

11261

4
257

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

"EL CALCIO PARTICIPA EN EL EFECTO INHIBIDOR DE LA MELATONINA SOBRE
LA CONTRACCION MUSCULAR DEL UTERO DE RATA ESTROGENIZADA"

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(AREA FARMACOLOGIA)

PRESENTA: *Med. Cir.* ARTURO GARCIA RILLO

ASESOR ACADEMICO: *Dr. en C.* CRUZ REYES VAZQUEZ

ABRIL DE 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

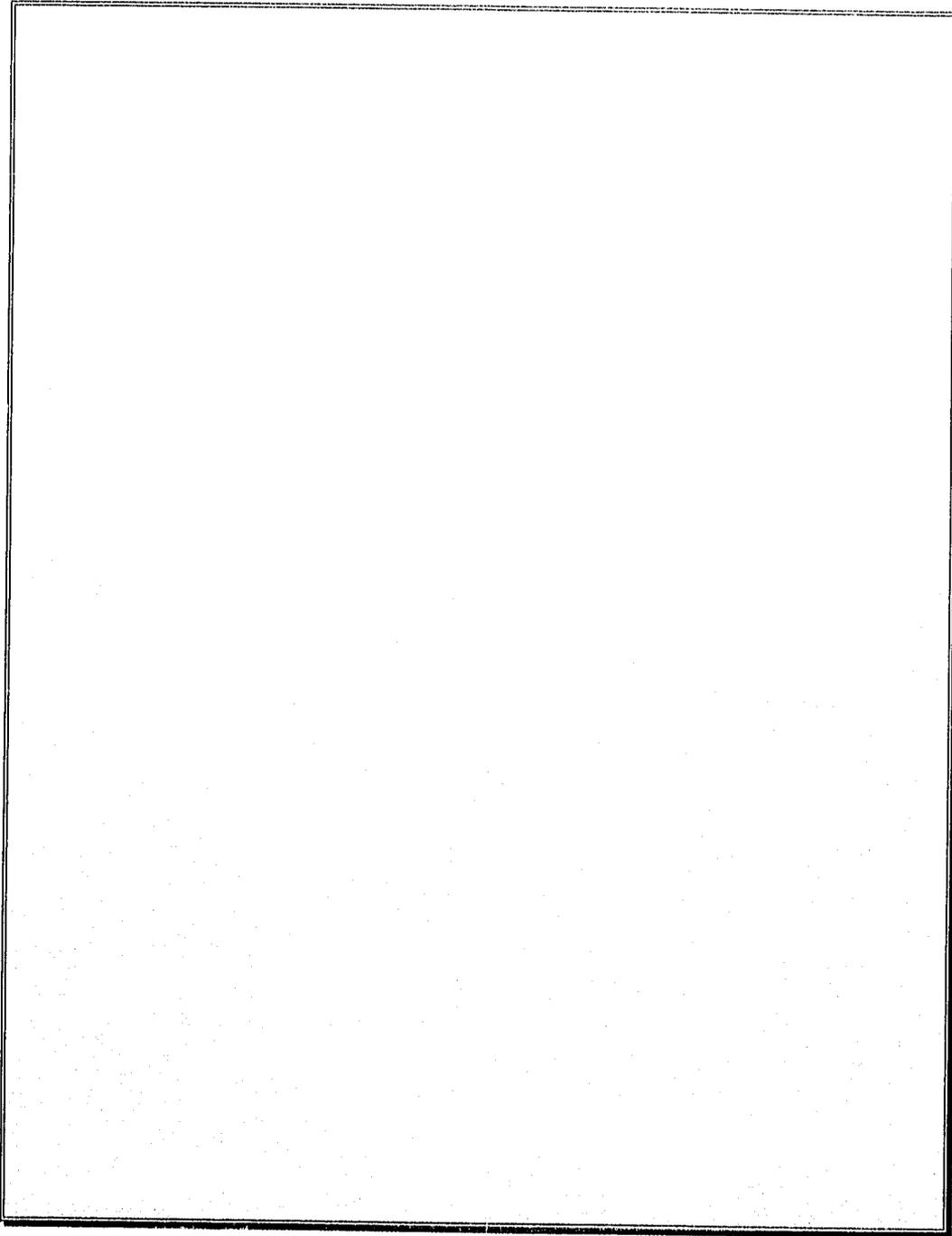
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCION:	
A) GLANDULA PINEAL	5
B) FARMACOLOGIA Y FISIOLOGIA DE LA MELATONINA	12
C) MECANISMO DE ACCION DE LA MELATONINA	18
D) INTERACCION ENTRE EL CALCIO Y LA MELATONINA	26
E) EL CALCIO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO	30
F) PARTICIPACION DEL CALCIO EN LA CONTRACCION UTERINA	34
G) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION DE MUSCULO LISO	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
OBJETIVOS	46
HIPOTESIS	48
DISEÑO EXPERIMENTAL	50
MATERIAL Y METODOS	54
RESULTADOS:	
A) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTANEA DEL TEJIDO UTERINO ESTROGENIZADO	62
B) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR CARBACOL	66
C) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR OXITOCINA	71
D) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR CALCIO	75
E) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA	78
DISCUSION	80
CONCLUSION	89
REFERENCIAS	92

RESUMEN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es secretada por la Glándula Pineal durante las horas de oscuridad en todos los vertebrados hasta ahora estudiados. La síntesis de melatonina (MEL) es inhibida por la luz, por lo que su secreción es regulada por los cambios ambientales, diarios y estacionales, del ciclo luz-oscuridad. Esta hormona ejerce una influencia reguladora sobre una gran variedad de procesos fisiológicos que incluyen a los ritmos biológicos y las funciones neuroendócrinas. Varios estudios señalan al cerebro, especialmente al área preóptica medial y suprarretroquiasmática, como el sitio blanco en la actividad antigonadal y neuroendócrina de la MEL, pero el mecanismo de acción utilizado por esta hormona para ejercer sus efectos es aún desconocido. Aunque se han identificado los sitios de unión a MEL en el Sistema Nervioso Central (SNC), su caracterización fuera de éste no se ha realizado a pesar de la amplia gama de acciones de la MEL en estos tejidos. Por ejemplo, la aplicación de MEL *in vitro* reduce el tono de la contracción espontánea de segmentos aislados de estómago, duodeno, ileo, colon y útero, a través de un efecto inhibitor sobre el músculo liso. Aunque se descubrieron muchos efectos fisiológicos y farmacológicos de la MEL en el músculo liso, su mecanismo de acción no está aún descrito. En otras estructuras como la retina y el cuerpo estriado, parte de sus efectos son consecuencia de una modificación de los flujos de iones de calcio a través de la membrana celular, evento que podría explicar su acción a nivel del músculo liso uterino. El objetivo del presente trabajo, consistió en investigar el efecto de esta hormona sobre la actividad del músculo liso de rata durante diferentes tipos de activación muscular lo cual probablemente implica diversos mecanismos de transporte de calcio. Los experimentos fueron realizados en porciones de útero aislado de rata de la cepa wistar pretratadas con dietilestilbestrol y suspendidos en una cámara de órgano aislado, con solución Ringer-Krebs-Henseleit. Se estudió el efecto de la MEL sobre la contracción espontánea del útero y la provocada por carbacol, oxitocina y calcio. El registro de la contracción isométrica del tejido fue realizado por medio de un transductor isométrico, acoplado a un polígrafo. La aplicación de dosis crecientes de MEL provocó la inhibición de la contracción fásica de la actividad espontánea ($GI_{50} = 2.28 \times 10^{-7}$ M/ml), así como la provocada por carbacol y oxitocina. Además, esta hormona induce la inhibición de la contracción tónica provocada por la adición de calcio en un medio libre de calcio. Estos hallazgos sugieren que la MEL posee un efecto inhibitor sobre diversos tipos de activación muscular (carbacol, oxitocina, calcio), así como de la contracción espontánea. Los resultados sugieren que la MEL ejerce efectos celulares en el tejido muscular uterino de rata, que involucran una modificación de la cascada de eventos relacionados con el transporte transmembranal de calcio; por lo que probablemente, la acción de la MEL sea una reducción de la entrada de calcio en las células de músculo liso del útero de rata.

ABSTRACT

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a hormone from the pineal gland, is secreted during the scotophase in all studied vertebrates. Light inhibits melatonin synthesis, therefore melatonin's secretion is mediated by the daily and seasonal changes in the environmental light-dark cycle. This hormone plays a main role on a variety of physiological processes including biological rhythms and neuroendocrine functions. It has been shown that the target site for melatonin's antigonadal action is located in the Central Nervous System (CNS); mainly the hypothalamic medial preoptic and supra-chiasmatic areas; however, its mechanism of action is still unknown. Recently the melatonin's binding sites in CNS had been identified but their characterization in tissues outside the brain had not been made, in spite of the widespread effects of melatonin in these sites. By example, melatonin decreases the spontaneous contractil activities of isolated muscle stripes stripes of the stomach, duodenum, ileum, colon and uterus, by a direct inhibitory action on smooth-muscle cells of there tissues. However, despite the fact that many physiological and pharmacological melatonin's actions had leave been described in these organs, its mechanism of action remains unclear. Both, biochemical and electrophysiological studies had demonstrated that melatonin reduce the calcium transmembranal transport in retinal and neostriatal cells. A similar mechanism on calium in smooth muscle cells could explain this inhibitory melatonin action on the contractil activity of these cells. The aim of the present study was to investigate the effects of melatonin on the contractility of isolated rat uterus during the muscular activation induced by several procedures which means different calcium transport mechanisms. The experiment were performed on the isolated rat uterus strips collocated in a organ bath (15 ml) filled with (Ringer-Krebs-Henseleit solution). The solution was oxygenated with a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). Activation of the uterine muscle contraction was evoked by carbachol, oxytocin or calcium. Additions of increamental melatonin doses inhibited the phasic spontaneous rhythmic activity (IC₅₀ = 2.20×10^{-7} M/ml) as well as the phasic contractions produced by carbachol and oxytocin. Furthermore melatonin induced an inhibition on the calcium ions stimulatory effect induced in a calcium free medium. These results suggest that melatonin modifies the cellular processes involved in the cascade of events and that controls the calcium transmembranal fluxes in the smooth muscle cells of the rat uterus.



INTRODUCCION

A) GLANDULA PINEAL

Desde la antigüedad, la glándula pineal (GP), también llamada órgano pineal o epfisis cerebri, ha provocado el interés de filósofos y hombres de ciencia, quienes la consideraron como la estructura anatómica donde residía el alma ⁽⁶²⁾ y a partir de la cual se ejercía una acción reguladora en el comportamiento fisiológico de los organismos ⁽¹⁵⁾; sin embargo, es hasta el presente siglo cuando se inicia su estudio sistemático ⁽¹⁵⁷⁾. El punto de partida son los trabajos de Lerner y cols. que culminaron en 1958 con la identificación de la melatonina (MEL) (5-metoxi-N-acetil-triptamina) como la principal hormona de la GP ^(113,114). Para 1965, Hofman y Reiter ⁽⁸³⁾ mostraron el papel que ejerce la GP en la regulación fotoperiódica de la conducta reproductora del hámster. En la misma década, Wurtman y Axelrod ^(12,221) acuñaron el término "transductor neuroendócrino" para describirla como un órgano que convierte un estímulo neuronal proveniente de la retina, en una respuesta endócrina.

Esta glándula posee características morfológicas y funcionales que se diversifican a lo largo de la escala filogenética ⁽¹⁵⁵⁾. En términos generales, la GP es una estructura epitalámica rodeada por el sistema ventricular cerebral que está presente en todos los vertebrados, a excepción del cocodrilo y el armadillo ^(8,142). En especies como los reptiles, el parénquima de la GP está conformado por células fotorreceptoras organizadas de tal manera que sugiere una función básicamente sensorial, aunque con capacidad secretora (transductor fotoneural). En las aves, los fotorreceptores pineales carecen de nervio eferente y poseen la capacidad de responder a los estímulos de entrada con una respuesta secretora (transductor fotoendócrino). En mamíferos, la glándula es típicamente endócrina y carece de fotorreceptores típicos (transductor neuroendócrino) ⁽³⁵⁾ (Fig. 1); posee un estroma rico en fibras colágenas, vasos sanguíneos, células de tejido conectivo y células linfocíticas ⁽¹⁵⁰⁾. El parénquima de la GP está formado por células de sostén del tipo de neuroglía y por células especializadas llamadas pinealocitos (Fig. 2) que constituyen el 85% de la masa pineal y cuya función es secretora ⁽⁷⁵⁾, por lo que presenta gránulos densos citoplasmáticos los cuales corresponden a lisosomas y sitios de almacenamiento de productos para la secreción ⁽¹¹⁶⁾. Los pinealocitos se clasifican en claros (tipo A) y oscuros (tipo B) de acuerdo a su translucidez, esto depende de la cantidad de gránulos presentes ^(32,33).

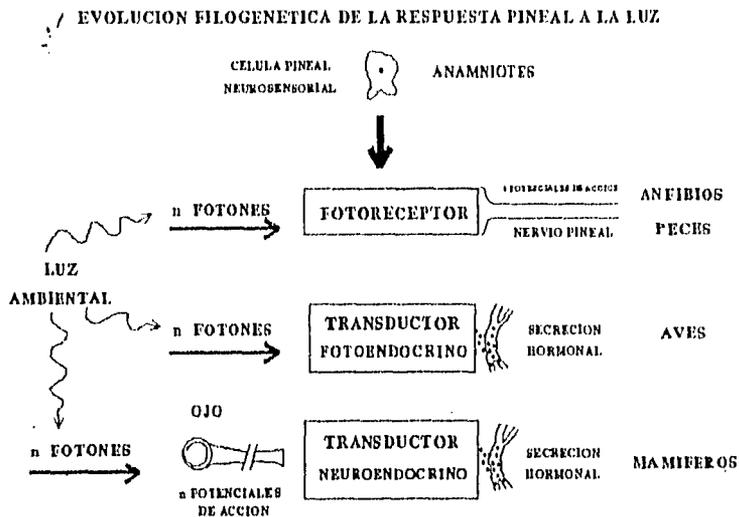


FIGURA 1: Evolución filogenética de la respuesta pineal a la luz (35).

De acuerdo a su actividad electrofisiológica, se han caracterizado 5 tipos diferentes de pinealocitos (75); tal clasificación refleja las interacciones que la GP posee con el resto del Sistema Nervioso Central (SNC) (Cuadro I).

CUADRO I	
TIPOS CELULARES DE PINEALOCITOS	
PINEALOCITOS	CARACTERISTICAS
TIPO 1	Activados o inhibidos por estímulos fóticos sobre el ojo.
TIPO 2	Presentan una ráfaga transitoria de actividad eléctrica en respuesta a estímulos acústicos.
TIPO 3	Presentan una respuesta bifásica a estimulación del bulbo olfatorio.
TIPO 4	Muestran niveles elevados de actividad espontánea, la cual se suprime por gangliectomía cervical superior.
TIPO 5	Células en grupo con inervación simpática.

Tomado de la referencia No. 75

La GP junto con las células endócrinas y neurosecretoras del eje hipotálamo-hipófisis, forman el sistema neuroendócrino difuso (148). Esta glándula se distingue del resto por ser un órgano impar, recibir un flujo sanguíneo elevado, superado sólo por el riñón, y tener un acceso directo al líquido cefalorraquídeo (LCR) a través del 3er ventrículo. Tal situación le permitiría vertir su secreción fuera de la barrera

hematoencefálica, aunque la mayor parte de su secreción es secretada hacia la circulación sanguínea (183).

Quizá la característica fundamental y única de la GP es su capacidad para producir y secretar hormonas de acuerdo al patrón fotoperiódico ^(12,156); en el cual la luz juega un papel supresor ^(38,53,144). Como consecuencia, durante la escotofase las concentraciones séricas de hormonas de la GP alcanzan su máximo nivel (30-50 pg/ml), mientras que en presencia de luz artificial brillante con intensidad suficiente, o de luz ambiental, se reduce tanto la producción ⁽²¹⁾ como la secreción (5 ng/ml) de los indoles pineales de importancia endócrina ⁽²⁰⁸⁾ (Fig. 3). La asociación entre la función de la GP y el fotoperíodo lleva implícito el papel tan importante que esta glándula juega en la regulación de las variaciones fotoperiódicas y estacionales de las funciones de los seres vivos ^(35,83,221).

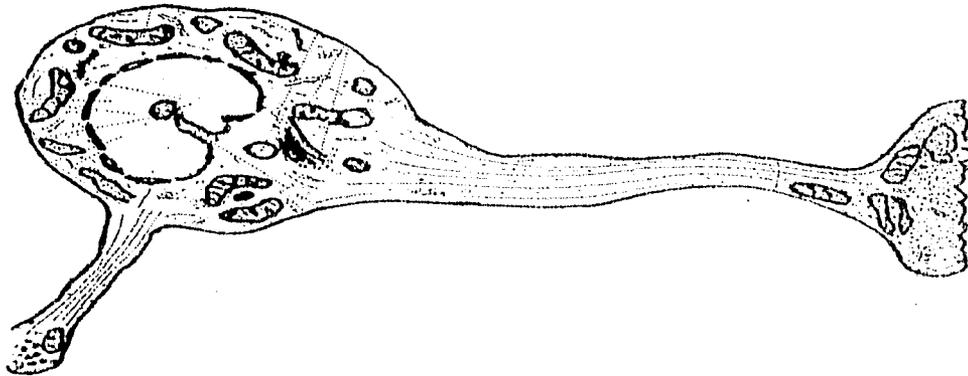


FIGURA 2: Diagrama de un pinealocito típico de la GP en mamíferos ⁽¹⁵⁰⁾.

La GP posee las enzimas necesarias para el metabolismo de diversos péptidos e indoles. En general, produce y libera diferentes compuestos químicos ⁽⁷⁵⁾: 5-metoxi-indoles del tipo de la MEL; péptidos de bajo peso molecular como la arginina-vasotocina; y péptidos de alto peso molecular del tipo de la sustancia inhibidora de gonadotropinas.

La MEL es un intermediario bioquímico que participa en la sincronización de ritmos biológicos y representa el principal indicador cuantificable para evaluar la función pineal ⁽⁷³⁾. Este 5-metoxi-indol es sintetizado a partir de la serotonina (5-HT) ⁽²¹⁸⁾, mediante dos etapas secuenciales (Fig. 4): la producción de N-acetil-5-HT por la acción de la enzima N-acetil-transferasa (NAT) que transfiere un grupo acetilo proveniente de la acetil coenzima A ⁽²¹⁷⁾; y la producción de MEL al metilar la N-acetil-5-HT por acción de la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT) ⁽¹³⁾.

La 5-HT también puede ser metabolizada a 5-hidroxi-indol-acetaldehído, por medio de una desaminación oxidativa a través de la enzima monoaminoxidasa (MAO), para formar 5-hidroxi-triptofol y 5-metoxi-triptofol; la HIOMT también convierte el 5-hidroxitriptofol y el ácido 5-hidroxi-indol acético a sus respectivos derivados metilados: 5-metoxitriptofol y 5-metoxi-indolacético, los cuales poseen actividad hormonal ⁽¹³⁴⁾ (Fig. 4).

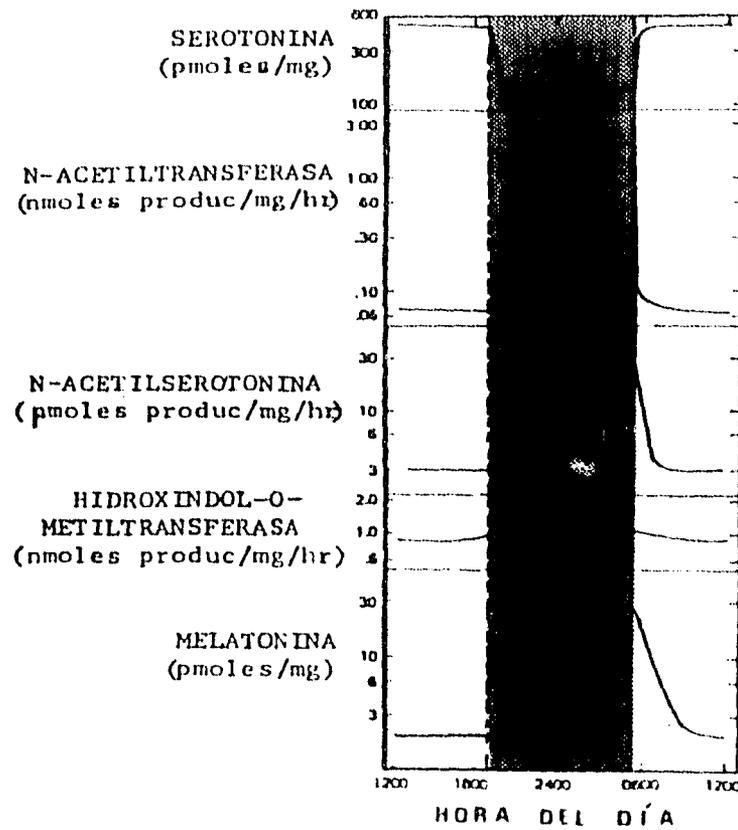


FIGURA 3: Representación de los ritmos circádicos de la concentración de los indoles y de la actividad de sus enzimas en la GP de la rata. La porción oscura corresponde a la escotofase ⁽⁹⁶⁾.

La información fótica necesaria para la regulación de la secreción de la MEL alcanza a la GP a través de una vía simpática multisináptica retina-pineal, la cual fue descrita en los estudios de Moore ^(96,131,132). Esta vía se inicia en las neuronas de la capa ganglionar de la retina, la cual se proyecta

bilateralmente sobre las neuronas del núcleo supraquiasmático. Esta conexión retinohipotalámica representa, desde el punto de vista filogenético, el elemento más general y estable del sistema visual de los vertebrados (Fig. 5).

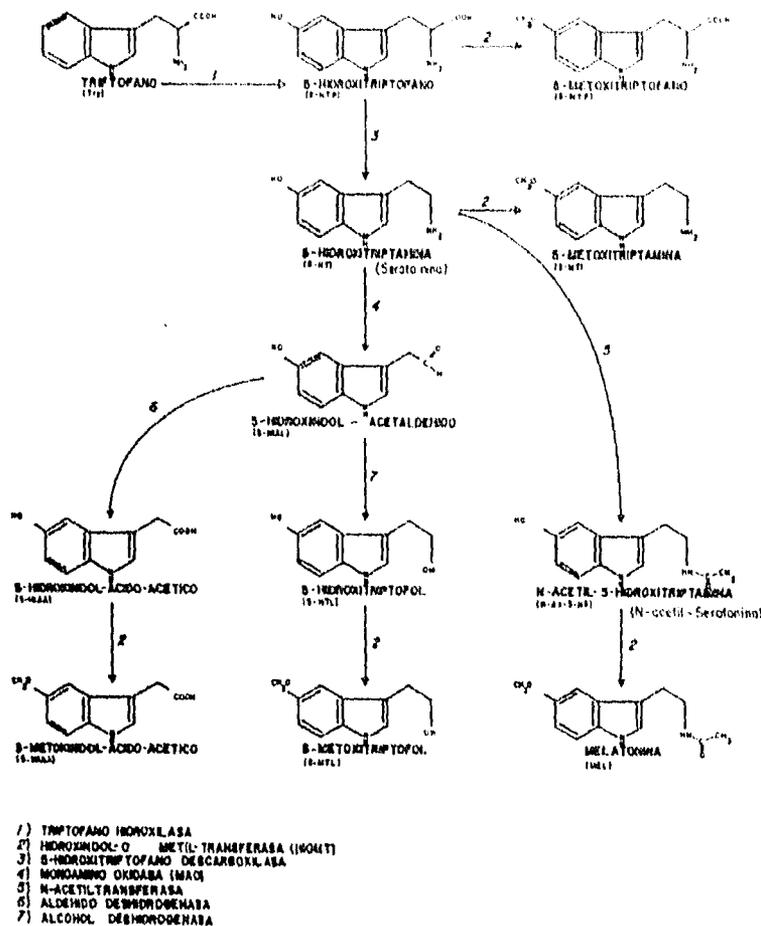


FIGURA 4: Esquema representativo de la vía anabólica de los indoles de la GP. Esta vía se inicia con el aminoácido triptófano y por la acción de diferentes enzimas, forma tres grupos de 5-metoxi-indoles [35].

Del núcleo supraquiasmático, la vía se proyecta caudalmente hacia el hipotálamo periventricular, a la eminencia media y al hipotálamo lateral. De este sitio, las neuronas establecen conexión con la columna intermediolateral de la médula cervical, desde donde se originan las fibras preganglionares que terminan en el ganglio cervical superior [96] (Fig. 5). Las fibras posganglionares que alcanzan a la GP conforman el nervio ciliar, denominado así por Galeno [10].

EL neurotransmisor postganglionar de esta vía es la norepinefrina, la cual actúa sobre receptores beta-adrenérgicos de los pinealocitos para provocar un incremento en la síntesis de indoles [35,160-162]. La mediación intracelular de este efecto beta-adrenérgico se realiza a través de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPc), el cual incrementa su acumulación e induce la fosforilación de histonas, el aumento en la síntesis de ácido ribonucleico (RNA) y proteínas, y la activación de las enzimas que sintetizan MEL (principalmente NAT) (2,35,75). Se ha observado que el incremento de nucleótidos cíclicos se incrementa hasta 100 veces mediante la estimulación adrenérgica cuando la norepinefrina estimula tanto receptores alfa 1 como beta en los pinealocitos de rata adulta (219); sin embargo, se ha destacado en diversos estudios que los receptores adrenérgicos alfa 1 regulan la actividad de la NAT durante el desarrollo más que los receptores beta (171).

