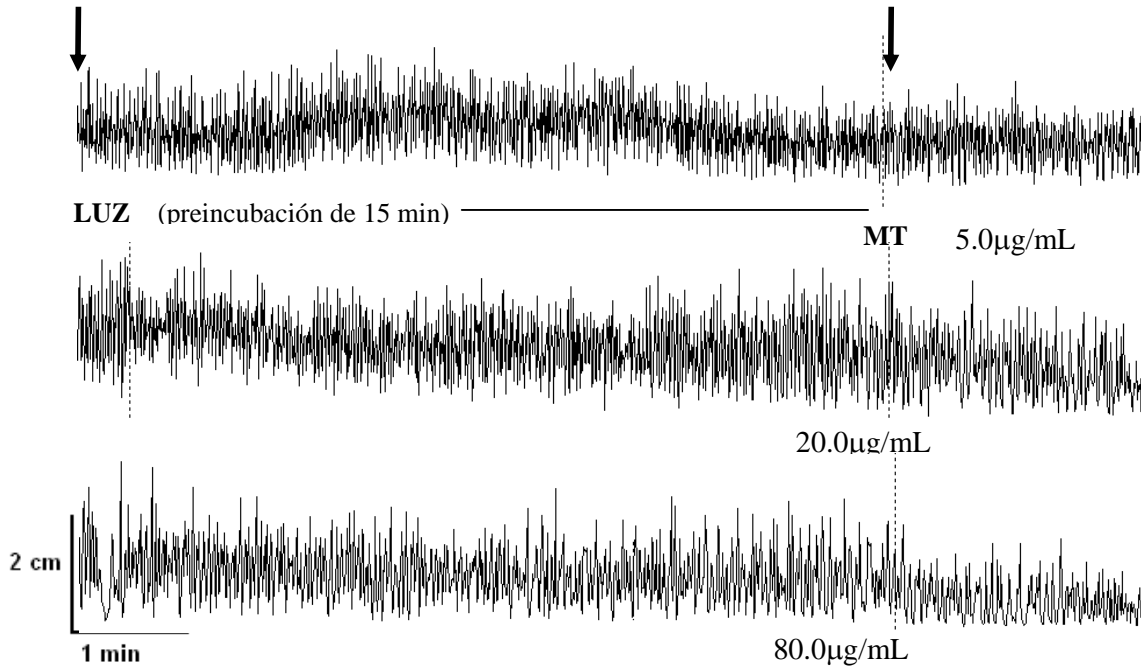
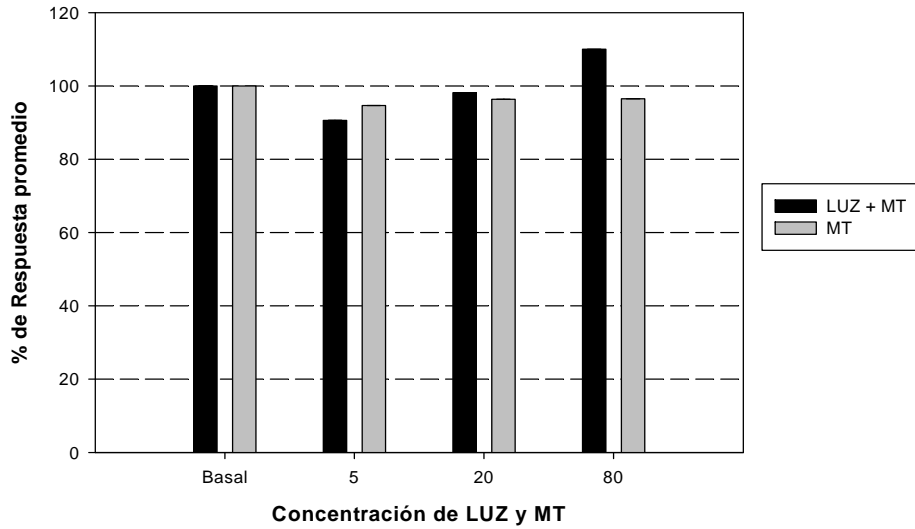


Figura 22. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ + MT preincubado basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

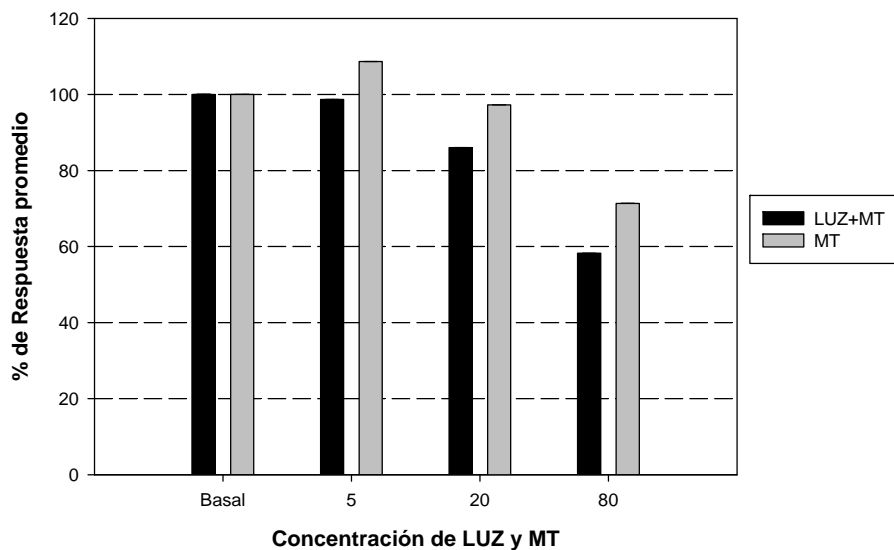
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 12 y Gráfica 14, 15 y 16.

Tabla 12. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del antagonista LUZ + MT y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3).

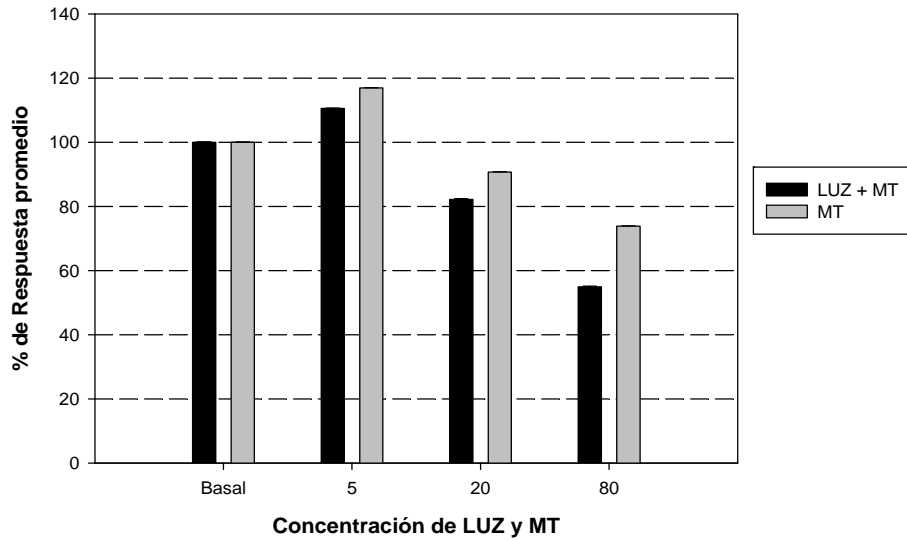
Porcentajes promedio con aplicación del antagonista LUZ + MT									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%
5	0.3440	0.3116	90.58	0.1122	0.1107	98.66	0.2794	0.3090	110.59
20	0.2856	0.2803	98.14	0.1293	0.1112	86.00	0.4167	0.3425	82.19
80	0.2482	0.2731	110.03	0.1207	0.0703	58.24	0.4283	0.2353	54.94