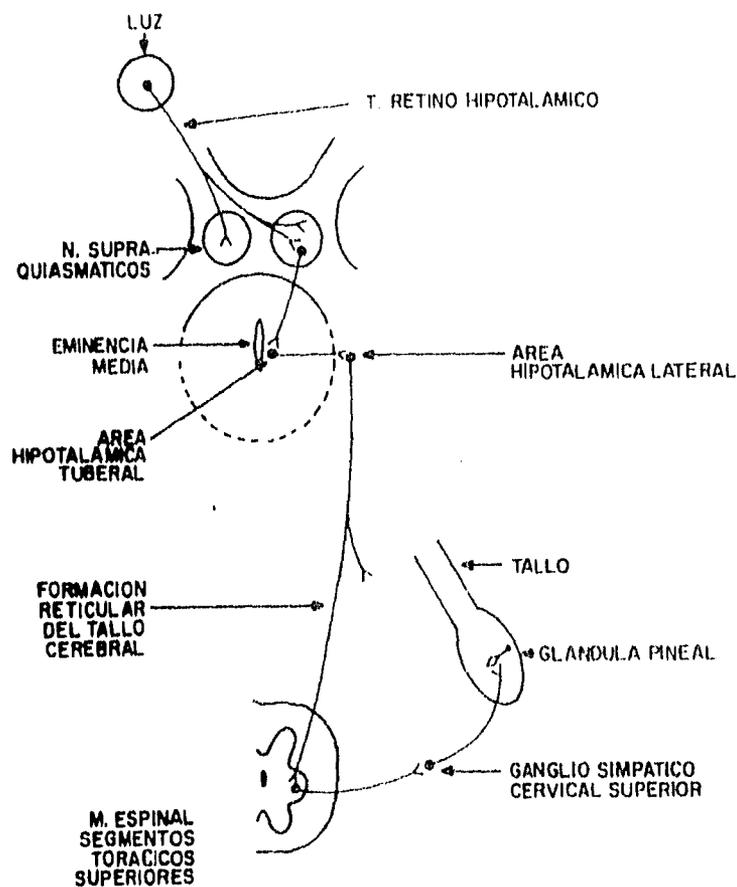


FIGURA 5: Representación del circuito neuronal, el cual provee de la información fótica a la GP (adaptado de referencia 35).

Probablemente la cantidad de luz no sea el único factor ambiental que regule la función de la GP. Por ejemplo, se mostró que señales provenientes de estímulos olfatorios, acústicos y de campos electromagnéticos pueden modificar la síntesis y liberación de indoles ⁽⁷⁶⁾. De igual manera, este efecto se observa por la estimulación del sistema simpático provocado por el estrés ⁽¹⁴⁶⁾ o por otros impulsos sensoriales como el cambio de temperatura ^(68,177,192).

La síntesis y la secreción hormonal de la pineal también se modifica por acción de los estrógenos, andrógenos, progestinas, corticoesteroides, tiroxina, gonadotrofinas ⁽⁴³⁾, prolactina, hormona estimulante de los melanocitos alfa y beta, hormona adrenocorticotrófica (ACTH), factor liberador de la hormona tirotrópica (TRH) ⁽¹³⁹⁾, factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH), somatostatina, arginina-vasotocina, calcitonina y la propia MEL. ⁽⁶⁾; lo que sugiere que aunque las señales neuronales constituyen la principal aferencia de la función pineal, el sistema no carece de una acción hormonal retroactiva, provocada por las hormonas secretadas en los distintos órganos blanco de la GP, tal como ocurre en el hipotálamo y la amígdala, centros que influyen significativamente sobre la actividad neuronal que regula a esta glándula ⁽⁵⁸⁾. Por otra parte, se sugiere que, además de las propiedades de transducción neuroendócrina del pinealocito; existe también un fenómeno de transducción endócrino-endócrina, en el que una célula endócrina quimiorreceptora para cierta hormona, transforma el mensaje de ésta en la secreción de otra hormona diferente ⁽⁴²⁾.

B) FARMACOLOGIA Y FISIOLOGIA DE LA MELATONINA.

La MEL es un producto exclusivo de la GP ⁽⁷³⁾; aunque estructuras como la retina ⁽³⁸⁾, el intestino ⁽¹⁵¹⁾, probablemente las plaquetas ⁽¹¹⁰⁾, y la glándula paratiroides, son capaces de sintetizar esta hormona; sin embargo, las concentraciones secretadas por los órganos no pineales son mínimas y aparentemente no contribuyen a conformar las concentraciones séricas ⁽¹⁴⁵⁾.

No se han identificado completamente los compartimientos hacia los cuales son secretadas las hormonas pineales ⁽¹⁶⁷⁾, pero en la circulación, la MEL se une a la albúmina en un 60%, formando complejos MEL-albúmina muy disociables. Al igual con lo que ocurre con otras hormonas, la presencia de esta proteína transportadora no modifica su actividad biológica, la concentración de sitios de unión tisular específicos, ni su elevada liposolubilidad ⁽³⁹⁾.

Los estudios farmacocinéticos realizados en humanos indican que la MEL es un compuesto que se distribuye rápidamente en el organismo. La inyección intravenosa de un bolo de 5 a 10 µg, induce un patrón farmacológico bifásico correspondiendo a un descenso con una fase de distribución de 1.35 min, una fase metabólica de 28.4 min ⁽¹¹⁹⁾, una vida media de 18 min ⁽⁵⁴⁾, un volumen aparente de distribución (V_{ss}) de 36.7 litros y una depuración de 966 ml/min ⁽⁵³⁾.

La aplicación intravenosa de MEL muestra que la hormona atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica e interactúa con estructuras cerebrales, principalmente el hipotálamo y áreas coliculares ⁽¹⁸³⁾. Sin embargo, sus concentraciones cerebrales decaen posteriormente en forma rápida (alrededor de 8 min); lo que sugiere una rápida distribución y recambio ⁽¹¹⁹⁾. Cuando se administra MEL tritiada (³H-MEL) en la circulación general, la hormona penetra en todos los tejidos, incluyendo al SNC; mientras que su administración en el LCR por inyección intraventricular, se acompaña de una acumulación en la región hipotalámica, y con un decaimiento rápido de su concentración cerebral generando una curva multifásica, lo cual sugiere una vida media con dos componentes principales: uno temprano de 5 min; y otro tardío de 40 min ^(37,54).

La MEL sufre un elevado metabolismo hepático de primer paso ⁽¹⁰⁶⁾. El catabolismo de esta hormona consiste en su conversión a N-acetil-5-HT o 6-hidroxi-MEL en la mayoría de los animales ⁽²²⁴⁾

(Fig. 6). En los seres humanos la sulfa-metoxi-MEL constituye el principal metabolito (152). La 6-hidroxi-MEL es un compuesto carente de actividad biológica y se conjuga posteriormente con ácido glucurónico o sulfato, para ser excretada por la orina y heces. También el hígado es capaz de desacetilar la MEL a 5-metoxi-triptamina por acción de una alicilamidasa específica (78).

Recientemente se mostró una vía catabólica en la que el núcleo indólico es coto para producir derivados quinurenámicos del tipo de la N-acetil-5-metoxiquinurenamina (Fig. 6). Este hallazgo resulta muy importante porque este tipo de compuestos ejercen efectos psicotrópicos (82,120,166).

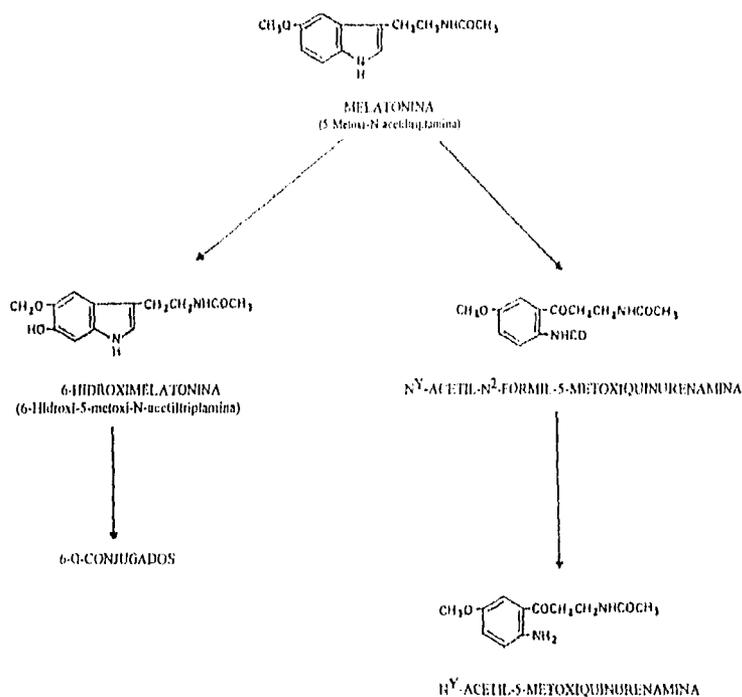


FIGURA 6: Metabolismo de la melatonina (35).

Desde un punto de vista fisiológico, el efecto mejor descrito y estudiado de la MEL es su participación en la regulación de la reproducción (76,83,180). Sin embargo, y sobre todo en la última década se han reportado efectos de esta hormona sobre otras funciones cerebrales y algunos efectos en órganos periféricos, pudiéndose incluir en efectos endócrinos y no endócrinos, o bien, como efectos conductuales, efectos metabólicos, efectos sobre la organización y periodicidad circádica, efectos inmunológicos, y efectos sobre la regulación del ciclo celular (Cuadro II) (68).

Dentro de las funciones neuroendócrinas destacan las relacionadas con el eje pineal-ovárico en las cuales participa la MEL, siendo de los efectos sobre la reproducción más importantes que se mencionan la inhibición de la liberación de factores hipotalámicos ⁽⁹³⁾, los cuales regulan todas las facetas de la reproducción estacional y no estacional ^(51,70,93,212). Estas acciones se ejercen tanto en animales como en seres humanos ⁽¹⁴⁸⁾ (Fig. 7).

CUADRO II	
FUNCIONES PROPUESTAS PARA LA GP.	
•	AGRESION
•	ENVEJECIMIENTO
•	ACTIVIDAD ANTIMICOTICA
•	INFLUENCIA SOBRE LA MALIGNIDAD
•	PROLIFERACION CELULAR
•	HIBERNACION
•	ESTADO DE HIPER-EXCITABILIDAD Y EPILEPSIA
•	HIPERTENSION
•	CONSERVACION DE LA ORGANIZACION Y PERIODICIDAD CIRCADIANA
•	CONSERVACION DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA
•	EFFECTOS METABOLICOS SOBRE CARBOHIDRATOS, LIPIDOS Y PROTEINAS
•	MODULACION DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS
•	REGULACION FOTOPERIODICA DEL CICLO REPRODUCTIVO DE ANFIBIOS, REPTILES, PECES, AVES Y MAMIFEROS.
•	PUBERTAD, FERTILIDAD Y EMBARAZO
•	REGULACION DEL PESO CORPORAL
•	RESPUESTA Y ADAPTACION GENERAL AL ESTRES
•	ESQUIZOFRENIA
•	DESORDENES AFECTIVOS ESTACIONALES
•	EVENTOS DE SINCRONIZACION DE HIBERNACION
•	TERMORREGULACION
•	CAMBIO DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA ("THE JET LAG")
•	SED Y BALANCE DE ELECTROLITOS
•	MENOPAUSIA
•	MODULACION DEL EJE ADRENO-TIROIDES
•	PREFERENCIA POR EL ETANOL

Tomado de la referencia No. 68

La actividad antigonal de la MEL en los mamíferos está bien documentada ⁽¹⁹³⁾; siendo su efecto característico un retardo en la maduración de los ovarios y testículos, como consecuencia de sus efectos a todo lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas ⁽¹⁰⁹⁾, de tal manera que regula el efecto de la luz sobre los ritmos endócrinos relacionados a la fertilidad, la pubertad, el embarazo y el parto. Tanto la síntesis como la secreción de MEL muestran una fluctuación rítmica durante el embarazo y el parto en los seres humanos ^(95,209), en los que se observa un ritmo bifásico en los niveles plasmáticos de MEL, y a sido sugerida su participación en el inicio de la pubertad ⁽²¹³⁾. Además destaca la observación reportada por Yasini y cols ⁽²²³⁾ sobre el efecto regulador de tipo

inhibitorio de la MEL sobre la liberación de hormonas neurohipofisarias (vasopresina y oxitocina), lo que es significativo debido a que se han observado niveles elevados de MEL en el inicio del embarazo, aunque se propone que éstos pueden promover un incremento en la producción de progesterona y reducir la motilidad uterina, lo que favorecería la implantación y desarrollo del embrión ^(69,74,122,130). Por otra parte se reportó un incremento en la concentración de MEL en el líquido folicular con posibles implicaciones fisiológicas en la reproducción ⁽¹⁶⁸⁾.

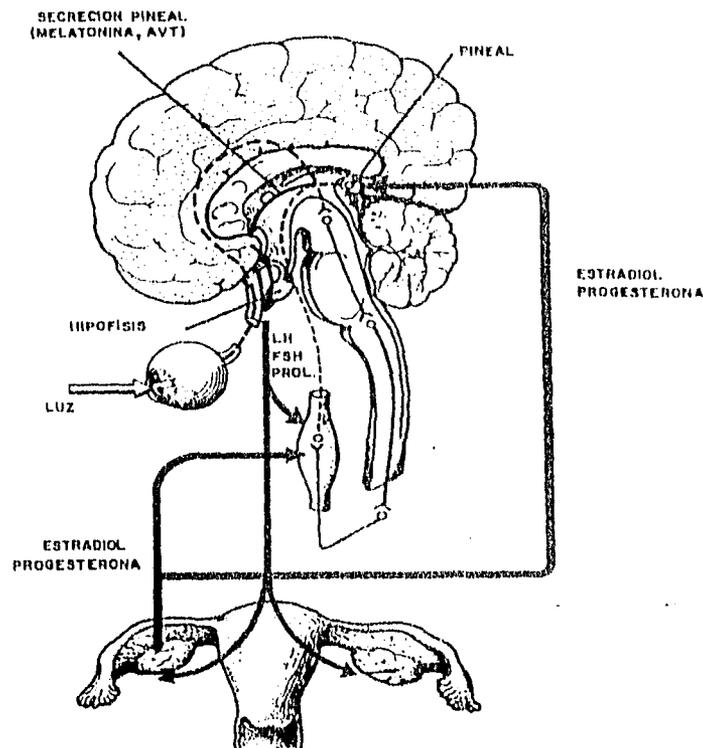


FIGURA 7: Representación esquemática del eje pineal-ovárico en el ser humano (35).

Los efectos de la MEL sobre la reproducción, pero que no están asociados directamente a al SNC, destaca la identificación de receptores en células de Leydig inmaduras, asociándose a una disminución en la síntesis de testosterona asociada además a la presencia de Hormona Luteinizante (201).

Por otra parte, en los últimos años, se ha iniciado el estudio de la influencia que posee la MEL sobre el desarrollo y los diferentes patrones fisiológicos del feto, llegando a establecer la hipótesis de que la producción de MEL y las concentraciones séricas de Hormona Folículo Estimulante (FSH) son influenciadas por la exposición fotoperiódica recibida durante la vida fetal (86,178,179).

Otro de los efectos de la MEL, es la regulación que ejerce sobre el ciclo celular (20) y la respuesta inmune (117); lo que ha provocado que sea involucrada en enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y en el cáncer (76,173,194). A este respecto, los animales pinealectomizados presentan un incremento de la tasa de mitosis en tumores experimentales, facilita el crecimiento y la propagación del carcinoma walker 256 en ratas (165); acelera el crecimiento de sarcomas transplantados

en ratas y facilita la propagación metastásica del melanoma maligno en animales de experimentación; aunque también posee efectos anticancerígenos en otros tipos de tumores.

En los humanos, el déficit en la función de la GP; expresada como la disminución de la secreción o pérdida de la liberación circádica de MEL ⁽¹⁶⁹⁾, puede ser considerada como un factor de riesgo adicional en el desarrollo del carcinoma endometrial ⁽¹⁷³⁾.

La MEL también inhibe el crecimiento de cáncer de mama en ratas y ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en cultivo de células cancerosas de mama MCF-7 provenientes del ser humano ⁽²²⁾, lo que indica que puede actuar como una hormona inmunomoduladora endógena. Estas acciones involucran a los antígenos activadores de linfocitos de células T, probablemente por un mecanismo opiopeptidérgico ^(117,118).

Algunas evidencias experimentales muestran una asociación entre la actividad de la GP y enfermedades como la esclerosis múltiple ⁽¹⁷²⁾, la disquinesia tardía, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer ⁽¹²⁴⁾ y padecimientos psiquiátricos como la depresión y la esquizofrenia ^(174,175).

En desórdenes afectivos como la depresión bipolar, existe una respuesta de supersensibilidad de la GP a la luz; en tanto que durante la depresión mental recurrente a veces muy marcada, existe una disminución de su secreción, por lo que los pacientes responden al tratamiento con esta hormona ^(115,196). También se describió suparticipación en la inducción del sueño ^(84,191,216) y como una sustancia anticonvulsiva ^(71,72).

Dentro de los efectos cerebrales no endócrinos, inicialmente se mostró su acción sobre la actividad locomotriz. Esta hormona induce una supresión marcada y duradera de todos los parámetros locomotores de la rata ⁽¹⁵⁴⁾.

Por otra parte la MEL también participa en la neutralización de los efectos tóxicos de compuestos oxidantes. Esta acción antioxidante ha sido atribuida a la presencia del grupo metoxi en el anillo y del grupo acetilo en la cadena lateral, por lo que tiene la capacidad de capturar radicales hidroxilo, incrementando la destoxicación y eliminación de radicales hidroxil tóxicos y altamente reactivos por una acción directa, y regulando el equilibrio de oxidación-reducción en el medio interno y protegiendo del

daño oxidativo a los componentes bioquímicos de las células, particularmente en los ácidos nucleicos (158,159); pero además reduce la generación y formación de radicales hidroxil por disminuir la concentración de peróxido de hidrógeno a través de estimulación de la enzima glutatión peroxidasa (14).

C) MECANISMO DE ACCION DE LA MELATONINA.

A pesar de las múltiples descripciones de los efectos antigonadotrópicos de la MEL, el sitio exacto de su acción está aún en discusión ⁽¹⁸⁷⁾. Probablemente el principal órgano blanco sea el SNC, pues es el tejido que posee mayor concentración de receptores, y es donde este indol modifica funciones metabólicas tales como la síntesis de proteínas ⁽⁴¹⁾, el contenido de 5-HT ⁽⁶⁾ y ácido gama-aminobutírico, la liberación y recaptura de neurotransmisores ⁽⁴⁰⁾, los niveles de tubulina, la liberación de LHRH ⁽⁸⁾ y la modificación en la actividad eléctrica cerebral ⁽¹³⁷⁾. En el SNC, el sitio más afectado es el hipotálamo, principalmente el área retroquiasmática, supraóptica y preóptica, con la consecuente modificación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis, lo cual provoca cambios en las concentraciones circulantes de hormonas hipofisarias y en el contenido y recambio de neurotransmisores.

El mecanismo de acción por el cual la MEL ejerce sus múltiples efectos, se vuelve complejo conforme se incrementan los procesos biológicos en los que participa la MEL. Sin embargo, actualmente se acepta que los efectos atribuidos a la MEL sean mediados a través de receptores membranales o intracelulares (ya sea en el citosol o en el núcleo) ⁽⁶⁵⁾.

En el SNC se han propuesto diversas hipótesis ⁽³⁵⁾ que sugirieren la posibilidad de que modifique la síntesis y transporte de neurotransmisores, el almacenamiento, liberación y metabolismo presináptico; la recaptura de neurotransmisores, la interacción neurotransmisor-receptor; el metabolismo postsináptico, o bien, algunos otros mecanismos postsinápticos; sin embargo, los estudios realizados se desarrollan a partir de dos paradigmas: uno indica que los efectos de la MEL están mediados a partir de receptores membranales, en tanto que el otro sugiere sitios de acción intracelulares (Fig. 8) ⁽⁶⁵⁾.

Con el empleo de MEL marcada con material radioactivo y de técnicas inmunoquímicas, autorradiográficas ⁽²⁰⁷⁾ y estudios *in vitro* ⁽¹⁸⁶⁾, se han identificado sitios de unión a la MEL en diversos tejidos de roedores (ratón, rata, hamster y conejo), ovinos, aves, lagartijas, peces y en el hombre ^(68,189). Dentro del SNC se describieron sitios de unión en la retina ⁽⁶⁶⁾, el núcleo supraquiasmático de humanos y roedores, la pars tuberalis de la eminencia media, el área postrema, los núcleos talámicos, el hipotálamo, la corteza occipital y cerebelar, el núcleo estriado, el puente y la amígdala de bovinos y roedores, la

glándula pineal y la hipófisis (44,67,100,101,207). Por otra parte, se han descrito sitios de unión en tejidos extraneurales como el ovario, vasos sanguíneos, hígado, testículo, pulmón, corazón, riñón, epifidimo y glándulas adrenales (34,55,107).

POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE LA MELATONINA

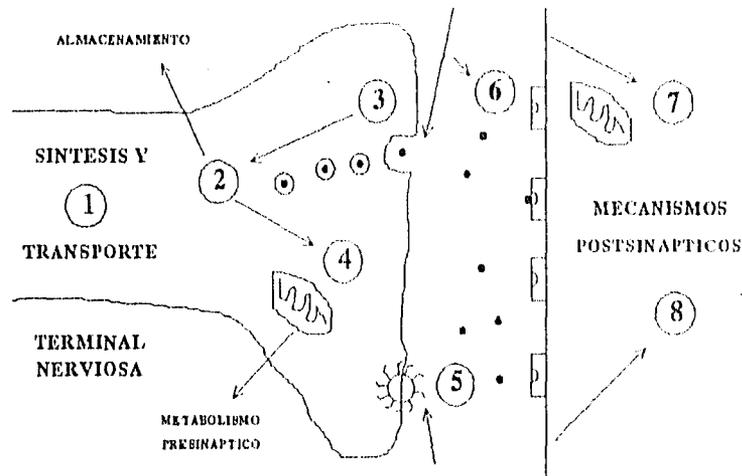


FIGURA 8: Representación de los posibles mecanismos de acción que se sugieren para que la MEL ejerza sus efectos, entre los que se indican modificación a nivel de: 1) síntesis y transporte de neurotransmisores, 2) almacenamiento, 3) liberación, o 4) metabolismo presináptico; 5) recaptura de transmisores; 6) interacción neurotransmisor-receptor, 7) metabolismo postsináptico, y 8) otros mecanismos postsinápticos (35).

Muchos de estos estudios difieren en las constantes de afinidad (kd) que reportan, lo cual probablemente sea debido al sitio cerebral analizado y a los ligandos marcados de MEL empleados ($^3\text{H-MEL}$, $^{125}\text{-MEL}$). El uso de $^3\text{H-MEL}$ revela sitios de unión de alta afinidad dentro del rango nanomolar en cerebro de ratas y ovinos, mientras que los estudios realizados por Laudon y Zisapel (108) empleando MEL iodada ($^{125}\text{-MEL}$) refieren la existencia de sitios de unión de alta afinidad con kd en el rango picomolar compatibles con una simple clase de receptores. Sin embargo, los estudios realizados por Dubocovich y cols (63-67,99) con $^{125}\text{-MEL}$, reportan una kd en el rango picomolar y otra en el rango nanomolar.

Aunque los resultados de estos estudios aún son muy controversiales en cuanto a la afinidad de estos sitios de unión, la existencia de receptores específicos a la MEL queda fuera de toda

duda, debido a que recientemente, un DNAc codificador del receptor a MEL fue clonado a partir del melanóforo de *Xenopus laevis*, se trata de una proteína de unión de alta afinidad a 125 I-MEL, posee 420 aminoácidos con siete dominios transmembranales hidrofóbicos; también se reportó la clonación de un DNAc que codifica a receptores a MEL en humanos y ovejas (Fig. 9) ⁽⁶⁵⁾.

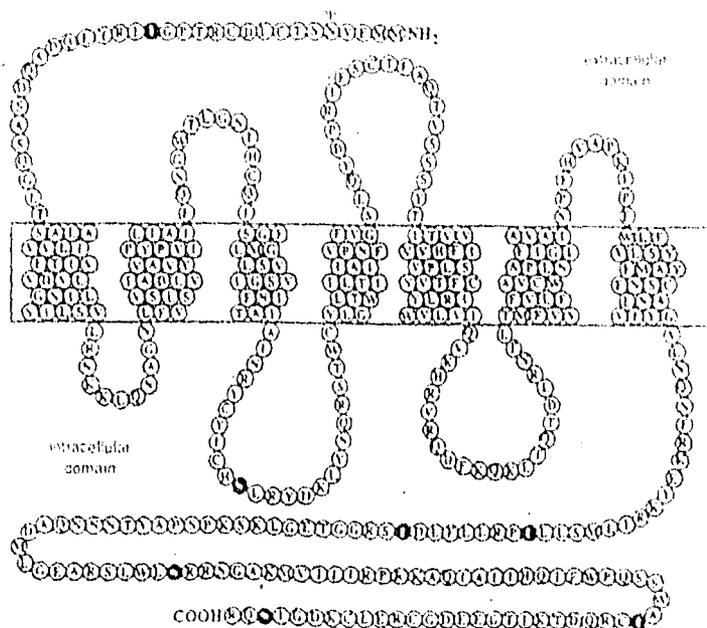


FIGURA 9: Secuencia de aminoácidos del receptor a MEL del melanóforo de *Xenopus laevis*. Los círculos en el rectángulo representan los residuos de aminoácidos en los siete dominios transmembranales. Se muestra el posible sitio de glicosilación y sitios de fosforilación de PKC ⁽⁶⁵⁾.

Tanto la diferencia como las variaciones de la afinidad del rango nanomolar al rango picomolar reportada puede ser explicada por dos mecanismos: la regulación de un sólo tipo de receptor a la MEL; o la expresión de dos tipos diferentes de receptores a la misma.

Dubocovich ^(63,65,99) propone la existencia de dos subtipos de receptores a MEL: ML_1 y ML_2 (Fig. 10). El sitio de unión ML_1 posee características farmacológicas idénticas en retina de pollo y conejo, es de alta afinidad, el valor de la K_d es de una magnitud en el rango picomolar, es reversible y saturable; esta funcionalmente asociado con la inhibición de la liberación de dopamina dependiente de Ca^{+2} ⁽²²⁹⁾, la potenciación de la respuesta contractil a la noradrenalina exógena, la estimulación nerviosa

en la arteria caudal de la rata, con los cambios circadianos de la actividad eléctrica en el núcleo supraquiasmático de la rata y con la inhibición de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (202). La vía de transducción intracelular es la inhibición de formación de AMPc a través de una proteína G inhibidora sensible a toxina pertusis (63,65,99,199).

El sitio de unión ML_2 se localiza en membranas de cerebro y se caracteriza por una menor afinidad por 125 -MEL (rango nanomolar), además de que la velocidad de asociación y (disociación) es mayor que la encontrada en la retina de pollo. La vía de transducción está acoplada a la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos via una proteína G. Debido a que la distribución de este subtipo de receptor no ha sido bien determinada las funciones fisiológicas de este receptor son aún difíciles de precisar (63,65,99).

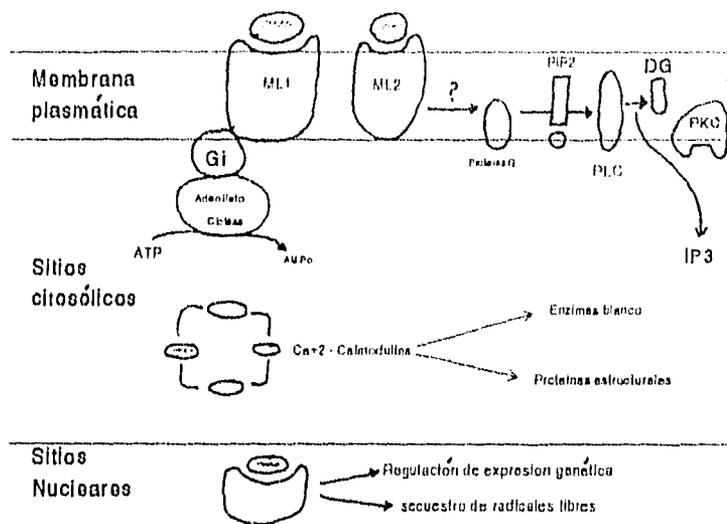


Figura 10: Posibles sitios de acción para MEL en la membrana plasmática (vía receptores ML_1 y ML_2), el citoplasma y el núcleo de la célula. DG, diacilglicerol; IP_3 , inositol 1,4,5-trifosfato; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C (65).

Por otra parte, existen evidencias experimentales que sugieren un solo tipo de receptor, pero que su afinidad a MEL es regulada por la oscilación del fotoperíodo, o por un microambiente iónico específico. Laitinen y cols (100) mostraron que el sitio de unión de alta afinidad a 125 -MEL en el núcleo supraquiasmático de la rata, posee un ritmo diurno, lo que podría reflejar la oscilación de la Ca^{2+} del

receptor en los rangos pico y nanomolar. Esto indicaría que la afinidad de los receptores a la MEL oscila a lo largo del fotoperíodo. Tal sugerencia recibe apoyo de estudios que muestran un sitio de alta afinidad en el SNC de ratas sacrificadas durante la mañana con una K_d en el rango picomolar; mientras que durante la noche se observa la aparición de formas de baja afinidad. Además, el ritmo circadiano de secreción de MEL y variación en la inhibición de la liberación de dopamina en el hipotálamo *in vitro*, son indicativos de un ritmo circadiano en la afinidad a los receptores a la MEL del cerebro de rata ⁽¹⁰⁴⁾.

Sin embargo, no se han observado variaciones en la afinidad de receptores en la pars tuberalis de ratas y hamsters asociados a cambios estacionales u hormonales (testosterona) ⁽¹⁰⁾; en tanto que en aves, se observó un aumento en el número total de sitios de unión más que un incremento de la afinidad al compararse por análisis de Scatchard los valores obtenidos durante el fotoperíodo ⁽²⁹⁾.

Laitinen y Saavedra ^(102,103) reportaron que la unión de 3H -MEL es inhibida por nucleótidos de guanina, NaCl, Na^+ -fosfato y LiCl, a concentraciones milimolares y de manera dependiente de la concentración. Este hallazgo sugiere que la unión de la MEL a sus receptores, también depende de la existencia de un ambiente iónico específico; aparentemente la presencia de estos cationes monovalentes modula directamente la afinidad del receptor hacia la MEL. Aunque se desconoce el mecanismo de tal modulación; es probable que esto sea consecuencia de cambios en la conformación de la molécula del receptor, como ocurre en el caso del receptor a TRH ⁽⁸¹⁾.

Adicionalmente el calcio promueve la unión de la MEL a su receptor de alta afinidad, mientras la ausencia de este catión disminuye la afinidad del receptor. Por el contrario, la presencia de 50 mM de NaCl o de GTP-s reduce significativamente la afinidad de tal receptor ⁽¹⁰³⁾. Resultados experimentales muestran que las concentraciones micromolares de nucleótidos de guanina y de cationes monovalentes (Na^+ y Li^+) inhiben en forma específica la unión de 3H -MEL. Además, las concentraciones picomolares de MEL inhiben la acumulación de AMPc provocada por forskolin, lo que sugiere que el receptor a MEL está acoplado a la proteína G sensible a toxina pertusis ⁽⁴⁵⁾; este sistema de segundos mensajeros es el encargado de transducir la señal intracelularmente ⁽²¹⁵⁾.

Aunque los sitios de unión a la MEL poseen un significado biológico y median muchos de los efectos fisiológicos que esta hormona ejerce, como es el caso de los receptores a la MEL en el tejido

vascular de la arteria cerebral ⁽³⁴⁾ y caudal de la rata ⁽¹⁷⁶⁾; los cuales se correlacionan con su participación en la termorregulación corporal ^(177,211), también existen datos sugerentes de que la MEL puede actuar a través de un fenómeno diferente, utilizando un mecanismo que involucra receptores similares pero que dispara eventos intracelulares diferentes a los mencionados. Adicionalmente, es posible que la MEL interactue con algunos sitios citosólicos y nucleares para mediar una variedad de efectos celulares en tejidos desprovistos de receptores unidos a membranas ⁽⁵⁵⁾.

Al respecto, Anton-Tay y cols. reportaron efectos de la MEL sobre la estructura del citoesqueleto ⁽¹⁸⁾, consecuencia de una modificación en los niveles celulares de calmodulina ⁽¹⁹⁾; aparentemente el mecanismo de acción es una inhibición del 50% de la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina. La incubación de células MDCK con MEL, provoca una compartimentalización de la calmodulina, la cual se acumula muy cerca de la membrana plasmática. Estos autores encontraron que la ³H-MEL se une a la calmodulina con una alta afinidad, de manera específica, rápida, estable, reversible, y dependiente de calcio; por lo que proponen la unión de MEL con calmodulina como el mecanismo de acción de esta hormona ⁽⁵²⁾.

Por otra parte, algunos efectos provocados por la MEL sugieren su asociación con organelos intracelulares; así, cuando esta hormona se asocia con tubulina purificada de hipotálamo se reduce el transporte axonal rápido (proceso dependiente del sistema microtubular), como consecuencia se producen cambios ultraestructurales en la eminencia media, los cuales son compatibles con reducción de la neurosecreción. También la migración de pigmentos en la piel de anfibios ^(162,188), la inhibición de la mitosis celular y probablemente algunos cambios neuroendócrinos en vertebrados superiores son consecuencia de la modificación de proteínas contráctiles intracelulares de tipo de la tubulina provocadas por la MEL ^(18,36).

En el núcleo celular, este indol puede actuar como un secuestrador de radicales libres, protegiendo el DNA de efectos citotóxicos ⁽¹⁵⁹⁾. Además, la MEL se une y activa un miembro orfan (RZRB) de la superfamilia de receptores nucleares, lo cual puede representar el sitio de unión nuclear descrito recientemente e indica que esta hormona puede regular la expresión genética ⁽¹⁵⁸⁾. Esto permite discernir las vías de señalización nuclear que utiliza la MEL para ejercer sus efectos oncostáticos,

inmunológicos y anti-envejecimiento. Por otra parte, la MEL inhibe la síntesis de prostaglandinas ^(61,111) en varias estructuras como el hipotálamo mediobasal ⁽⁷⁶⁾ y el útero, como parte de su papel en el mecanismo de acción hormonal ^(59,78,105).

Otros eventos asociados al mecanismo de acción de la MEL que actualmente se exploran es la probabilidad de que actúe a diferentes sitios para regular una respuesta neuroendócrina individual a cambios estacionales ⁽¹²⁵⁾, o bien, desde un enfoque del desarrollo, a través de la coexistencia de "factores difusibles" ⁽²¹⁹⁾.

Como en el caso de los sitios de unión a MEL, se han identificado una pluralidad más que una singularidad de presuntos segundos mensajeros que participan en la transducción de la señal de MEL para producir sus efectos ^(65,99,186,187). Entre los segundos mensajeros se encuentran los nucleótidos cíclicos (disminución de AMPc, y un posible incremento en la producción de GMPc) ^(45,199,210,216,228), derivados del ácido araquidónico ⁽⁹⁹⁾ y el calcio ⁽²⁰⁰⁾ (Fig. 10).

Se ha observado que la MEL provoca una reducción en la actividad eléctrica de las células del hipotálamo anterior y lateral, lo que indica que ejerce una acción moduladora de tipo depresor e inhibitorio sobre la excitabilidad celular ⁽²⁰³⁾; aunque el mecanismo de este efecto, aún es motivo de discusión, análisis y estudio ⁽¹⁸⁶⁾; en tanto que en la pars distalis de la hipófisis, la inhibición de la corriente de entrada de calcio y las modificaciones del potencial de membrana son importantes mediadores de los efectos de la MEL ⁽¹³³⁾.

Estudios realizados en melanóforos de *Xenopus laevis*, han permitido comprender el mecanismo de acción de la MEL a través de mecanismos dependientes del flujo de calcio y del bloqueo por la toxina pertusis, sugiriéndose que está involucrada una proteína G en la respuesta. Por otra parte, se ha propuesto que el receptor a MEL de alta afinidad está acoplado a una proteína G_i , lo que le permite regular una variedad de eventos intracelulares, como la producción de nucleótidos cíclicos, mecanismos de regulación del calcio, fosfoinosítidos, prostaglandinas, potencial de membrana y canales iónicos. La MEL puede actuar disminuyendo la disponibilidad de calcio para los procesos secretorios pudiendo ser afectada la entrada de iones de calcio a la terminal nerviosa presináptica. Un importante mecanismo de

transducción de la señal de MEL involucra la inhibición de la formación de AMPc debido a la inhibición de la adenilil ciclasa.

Aunque todos estos estudios puntualizan la interacción de la MEL con un sitio de unión específico como prerequisite para ejercer su efecto, existen incongruencias difíciles de explicar con este modelo de acción. El más importante es el rango de la dosis; para reproducir muchos de los efectos de la MEL se requiere de dosis suprafisiológicas ⁽²²²⁾. Por ejemplo, se requiere entre 100 a 10,000 veces la concentración fisiológica para reproducir los efectos antigonadotrópicos de la MEL ⁽¹⁹³⁾. Los requerimientos de las dosis no parecen ser consecuencia de las propiedades farmacocinéticas de la MEL ⁽¹²⁸⁾, puesto que por su solubilidad, esta hormona atraviesa prácticamente y con mucha facilidad cualquier tipo de membrana celular ⁽⁹⁷⁾. Por esta discrepancia, usualmente se refieren dos tipos de efectos de la MEL: los fisiológicos y los farmacológicos ⁽¹⁴⁴⁾. Estos últimos no parecen ser consecuencia de una acción a través de receptores específicos, sino que podrían ser consecuencia de una interacción entre la MEL y algunas lipoproteínas de la membrana celular ⁽⁸⁾.

D) INTERACCION ENTRE CALCIO Y MELATONINA.

El calcio intracelular participa como segundo mensajero en procesos fundamentales como la liberación de neurotransmisores (11,70,182) y el control de la excitabilidad de la membrana celular de los tejidos excitables (11,152,153,170,182), inicia el acoplamiento excitación-contracción, el acoplamiento excitación-secreción y múltiples procesos bioquímicos, los cuales controlan la apertura de canales iónicos (50), la actividad enzimática, el metabolismo y la expresión genética (195,214). De igual manera, la estimulación hormonal o por neurotransmisores, también incrementa la concentración del ion calcio en el citosol, al activar canales iónicos de calcio dependientes de la presencia de un complejo receptor-hormona (23,91).

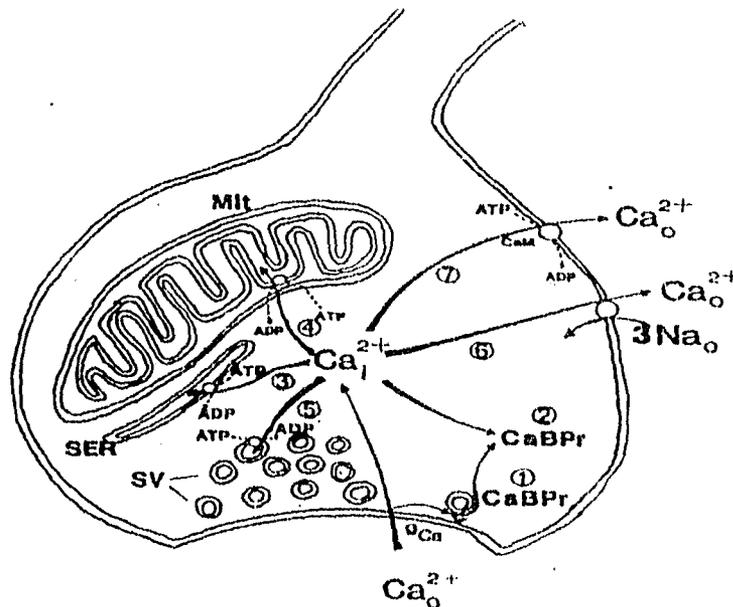


FIGURA 11: Vías de transporte y organelos involucrados en la regulación de la concentración intracelular de calcio en una terminal presináptica. g_{Ca} , conductancia de Ca^{2+} disparado por voltaje, (1) proteínas unidas a Ca^{2+} , CaBPr involucradas en la señalización (e.g. liberación de transmisores); (2) Proteínas unidas a Ca^{2+} , CaBPr involucradas en el buffering de Ca^{2+} (e.g. parvalbumina). Organelos involucrados en el secuestro de Ca^{2+} ; (3) SER, retículo endoplásmico liso (calciosomas); (4) Mit, mitocondria; (5) SV, vesículas sinápticas. Vías de expulsión de Ca^{2+} ; (6) bomba Na^+/Ca^{2+} ; (7) Bomba $ATP-Ca^{2+}$. El Ca^{2+} puede entrar al citosol vía bomba Na^+/Ca^{2+} (6) y puede ser liberado de almacenes internos (3) (23).

Los incrementos transitorios en la concentración intracelular de calcio tienen dos orígenes (Fig. 11); uno de ellos se debe a su liberación de los almacenes intracelulares asociados con el retículo endoplásmico; en todo caso, diversos estímulos importantes (tales como hormonas o neurotransmisores) actuando sobre un receptor de superficie celular, estimulan la ruptura del fosfatidilinositol fosfato, generando con ello diacilglicerol e inositol trifosfato (IP_3). Una vez que los receptores intracelulares a IP_3 son activados, éstos provocan la disociación del Ca^{+2} de sus proteínas almacenadoras con lo cual la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma se incrementa ⁽¹³⁶⁾. El otro origen es el calcio extracelular que penetra al interior de la célula por un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, la cual en condiciones de no estimulación es prácticamente impermeable a calcio. La entrada de calcio es consecuencia de la apertura de canales a través de los cuales este ion pasa al citoplasma ⁽¹²⁷⁾.

Cuando la concentración intracelular de calcio se incrementa, ésta se une a proteínas localizadas en el citoplasma, del tipo de la calmodulina, formando un complejo calmodulina-calcio el cual es biológicamente activo. Por el contrario, cuando la concentración intracelular de calcio disminuye, el ion se disocia de la proteína receptor y con ello se incrementa su concentración. De esta manera, el calcio participa en la transducción de la información de la superficie celular hacia el interior de la célula.

La coexistencia de múltiples tipos de corrientes de calcio en un solo tipo de células ha sido demostrado en experimentos de fijación de voltaje; sin embargo, ninguno de los canales posee un papel biológico en particular; por ejemplo, en el corazón, los canales de calcio tipo T (activados por bajo voltaje -LVA-) están involucrados en la regulación de actividad de marcador de paso, mientras los canales tipo L y N (activados por voltaje elevado -HVA-) lo son en el acoplamiento excitación-respuesta; mientras que la secreción depende de la corriente de entrada de calcio a través de canales tipo T, L o N, dependiendo del tejido y el transmisor u hormona involucrado ^(50,127,198).

Muchas evidencias experimentales muestran que el calcio juega un papel importante en diversos eventos relacionados con la MEL, como es el caso en la regulación de su síntesis y secreción, o bien, participando en el mecanismo de acción, ya sea mediado a través de su receptor, o bien, por una unión a proteínas específicas (canales iónicos) de la membrana celular o incluso por su asociación con proteínas intracelulares ^(18,52).

La secreción de MEL está acoplada a su síntesis ⁽²⁾ y no existen evidencias de que se almacene ⁽³⁶⁾, para su liberación los flujos de calcio a través de canales dependientes de voltaje juegan un papel fundamental ^(190,227). El ingreso del ion calcio a través de estos canales incrementa la concentración intracelular de calcio inorgánico en los pinealocitos de 2-4 veces más que en condiciones basales ^(152,153,226). La importancia de estas corrientes de calcio en la síntesis de MEL se manifiesta cuando se aplica nitrendipina, Bay K8644, cobalto y magnesio, así como bajas concentraciones de calcio ⁽²²⁶⁾; en estas condiciones, tanto la síntesis como la liberación de MEL se reducen significativamente. Además, la adición de concentraciones elevadas de calcio a homogenizados de pineal, reduce la actividad de la enzima NAT ⁽¹⁴¹⁾.

En algunos tejidos, el calcio promueve la unión de 125 -MEL a receptores ML_1 ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. Además, los estudios realizados por Zizapel y Laudon ⁽²²⁹⁻²³¹⁾ muestran que la MEL inhibe la liberación de dopamina provocada, ya sea eléctricamente o por potasio, en neuronas de hipotálamo de rata. Este efecto es consecuencia de un bloqueo de la entrada de calcio al interior de la terminal nerviosa presináptica aunque se desconoce el por qué este efecto no se ejerce en todas las células que liberan dopamina. Estos datos muestran que la MEL puede afectar alguna etapa de la cascada de eventos que involucran al calcio intracelular y que es necesaria para liberar dopamina. Este efecto es sensible a la presencia de calcio extracelular, lo que sugiere que la MEL puede disminuir la disponibilidad de calcio para el proceso secretor al modificar la entrada de iones de calcio en la terminal nerviosa presináptica ⁽⁹⁹⁾. Sin embargo, no ha sido posible discriminar si el calcio, en este efecto provocado por la MEL, constituye una parte de la vía de señalización asociada al receptor a MEL o es simplemente un requerimiento del proceso de liberación de dopamina ⁽¹³³⁾.

El efecto antigonadotrópico de la MEL puede ser consecuencia de inhibir la corriente entrante de calcio. Por ejemplo, la MEL reduce la movilización de calcio inducida por LHRH, efecto que no se manifiesta cuando se reduce la concentración de calcio extracelular ⁽²⁰²⁾. Estudios recientes señalan que la MEL bloquea la entrada de calcio del canal tipo L dependiente de voltaje ^(202,203). Consecuentemente la MEL provoca una hiperpolarización de la membrana y repolariza los efectos despolarizantes provocados por la LHRH ⁽²⁰³⁾.

En la hipófisis esta acción de la MEL es mediada por un mecanismo sensible a la toxina pertusis. Además, la acción sobre el potencial de membrana es sensible a sodio lo que implica la participación del AMPc y de una ATPasa dependiente de la Na^+/K^+ (187). En la hipófisis anterior de rata neonatal la MEL inhibe el incremento que induce la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnHR) de la corriente de entrada de Ca^{+2} a través de canales de calcio dependientes de voltaje.

Se ha descrito también que la MEL disminuye, en preparaciones celulares y subcelulares cerebrales, la recaptura de Ca^{+2} inducida por la despolarización, sugiriendo una actividad moduladora de esta hormona sobre canales de calcio controlados por voltaje en grupos neuronales (228).

También otras acciones de la MEL parecen ser mediadas a través del mecanismo que involucran la movilización de calcio. Por ejemplo, estudios que analizan el movimiento físico de gránulos de pigmento de la piel de anfibios muestran que el retiro de calcio del medio induce la disminución de la respuesta de agregación del pigmento en melanóforos a MEL (126,188); aunque este hallazgo es un tanto controversial (220); además, la aplicación del ionóforo A23187 da resultados ambigüos cuando se aplica a melanocitos aislados (126). Sin embargo, Sugden (189) reportó que el retiro del calcio extracelular o la aplicación de varios cationes divalentes, capaces de bloquear la entrada de calcio, bloquea la agregación de pigmentos inducido por MEL.

E) EL CALCIO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO.

En el caso del músculo liso aislado expuesto a estímulos de tipo eléctrico, neuronal o humoral, existe una serie de eventos que incluyen la activación neuronal y celular, la interacción agonista-receptor, el acoplamiento eléctrico y mecánico entre células musculares, y la modulación intracelular de la respuesta contractil ⁽¹⁾.

Al ocurrir la activación del músculo liso por acción de un agonista en el ambiente externo, el primer paso es la formación de un complejo reversible entre las moléculas del agonista y los receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la célula muscular. Subsecuentemente se presenta un incremento de la corriente de entrada del ion calcio a través de la membrana plasmática y/o la liberación de iones de calcio provenientes de depósitos intracelulares ⁽⁸⁷⁾. El calcio intracelular se une a la calmodulina y el complejo calmodulina-calcio activa a la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina. La enzima activada cataliza la fosforilación de la cadena ligera de miosina, presentándose la unión de la miosina a la actina y el aumento de la actividad de la ATPasa de miosina, teniendo como resultado final la contracción muscular ⁽²⁴⁾. Finalmente, se produce una desfosforilación de la miosina por diversas fosfatasas y en consecuencia se presenta la relajación (Fig. 12).

Cuando se presenta un sostenimiento de la contracción del músculo liso, éste se debe a la presencia de una corriente de entrada del ion calcio a través de canales operados por receptor y dependientes de voltaje ⁽⁹²⁾. Este incremento intracelular de calcio a expensas del calcio extracelular, se considera el factor determinante en el acoplamiento excitación-contracción del músculo liso ^(24,152,153).

Estos eventos ponen de manifiesto el papel del calcio en la regulación de la contracción del músculo liso. Esta regulación es de dos tipos (Fig. 12): fosforilación de la cadena ligera de miosina y unión directa del calcio para activar la actomiosina.

La permeabilidad que la membrana celular del músculo liso muestra a los diferentes iones inorgánicos en condiciones fisiológicas es determinante para la modulación de la actividad de las proteínas contráctiles que desarrollan la tensión muscular. Muchos fármacos que contraen o relajan al músculo liso, alteran esta permeabilidad celular.