Gráfica 14. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de la FREC con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

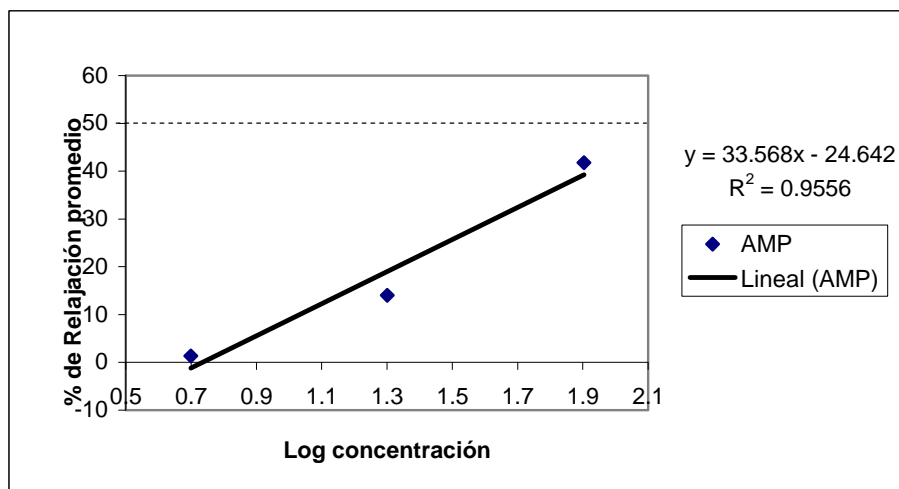


Gráfica 15. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de la AMP con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

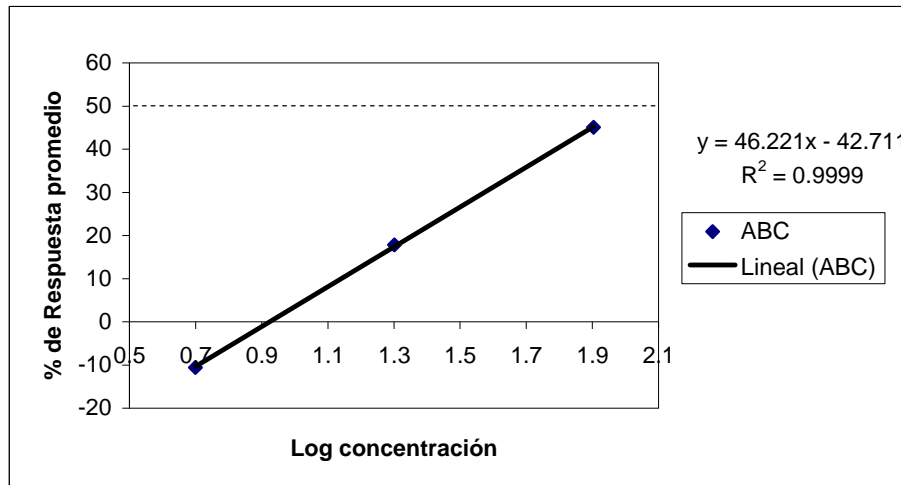


Gráfica 16. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) del ABC con la administración del antagonista LUZ + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

En las Gráficas 14, 15 y 16 no se obtienen diferencias significativas ($p = 0.05$) entre las concentraciones utilizadas y la basal para cada parámetro. A partir de los datos expuestos en la Tabla 12, se obtuvieron las CDRG de los parámetros AMP y ABC, graficando el logaritmo de la concentración vs el porcentaje de respuesta.



Gráfica 17. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + MT.



Gráfica 18. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + MT.

Con las Gráficas 19 y 18 de CDRG para los datos de AMP y ABC no fue posible calcular la concentración de MT a la cual se inhibe el 50% (CI₅₀) de la actividad muscular espontánea del tejido, ya que a ninguna concentración estudiada se inhibe el 50% de la respuesta.

Experimento 7. Efecto del antagonista Luzindol (LUZ) + el análogo M1A sobre la actividad espontánea del duodeno (LUZ preincubado):

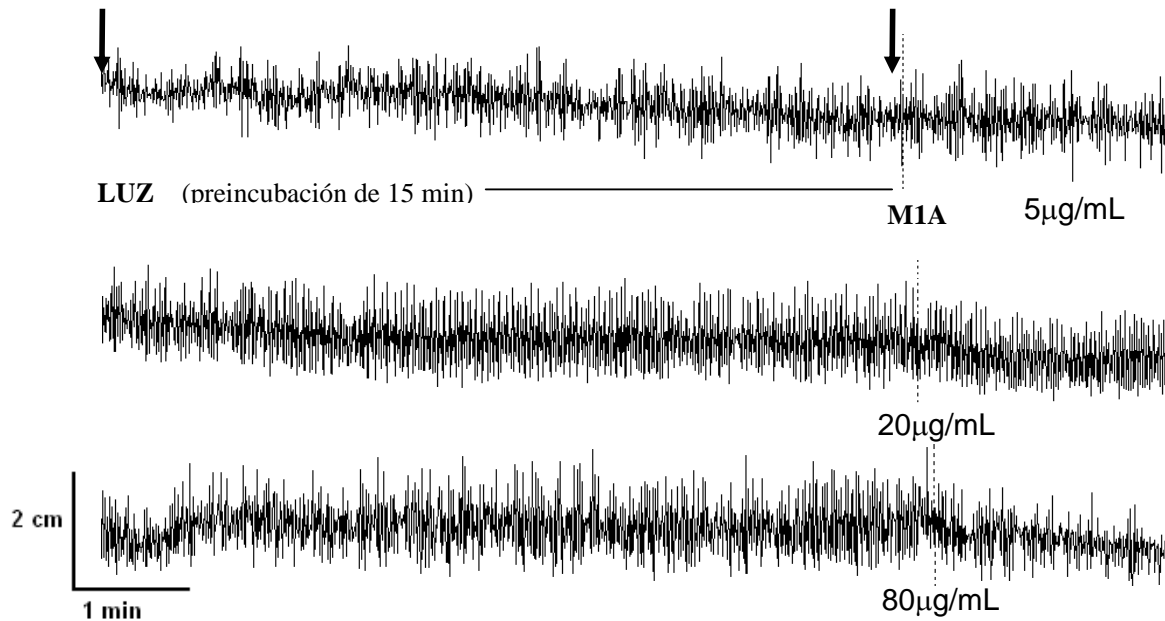
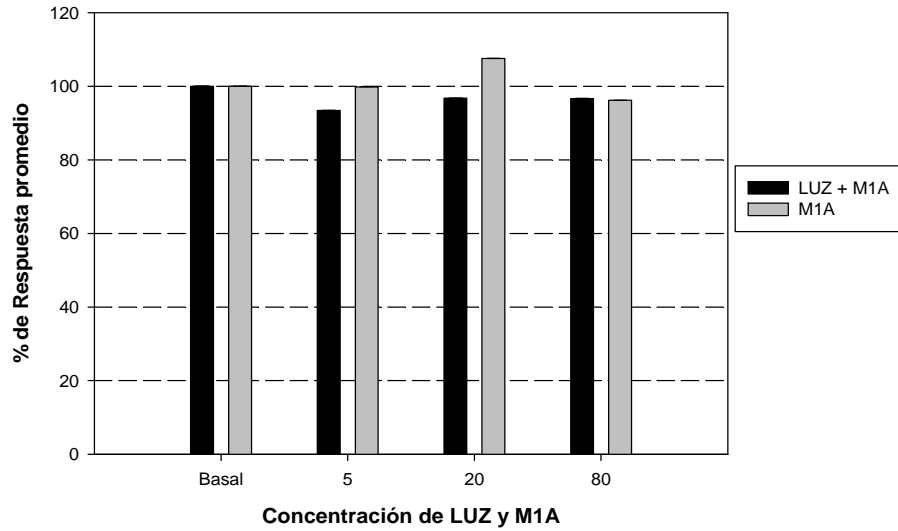