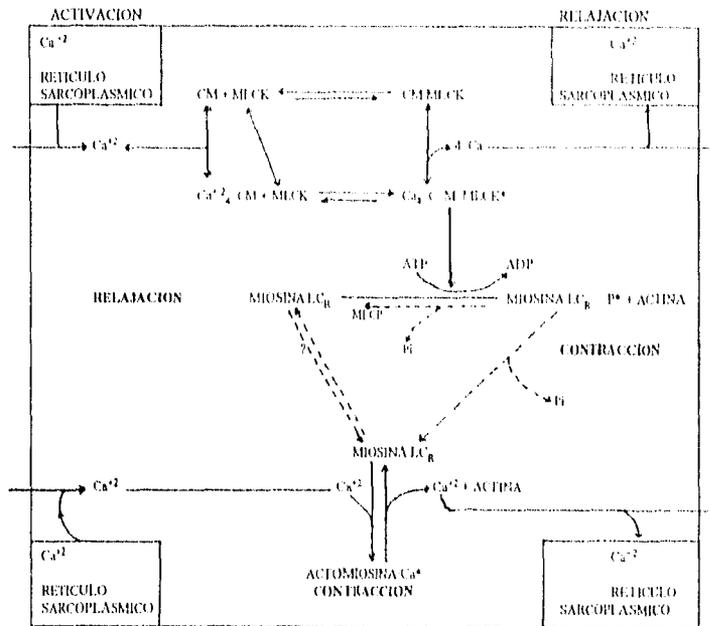


FIGURA 12: Regulación de la contracción de músculo liso por el Ca^{+2} . Se presentan los eventos para la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) dependiente de calmodulina (CM), y la activación de la actomiosina por unión directa de calcio (Ca). LC_R = cadena ligera de miosina; $MLCP$ = Fosfatasa de la cadena ligera de miosina (24, 88).

Para describir el mecanismo de acción de diversos fármacos sobre el músculo liso es necesario tener presente (Fig. 13 y 14):

- a) La membrana celular de varios tipos de músculo liso generan potenciales de acción en forma espontánea; estas despolarizaciones se asocian con un tipo de contracción, por lo que tejidos con musculatura lisa que no generan potenciales de acción, al ser despolarizados por el paso de corriente a través de su membrana celular o por otros mecanismos, responden con un incremento en su tensión. El músculo liso mantiene una tensión sostenida si es despolarizado, aún en ausencia de potenciales de acción (24).
- b) Los fármacos que incrementan la frecuencia de disparo de potenciales de acción incrementan el desarrollo de tensión muscular, mientras que aquellos que la disminuyen lo hacen por reducir la frecuencia de estos potenciales de acción (24). Tal efecto implica una modificación en el nivel de potencial de membrana.

c) En los tejidos con musculatura lisa que no generan potenciales de acción, los fármacos pueden o no despolarizar la membrana celular; aunque son capaces de incrementar la permeabilidad celular, facilitando con ello la entrada de calcio (o sodio) a la célula desde el espacio extracelular; además, el calcio localizado en los depósitos intracelulares puede ser liberado por la activación de estos receptores (24).

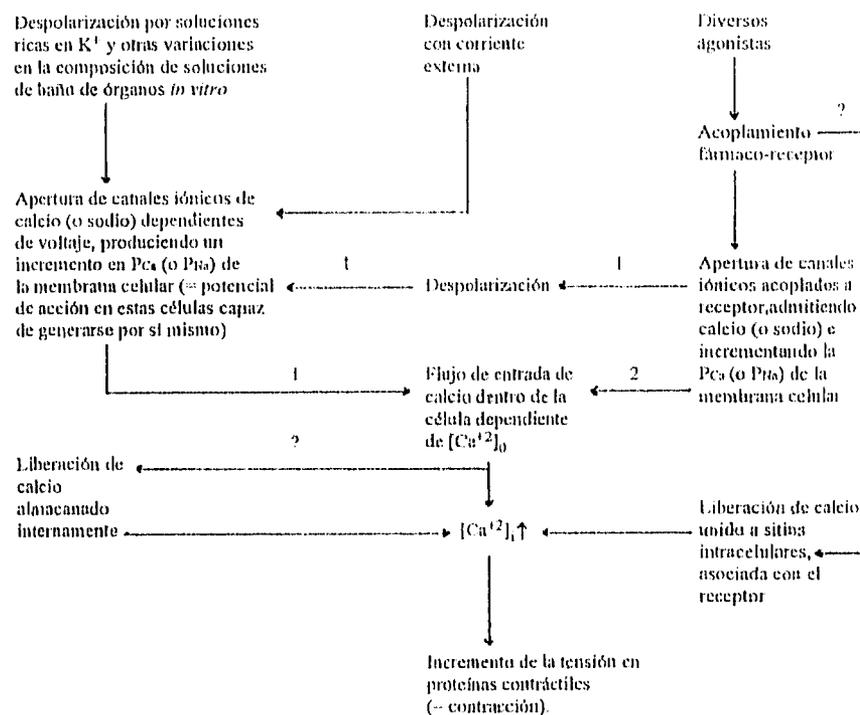


FIGURA 13: Diagrama de la cadena de eventos que se producen en el músculo liso que genera potenciales de acción, en presencia de un agonista (24).

En la generación de potenciales de acción, es fundamental el flujo de calcio a través de canales dependientes de voltaje (Fig. 14). Mientras que en las células que no generan potenciales de acción el mecanismo de acción del fármaco usualmente se asocia con la vía de receptor que estimula la liberación de calcio a partir de depósitos intracelulares (Fig. 15).

En el caso de sustancias que modifican la tensión del músculo liso, estos actúan a través de dos tipos de canales iónicos de la membrana celular (los canales operados por receptor y los canales dependientes de voltaje) los cuales facilitan la entrada a la célula de calcio y de otros iones (123,129).

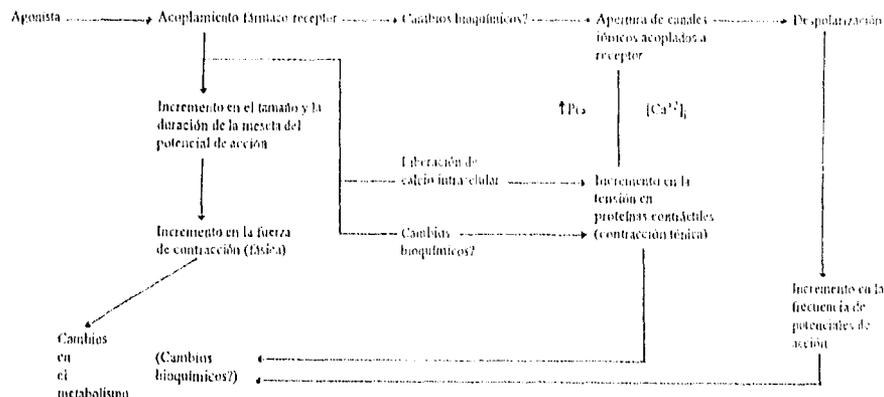


FIGURA 14: Posible papel del calcio en diversos mecanismos que estimulan al músculo liso. Pequeñas concentraciones de agonistas ejercen su efecto por la vía marcada con (1), y amplias concentraciones actúan por la vía marcada con (2) (24).

La activación de uno o ambos tipos de canales iónicos explica los efectos de sustancias estimulantes o inhibitoras, así como la participación del sistema T (tónico) o P (fásico) en la activación de la contracción del músculo liso (129).

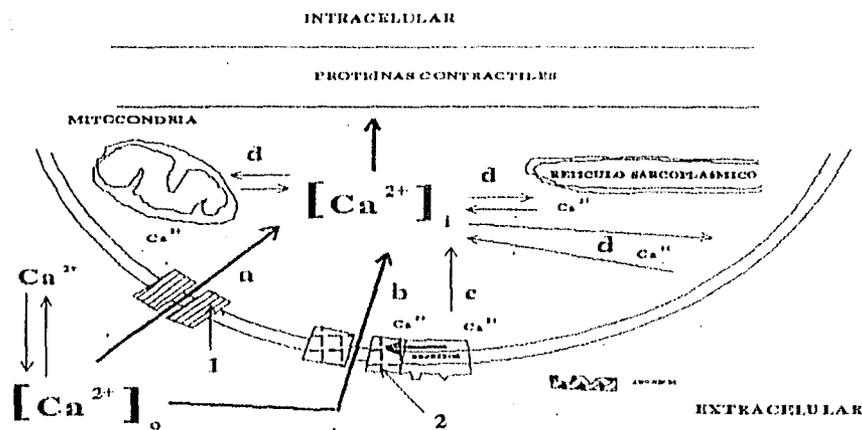


FIGURA 15: Representación de las fuentes de calcio involucradas en la contracción del músculo liso (24).

En resumen, en la musculatura lisa el potencial de acción consiste en un flujo de entrada de una cantidad sustancial de iones de calcio; aunque los iones de sodio también penetran a través de canales, sin embargo, el calcio es el principal ion involucrado en este proceso eléctrico en músculo liso.

F) PARTICIPACION DEL CALCIO SOBRE LA CONTRACCION UTERINA.

La mayor parte de la descripción acerca de la regulación de la contracción del músculo liso se ha obtenido de estudios realizados en el músculo liso vascular de mamíferos. Aunque existen claras diferencias entre los tipos de musculatura lisa; con respecto a sus propiedades morfológicas, electrofisiológicas y farmacológicas, se considera que los elementos y la regulación del proceso de contracción son comunes a todos. Así, en el caso del músculo uterino, el miométrico, al igual que otros tejidos con musculatura lisa, su contractilidad depende de la interacción de las proteínas de actina y miosina. La interacción actina-miosina, y con ello la contracción muscular, se produce solamente si la regulación de la cadena ligera de miosina ha sido fosforilada, reacción que es catalizada por la cinasa de la cadena ligera de miosina en un proceso que es dependiente de los niveles celulares de calcio ^(89,90) (Fig. 16). En este caso, la cinasa de la cadena ligera de miosina es regulada por tres eventos celulares ^(143,147):

- 1) Se requiere calcio para su activación necesaria para formar el complejo actina-miosina;
- 2) Se activa solamente cuando la calmodulina, proteína reguladora dependiente de calcio, se asocia con la enzima;
- 3) La fosforilación de la enzima inducida por AMPc inhibe su actividad.

En este tejido, la relevancia del calcio extracelular con respecto al intracelular en el proceso de la contracción no está aún bien establecida. sin embargo, se conoce que durante la contracción del músculo liso uterino, a través de múltiples mecanismos se observa un incremento de la concentración de Ca^{+2} citosólico libre de un nivel de 10^{-7} M a $0.5 - 1 \times 10^{-6}$ M. Este incremento de Ca^{+2} puede provenir de fuentes intracelulares de calcio, sin embargo, el Ca^{+2} extracelular también posee una importancia relativa (Fig. 17) ^(7,90,121,226).

Además, la actividad contractil del músculo liso uterino es regulada por hormonas durante el ciclo estral; así, es posible correlacionar los niveles hormonales con la actividad eléctrica o mecánica muscular, posiblemente a través de sustancias intermediadoras. Por ejemplo, la administración de agonistas alfa-adrenérgicos u otros estimulantes del sistema nervioso simpático estimulan la contracción

uterina. Estos fármacos al interactuar con receptores, incrementan la entrada de calcio al interior de la célula a través de la apertura de canales de calcio. Esta acción es resultado de procesos de fosforilación en la membrana celular. Por su parte, los agonistas β -adrenérgicos inhiben la contracción uterina, utilizando la activación de la adenilato ciclasa para formar AMPc. Esta sustancia reduce la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina además de que promueve la fijación de calcio por el retículo sarcoplásmico. En este sentido, los agentes estimulantes de la contracción uterina alfa-adrenérgicos causan un decremento en los niveles de AMPc, modificando la activación de la fosfodiesterasa (90).

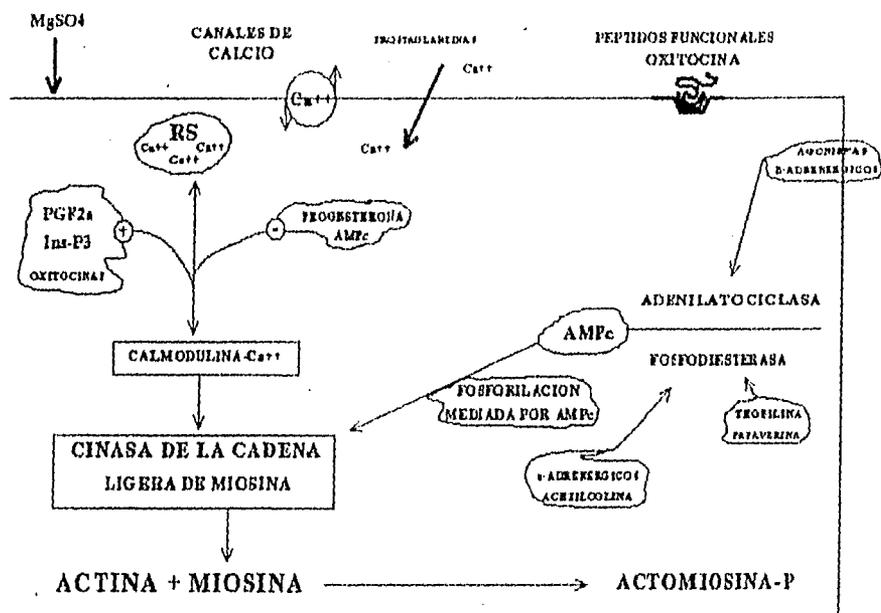


FIGURA 16: Regulación celular de la contractilidad del miometrio (90).

Los receptores uterinos sensibles a la oxitocina y a los agonistas alfa-adrenérgicos, se incrementan después de la administración de estrógenos (92). La oxitocina, potente hormona uterotónica secretada por la hipófisis posterior, promueve el incremento del calcio citosólico a partir del retículo sarcoplásmico y del medio extracelular. En medios libres de calcio, el incremento de la fosforilación de la cadena ligera de miosina inducida por oxitocina es transitorio, lo que sugiere que la oxitocina ejerce su efecto facilitando la entrada de calcio extracelular (90,140).

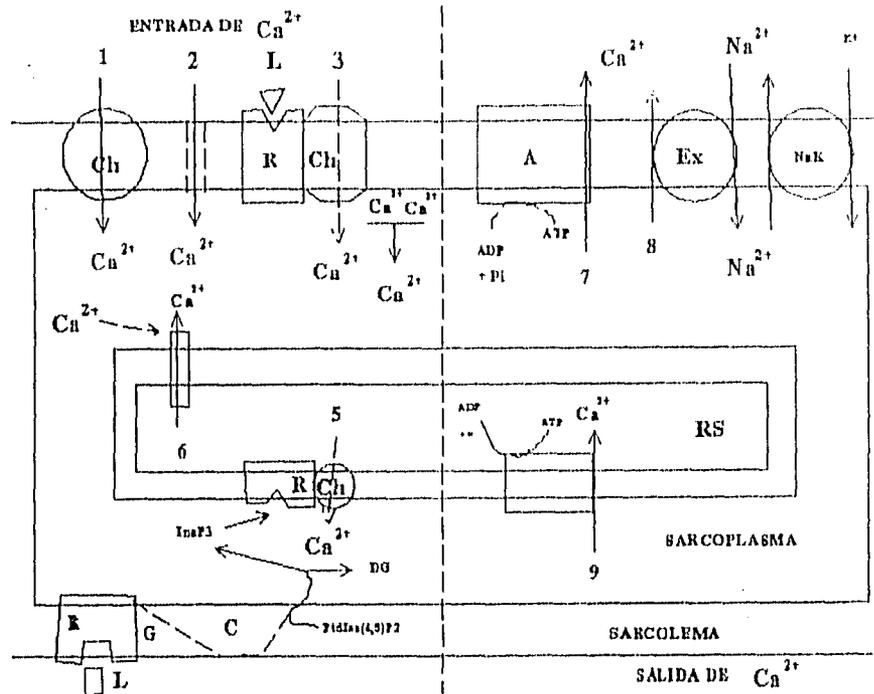


FIGURA 17: Representación del enfoque actual de la regulación del Ca^{+2} en células de músculo liso. Ch, canal; C, fosfolipasa; R, receptor; G, proteína G; A, ATPasa de Ca^{+2} ; Ex, intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$; NaK, $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPasa}$; L, ligando; DG, diacilglicerol; 1, canal de Ca^{+2} operado por voltaje; 2, flujo pasivo de entrada de Ca^{+2} (" Ca^{+2} leak"); 3, canal de calcio operado por receptor; 4, liberación de Ca^{+2} asociado al sarcólema; 5, liberación de Ca^{+2} mediado por InsP_3 del SR; 6, liberación de Ca^{+2} inducido por Ca^{+2} ; 7, ATPasa de Ca^{+2} de sarcólema; 8, Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$; 9, ATPasa de Ca^{+2} de SR (90).

Finalmente, la acetilcolina produce la contracción del músculo liso uterino también por movilización de iones de Ca^{+2} utilizando tres mecanismos diferentes (24,59,105):

- 1) Por un incremento de la corriente entrante de Ca^{+2} a través de canales dependientes de voltaje,
- 2) Por una corriente entrante de Ca^{+2} a través de canales de calcio operados por receptor,
- 3) Por una liberación de iones de Ca^{+2} de almacenes intracelulares provocando con ello una contracción transitoria.

En el caso específico del útero, los receptores colinérgicos muscarínicos inducen la activación de la contracción muscular a través de dos mecanismos bioquímicos: el incremento en la

formación de inositol-fosfato y la inhibición de la adenilato ciclasa; por lo que el carbacol, fármaco colinérgico, produce una inhibición del AMPc. Un mecanismo extra recién descrito implica la modulación de canales de potasio (112).

G) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION DE MUSCULO LISO.

El interés inicial en el análisis farmacológico y fisiológico de las acciones de la MEL reside en su actividad antigonadotrópica, la cual es sumamente evidente en especies con reproducción estacional ⁽³⁶⁾. Sin embargo, aún cuando en el ser humano la reproducción no es estacional, esta neurohormona ejerce también efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas ^(75,155). En el hombre, las variaciones circádicas y circanuales de la concentración de MEL se han asociado con el inicio de la pubertad ^(70,213) y durante el embarazo, el desarrollo fetal y el trabajo de parto ⁽¹³⁰⁾.

Se mostró que la MEL posee un efecto definido sobre el aparato genital como es el caso de la disminución en la incidencia del estro, participación en el crecimiento y maduración del ovario y testículo, disminución del peso de vesículas seminales, pero además también se describieron efectos directos sobre otras estructuras periféricas como es el caso de la termoregulación.

La identificación de la síntesis y liberación de MEL en glándula harderiana, retina y tracto intestinal de roedores sugirieron la posibilidad de que esta neurohormona ejerciera efectos en varios órganos diferentes al SNC. En particular en sitios como el aparato reproductor femenino, el músculo liso de intestino, el vaso deferente, los vasos sanguíneos y el aparato respiratorio.

Desde la década de los sesenta, varios estudios mostraron que la MEL inhibe la contracción del músculo liso, tanto la espontánea como aquella inducida por diferentes fármacos ^(80,149). En el caso del útero, los resultados obtenidos por Hertz-Eshel y Rahamimoff ⁽⁸⁰⁾ mostraron que una concentración de 3×10^{-7} M de MEL inhibe totalmente la actividad espontánea del tejido uterino, así como la contracción uterina provocada por 5-HT. El efecto máximo se obtuvo a la concentración final de 1,026 nM/ml de MEL en una contracción provocada por 1.6 nM/ml de 5-HT. Posteriormente, Quastel y Rahamimoff ⁽¹⁴⁹⁾ mostraron también un efecto inhibitor de la MEL dependiente de la dosis sobre la contracción espontánea de duodeno, obteniéndose una inhibición del 50% de la amplitud de la contracción a partir de $5 \text{ a } 10 \times 10^{-9}$ M/ml y una inhibición completa a la dosis de 160×10^{-9} M/ml. En este caso, la frecuencia de contracción permaneció sin cambio después de la administración de MEL. Esta hormona también redujo el tono de la contracción provocada por 5-HT, sobre todo a dosis bajas.

G) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION DE MUSCULO LISO.

El interés inicial en el análisis farmacológico y fisiológico de las acciones de la MEL reside en su actividad antigonadotrópica, la cual es sumamente evidente en especies con reproducción estacional ⁽³⁶⁾. Sin embargo, aún cuando en el ser humano la reproducción no es estacional, esta neurohormona ejerce también efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas ^(75,155). En el hombre, las variaciones circádicas y circanuales de la concentración de MEL se han asociado con el inicio de la pubertad ^(70,213) y durante el embarazo, el desarrollo fetal y el trabajo de parto ⁽¹³⁰⁾.

Se mostró que la MEL posee un efecto definido sobre el aparato genital como es el caso de la disminución en la incidencia del estro, participación en el crecimiento y maduración del ovario y testículo, disminución del peso de vesículas seminales, pero además también se describieron efectos directos sobre otras estructuras periféricas como es el caso de la termoregulación.

La identificación de la síntesis y liberación de MEL en glándula paratiroidea, retina y tracto intestinal de roedores sugirieron la posibilidad de que esta neurohormona ejerciera efectos en varios órganos diferentes al SNC. En particular en sitios como el aparato reproductor femenino, el músculo liso de intestino, el vaso deferente, los vasos sanguíneos y el aparato respiratorio.

Desde la década de los sesenta, varios estudios mostraron que la MEL inhibe la contracción del músculo liso, tanto la espontánea como aquella inducida por diferentes fármacos ^(80,149). En el caso del útero, los resultados obtenidos por Hertz-Eshel y Rahamimoff ⁽⁸⁰⁾ mostraron que una concentración de 3×10^{-7} M de MEL inhibe totalmente la actividad espontánea del tejido uterino, así como la contracción uterina provocada por 5-HT. El efecto máximo se obtuvo a la concentración final de 1,026 nM/ml de MEL en una contracción provocada por 1,6 nM/ml de 5-HT. Posteriormente, Quastel y Rahamimoff ⁽¹⁴⁹⁾ mostraron también un efecto inhibitorio de la MEL dependiente de la dosis sobre la contracción espontánea de duodeno, obteniéndose una inhibición del 50% de la amplitud de la contracción a partir de 5 a 10×10^{-9} M/ml y una inhibición completa a la dosis de 160×10^{-9} M/ml. En este caso, la frecuencia de contracción permaneció sin cambio después de la administración de MEL. Esta hormona también redujo el tono de la contracción provocada por 5-HT, sobre todo a dosis bajas.

Por otro lado, en un estudio posterior, realizado por Davis y cols ⁽⁶⁰⁾, la contracción espontánea uterina sólo se inhibía con una concentración de 2.07×10^{-4} M de MEL. A pesar de estas discrepancias, estos resultados muestran que la MEL disminuye la excitabilidad celular del tejido uterino. Davis y cols observaron que el efecto estimulante de la oxitocina sobre útero de ratón estrogenizado fue bloqueado por una dosis de MEL de 1,800 ug suprimiendo el 42.4% de la contracción provocada por 2.5 mU de oxitocina, en tanto que la inhibición de la contracción inducida por 100 mU de oxitocina en útero humano gestante con la misma dosis de MEL fue de 45.4%. Además de que se describió un efecto anti-oxitóxico en útero de ratón y útero gestante en humano ⁽⁶⁰⁾. Esto permite pensar que en el caso específico del tejido uterino, la MEL provoca un efecto inhibitor disminuyendo la excitabilidad celular.

En 1967, Bruderman y Rahamimoff ⁽³⁰⁾ reportaron que la MEL inyectada intravenosamente a perros anestesiados, causa una marcada disminución en la resistencia pulmonar y un incremento en la complianza pulmonar. Así, observaron que la MEL inhibe sustancialmente la broncoconstricción provocada por 5-HT, así como una disminución de la contracción en la preparación *in vitro* de músculo liso traqueal de gato, indicando con ello que la MEL posee un efecto broncodilatador. Estos resultados, sugieren que la acción inhibitoria de MEL es consecuencia de un efecto directo sobre el músculo liso bronquial, aunque no descartan la posibilidad ya sea de un efecto inhibitor de la MEL sobre la fibra nerviosa parasimpática; o de la liberación de una sustancia relajante desconocida o también de un efecto indirecto sobre el músculo liso bronquial.

El efecto inhibitor de la MEL sobre el músculo liso fue también descrito en el duodeno de rata ⁽³¹⁾, ileo, yeyuno y colon de hamster así como en el conducto deferente de rata. La concentración de MEL que provoca el efecto máximo; así como la magnitud del efecto inhibitor difieren entre sí en estos estudios (Cuadro III), lo que indica que cada uno de los tipos de musculatura lisa muestran sensibilidades diferentes a la MEL.

La administración *in vitro* de MEL inhibe el tono y la amplitud de la contracción espontánea del músculo liso de segmentos del tracto intestinal como son estómago, duodeno, ileo y colon, mismos que se correlacionan con la cantidad relativa de MEL endógena detectada por inmunoquímica; es decir, estas áreas exhiben mayor inhibición después del tratamiento con MEL pues contienen una mayor

concentración de MEL endógena. Los resultados de estudios *in vitro* indican que el efecto de MEL sobre la motilidad del tracto gastrointestinal de animales intactos puede involucrar una acción antiserotoninérgica (31).

CUADRO III

TEJIDO	ESPECIE	ACTIVIDAD	EFEECTO	[MEL]	REF.
Nervio Ciático	Rana	Conducción nerviosa	Disminuye la excitabilidad celular.	?	Hetz-Eshel, 1965
Utero	Rata	Contracción espontánea	Inhibición completa	300nM/ml	Hetz-Eshel, 1965
		Contracción provocada por serotonina	Inhibición	1,026 nM/ml	Hetz-Eshel, 1965
		Contracción isométrica.	Inhibición	1,026 nM/ml	Hetz-Eshel, 1965
	Humano	Contracción inducida por oxitocina	Inhibición del 45.4%	1,800 ug	Davis, 1971
Ratón	Contracción inducida por oxitocina	Inhibición del 44.5%	1,800 ug	Davis, 1971	
Duodeno	Rata	Contracción espontánea	Inhibición	160 nM/ml	Quastel, 1965
			Inhibición del 94%	2 ug/ml	Harlow, 1986
		Contracción provocada por serotonina	Inhibición	160 nM/ml	Quastel, 1965
Colon	Rata	Contracción espontánea	Inhibición del 52-53%	2 ug/ml	Harlow, 1986
Ileo	Rata	Contracción espontánea	Inhibición del 22-26%	2 ug/ml	Harlow, 1986
Yeyuno	Rata	Contracción espontánea	Inhibición del 22-26%	2 ug/ml	Harlow, 1986
Bronquios	Perro	Contracción provocada por vagotomía	Inhibición	60×10^{-6} Mol/kg	Bruderman, 1967
		Relajación provocada por serotonina	Sin efecto	60×10^{-6} Mol/ml	Bruderman, 1967
Tráquea	Gato	Contracción provocada por serotonina	Inhibición	66.7 nM/ml	Bruderman, 1967
Vaso deferente	Rata	Contracción provocada por acetilcolina	Incremento	100 pg/ml	Cameiro, 1991
Arteria Caudal	Rata	Contracción producida por norepinefrina.	Incremento	?	Viswanathan, 1990

La MEL aplicada intraperitonealmente a ratones con implantes de 5-HT, bloquea parcialmente el efecto de la 5-HT e incrementa el tiempo de tránsito intestinal en un 50%; aunque no se observó una correlación dosis-respuesta cuando se emplearon dosis entre 0.01 y 1 mg.

In vitro, la máxima inhibición del espasmo provocado por 5-HT se observó con la proporción de MEL:5-HT de 1:1 ^(31,80), lo que puede indicar que parte de la acción de la MEL sobre el movimiento intestinal es mediado por mecanismos extraintestinales; pudiendo existir un hipotético sistema de contrabalance de MEL y 5-HT, similar al sistema adrenalina-acetilcolina, para participar en la regulación de la actividad intestinal ⁽³¹⁾.

En el intestino delgado, se observó que este indol no modifica la frecuencia de contracción, lo que sugiere un efecto exclusivamente sobre las propiedades miogénicas del tejido ⁽³¹⁾. Sin embargo, Bubenick y Dhanvantari ⁽³¹⁾, así como Harlow y Weekley ⁽⁷⁸⁾ describieron que la MEL reduce la fuerza y el tono de la contracción rítmica del intestino, efecto más evidente en áreas intestinales donde la concentración fisiológica de esta hormona es mayor. A partir de estos estudios se sugirió que la MEL y otros metoxi-indoles tienen un efecto local sobre la motilidad intestinal. Por otra parte, en experimentos realizados en útero de rata estrogenizada se encontró que la MEL inhibe la contracción espontánea e inducida por 5-HT ⁽⁸⁰⁾ y carbacol ^(163,164).

Bubenik ⁽³¹⁾ sugiere que el papel inhibitorio de la MEL sobre el tono de la contracción del músculo liso intestinal puede deberse a una influencia de la MEL sobre receptores neurales a 5-HT que ejercen influencias inhibitorias; sin embargo, también establece la posibilidad de que la MEL al unirse a su receptor modificaría la fuerza de contracción intestinal; a través de la vía del GMPc; con ello modificaría la translocación intracelular de calcio y consecuentemente inhibiría la contracción muscular. Aunque todos los segmentos del intestino presentan una depresión de la amplitud de contracción en respuesta al tratamiento con MEL, cada segmento intestinal muestra diferente perfil de respuestas, así, el área duodenal presenta la mayor respuesta a MEL, con un 94% de depresión en la fuerza de contracción espontánea y 92% de depresión en la motilidad compuesta (aquella que modula todo los tipos de movimiento del intestino). Este fue seguido por 52 y 53% de inhibición en el colon en la fuerza y la motilidad compuesta, respectivamente. El íleo fue el siguiente en la respuesta seguido por el yeyuno,

que presentaron solamente un 22% de depresión en la fuerza y 26% de depresión en la motilidad compuesta. Estos resultados sugieren que diferentes áreas del tracto intestinal puede tener varias sensibilidades a los efectos depresores de la contracción espontánea provocada por MEL, lo que también puede estar asociado con el nivel tisular de MEL en el área ⁽⁷⁸⁾.

Es probable que cuando la MEL no inhiba la frecuencia de la contracción, su acción no se ejerza sobre el marcapaso rítmico de la musculatura intestinal ⁽¹⁴⁹⁾; sin embargo, cuando la amplitud y el tono de los segmentos es influido por la MEL, es de esperarse una acción sobre la capacidad contráctil del músculo liso, o bien, sobre la transmisión a través de la musculatura intestinal. El mecanismo de acción de la MEL sobre el músculo liso permanece aún desconocido, pero cualquiera que éste sea, está dirigida sobre la excitabilidad muscular ^(60,78).

Por otro lado, el efecto *in vitro* de la MEL (100 µg/ml) sobre la contracción inducida por acetilcolina en la porción prostática del vaso deferente mostró que la MEL incrementa la contracción provocada por acetilcolina sin cambiar la sensibilidad a este agonista ⁽⁴⁶⁾. En este caso, la MEL probablemente esté actuando sobre las neuronas que poseen receptores nicotínicos, porque ninguna respuesta a la epinefrina o al ATP, (fármacos que estimulan los receptores localizados sobre las células de músculo liso), modificarían tales efectos ⁽⁴⁶⁾.

De igual forma, la MEL potencializa la respuesta contractil a norepinefrina en la arteria caudal de la rata albina ⁽²¹¹⁾.

Es importante destacar que la correlación del efecto inhibitor *in vitro* de la MEL con su posible acción *in vivo* es difícil de realizar, básicamente porque el primero es un efecto evidentemente farmacológico presente sólo a una concentración cientos de veces superior a la concentración encontrada en condiciones fisiológicas, además de que se ha reportado una influencia importante del fotoperíodo sobre el mecanismo de acción y los efectos atribuidos a la MEL ^(79,85,94).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La MEL está ampliamente involucrada en la regulación de la función reproductora de casi todas las especies, aunque este efecto es particularmente importante en las especies con reproducción estacional. El mecanismo que utiliza esta hormona para producir estos efectos es aún desconocido, se propone una disminución de la excitabilidad celular; y como consecuencia, modifica la función del calcio en el mecanismo de neurosecreción (204-206). Por ejemplo, se mostró que la MEL inhibe la liberación de dopamina a través de un mecanismo dependiente de calcio (229,230).

La MEL reduce la entrada de calcio hacia la terminal nerviosa presináptica en un margen de concentración que oscila entre 10^{-10} y 10^{-7} M (230). Tal efecto en el hipotálamo se observa durante la estimulación eléctrica o por concentraciones elevadas de K^+ ; mientras que la adición del ionóforo de calcio A23187, bloquea este efecto, restaurando la entrada de Ca^{+2} y como consecuencia la liberación de dopamina (231).

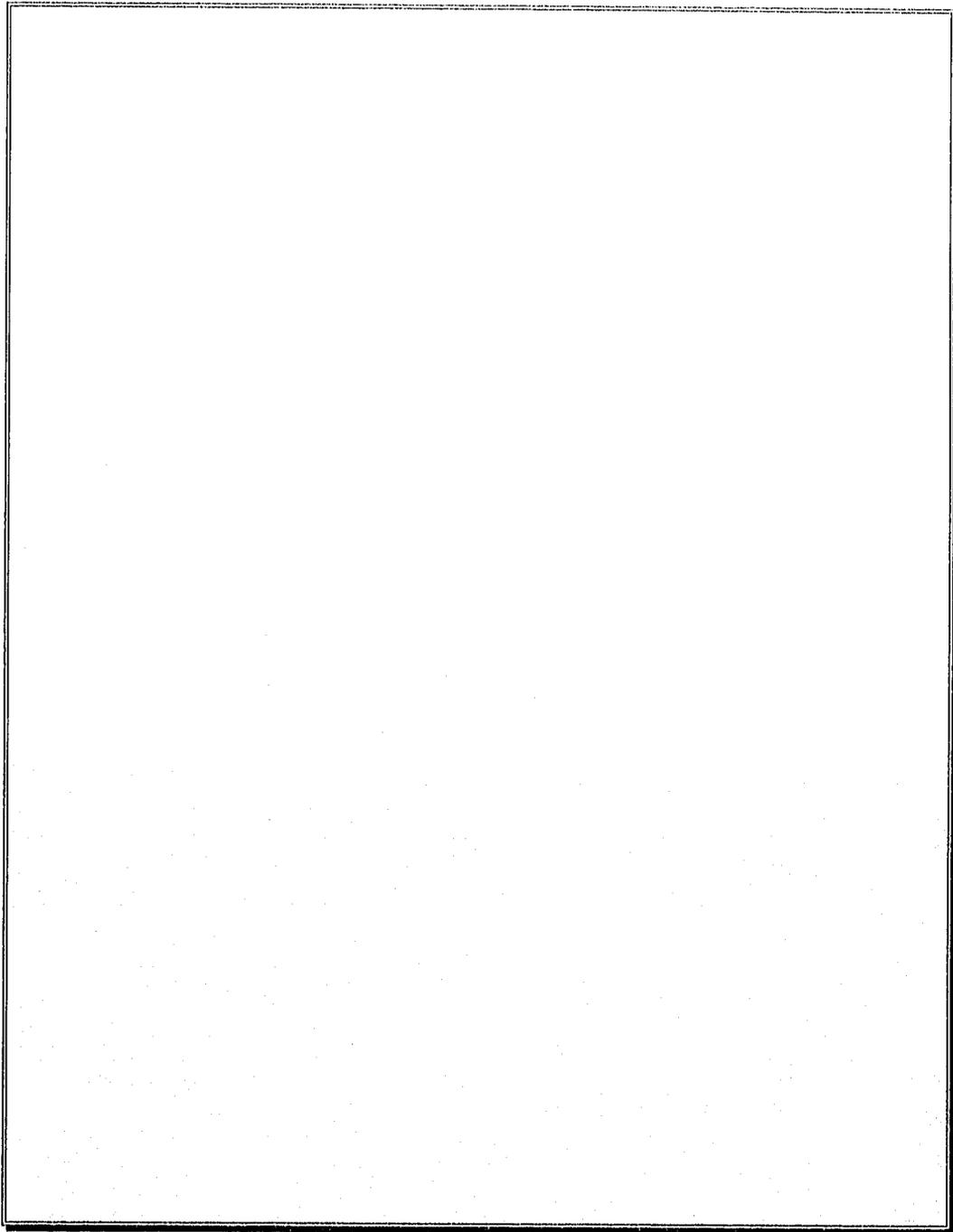
Estos datos muestran que la MEL interfiere en el recambio del calcio intracelular (204,231), acción que puede ser consecuencia de su unión a un receptor, de un bloqueo directo de canales de calcio, e incluso, por interactuar con proteínas intracelulares que fijan el ion Ca^{+2} con la calmodulina. También es posible que la acción inhibidora de la MEL sobre el tono de la musculatura lisa sea consecuencia de una influencia ejercida sobre receptores serotoninérgicos que producen inhibición (31), aunque los intentos para mostrar una interacción entre la MEL y los receptores serotoninérgicos han fracasado hasta la actualidad. Estas acciones mediadas por el GMP cíclico (GMPc), modificarían la traslocación celular de calcio y consecuentemente la contracción muscular (210).

La MEL inhibe la contracción de tejido con musculatura lisa en estudios *in vitro*. Este efecto puede estar asociado a la disminución de la excitabilidad celular; sin embargo, el mecanismo por el cual la produce este efecto aún es motivo de discusión. Estudios realizados con el propósito de caracterizar el efecto farmacológico de la MEL sobre la contracción espontánea y provocada por carbacol en útero de rata, han reportado una disminución de la eficacia del carbacol, sugiriéndose un mecanismo de acción mediante un antagonismo fisiológico que involucra al permeabilidad membranar al calcio (163), debido al hecho de que la actividad muscular espontánea del tejido uterino este regulada por corrientes de calcio, mientras que la contracción inducida por carbacol implica principalmente cambios en la

corriente iónica de sodio e inhibición de AMPc, además de un componente de participación de corrientes de calcio dependientes de voltaje; destaca la conducta inhibitoria de la MEL, apoyando la idea de que esta neurohormona actúa de manera inespecífica, por lo que puede sugerirse que el mecanismo de acción para la producción del efecto inhibitorio observado está relacionado con cambios en la excitabilidad celular que regulen los flujos de calcio, ya sea mediante el bloqueo de canales de calcio o la formación de complejos calmodulina-MEL (164).

Los resultados experimentales obtenidos hasta ahora muestran que la MEL disminuye la excitabilidad celular, posiblemente al interferir con los mecanismos que mantienen una determinada concentración de calcio intracelular en una forma similar a lo que ocurre en el hipotálamo, en relación con la liberación de dopamina. De acuerdo con esta sugerencia, la inhibición de la actividad contractil de la musculatura lisa uterina provocada por la MEL, podría ser consecuencia de un efecto sobre los canales de calcio operados por receptor o activados por voltaje, o bien de una acción directa sobre la membrana celular lo cual implicaría alteraciones en la permeabilidad membranar al calcio en la célula muscular lisa.

Sin embargo, no existe en la literatura estudios que exploren el papel que juega el calcio en el efecto inhibitorio de la MEL sobre la contracción del tejido uterino, por lo que desde un enfoque farmacológico, el planteamiento del problema de investigación del presente trabajo se expresó en los siguientes términos: *¿en tejidos periféricos como el músculo liso uterino, el calcio participa directamente en el mecanismo de acción de la MEL para disminuir la contracción muscular?*



OBJETIVOS

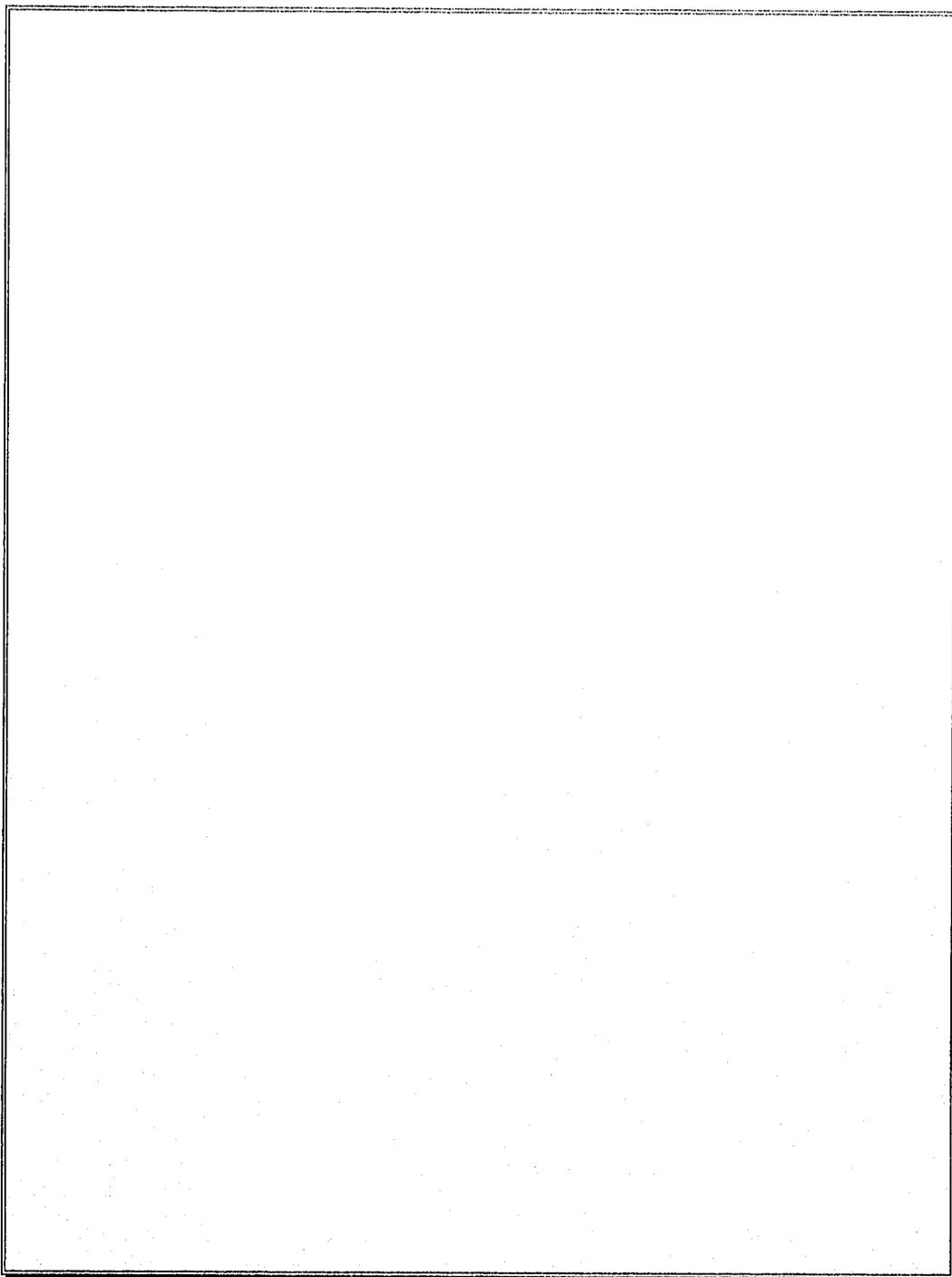
Con base en las propiedades del músculo liso uterino y en los reportes mencionados previamente que involucran a la MEL en el control de la contracción del músculo liso, los objetivos del presente estudio se centraron en:

a) *Objetivo General:*

Analizar la participación del calcio en el efecto relajante de la musculatura lisa uterina provocada por la MEL.

b) *Objetivos específicos:*

1. Caracterizar el efecto de la MEL sobre la contractilidad espontánea *in vitro* del útero de la rata estrogenizada.
2. Describir el efecto de la MEL sobre la contractilidad del útero de rata estrogenizada *in vitro* provocada por la estimulación colinérgica y oxiócica.
3. Analizar el efecto de la MEL sobre la contracción uterina, en útero de rata estrogenizada y despolarizado con concentraciones elevadas de K^+ , en un medio libre de calcio; así como en presencia de diversas concentraciones del mismo.

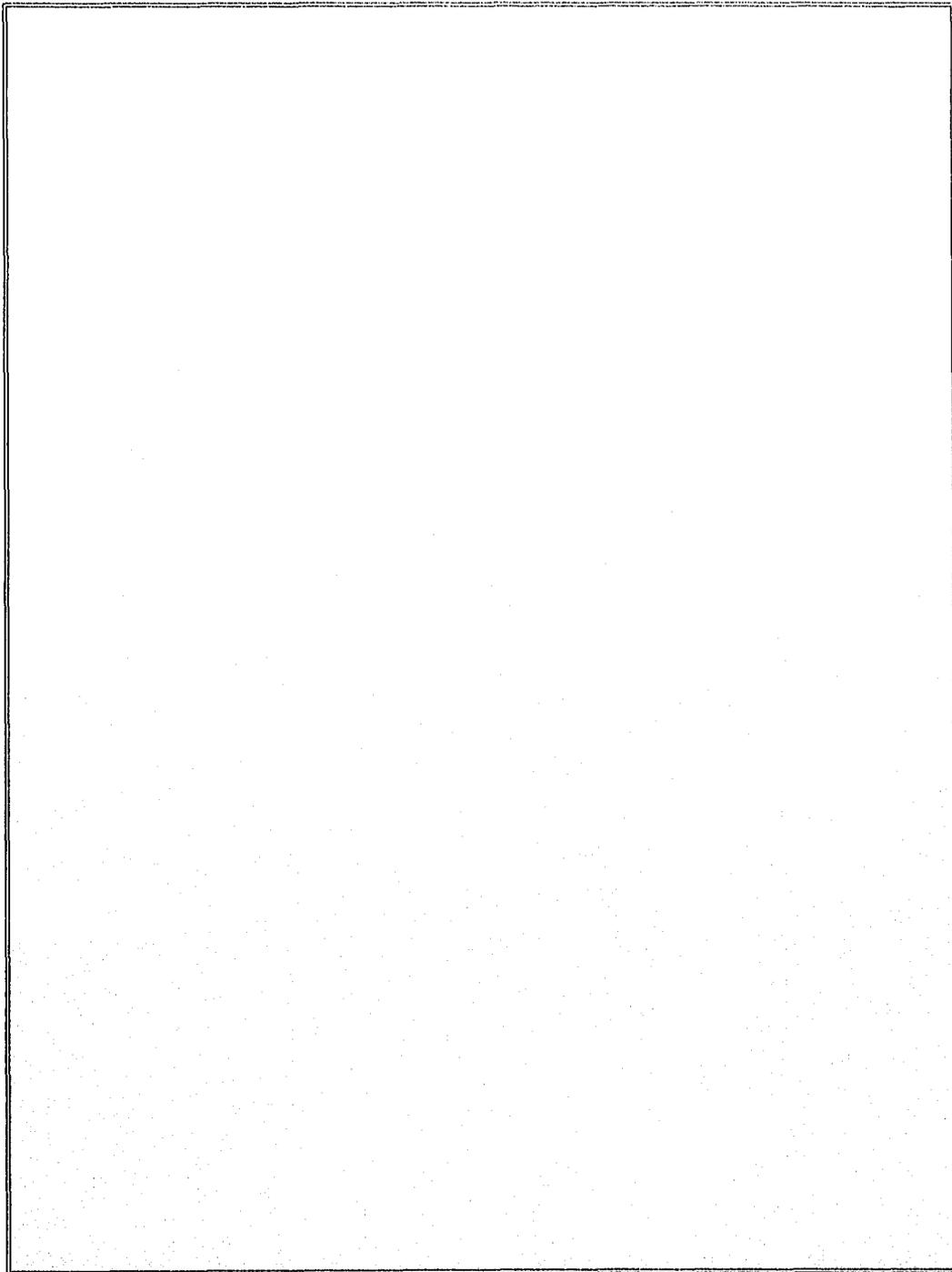


HIPOTESIS

La hipótesis general a la que se orientó el desarrollo del presente estudio se expresó en los siguientes términos: *Si la MEL disminuye la contracción del músculo liso a través de modificar la participación del calcio en la contracción del músculo liso uterino de rata estrogenizada; su efecto depresor se manifestará en presencia de cualquier estimulante uterino, además que este efecto dependerá de la concentración extracelular de calcio.*

Con el propósito de obtener un diseño experimental apropiado para el análisis de la hipótesis, y dentro del contexto del marco teórico, se establecieron las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La MEL inhibe completamente la contracción espontánea del tejido uterino.
2. La DE_{50} de carbacol que provoca una contracción uterina se incrementa significativamente en presencia de MEL.
3. La DE_{50} de oxitocina que provoca una contracción del tejido uterino se incrementa significativamente en presencia de MEL.
4. La MEL inhibe la contracción uterina provocada por la adición del ión calcio al baño del tejido.



DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo del estudio se basó en un diseño experimental de posprueba en grupos seleccionados por aleatorización:

G $A_1 \times O_1$
 $A_2 \times O_1$
 $A_3 \times O_1$
 $A_4 \times O_1$

La contrastación de las hipótesis se realizó con el empleo de la técnica de órgano aislado, la cual permitió analizar el efecto de la MEL sobre la contracción de tejido uterino *in vitro* de rata estrogenizada, tomando en cuenta las características de la activación muscular. Se analizó el efecto de la melatonina en 4 situaciones experimentales listados en el cuadro IV.

CUADRO IV

CARACTERÍSTICAS DEL MECANISMO INVOLUCRADO EN LA CONTRACCION DEL MUSCULO LISO, POR DIVERSOS TIPOS DE ESTIMULACION

CONTRACCION	MECANISMO DE ACCION	EFFECTO EN MEMBRANA	IONES
ACTIVIDAD ESPONTANEA	APERTURA DE CANALES SENSIBLES A VOLTAJE	DESPOLARIZACION	SODIO Y CALCIO
INDUCIDA POR CARBACOL	RECEPTOR MUSCARINICO	DESPOLARIZACION	SODIO
INDUCIDA POR OXITOCINA	RECEPTOR A OXITOCINA	DESPOLARIZACION	CALCIO
INDUCIDA POR POTASIO	APERTURA DE CANALES SENSIBLES A VOLTAJE	DESPOLARIZACION SOSTENIDA	CALCIO

Fuente: Referencia No. 24.

El nivel de excitabilidad de la membrana es fundamental en la regulación de la contractilidad uterina ⁽¹⁴⁷⁾. La actividad mecánica de este músculo liso depende de su actividad eléctrica subyacente, la cual consiste en variaciones transitorias del potencial de membrana, fenómeno que a su vez, es consecuencia de movimientos iónicos a través de la membrana celular. Uno de los iones que juegan un

papel fundamental en este mecanismo es el calcio ⁽⁵⁹⁾, sobre todo del que corresponde al calcio libre intracelular ⁽⁷⁾. En animales como la rata, el útero es extremadamente sensible a las variaciones en la concentración de calcio extracelular ^(89,90,225), motivo por el cual se utilizó en el presente trabajo.