Figura 23. Registro obtenido con la aplicación del antagonista LUZ + el análogo M1A basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

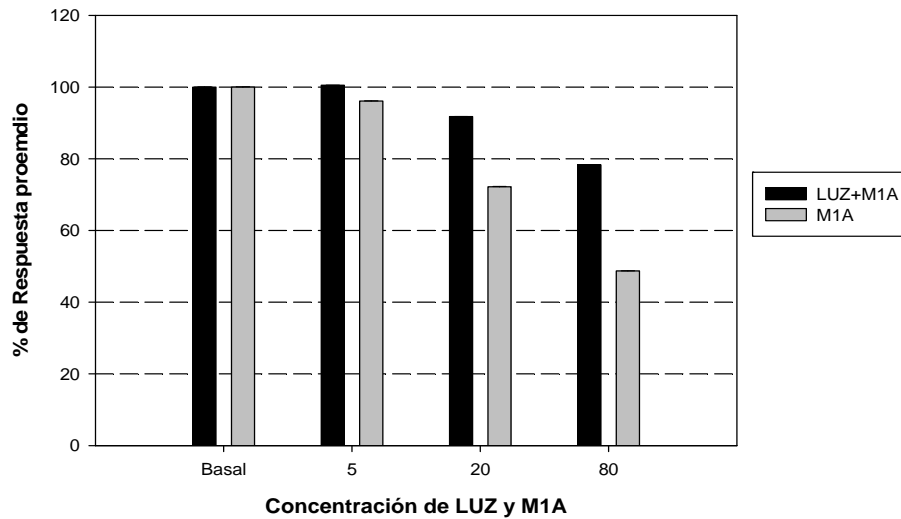
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 13 y Gráfica 19, 20 y 21.

Tabla 13. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del antagonista LUZ + el análogo M1A y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3).

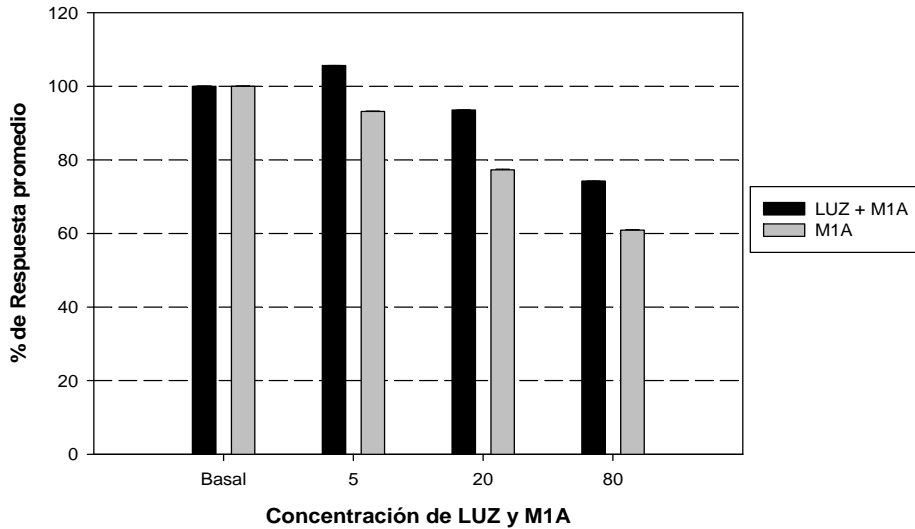
Porcentajes promedio con aplicación del antagonista LUZ + el análogo M1A									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	Post-aplicación	%
5	0.4221	0.3943	93.41	0.0380	0.0382	100.53	0.0800	0.0845	105.63
20	0.3727	0.3607	96.78	0.0631	0.0579	91.76	0.1511	0.1414	93.58
80	0.3370	0.3257	96.65	0.0221	0.0173	78.28	0.0524	0.0389	74.24



Gráfica 19. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de FREQ con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con el análogo M1A.

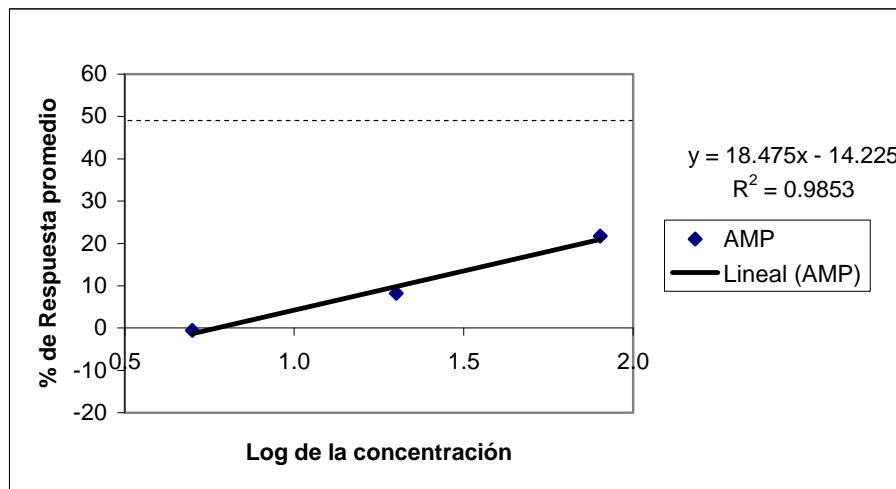


Gráfica 20. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de AMP con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con el análogo M1A.

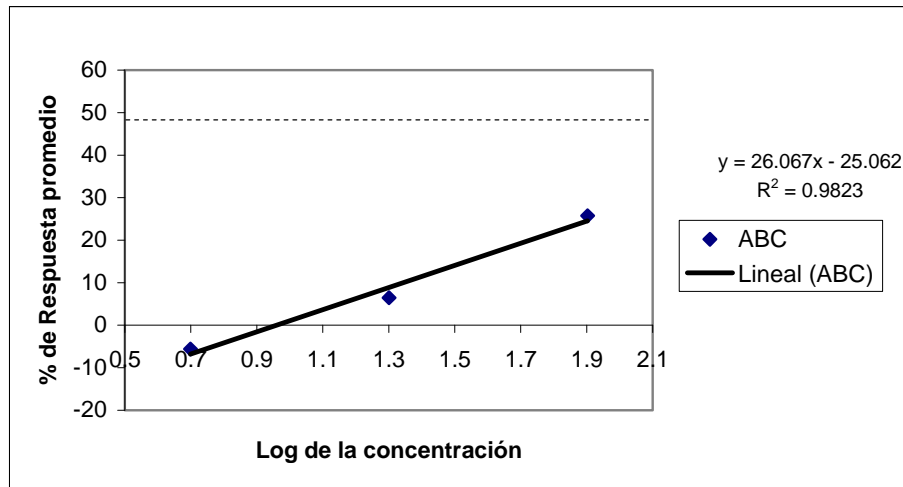


Gráfica 21. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm D.S.$) de ABC con la administración del antagonista LUZ + M1A en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con el análogo M1A.