La actividad contráctil del músculo liso uterino muestra variaciones a lo largo del ciclo estral ^(98,197). Este efecto parece ser debido a las oscilaciones en las concentraciones de las hormonas sexuales que se observan regularmente a lo largo de éste. Sin embargo, en una aplicación de estrógenos exógenos es posible sincronizar el ciclo de cualquier rata a un patrón fijo, por lo que en los animales utilizados en el presente experimento recibieron una aplicación previa de dietilestilbestrol (100 ug) subcutánea 24 horas antes de realizar el estudio, con el objeto de hacer comparativos los resultados.

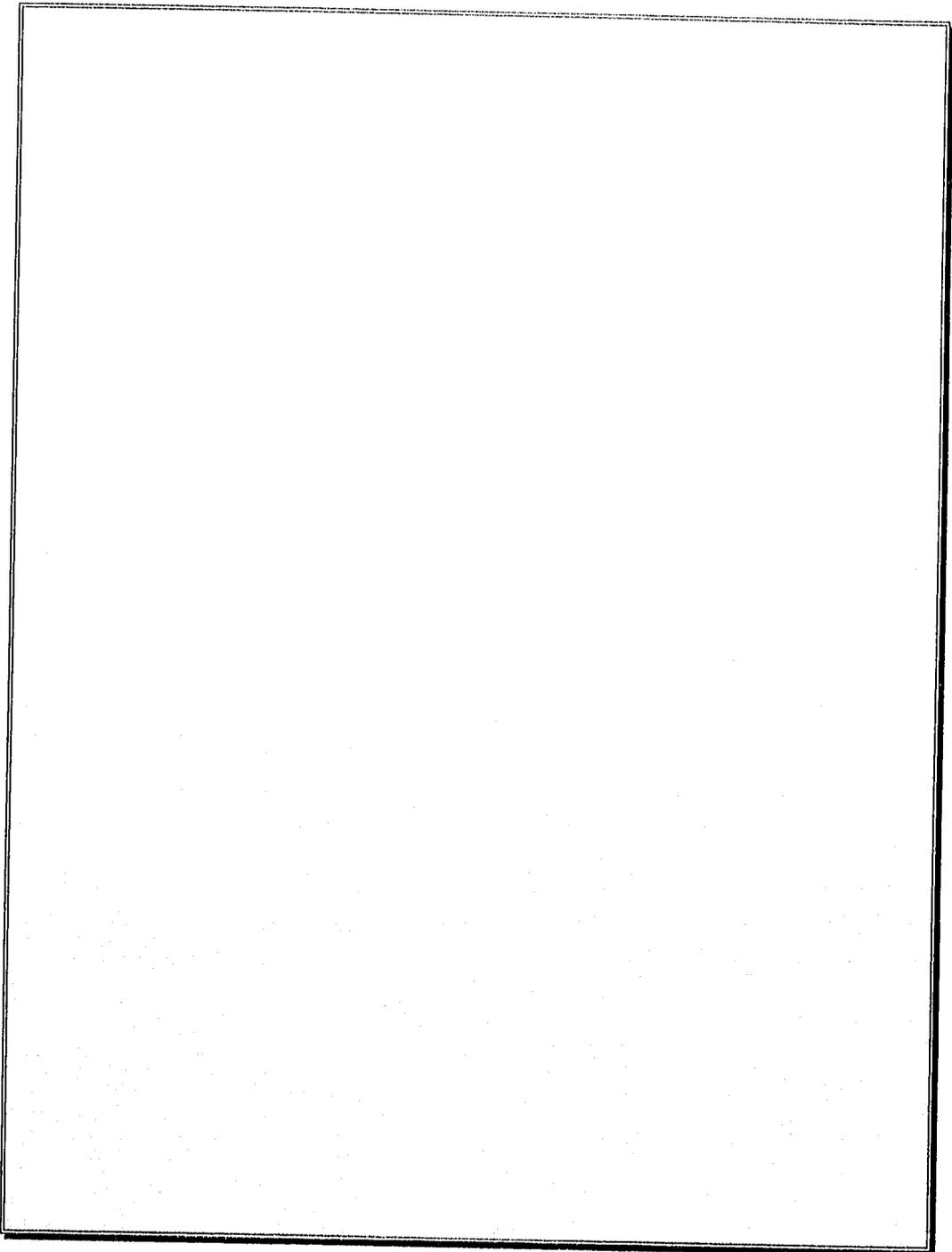
Por otra parte, tanto el carbacol como la oxitocina inducen una contracción uterina a través de mecanismos diferentes ^(17,121), aunque ambos fármacos, al igual que la contracción espontánea, incrementan el calcio intracelular ⁽⁷⁾. El carbacol, agonista colinérgico, produce sus efectos por activación de receptores muscarínicos colinérgicos, lo que provoca un incremento en la frecuencia y la fuerza de contracción del músculo liso. Este efecto se manifiesta *in vitro* en preparaciones de músculo liso aislado ⁽²⁵⁾. El carbacol incrementa la conductancia al sodio de la membrana, provocando con ello una reducción en el umbral y generando, en consecuencia, potenciales de acción con un incremento en la duración del mismo ^(24,28).

Por su parte, la oxitocina provoca la contracción del músculo liso uterino, como resultado de su interacción directa con sus receptores ^(3-5,16,77,184). Esta hormona provoca un incremento en la frecuencia de potenciales de acción con lo que incrementa la frecuencia de contracción sin producir una despolarización basal notable. Tanto el sodio, como el potasio, el calcio y posiblemente el cloro, parecen estar involucrados en la modificación de la permeabilidad celular provocado por esta hormona hipotalámica ^(24,57).

Finalmente la adición al baño del músculo liso de una solución rica en potasio, induce una contracción que muestra un pico inicial de tensión antes de declinar a un estado relativamente menor de contracción. Tal efecto es consecuencia de una despolarización que inicialmente estimula la contracción pero que posteriormente inhibe la descarga de potenciales de acción y como consecuencia genera una

presión menor. Al emplear soluciones ricas en potasio y libres de calcio se consigue un estado tal que en cuanto se administra un pulso de calcio se produce una contractura sustancial debido a la penetración de este ión a través de canales dependientes de voltaje y que se encuentran abiertos gracias a la despolarización inducida por potasio (24,25,129).

En su conjunto, el primer tipo de experimentos realizados se orientó hacia caracterizar el efecto de la MEL sobre la actividad espontánea del tejido uterino de rata estrogenizada; mientras que el segundo tipo de experimentos se realizó con la intención de explorar el mecanismo de acción de la MEL sobre la actividad muscular uterina comparándolo y combinándolo con aquel provocado por carbacol y oxitocina. Por último, el tercer tipo de experimentos realizados exploró el efecto de la MEL sobre la contracción muscular inducida por pulsos de calcio en tejido uterino depolarizado con concentraciones elevadas de potasio.



MATERIAL Y METODOS

Para todos los experimentos, se emplearon ratas hembras adultas de la cepa Wistar con pesos comprendidos entre 180-220 g, mantenidas en jaulas individuales (cajas de acrílico transparente de 40x30x20 cm) con acceso libre a comida (Purina Rat Chow) y agua. El ciclo de luz-oscuridad fue de 10-14 hs (luces encendidas de 08:00-18:00 hs) y con temperatura ambiental controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$). Los experimentos se realizaron en los meses de otoño-invierno.

Después de un período de habituación de una semana en las condiciones antes mencionadas, cada una de las ratas recibió una administración, por vía subcutánea, de una dosis de 100 ug (dosis total) de dietilestilbestrol (dosis única) disuelto en aceite de maíz; 24 hs previas a la realización del registro de su actividad uterina. Gracias a este pretratamiento se incrementa la sensibilidad del tejido uterino al efecto de los fármacos estudiados ⁽¹¹⁵⁾.

En la sesión de registro, los animales fueron sacrificados por desnucamiento, y después de una incisión de aproximadamente 10 cm de longitud en la línea media abdominal se extirpaba el útero, el cual se depositaba en una caja de petri que contenía solución Ringer-Krebs-Henseleit con la siguiente composición en mM: 119 de NaCl, 4.6 de KCl, 1.5 de CaCl_2 , 1.2 de MgSO_4 , 1.2 de KH_2PO_4 , 20 de NaHCO_3 y 11.1 de glucosa, con un pH de 7.4 y una temperatura de 37°C ; la solución fue burbujeada con una mezcla de O_2 (95%) y CO_2 (5%).

Después de retirar el tejido conectivo de ambos cuernos uterinos, se seccionaron en fragmentos de 2 cm de longitud (Fig. 18) cada uno. El fragmento proximal a la vagina se seleccionó para realizar el registro de la actividad uterina en cada uno de los experimentos realizados. A cada extremo del segmento seleccionado de tejido uterino, se ató una porción de hilo de seda 000 (Anacap Davis-Geck) y se colocó dentro de una cámara para baño de tejido (15 ml) llena con solución Ringer-Krebs-Henseleit a 37°C y también burbujeada con una mezcla de O_2 (95%) y CO_2 (5%). Un extremo de la preparación se sujetó a un transductor de fuerza isométrica (Grass FTO3C); y a su vez a un preamplificador de corriente directa (Grass 7P1F) el cual es parte integrante de un polígrafo (Grass RPS7C8). Este instrumento registró en papel la contracción uterina a una velocidad de 5 mm/min. El sistema de registro fue calibrado de tal manera que un cm de desplazamiento de la plumilla inscriptora,

correspondía a 1 gramo de fuerza (1 cm = 1 g = 10 mN). Posterior al procedimiento de calibración, se colocaba el tejido uterino para su registro.

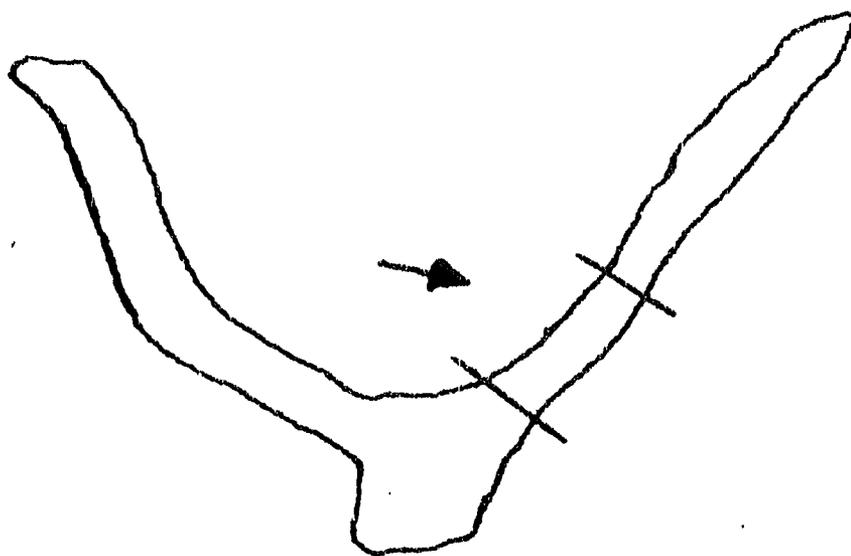


FIGURA 18: Utero proveniente de una rata estroginizada, donde se muestra la porción uterina utilizada para realizar los registros del presente estudio.

Antes de iniciar cualquier registro, el segmento de tejido uterino permaneció durante al menos una hora en la solución Ringer-Krebs-Henseleit con el propósito de lograr su equilibrio con la solución del baño, y para obtener una línea basal de contracción. La tensión inicial durante la fase de equilibrio fue de 1 g (10 mN). A continuación se procedía a realizar el registro de la contracción muscular basal por los procedimientos mencionados anteriormente.

El registro de la actividad espontánea basal se realizó en 12 segmentos de tejido uterino provenientes, cada uno, de diferentes ratas estroginizadas; el registro obtenido durante un período de 10 min previo a la administración de alguna de las diversas dosis de MEL (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M) se consideró como control. La aplicación de MEL se realizó en un volumen constante (0.1 ml/10 ml de baño) y con una velocidad de aplicación de 5 seg. Al final cada una de las dosis de MEL, proporcionó una concentración de 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M, respectivamente. Los resultados presentados en este trabajo, son expresados en relación a esta concentración final del baño en el que se encontró el

tejido uterino. Después de adicionar la MEL, se registró la actividad uterina durante 10 min. La administración de estas concentraciones fue acumulativa, sin realizar lavado del tejido entre la aplicación de cada dosis, y con registros del tejido en paralelo.

Para registrar el efecto del carbacol sobre la actividad muscular uterina, se emplearon otros 12 segmentos de tejido uterino provenientes, cada uno, de diferentes ratas estrogenizadas. Se agregaron al baño del tejido diversas concentraciones (5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} y 10^{-4} M) de carbacol, y se registró la actividad durante 10 min posteriores a su administración. Cada concentración se aplicó en un volumen de 0.1/10 ml de baño para obtener una concentración final de 5×10^{-8} , 10^{-7} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-6} y 10^{-5} M, respectivamente. Entre cada adición de carbacol al baño, se lavó el tejido con solución Ringer-Krebs-Henseleit, y 15 min después del lavado se aplicó la siguiente dosis de carbacol.

Para analizar el efecto de la MEL sobre la contracción provocada por carbacol, se repitió el mismo procedimiento, sólo que en este caso, los trozos de útero fueron pre-incubados con MEL. En este caso, se agregó 0.1 ml de MEL por cada 10 ml de baño, de una concentración de 10^{-4} M, lo que permitió obtener una concentración final de 10^{-6} M. En todos los casos la MEL se administró 10 min antes de añadir el carbacol. Los resultados son expresados en relación a las concentraciones finales de carbacol y MEL en el baño del tejido.

Un procedimiento similar fue utilizado para estudiar el efecto de la oxitocina. En este caso, también se utilizaron 12 segmentos de tejido uterino provenientes de diferentes ratas estrogenizadas cada uno, y después de registrar la contracción basal se agregaron 0.1 ml de diversos volúmenes de una solución de oxitocina (Sintocinon) que contenía 5×10^{-9} , 5×10^{-7} , 5×10^{-5} , 5×10^{-3} y 0.5 U por cada 10 ml de baño, para obtener una concentración final de 5×10^{-11} , 5×10^{-9} , 5×10^{-7} , 5×10^{-5} y 5×10^{-3} U/ml, respectivamente. Se registraron 10 min de actividad seguidos por 10 min de registro posteriores a la adición del fármaco al baño. Entre cada una de las administraciones de oxitocina, el tejido se lavó con 60 ml de solución Ringer-Krebs-Henseleit, después de lo cual regresaba a su línea basal. Para analizar el efecto de la MEL sobre los efectos inducidos por oxitocina, se repitió el mismo procedimiento al aplicar la misma serie de concentraciones de oxitocina a porciones de útero pre-

incubados con 10^{-6} M de MEL, administrada 10 min antes que la oxitocina. Los resultados se expresaron en relación a la concentración final de oxitocina y MEL en el baño del tejido.

El análisis del efecto de la MEL sobre la contracción inducida por calcio se realizó en 12 segmentos de tejido uterino provenientes, al igual que en los demás casos, de diferentes ratas estrogenizadas cada uno. Los segmentos de tejido uterino se equilibraron durante una hora en solución Tris-Krebs (composición en mM: NaCl 123; KCl 4.5; Tris 10; $MgCl_2$ 1.2; KH_2PO_4 1.2; $CaCl_2$ 1.2 y glucosa 11.4) con una tensión inicial de 1 g (10 mN). Después de este período, el tejido se despolarizó con una solución trizma de K^+ alto y libre de Ca^{2+} (por sustitución equimolar de NaCl por KCl), que contenía (en mM): NaCl 84.5; KCl 40; Tris 10; $MgCl_2$ 1.2; KH_2PO_4 1.2; EDTA 2; glucosa 11.4, pH 7.4, burbujeadado con O_2 . Después de 45 min de iniciada la despolarización se adicionó, 0.1 ml de diversos volúmenes de solución que contenía 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 mM de calcio, para obtener una concentración final de este ion de 1.25×10^{-6} , 2.5×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} y 2.5×10^{-5} M, respectivamente.

La adición de los diversos volúmenes de calcio indujo una contracción tónica sostenida durante 10 min, la cual fue considerada como control, e interrumpida al cambiar el medio por una solución libre de calcio. Al alcanzar nuevamente el equilibrio, se incubó el tejido con MEL a una concentración de 10^{-6} M durante 10 min previos a la administración nuevamente de cada una de las concentraciones de calcio utilizadas. Los resultados son expresados también, en relación a la concentración final de calcio y MEL en el baño del tejido.

Para su aplicación, la MEL se disolvió en polietilenglicol al 10% y se preparó inmediatamente antes de su aplicación. Las adiciones al baño de las soluciones de MEL siempre se realizaron en volúmenes de 0.1 ml/10 ml de baño, medidas a través de una jeringa para tuberculina de 1 ml. Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company. La oxitocina, el carbacol y el calcio fueron disueltos en agua destilada.

Procesamiento y análisis de resultados.

En la lectura de los registros de contracción de cada uno de los experimentos, se cuantificó la frecuencia de la actividad contractil (número de contracciones durante el período de registro); la amplitud de la contracción fásica y la contracción tónica en mm a partir de la línea basal.

Así, del registro obtenido se midió la amplitud de la contracción fásica expresándose en mm y el número de contracciones presentes durante cada uno de los 10 min de registro. La amplitud en mm se transformó a gramos ($10 \text{ mm} = 1 \text{ cm} = 1 \text{ g}$) y a milinewton ($1 \text{ g} = 10 \text{ mN}$) para obtener la magnitud de la fuerza de contracción fásica.

Posteriormente se calculó el porcentaje de respuesta máxima obtenida en cada uno de los tejidos, tanto para la frecuencia como para la amplitud de la contracción. De los valores obtenidos para la actividad espontánea, se calculó el porcentaje de inhibición; considerándose el valor promedio del registro control como el 100% de la contracción, y el correspondiente obtenido en presencia de cada una de las dosis de melatonina. En el presente trabajo, el porcentaje de inhibición se obtuvo al sustraer el valor obtenido en cada una de las dosis de melatonina al 100% de la respuesta basal. Para cada uno de los ensayos *in vitro*, se obtuvo la concentración de inhibición media (CI_{50}) la cual corresponde a la dosis de MEL que inhibe el 50% de la contracción máxima. Este valor se obtuvo por regresión lineal de la relación logaritmo de la dosis-porcentaje de inhibición.

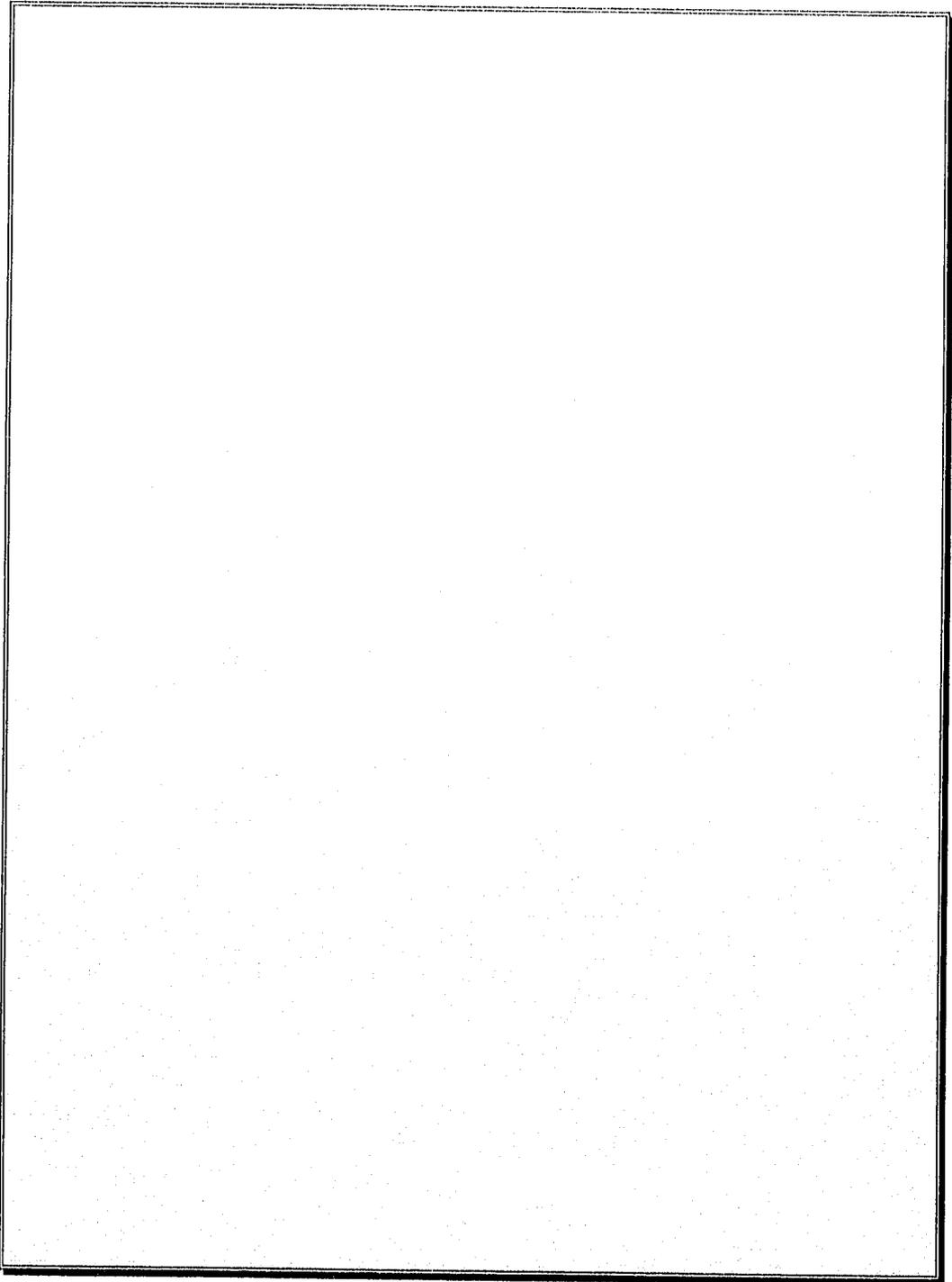
Para todos los casos se calcularon las curvas concentración-respuesta en presencia y ausencia de MEL para analizar el efecto de esta hormona sobre la contracción uterina ^[9,178].

Los resultados que se presentan reflejan el promedio de las contracciones presentadas durante el tiempo de registro (10 min). Los valores expresados para el conjunto de los tejidos son el promedio (\bar{x}) \pm el error estándar de la media (E.E.).

Los resultados así obtenidos se analizaron con la prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas. Cuando los valores resultaron homogéneos, la diferencia encontrada se analizaba con la prueba de análisis de varianza (ANOVA); y en el caso de valores no homogéneos, por medio de la prueba de Tukey ^[46,47].

Los resultados del análisis de la frecuencia de contracción fueron analizados estadísticamente con la prueba de Tukey, mientras que los resultados del porcentaje de inhibición provocado por la MEL sobre la actividad espontánea, se analizaron por medio de la prueba de ANOVA. Finalmente, los valores obtenidos al probar carbacol, oxitocina y calcio en ausencia y presencia de MEL se analizaron con la prueba de t de Student para muestras dependientes y análisis de covarianza ^(46,47).

Los resultados numéricos de las curvas concentración-respuesta en presencia y ausencia de MEL para analizar el efecto de esta hormona sobre la contracción uterina, fueron analizados con la prueba de t de Student, análisis de doble entrada de Fisher y análisis de covarianza ^(46,47).



RESULTADOS

A) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTANEA DEL TEJIDO UTERINO ESTROGENIZADO.

En términos generales, después de un período de 60 min de equilibrio en solución Ringer-Krebs-Henseleit, el tono de la contracción muscular alcanzó una línea basal que se mantuvo durante los 60 min de duración del experimento. Tanto la frecuencia como la amplitud durante el registro de las contracciones fásicas, mostró una gran variabilidad en los diferentes segmentos de tejido uterino registrados. La frecuencia promedio de estas contracciones fue de 10.42 ± 1.49 , con un rango de 2 a 16 contracciones; mientras que la amplitud fue de 1.63 ± 0.9 g (16.30 ± 9.0 mN) con un rango de 0.60 a 4.8 g (6 a 48 mN). La contracción tónica no presentó modificación alguna (Fig. 19).

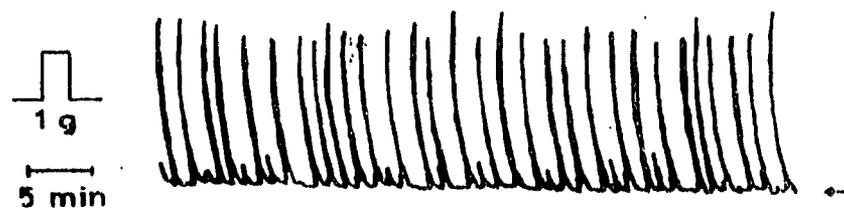


FIGURA 19: Registro de la actividad contractil basal de un segmento uterino, donde se observa el tono basal (indicado por la flecha) y las contracciones fásicas uterinas que se superponen al tono basal. El pulso de calibración equivale a 1 g, y la línea inferior corresponde a la escala de tiempo, con un intervalo de 5 min.

Al administrar las diversas concentraciones de MEL, se provocó una disminución progresiva de la amplitud y de la frecuencia de la contracción espontánea del tejido uterino estrogenizado (Fig. 20); lo que indica que este efecto es dependiente de la concentración administrada de MEL.

También la frecuencia de la contracción uterina disminuyó progresivamente de acuerdo al incremento en las concentraciones de MEL añadidas al baño del tejido. Así, en presencia de 10^{-9} M de MEL, la frecuencia fue de 8.75 ± 1.41 ; con 10^{-8} M fue de 9.17 ± 1.89 ; con 10^{-7} M fue de 7.92 ± 1.64 , mientras que con 10^{-6} M la frecuencia fue de 7.17 ± 1.61 . Finalmente, con la concentración de 10^{-5} M se observó una frecuencia de 5.50 ± 1.63 (Fig. 20 y 21). Sin embargo, el análisis estadístico mostró que

la diferencia observada entre la frecuencia de la contracción basal y en presencia de las diversas concentraciones de MEL no es estadísticamente significativa a un nivel de $p > 0.05$.

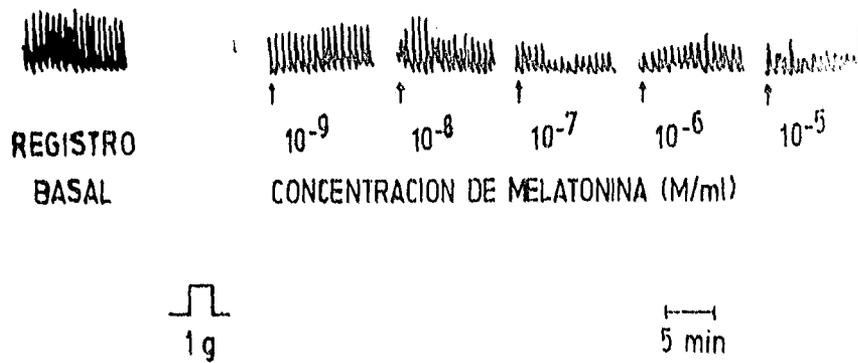


FIGURA 20: La adición de MEL al baño provocó una disminución de las contracciones uterinas espontáneas, dependientes de la concentración de MEL.

Los efectos depresores de la contracción provocadas por la MEL, se manifestaron principalmente durante la contracción fásica (Fig. 20). Así, en presencia de 10^{-9} M de MEL, la amplitud de la actividad espontánea disminuyó 0.15 g (1.5 mN) en promedio; mientras que con 10^{-8} M la disminución fue de 0.52 g (5.2 mN). La concentración de 10^{-7} M provocó una reducción de 0.56 g (5.6 mN) del tono previo. Finalmente, en presencia de 10^{-6} M y de 10^{-5} M de MEL se observó una disminución de 0.88 g (8.8 mN) y de 1.07 g (10.7 mN), respectivamente.

Para analizar cuantitativamente el efecto de la MEL sobre la actividad espontánea, se realizó una transformación matemática de los datos; para ello, se consideró el valor de la amplitud basal o de la frecuencia de la contracción como el 100% mientras que estos parámetros registrados en presencia de MEL se refirieron como un porcentaje de la contracción máxima o de la frecuencia máxima. A partir de estos valores, se obtuvo el porcentaje de inhibición de la actividad espontánea del tejido uterino que provocaron las diferentes concentraciones de MEL.

El efecto provocado por la MEL sobre la contracción espontánea del tejido uterino consistió en la inhibición de la amplitud de la contracción, en un rango de magnitud que va del 20.17 al 67.69% de la contracción uterina espontánea, como puede observarse en el *cuadro V*.

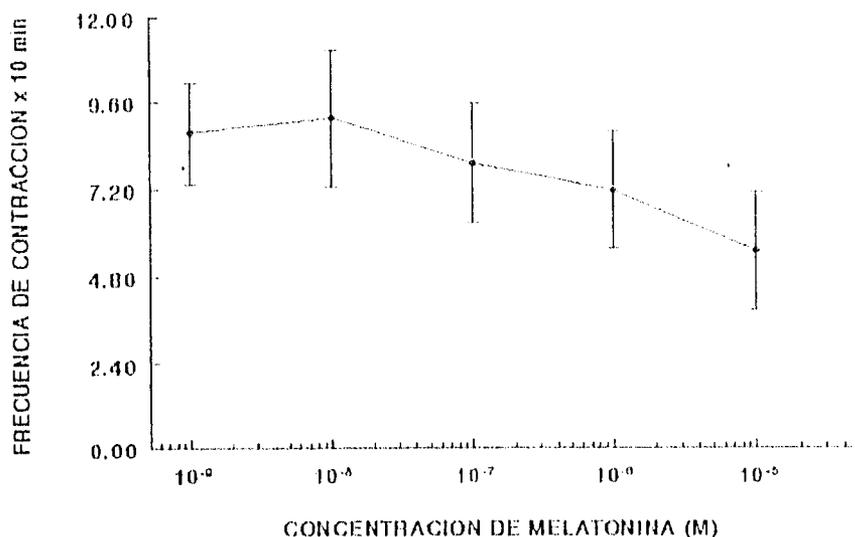


FIGURA 21: Representación gráfica del efecto de la adición de MEL sobre la frecuencia de la contracción espontánea del tejido uterino. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica $\bar{x} \pm$ E.E. (n = 12).

Cuando estos valores se relacionan a través de una curva log de la concentración- porcentaje de inhibición, se observa una relación lineal (Fig. 22). Con esta curva se calculó la concentración de MEL que inhibe el 50% (CI_{50}) de la actividad muscular espontánea del tejido uterino, la cual corresponde a un valor de 228.32×10^{-9} . Además, esta curva sugiere la existencia de una relación lineal entre la concentración de MEL y la disminución de la contracción muscular; lo que indica que el efecto inhibitor de la MEL es dependiente de la concentración.

CUADRO V
EFECTO DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE MELATONINA SOBRE LA AMPLITUD Y LA FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ESPONTANEA DE UTERO DE RATA ESTROGENIZADA (n = 12; $\bar{x} \pm$ E.E.)

CONCENTRACION DE MELATONINA (M)	PORCIENTO DE INHIBICION DE LA CONTRACCION	PORCIENTO DE LA FRECUENCIA DE LA CONTRACCION
10 ⁻⁹	20.17 ± 5.09	99.50 ± 14.60
10 ⁻⁸	37.11 ± 5.89	87.29 ± 10.30
10 ⁻⁷	46.86 ± 8.01 *	80.95 ± 12.04
10 ⁻⁶	57.48 ± 7.41 *	77.52 ± 13.29
10 ⁻⁵	67.69 ± 7.47 *	56.50 ± 11.37

(*) p < 0.05 (ANOVA)

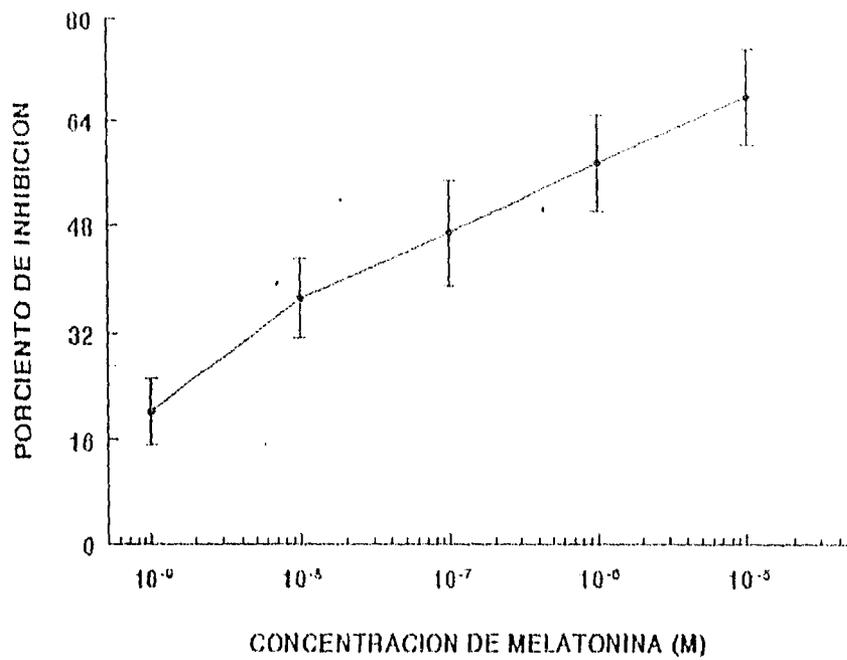


FIGURA 22: Relación gráfica entre la concentración de MEL y el efecto inhibitor sobre la contracción espontánea del tejido uterino. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica \pm E.E. (n = 12).

B) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR CARBACOL.

Cuando en otras preparaciones se adicionó carbacol al baño del tejido para obtener una concentración final que osciló entre 5×10^{-8} y 10^{-5} M, se provocó un incremento tanto en la frecuencia como en el tono y la amplitud de la contracción rítmica en todos los segmentos uterinos inmersos en solución Ringe-Krebs-Henseleit provenientes de ratas estrogenizadas. Este efecto se inició en el transcurso del primer minuto de la adición del carbacol (Fig. 23).

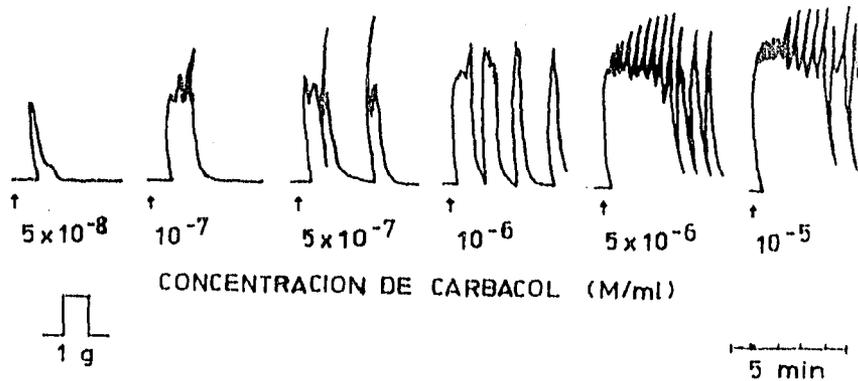


FIGURA 23: Efecto del carbacol sobre el tejido uterino. La adición de carbacol al baño de tejido produjo un incremento de la frecuencia, tono y amplitud de la contracción del tejido uterino.

En presencia de 5×10^{-8} M la frecuencia obtenida fue de 2.08 ± 0.70 , mientras que con 10^{-7} M, la frecuencia fue de 3.83 ± 0.88 ; con 5×10^{-7} M ésta fue de 6.33 ± 1.37 ; y con 10^{-6} M y 5×10^{-6} M, fue de 10.25 ± 1.71 y 14.068 ± 0.78 respectivamente. Finalmente, en presencia de carbacol a la concentración de 10^{-5} M, la concentración más alta utilizada, la frecuencia se incrementó discretamente alcanzando un valor de 14.75 ± 0.94 (Fig. 25).

El efecto del carbacol sobre la amplitud de la contracción uterina fue similar a lo ocurrido con la frecuencia. Entonces, con la concentración de 5×10^{-8} se observó un incremento de 1.98 ± 0.56 g (19.8 ± 5.6 mN); con 10^{-7} M, ésta se incrementó hasta 3.96 ± 0.36 g (39.6 ± 3.6 mN); con 5×10^{-7} M, el aumento fue de 4.90 ± 0.26 g (49 ± 2.6 mN). Para 10^{-6} M el incremento fue de 5.44 ± 0.23 g

(54.4 ± 2.3 mN); a 5×10^{-6} M de 6.62 ± 0.39 g (66.2 ± 3.9 mN); y con la concentración más elevada (10^{-5} M) el incremento fue de 6.82 ± 0.36 g (68.2 ± 3.6 mN) (Fig. 26).

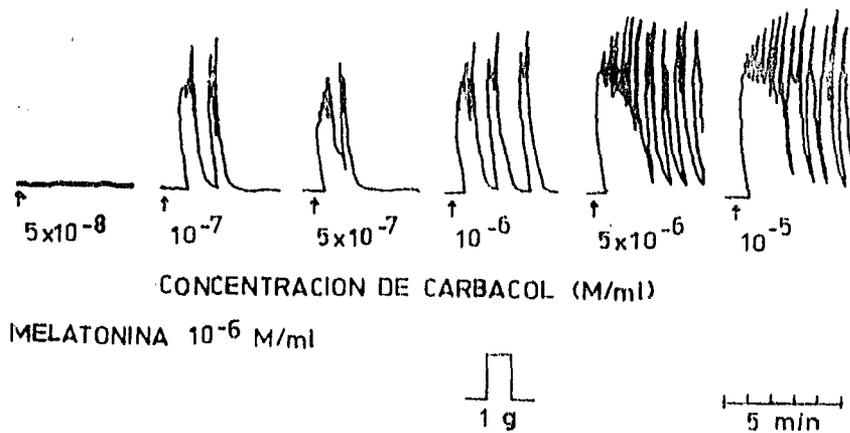


FIGURA 24: Efecto de la adición de MEL al baño del tejido sobre el efecto excitador del carbacol. Nótese la disminución del efecto provocado por el carbacol.

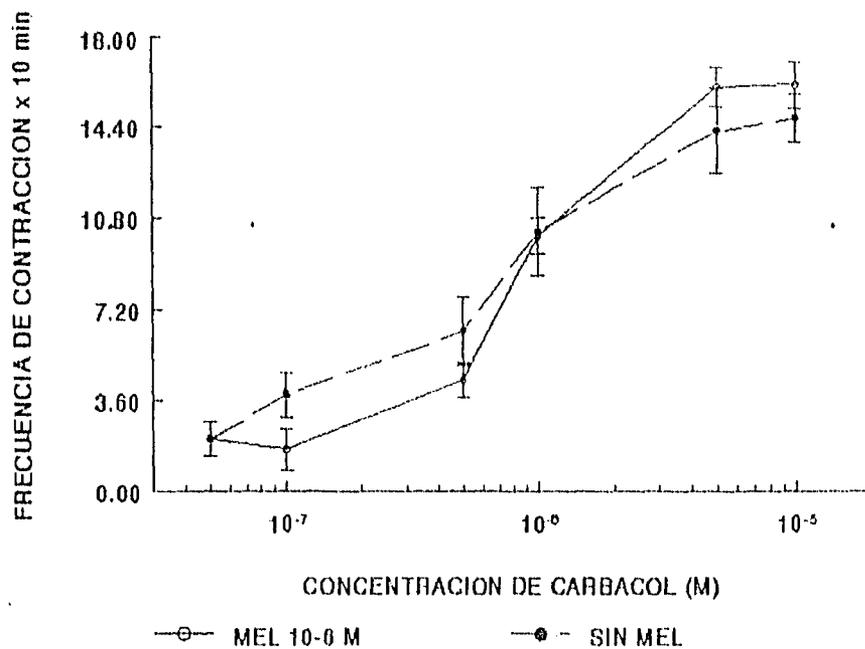


FIGURA 25: Relación gráfica del efecto del carbacol (en ausencia y presencia de MEL), sobre la frecuencia de contracción de tejido uterino. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica el $\bar{x} \pm E.E.$ (n = 12).

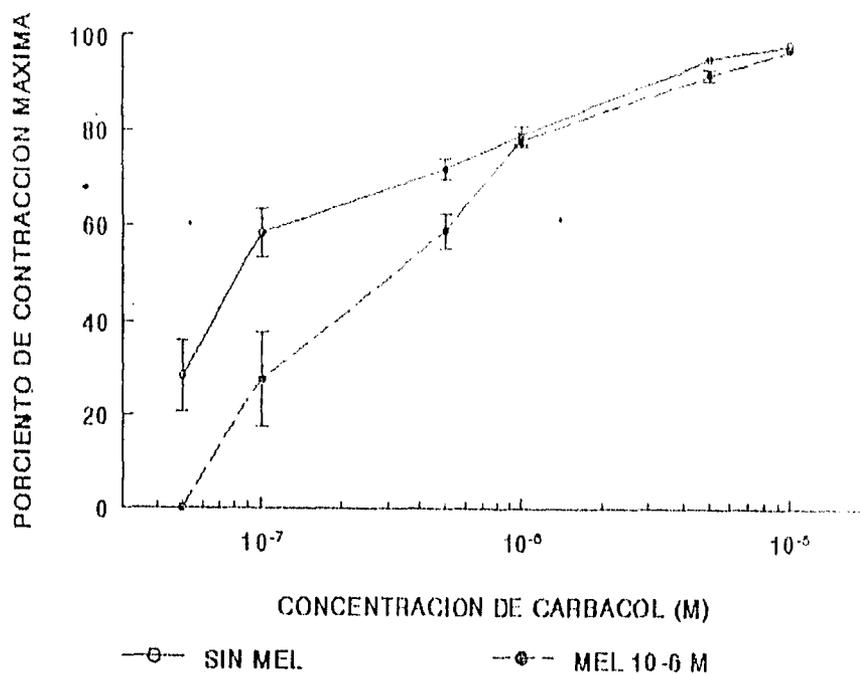


FIGURA 26: Relación entre la concentración de carbacol y el porcentaje de contracción máxima. Se observa que la curva concentración-respuesta máxima a carbacol en presencia de MEL se desplaza hacia la derecha de la curva a carbacol en ausencia de MEL. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica el $\bar{x} \pm E.E.$ ($n = 12$).

En el rango de concentraciones de 5×10^{-8} a 10^{-6} M, el carbacol incrementó la amplitud de la contracción fásica del tejido uterino; mientras que con concentraciones de 5×10^{-6} M o mayores, además de la contracción fásica, también se incrementó la contracción tónica o el tono basal. Así, con la concentración de 5×10^{-6} M la amplitud de la contracción se incrementó a un valor de 5.57 ± 0.34 (55.7 ± 3.4 mN) de la línea del tono basal; y con la concentración de 10^{-5} M, el incremento del tono basal fue de 6.05 ± 0.33 (60.5 ± 3.3 mN). En ambos casos, la contracción tónica disminuía gradualmente y sobre ella se sobreponía la contracción fásica previamente descrita (Fig. 23).

Cuando se adicionaron diferentes concentraciones de carbacol a tejidos preincubados durante 10 min con MEL (10^{-6} M), se observó que el carbacol continuó provocando un incremento en la frecuencia y amplitud de la contracción fásica del tejido uterino (Fig. 24). Sin embargo, la frecuencia de la contracción en presencia de MEL, muestra una disminución del valor obtenido en relación con el

control, pero sin presentar diferencias significativas ($p > 0.05$). Los valores absolutos obtenidos en este caso fueron; en presencia de 10^{-7} M de carbacol, la frecuencia fue de 1.67 ± 0.83 ; con 5×10^{-7} M ésta fue de 4.42 ± 0.69 ; a 10^{-6} M correspondió una frecuencia de 10.08 ± 0.69 ; con 5×10^{-6} M de 16 ± 0.80 . Finalmente, la concentración más elevada de carbacol (10^{-5} M) también en presencia de 10^{-6} M de MEL, provocó un incremento de 16.08 ± 0.95 (Fig. 25).

En lo que respecta al efecto del carbacol sobre la amplitud de la contracción fásica, esta disminuyó significativamente ($p < 0.005$) por la presencia de 10^{-6} M de MEL (Fig. 26). En estas condiciones, se obtuvieron los siguientes resultados: con 5×10^{-8} M no se observó respuesta alguna; con 10^{-7} M, ésta fue de 1.90 ± 0.70 g (19 ± 7 mN); con 5×10^{-7} M el incremento fue de 3.97 ± 0.23 g (39.7 ± 2.3 mN); con 5×10^{-6} M, de 6.28 ± 0.32 g (62.8 ± 3.2 mN); y con la concentración más elevada (10^{-5} M), el incremento fue de 6.65 ± 0.34 g (66.5 ± 3.4 mN). Estos valores son diferentes estadísticamente a los observados en ausencia de MEL.

En lo relativo al tono basal del tejido, las concentraciones de 5×10^{-6} y 10^{-5} M de carbacol, en presencia de 10^{-6} M de MEL, produjeron una contracción tónica del tejido uterino de una magnitud de 5.10 ± 0.26 g (51 ± 2.6 mN) y 5.67 ± 0.28 g (56.7 ± 2.8 mN) respectivamente, los cuales son similares a los observados en úteros no preincubados con MEL.

Para el análisis cuantitativo de los datos, también se calculó el porcentaje de respuesta en relación a la contracción máxima del tejido obtenida en presencia de carbacol. Los valores así obtenidos se presentan en el *cuadro VI*. Este cuadro muestra los valores del efecto cuando se administraron las mismas concentraciones de carbacol pero ahora en presencia de 10^{-6} M de MEL; con estos valores se calculó la curva log de la concentración-porcentaje de contracción máxima para ambos casos; observándose que ambas curvas presentan un comportamiento sigmoideo (Fig. 26).

En esta figura, se observa que la MEL provoca un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de carbacol. La CE_{50} de carbacol corresponde a un valor de 102.50×10^{-9} M, mientras que en presencia de MEL ésta se incrementa hasta 392.43×10^{-9} M. Entre ambas CE_{50} de carbacol existe una diferencia de 289.93 nM, lo que es estadísticamente significativo. Estos datos indican que la MEL está antagonizando la contracción provocada por este fármaco.

CUADRO VI

PORCIENTO DE CONTRACCION MAXIMA DE LA ACTIVIDAD MUSCULAR
INDUCIDA POR CARBACOL EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MELATONINA
(10^{-6} M) EN UTERO DE RATA ESTROGENIZADA (n = 12; x \pm E.E.)

CONCENTRACION DE CARBACOL (M)	EN AUSENCIA DE MELATONINA	EN PRESENCIA DE MELATONINA
5×10^{-8}	30.47 \pm 7.85	0 *
10^{-7}	58.82 \pm 4.82	28.67 \pm 10.57 *
5×10^{-7}	71.25 \pm 2.10	68.78 \pm 3.71
10^{-6}	79.86 \pm 1.80	80.74 \pm 1.70
5×10^{-6}	96.43 \pm 0.80	94.39 \pm 1.44
10^{-5}	99.66 \pm 0.32	99.88 \pm 0.13

(*) p < 0.05 (ANOVA)

C) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR OXITOCINA.

Para analizar el efecto de la MEL sobre la contracción uterina inducida por oxitocina se utilizaron únicamente 12 segmentos de tejido uterino provenientes cada uno de diferentes ratas estrogenizadas. Al igual que en los otros experimentos, después de permanecer durante 60 min en la solución Ringer-Krebs-Henseleit, el tono de la contracción muscular alcanzó un nivel basal, el cual se mantuvo durante toda la duración del experimento. La administración de las diversas cantidades de oxitocina provocó un incremento tanto en la frecuencia como en la amplitud de la contracción fásica del tejido uterino. Tal incremento también mostró una relación directa con la cantidad de oxitocina administrada (*Fig. 27*). En general, la respuesta contráctil se presentó dentro de los primeros tres minutos de añadida la oxitocina. Se agregaron 5 diferentes concentraciones de oxitocina al baño; la más pequeña (5×10^{-11} U/ml) provocó un incremento en la frecuencia de contracción de 6.17 ± 0.61 , mientras que la concentración más alta (5×10^{-3} U/ml) indujo un incremento de 11.5 ± 0.62 . Estos efectos se muestran en la *figura 29*.

En el caso de la fuerza o tono de la contracción uterina, la concentración menor de oxitocina utilizada (5×10^{-11} U/ml), provocó una contracción promedio de 2.55 ± 0.27 g (25.5 ± 2.7 mN), mientras que con 5×10^{-9} U/ml, la contracción fue de 2.55 ± 0.44 g (25.5 ± 4.4 mN). La concentración de 5×10^{-7} U/ml se asoció a una contracción de 2.38 ± 0.51 g (23.8 ± 5.1 mN). Finalmente, con las concentraciones más elevadas de 5×10^{-5} U/ml se observó un incremento de hasta 3.19 ± 0.45 g (31.9 ± 4.5 mN) y de 4.11 ± 0.44 g (41.1 ± 4.4 mN), respectivamente.

En lo relativo al tono basal uterino, únicamente la administración de oxitocina en un rango de 5×10^{-11} y 5×10^{-5} U/ml, incrementaron la amplitud de la contracción fásica del tejido uterino; es decir, no modificaron el tono basal. Sin embargo, al añadir la concentración de 5×10^{-3} U/ml se observó un incremento de esta contracción tónica de 3.7 ± 0.25 g (37 ± 2.5 mN), la cual disminuyó progresivamente. Sobre este incremento se sobreponían contracciones fásicas (*Fig. 27*).

La adición de MEL no modificó el tono basal de la contracción inducida por oxitocina; así, a la concentración de 5×10^{-3} U/ml se encontró una contracción tónica de 3.52 ± 0.41 g (35.2 ± 4.1 mN) la cual es muy similar a la encontrada en ausencia de MEL.