En las Gráficas 19, 20 y 21 no se obtienen diferencias significativas ($p = 0.05$) entre las concentraciones utilizadas y la basal para cada parámetro. A partir de los datos expuestos en la Tabla 13, se obtuvieron las CDRG de los parámetros AMP y ABC, graficando el logaritmo de la concentración vs el porcentaje de respuesta.



Gráfica 22. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + el análogo M1A.



Gráfica 23. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del antagonista LUZ + el análogo M1A.

Con las Gráficas 22 y 23 de CDRG para los datos de AMP y ABC no fue posible calcular la concentración del análogo M1A a la cual se inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido, ya que a ninguna concentración estudiada se inhibe el 50% de la respuesta.

Experimento 8. Efecto del análogo M1A + MT sobre la actividad espontánea del duodeno (M1A preincubado):

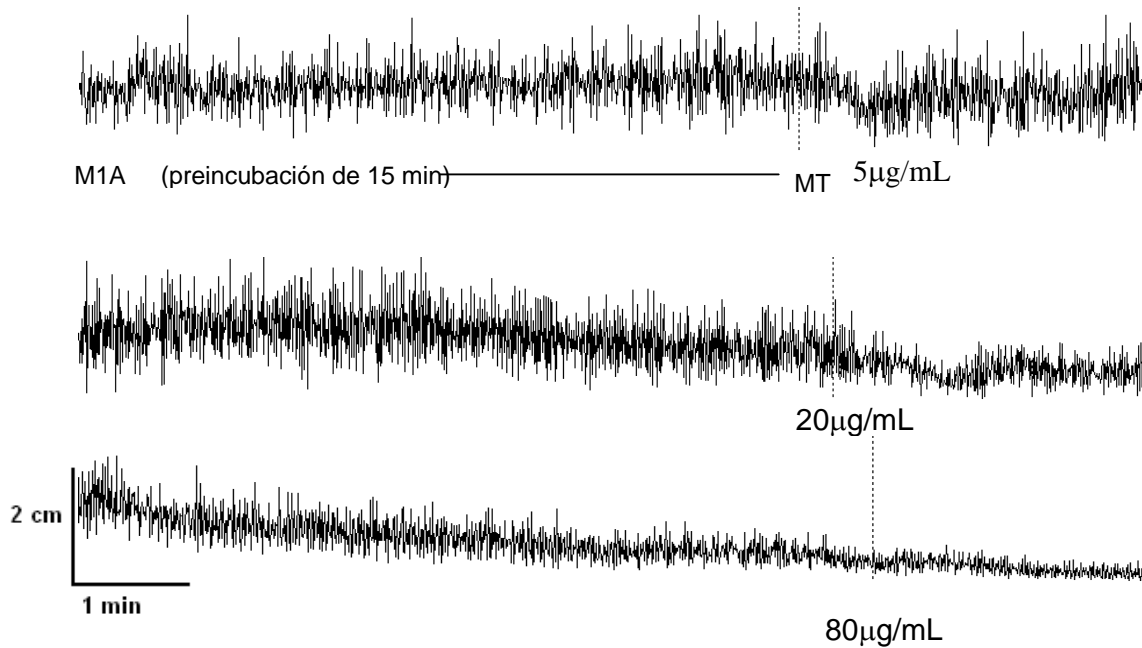
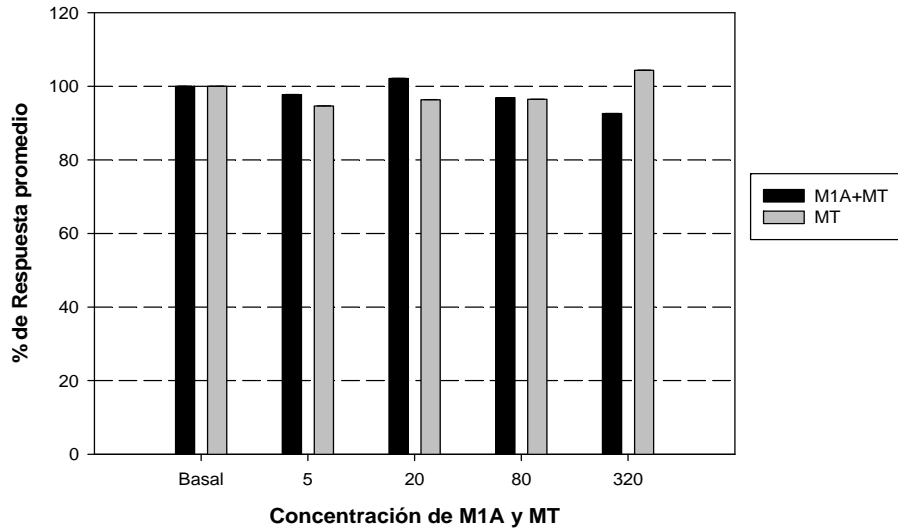


Figura 24. Registro obtenido con la aplicación del análogo M1A + MT basal y post administración. La flecha, así como la línea punteada, indican el momento de la aplicación a las diferentes concentraciones señaladas.

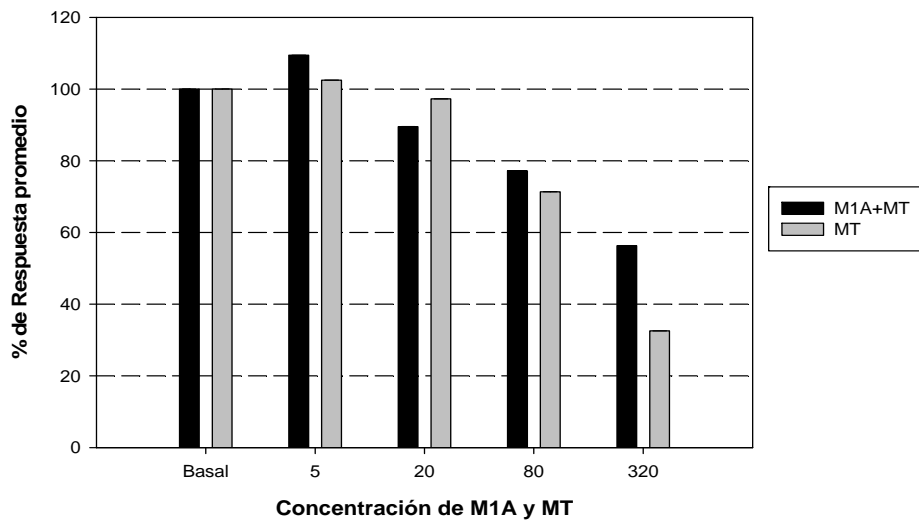
Con el registro anterior se obtienen los parámetros cuantificados, los cuales se muestran en la Tabla 14 y Gráficas 24, 25 y 26.

Tabla 14. Porcentaje de respuesta obtenida con la administración del análogo M1A + MT y los valores promedio de cada registro basal y post-aplicación, tomando a la respuesta basal como el 100% (n=3).

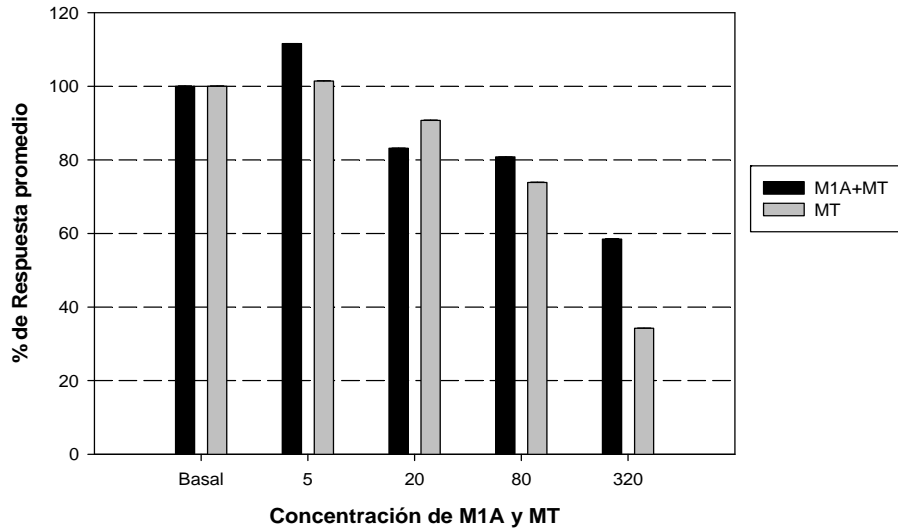
Porcentajes promedio con aplicación del análogo M1A+ MT									
Concentración en µg/mL	FREC			AMP			ABC		
	basal	post-aplicación	%	basal	post-aplicación	%	basal	Post-aplicación	%
5	0.3684	0.3600	97.72	0.0201	0.0220	109.45	0.0510	0.0569	111.57
20	0.3843	0.3925	102.13	0.0763	0.0683	89.52	0.1777	0.1478	83.17
80	0.3935	0.3812	96.87	0.0902	0.0696	77.16	0.2077	0.1678	80.79
320	0.3580	0.3314	92.57	0.0570	0.0321	56.32	0.1519	0.0888	58.46



Gráfica 24. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de la FREC con la administración del análogo M1A + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

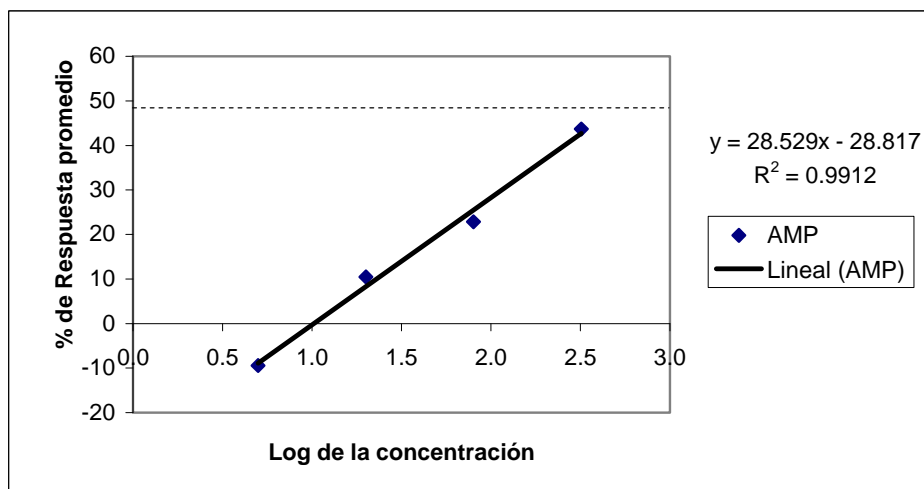


Gráfica 25. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de AMP con la administración del análogo M1A + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

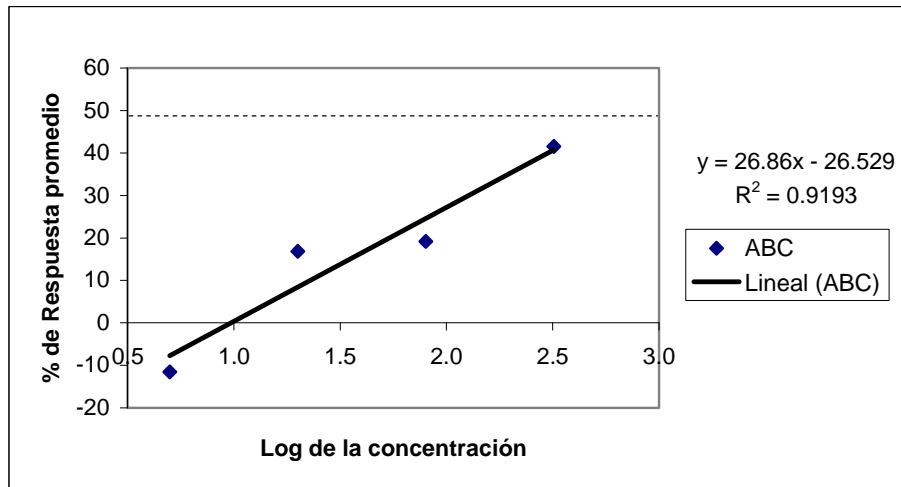


Gráfica 26. Valores del % de respuesta promedio ($n=3 \pm$ D.S.) de ABC con la administración del análogo M1A + MT en el tejido duodenal tomando a la respuesta basal como el 100%. También se observa la respuesta obtenida con la MT.

En las Gráficas 24, 25 y 26 no se obtienen diferencias significativas ($p = 0.05$) entre las concentraciones utilizadas y la basal para cada parámetro. A partir de los datos expuestos en la Tabla 14, se obtuvieron las CDRG de los parámetros AMP y ABC, graficando el logaritmo de la concentración vs el porcentaje de respuesta.



Gráfica 27. Curva dosis-respuesta gradual para AMP con las diferentes concentraciones del análogo M1A + MT.



Gráfica 28. Curva dosis-respuesta gradual para ABC con las diferentes concentraciones del análogo M1A + MT.

Con las Gráficas 27 y 28 de CDRG para los datos de AMP y ABC no fue posible calcular la concentración de MT a la cual se inhibe el 50% (CI₅₀) de la actividad muscular espontánea del tejido, ya que a ninguna concentración estudiada se inhibe el 50% de la respuesta.

DISCUSIÓN.

Por estudios previos se conoce que la concentración de MT en tejidos del TGI rebasa por 10-100 veces a la encontrada en la sangre y que hay al menos 400 veces más MT en el TGI que en la GP. ⁽²⁹⁾ También, se conoce que la liberación de MT por la GP está estrechamente relacionada con la secreción foto periódica, sin embargo, a nivel del TGI parece estar más relacionada con la periodicidad en la ingesta de alimento. ⁽⁵³⁾ En otros estudios se ha indicado que la mayor parte de la concentración de MT en la fotofase (fase de luz) es probablemente de origen GI, generada por las CE del TGI en respuesta a la presencia de alimento en ese sitio. ⁽⁵³⁾ Aunque, también, se ha encontrado que al menos una porción de la MT detectada en el TGI es de origen pineal especialmente, durante la escotofase (fase de oscuridad). ⁽²⁹⁾

La detección de la MT endógena en el TGI se ha realizado mediante análisis inmunohistológicos, por radio-inmunoensayo y por CLAR en las CE de la mucosa digestiva, ^(2, 3, 29) así como las enzimas involucradas en la síntesis de MT: la NAT y la HIOMT. ⁽²⁹⁾ La MT exógena, cuando se administra por vía oral, se acumula a lo largo del TGI, particularmente en el estómago y el colon.

Por otro lado, desde el descubrimiento de los receptores a MT en el TGI conformado por músculo liso, se ha planteado que el mecanismo de acción de ella en ese sitio probablemente sea vía receptores MT_2 , acoplados a proteínas G. Dentro de los efectos reportados por la MT en el TGI mediante estudios in vitro se ha demostrado que la MT a concentraciones bajas (1-10 μ M) produce contracción del tejido y a concentraciones mayores

(100-1000 μ M) inhibe las contracciones espontáneas o inducidas por 5-HT del músculo liso GI produciendo la relajación del mismo. ^(10, 29)

La información anterior nos permite explicar los resultados obtenidos en este trabajo experimental.

Así tenemos, que en el experimento 3 se observó que la actividad eléctrica contráctil del duodeno aumentó (Tabla 9) al aplicar MT al tejido, a las concentraciones bajas de 0.625 a 7.5 μ g/mL, mientras, que dicha actividad disminuyó al aplicar las concentraciones altas de 10.0 a 320 μ g/mL. Con esto concordamos con lo reportado en la literatura, respecto a que la MT ejerce un efecto bifásico sobre el músculo liso, es decir, contrae el tejido o lo relaja dependiendo de la concentración que se aplique gradualmente. Lo anterior, se reportó también con estudios realizados en ratas íntegras, en donde después de una administración vía i.p. a dosis pequeñas de MT (1 a 10 μ g/Kg) se observó un incremento en la motilidad y el tránsito intestinal, así como una disminución de estas actividades al administrar vía i.p. dosis altas de MT (100 a 1000 μ g/Kg), provocando con esto relajación del tejido en estudio. ⁽⁵⁴⁾

Tomando como referencia el artículo de Drago y cols. ⁽⁵⁴⁾ para realizar el presente trabajo, obtuvimos resultados similares a ellos, los cuales una vez analizados estadísticamente (ANDEVA y Tuckey) ⁽⁵¹⁾ a las concentraciones utilizadas encontramos que de aquellas que produjeron un incremento en la contracción del tejido, ninguna lo hizo con un nivel de significancia de $P = 0.05$ para los tres parámetros de estudio, FREC, AMP y ABC; en cuanto a la inhibición de la actividad contráctil, se observó que para los parámetros AMP y ABC, con un nivel de significancia de $P = 0.05$, se presentó una disminución en dicha actividad del tejido a las concentraciones de 160 y 320 μ g/mL, para el caso de la AMP, y a la

concentración de 320 $\mu\text{g/mL}$ para el ABC. Empleando los resultados del parámetro AMP se encontró que el valor de CI_{50} fue de 285.18 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para el ABC el valor de la CI_{50} fue de 363.48 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos para el parámetro de FREC no fueron similares a los obtenidos con los ya mencionados. El número de eventos contráctiles por minuto no se vio alterado a ninguna concentración aplicada de MT, lo cual concuerda con lo reportado por Quastel y Rahamimoff ⁽¹⁰⁾ en cuya publicación se menciona que la MT no tiene influencia sobre la FREC de las contracciones del tejido, pero sí disminuye la actividad contráctil (AMP) significativamente, produciendo el efecto de relajación. Sallinen y cols. ⁽⁴⁰⁾ mediante la técnica de PCR en diferentes tejidos de rata, incluido el TGI, determinaron que la acción de la MT se debe probablemente, a la unión de ella con los receptores MT_1 y MT_2 de membrana. Además, se han detectado sitios de unión a MT en la mucosa del TGI así como a nivel subcelular. ⁽²⁹⁾

Experimento 4. Con respecto a los parámetros de AMP y ABC con el análogo M1A, éste tiene un comportamiento similar al de la MT, ya que a concentraciones bajas se presenta un aumento en la contracción del duodeno, aunque éste no es estadísticamente significativo, mientras que a concentraciones altas de 160 y 320 $\mu\text{g/mL}$ la actividad contráctil disminuye, con un nivel de significancia de $P = 0.05$.

Con relación a la CI_{50} obtenida con el análogo M1A para los parámetros de AMP y ABC con un valor de 61.55 $\mu\text{g/mL}$ y 72.50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, es menor comparada con las de MT. Lo anterior no concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado con MT, con este mismo análogo y con duodeno de rata, en el cual la CI_{50} del análogo es mayor que

la de la MT. ⁽³⁹⁾ Suponemos que la diferencia radica en la época del año en la que se realizaron los experimentos.

Para los siguientes experimentos (5, 6, 7 y 8), se utilizó un antagonista no selectivo a receptores de MT, el LUZ, con referencia al estudio realizado por Drago y cols., quienes reportaron en un estudio *in situ* en rata, que este antagonista al ser administrado a una dosis de 0.25 mg/Kg 15 min antes de administrar la MT, previene totalmente el efecto que causa ésta en el intestino a dosis bajas (1 a 10 µg/Kg), argumentando, que el efecto de MT en el tejido puede estar mediado por receptores a ésta en el intestino. ⁽⁵⁴⁾

En el experimento 5 se utilizó el LUZ a tres concentraciones, 5 µg/mL, 20 µg/mL y 80 µg/mL, para realizar la curva correspondiente. Se observó que el efecto que tiene dicho compuesto sobre la actividad contráctil del tejido duodenal consiste en el aumento de ésta, resultando en el aumento en los parámetros de medición utilizados, sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo.

En el experimento 6, se incubó el tejido con tres concentraciones de LUZ independientes durante 15 min y se aplicaron tres concentraciones de MT independientes al término de la incubación para obtener la curva correspondiente. En este caso, se observó un efecto de disminución de la actividad contráctil provocada por MT, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Aunque, sí resultó ser mayor a la obtenida en el experimento 3 donde solo se añade MT al tejido aislado. Probablemente, este resultado pudiera deberse a que el LUZ, al ser un antagonista no selectivo a receptores de MT, puede actuar como agonista/antagonista en los receptores a MT. (Dubocovich 1988 ⁽⁵⁵⁾ y 1997 ⁽⁵⁶⁾), citado por 54). Al realizar las CDRG para los datos de AMP y ABC, observamos que con las

concentraciones de MT utilizadas no se alcanza a inhibir el 50% de la actividad contráctil duodenal, por lo tanto no fue posible calcular el valor de CI_{50} para la MT.

Por el contrario, en el experimento 7, donde se utilizaron las mismas concentraciones de LUZ y del análogo M1A para realizar la curva correspondiente, se observó que el antagonista inhibió la actividad del análogo M1A, ya que en las tres concentraciones utilizadas de éste, la relajación del duodeno fue menor a la obtenida en el experimento 4 donde solo se añade M1A al tejido aislado para los parámetros de AMP y ABC. De hecho, no hubo diferencia significativa entre las concentraciones con respecto a la basal. Por lo que, al realizar las CDRG para dichos parámetros y observar que con las concentraciones del análogo M1A utilizadas no se alcanza a inhibir el 50% de la actividad contráctil duodenal, no fue posible calcular el valor de CI_{50} para ese compuesto.

Por último, en el experimento 8, en donde se aplicaron las mismas concentraciones del análogo M1A y de MT, se encontró que la relajación del duodeno fue menor que la encontrada en el experimento 3, donde solo se aplica MT; además, no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas con respecto a la basal. Nuevamente, al realizar las CDRG para los parámetros de AMP y ABC y observar que con las concentraciones de MT utilizadas no se alcanza a inhibir el 50% de la actividad contráctil duodenal, no fue posible calcular su valor de CI_{50} .

CONCLUSIONES.

Los resultados de los experimentos, así como su análisis y discusión conducen a las siguientes conclusiones:

1. La MT produce un incremento y decremento de la actividad contráctil del tejido duodenal, dependiente de la concentración.
2. El efecto de la MT sobre la actividad contráctil del tejido duodenal produce un efecto bifásico de contracción-relajación dependiente de la concentración (ABC y AMP).
3. El análogo M1A produce un incremento y decremento de la actividad contráctil del tejido duodenal, similar al de la MT.
4. El análogo M1A produce un efecto bifásico similar al producido por la MT (ABC y AMP).
5. El análogo M1A fue más potente que la MT.
6. El LUZ produce un incremento en la contracción del tejido duodenal, sin ser estadísticamente significativo cuando se compara con la respuesta basal.
7. La MT, en presencia de LUZ, disminuye la actividad contráctil del tejido duodenal, sin ser estadísticamente significativo cuando se compara con la respuesta basal.
8. El análogo M1A, en presencia de LUZ, no disminuye la actividad contráctil del tejido duodenal.
9. La MT, en presencia del análogo M1A, disminuye la actividad contráctil del tejido duodenal, sin ser estadísticamente significativo cuando se compara con la respuesta basal.

REFERENCIAS.

1. Bubenik GA, Purtil RA, Brown GM, Grota LJ. Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Exp Eye Res* 27:323-333, 1978.
2. Raikhlin NT, Kvetnoy IM. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem* 55:19-25, 1976, *Abstract*.
3. Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN. Melatonin may be synthesized in enterochromaffine cells. *Nature* 255:344-345, 1975, *Abstract*.
4. Reiter R: The melatonin rhythm. both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664, 1993.
5. Bubenik GA, Niles LO, Pang SF, Pentney PJ. Diurnal variations and binding characteristics of melatonin in the mouse brain and gastrointestinal tissues. *Comp Biochem Physiol* 104:377-380, 1993.
6. Pontoire C, Bernard M, Silvain C, Collin J-P, Voissin P. Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *Eur J Pharmacol* 247:111-118, 1993.
7. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Intern Jour Biochem & Cell Biol* 38:313-316, 2006.
8. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Czenikiewicz-Guzik M, Kwiecień S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol & Pharmacol* 58, 3, 381-405, 2007.
9. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 58, 6, 23-52, 2007.
10. Quastel R, Rahamimoff R. Effect of melatonin on spontaneous contraction and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Brit J Pharmacol* 24:455-461, 1965.
11. <http://www.lacoctelera.com/myfiles/utopias-/glándula-pineal.gif> (15. Octubre. 2009).
12. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325-395, 2003.

13. Cingolani HE, Houssay AB. Fisiología Humana de Houssay. Cap 49: Fisiología de la glándula pineal. Houssay AB. 7ª Edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 2000, pp 632-637.
14. Tresguerres JAF. Fisiología Humana. 3ª Edición. Cap 71: La Glándula Pineal. Ed. McGraw-Hill. México 2005.
15. http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/12_diencefalo_archivos/image7461.jpg (15. Octubre. 2009)
16. Tresguerres JAF. Fisiología Humana. Cap 61: Secreción y absorción intestinales. 3ª Edición. Ed. McGraw-Hill. México 2005.
17. Studnika, FK. Sur les organes parietaux de *Petromyzon planeri*. Sitzg Kg. Ges. Wiss. (Prague) 1, 1--50 (1893).
18. Studnika, FK. Die Parietalorgane. Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere, Teil V (Hrsg. A. Oettel). Jena: Fischer 1905.
19. McCord CP, Allen FP. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. J Exp Zool 23:207-224, 1917.
20. Lerner AB, Case JD, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc 80:2587, 1958.
21. 4(A) Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol 58, 6, 23-52, 2007.
22. 4(B) Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. Intern Jour Biochem & Cell Biol 38:313-316, 2006.
23. Lira RA, Espejo GO, Naranjo RE. Receptor-binding of 1-N-substituted melatonin analogues. European J Med Chem 37:945-951, 2002.
24. Cingolani HE, Houssay AB. Fisiología Humana de Houssay. Cap 49: Fisiología de la glándula pineal. Houssay AB. 7ª Edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 2000.
25. Wurtman RJ, Axelrod J. The pineal gland. Sci Am 213, 50-60, 1965.
26. Moore RY: Circadian rhythms. Basic neurobiology and clinical applications. Annu Rev Med 48:253-266, 1997.

27. Bubenik GA. Gastrointestinal Melatonin. Localization, Function and Clinical Relevance. *Digest Dis Sci* 47(10), 2336-2348, 2002.
28. Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Kadagidze ZG, Sokolov AV. Immunohistochemical detection of cells containing melatonin and N acetylserotonin. *Biull Eksp Biol Med* 82(11):1400-1, 1976.
29. Bubenik GA. Gastrointestinal Melatonin. Localization, Function and Clinical Relevance. *Digest Dis Sci* 47(10), 2336-2348, 2002.
30. Huether G, Poeggeler G, Reimer R, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in gastrointestinal tract. *Life Sci* 51, 945-953, 1992.
31. Bubenik GA, Pang SF, Hacker RR, Smith PS. Melatonin concentration in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J Pineal Res* 21, 251-256, 1996.
32. Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 59, 2, 33-51, 2008.
33. Thor PJ, Krolczyk G, Gil K, Zurowsky D, Nowak L. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. *J Physiol & Pharmacol* 58, 6, 97-105, 2007.
34. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Reviews* 78(3):687-721, 1998
35. Dubocovich ML. Pharmacological characterization of melatonin binding sites. *Adv Pineal Res* 5:167-173, 1991.
36. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5):1177-1185, 1994.
37. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel(1b) melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19):8734-8738, 1995.
38. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delangrange P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT₃ as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275(40):31311-31317, 2000.

39. Lira RA. Obtención de análogos de melatonina como posibles agonistas o antagonistas. Tesis Doctoral. UNAM, 2006.
40. Pirkko Sallinen, Seppo Saarela, Mika Ilves, Olli Vakkuri, Juhani Leppäluoto. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sciences* 76:1123-1134, 2005.
41. Barajas-Lopez C, Peres AL, Espinosa-Luna R, Reyes-Vazquez C, Prieto-Gomes B. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur J Pharmacol* 312:319-325, 1996.
42. Kachi T, Suzuki T, Yanagisawa M, Kimura N, Irie T. Pineal-gut relations. *Hiroshima Med J* 51 (suppl):S209-S213, 1999.
43. Reiter R, Tan D-X, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz R, Mayo J, Ramon S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signal Recept* 8:56-63, 1999.
44. http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/laboratorios/fisiologia/guia_estudio_2006/ppt/p9.pdf (15. Octubre. 2009).
45. Tresguerres JAF. *Fisiología Humana*. 3ª Edición. Cap 61: Secreción y absorción intestinales. Ed. McGraw-Hill. México 2005. pp 732-735.
46. Tresguerres JAF. *Fisiología Humana*. 3ª Edición. Cap 60: Motilidad del intestino delgado. Ed. McGraw-Hill. México 2005. pp 728 y 729.
47. Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiología Humana de Houssay*. Cap 13: Funciones motoras del sistema digestivo. 7ª Edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 2000, pp 166-178.
48. http://www.ceidis.ula.ve/cursos/medicina/fisiologia_digestiva/tema_1/sesion_1/recursos1/tema1_2004.pdf (15. Octubre. 2009).
49. Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiología Humana de Houssay*. Cap 13: Funciones motoras del sistema digestivo. 7ª Edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires 2000.
50. Emmanuel A, Roy A. Small intestine and colon motility. *Mot and Funct Bowel Disease Medicine* 35(5):272-276, 2007.
51. UPN. Estadística. Antología 4. Agosto 2007. México.
52. Reference Manual Version 3.8.1 for MP Hardware/Firmware and AcqKnowledge Software on PC running Windows 2000 or XP.

53. Bubenik GA, Brown GM. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of the rat. *Biol Signals* 6:40-44, 1997.
54. Drago F, Macaudo S, Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis & Sci* 47:1969-1974, 2002.
55. Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): A novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Experim Therap* 246(3):902-910, 1988.
56. Dubocovich ML, Masana MI, Jacob S, Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:365-375, 1997.

ANEXO.**I. Calibración.**

Para calibrar ⁽⁵²⁾ el equipo se ajustó la escala para que 1g de tensión produjeran un desplazamiento de 2 cm (Figura 25). ⁽⁵²⁾

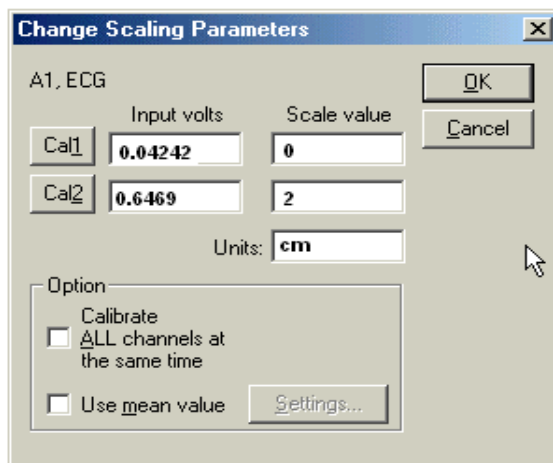


Figura 25. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de escala. ⁽⁵²⁾

El tiempo total de registro de datos es de 10 min, el rango de datos es de una muestra por segundo (Figura 26) ⁽⁵²⁾ y la velocidad de adquisición de datos es de 100 s/div (Figura 27). ⁽⁵²⁾

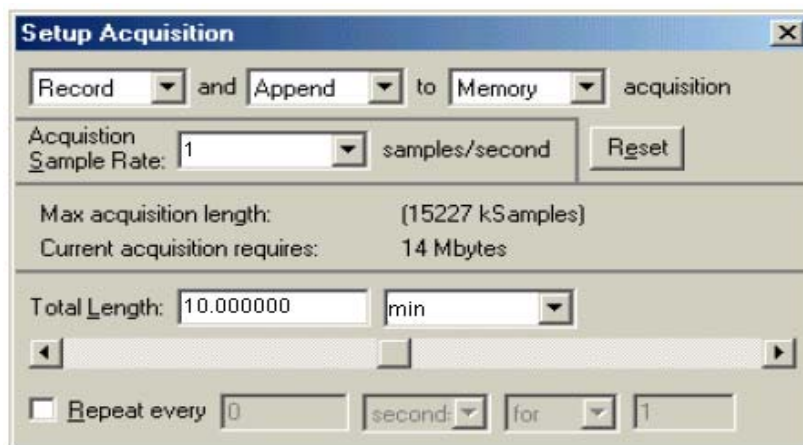


Figura 26. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de la adquisición de datos. ⁽⁵²⁾

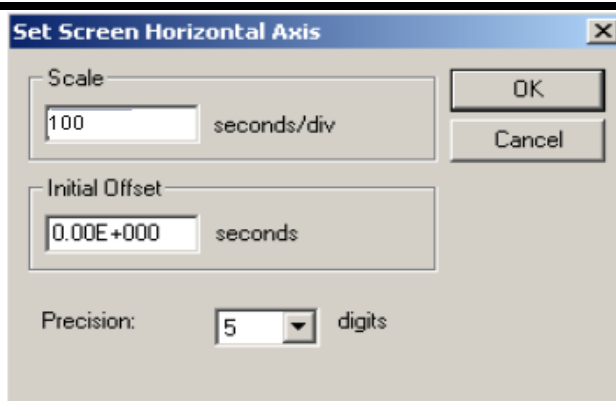


Figura 27. Ventana de diálogo donde se muestra el ajuste de velocidad. (52)

II. Toma de registros.

Todas las respuestas de la actividad eléctrica intestinal se capturaron mediante la ayuda del software en la computadora para analizarlas (Figura 28). (52)

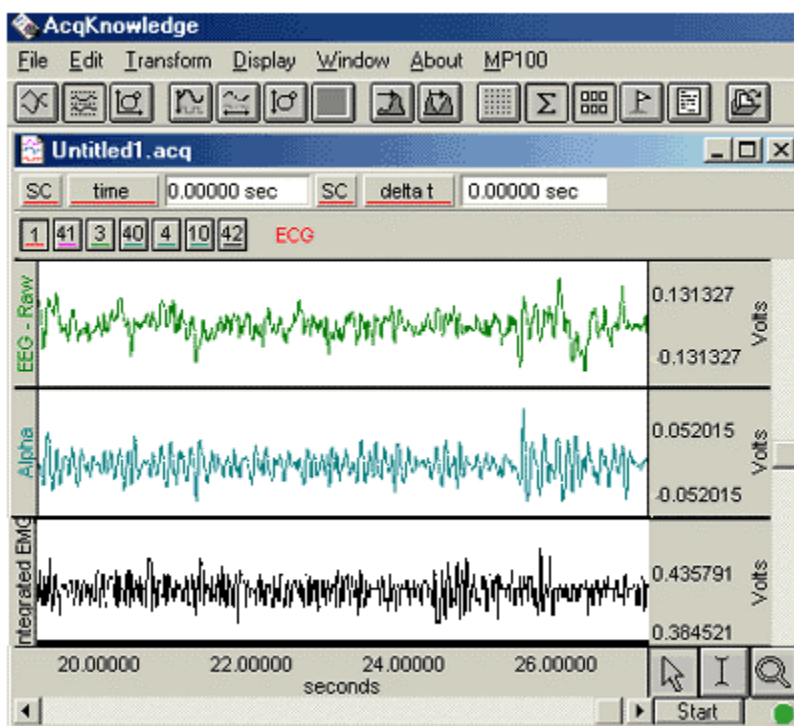


Figura 28. Ventana principal de la pantalla de la computadora donde se muestran los registros. (52)