En el caso de la frecuencia de contracción, ésta fue menor significativamente con respecto a la observada en ausencia de MEL. Cuando se agregó una cantidad de 5×10^{-11} U/ml, la frecuencia fue de 4.83 ± 1.89 . Con 5×10^{-9} U/ml, ésta fue de 3.17 ± 1.08 , con 5×10^{-7} U/ml de 2.17 ± 0.47 , con 5×10^{-5} U/ml de 6.83 ± 0.88 y finalmente, con 5×10^{-3} U/ml de oxitocina, la frecuencia fue de 11.50 ± 0.58 (Fig. 29).

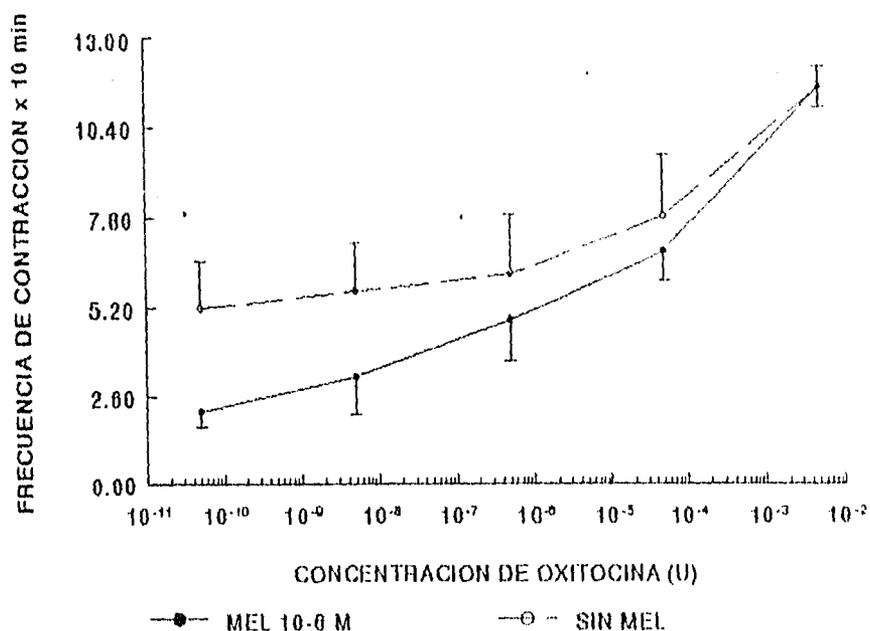


FIGURA 29: Relación del efecto de la oxitocina en ausencia y presencia de MEL, sobre la frecuencia de contracción del tejido uterino. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica el $\bar{x} \pm E.E.$ ($n = 12$).

Debido a la variación observada, estos datos fueron transformados, para obtener el porcentaje de contracción en función de la contracción máxima, para cada uno de los tejidos. Así, el cuadro VII muestra el porcentaje de contracción correspondiente a cada una de las cantidades de oxitocina en ausencia y presencia de MEL. Al relacionar estos valores en una curva log de la concentración-porcentaje de contracción máxima (Fig. 30), se observa que la curva semeja la porción

superior de una curva sigmoidea. Al calcular la CE_{50} para oxitocina (en ausencia de MEL) a partir de la curva obtenida, se obtuvo un valor de 1.0763×10^{-11} U/ml; mientras que en presencia de MEL, la CE_{50} obtenida para oxitocina fue de 8.2696×10^{-9} U/ml. La diferencia entre ambas curvas, indica un efecto de antagonismo observándose un desplazamiento de la curva hacia la derecha, aunque tal efecto es sólo observable con dosis bajas de oxitocina.

CUADRO VII

PORCIENTO DE CONTRACCION MAXIMA DE LA ACTIVIDAD MUSCULAR INDUCIDA POR OXITOCINA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MELATONINA (10^{-6} M) EN UTERO DE RATA ESTROGENIZADA (n = 12; $\bar{x} \pm E.E.$)

CONCENTRACION DE OXITOCINA (U/ml)	EN AUSENCIA DE MELATONINA	EN PRESENCIA DE MELATONINA
5×10^{-11}	59.62 ± 6.57	34.57 ± 12.94 *
5×10^{-9}	62.11 ± 10.71	42.56 ± 12.06 *
5×10^{-7}	55.39 ± 12.46	45.50 ± 9.44
5×10^{-5}	74.21 ± 10.86	78.08 ± 9.90
5×10^{-3}	100	97.32 ± 11.89

(*) $p < 0.05$ (ANOVA)

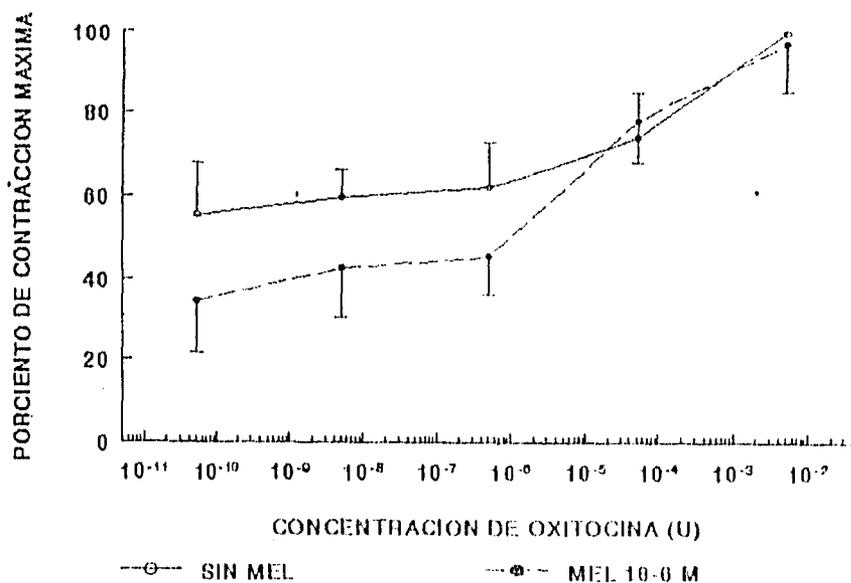


FIGURA 30: Relación de la concentración de oxitocina y el porcentaje de contracción máxima. La curva de oxitocina en presencia de MEL se desplaza hacia la derecha de la curva de oxitocina sin MEL. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica $\bar{x} \pm E.E.$ (n = 12).

D) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA PROVOCADA POR CALCIO.

El efecto de la MEL también se analizó sobre la contracción uterina provocada por diversas concentraciones de calcio. Para el desarrollo de estos experimentos, cada uno de los 12 tejidos uterinos provenientes de 12 ratas estrogenizadas, permaneció durante 60 min inmerso en solución Ringer-Krebs-Henseleit alcanzando al final de este tiempo una línea basal de tensión, posteriormente, la solución anterior fue sustituida por una solución Krebs-Tris libre de calcio y alta en potasio. Al momento del cambio de esta solución se presentó una contractura que desarrolló un tono equivalente a 4.5 ± 0.58 g (45 ± 5.8 mN) sin la presencia de contracciones fásicas asociadas. Esta contractura tónica disminuyó gradualmente a nivel de la línea basal en un tiempo aproximado de 90 min.

Una vez alcanzada esta situación, se administraron diversas concentraciones de calcio, las cuales se asociaron invariablemente con una contractura tónica. Las concentraciones de 1.25×10^{-6} y 2.5×10^{-6} M de calcio no provocaron respuesta alguna; sin embargo, con la concentración de 5×10^{-6} M de calcio la contractura obtenida fue de 3.37 ± 0.36 g (33.7 ± 3.6 mN); con 10^{-5} M ésta fue de 3.9 ± 0.45 g (39 ± 4.5 mN) y con 2.5×10^{-5} M fue de 4.97 ± 0.53 g (49.7 ± 5.3 mN) (Fig. 31).

Cuando se analizó la acción de la MEL sobre el efecto inducido por calcio, las contracturas observadas para las concentraciones de 5×10^{-6} , 10^{-5} y 2.5×10^{-5} M de calcio fueron de 2.03 ± 0.22 g (20.3 ± 2.2 mN), 3.83 ± 0.53 g (38.3 ± 5.3 mN) y 4.47 ± 0.55 g (44.7 ± 5.5 mN) respectivamente (Fig. 32).

Al igual que en los otros experimentos, la contracción inducida por calcio presentó una amplia variación entre cada tejido uterino, por lo que estos nuevamente se expresaron en porcentaje. El cuadro VIII muestran tales porcentajes de respuesta máxima inducida por calcio en ausencia y presencia de MEL.

Al relacionar estos valores, en una curva log de la concentración-porciento de contracción máxima, se observa que ambas curvas tienen una forma sigmoidea. Además, la curva de calcio en presencia de MEL, se desplaza hacia la derecha, lo que indica un efecto antagonista de la MEL sobre la

contractura inducida por este ión (Fig. 33). A partir de ambas curvas, se calculó la CE_{50} , observándose un valor de 4.45×10^{-6} M para el calcio en ausencia de MEL y de 6.0606×10^{-6} M en presencia de esta hormona.

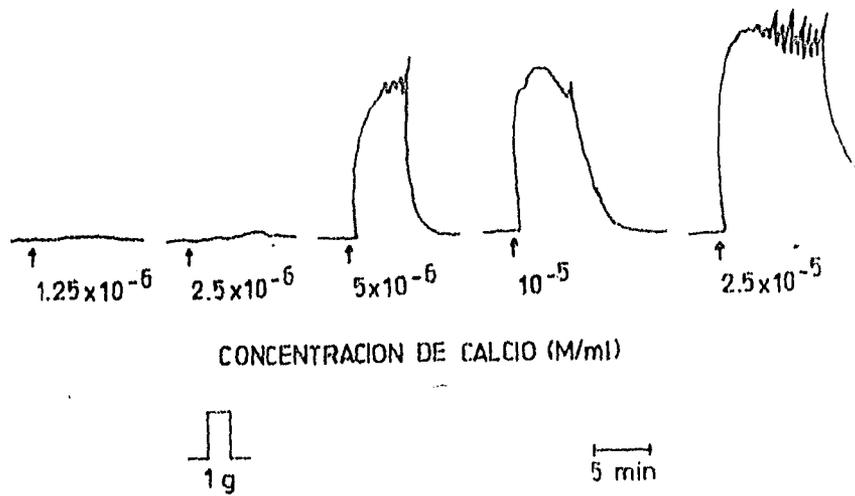


FIGURA 31: Efecto del calcio sobre el tejido uterino, en un medio libre de calcio y rico en potasio.

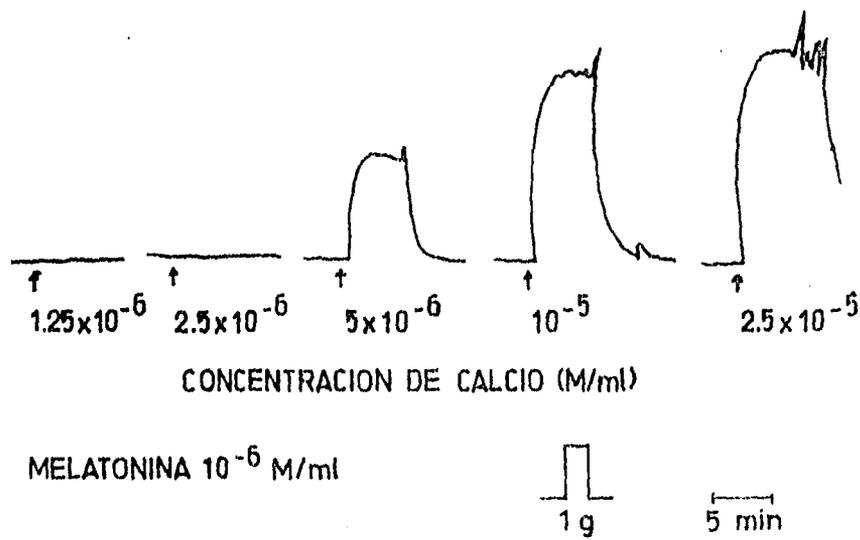


FIGURA 32: Efecto de la MEL sobre la contractura provocada por calcio en tejido uterino, en un medio libre de calcio y rico en potasio.

CUADRO VIII

PORCIENTO DE CONTRACCION MAXIMA DE LA ACTIVIDAD MUSCULAR INDUCIDA POR CALCIO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MELATONINA (10-6 M) EN UTERO DE RATA ESTROGENIZADA (n = 12; x ± E.E.)

CONCENTRACION DE CALCIO (M)	EN AUSENCIA DE MELATONINA	EN PRESENCIA DE MELATONINA
1.25×10^{-6}	0	0
2.50×10^{-6}	0	0
5×10^{-6}	60.66 ± 8.80	40.86 ± 4.22 *
10^{-5}	77.94 ± 3.17	75.09 ± 10.72 *
2.50×10^{-5}	100	88.59 ± 5.71 *

(*) $p < 0.05$ (ANOVA)

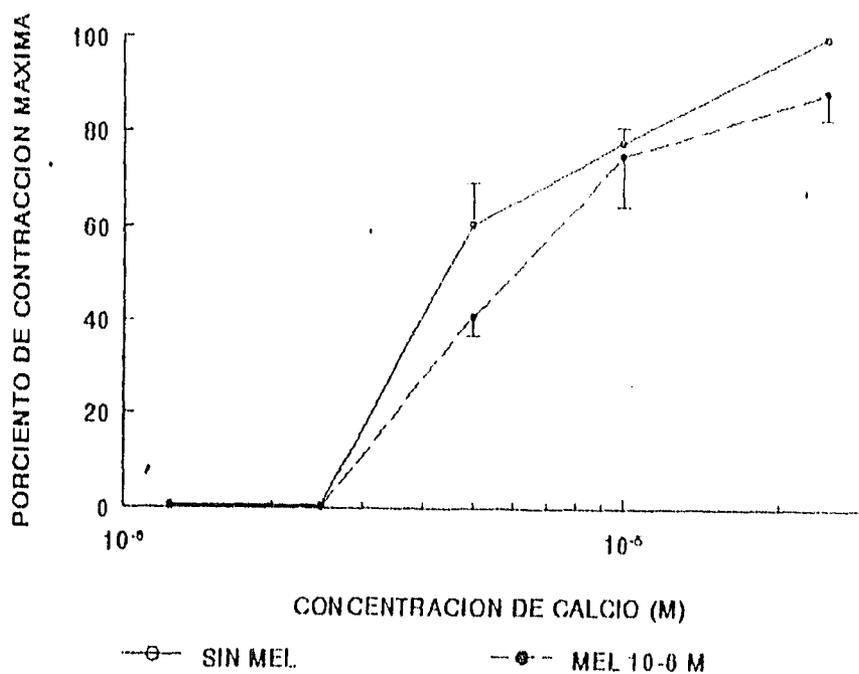


FIGURA 33: Relación de la concentración de calcio y el porcentaje de contracción máxima del tejido uterino en un medio rico de calcio y rico en potasio. La curva de calcio obtenida en presencia de MEL se desplaza hacia la derecha de la curva de calcio sin MEL. La escala de la abscisa es logarítmica. Se grafica el $x \pm E.E.$ (n = 12).

E) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONTRACCION UTERINA.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la MEL posee un efecto inhibidor sobre la contracción fásica del tejido uterino.

En el *cuadro IX* se resumen las CE_{50} de carbacol, oxitocina y calcio calculadas a partir de los resultados obtenidos, tanto en presencia como en ausencia de MEL, así como la Cl_{50} de MEL sobre la actividad espontánea del tejido. Como puede observarse, en todos los casos, la diferencia existente entre la CE_{50} en ausencia y presencia de MEL es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), por lo que en sus relaciones gráficas se ha comentado el desplazamiento de la curva en presencia de MEL hacia la derecha de la curva sin MEL. Es importante indicar que en este caso, la significancia se obtuvo mediante la prueba estadística de ANOVA y Tukey.

Por otra parte, destaca el hecho de contar con una Cl_{50} misma que es estadísticamente significativa con las diversas concentraciones probadas durante los experimentos.

CUADRO IX

CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA DE DIFERENTES AGONISTAS
DEL TEJIDO UTERINO DE RATA ESTROGENIZADA
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE MELATONINA (10^{-6} M)

AGONISTA	SIN MELATONINA	CON MELATONINA
ACTIVIDAD ESPONTANEA		228×10^{-9} M [@]
CARBACOL	102.50×10^{-9} M	392.43×10^{-9} M *
OXITOCINA	1.0763×10^{-9} U/ml	8.2696×10^{-9} U/ml *
CALCIO	4.4595×10^{-6} M	6.0606×10^{-6} M *

([@]) Corresponde a la Cl_{50}

(*) $p < 0.05$

ESTA TESIS HA SIDO
SELECCIONADA PARA LA OBTENCION DEL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

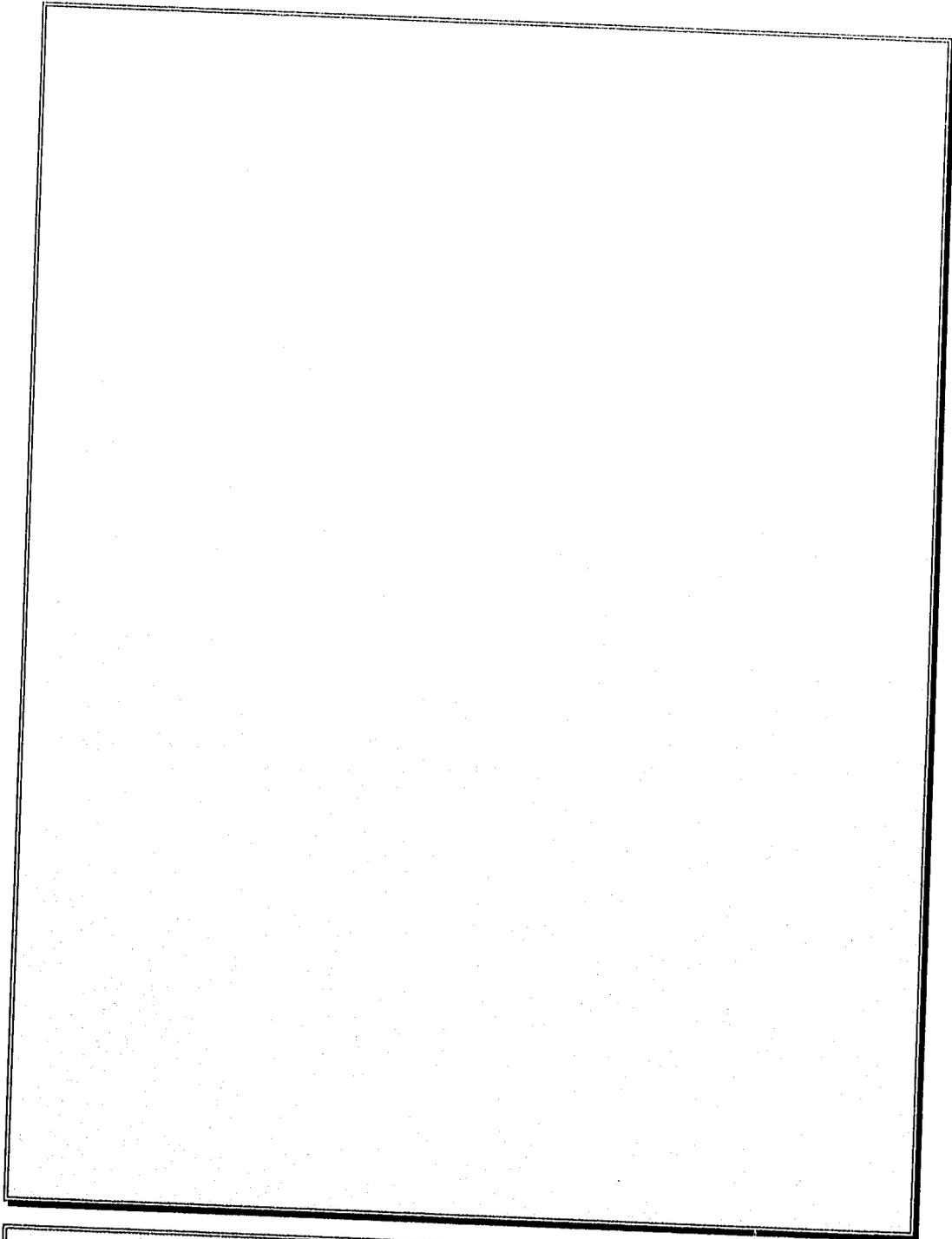
En el *cuadro X*, puede observarse compartiva y cualitativamente el efecto de la MEL que se obtuvo sobre la contracción uterina en cada una de las situaciones experimentales, ya sea actividad espontánea, o bien, inducida por carbacol, oxitocina y calcio. Como se ha expresado anteriormente, el efecto que produce la MEL en cada una de estas situaciones no es idéntica, por lo que además podemos observar el efecto sobre la frecuencia de la contracción, la contracción fásica y la contracción tónica. De la observación y análisis de este cuadro destaca que el cambio inducido por la MEL no es estadísticamente significativo sobre la frecuencia de contracción ni la contracción tónica, ya sea espontánea o inducida por carbacol u oxitocina. Mientras que la disminución de la contracción fásica tanto en la actividad espontánea como en la contracción inducida por carbacol u oxitocina. Finalmente, la MEL inhibe la contracción tónica provocada por calcio en un medio despolarizante.

CUADRO X

EFECTO DE LA MELATONINA (10^{-6} M) SOBRE LA CONTRACCION UTERINA
EN DIVERSOS MECANISMOS DE ESTIMULACION

CARACTERISTICAS DE LA CONTRACCION	ACTIVIDAD ESPONTANEA	CARBACOL	OXITOCINA	CALCIO
FRECUENCIA	=	=	=	- - - - -
CONTRACCION FASICA	↓	↓	↓	- - - - -
CONTRACCION TONICA	=	=	=	↓

- (=) Sin cambios
- (- - - -) no hubo respuesta
- (↓) disminución.



DISCUSION

Los efectos que la GP ejerce sobre los mecanismos de la reproducción de algunos mamíferos han sido descritos ampliamente ^(35,157). Estos efectos son consecuencia de una acción sobre los sistemas hormonales en el SNC localizados principalmente en el hipotálamo ventromedial ⁽³⁶⁾. Sin embargo, hallazgos como la descripción de sitios de unión específicos a la MEL en útero de rata ⁽⁵⁵⁾ y estructuras vasculares ^(176,211); así como su presencia en líquido folicular ⁽¹⁶⁸⁾, la participación en la iniciación del trabajo de parto ⁽¹³⁰⁾ y su efecto inhibitorio sobre la contracción de músculo liso ⁽⁷⁸⁾, sugieren que esta hormona también ejerce diversos efectos sobre tejidos periféricos; aunque su mecanismo de acción tanto en estructuras del SNC como en tejidos periféricos es aún desconocido.

Desde la década de los sesenta, los estudios realizados con músculo liso, mostraron el efecto inhibitorio que la MEL ejerce sobre la contracción espontánea e inducida por diferentes fármacos; pero estos efectos no han sido analizados farmacológicamente.

El efecto de la MEL sobre la contracción espontánea descrito en el presente estudio, muestra que esta neurohormona no disminuye significativamente la contracción fásica del tejido uterino de ratas estrogenizadas. Estos resultados difieren con los obtenidos por Hertz-Hesel y Rahamimoff ⁽⁸⁰⁾, quienes mencionan que la MEL, en concentraciones de 3×10^{-7} M, inhibe completamente la actividad espontánea de tejido uterino estrogenizado. En este trabajo, la concentración máxima de MEL empleada (10^{-6} M) no provocó una inhibición mayor al 70% de la contracción concomitantemente con una reducción del 50% en la frecuencia de la contracción. Tal discrepancia en cuanto a la magnitud del efecto depresor de la MEL, también fue descrita por Davis y cols ⁽⁶⁰⁾ al mostrar que la MEL inhibe la contracción espontánea sólo a una concentración de 2.07×10^{-4} M y puede ser consecuencia de las diferentes etapas estrales en las que se encontraban las ratas seleccionadas para el registro.

El efecto inhibitorio de la MEL sobre la actividad espontánea del músculo liso fue también descrito en el duodeno de ratas ⁽¹⁴⁹⁾, íleon, yeyuno y colon de hamster ⁽⁷⁸⁾ así como en conducto deferente de rata ⁽¹³⁶⁾. La magnitud del efecto inhibitorio difiere entre sí en estos estudios, sugiriendo con ello que cada uno de los tipos de musculatura lisa muestran una sensibilidad propia al efecto inhibitorio de la MEL.

Los efectos observados sobre la frecuencia de contracción no son estadísticamente significativos, lo que implica que la actividad rítmica automática (neurogénica) de la musculatura lisa uterina no es afectada por la MEL. Estas contracciones se relacionan con ciertos eventos intracelulares que movilizan calcio debido a la generación espontánea de pulsos de potenciales de acción ⁽²⁴⁾, lo que sugiere que la MEL probablemente no interviene con este mecanismo intracelular. Otros resultados también muestran que la MEL no modifica la frecuencia de la contracción espontánea del intestino delgado. Esto indica que tanto en útero como en intestino la MEL ejerce un efecto exclusivamente sobre las propiedades miogénicas del tejido ^(78,136). La disminución de la amplitud de la fuerza de contracción (contracción fásica) provocada por la presencia de MEL, es estadísticamente significativa ($p < 0.005$), y puede ser consecuencia de la disminución en el tamaño y duración de la meseta del potencial de acción ⁽²⁴⁾. Es precisamente durante esta meseta cuando ocurre el ingreso de calcio al interior celular para promover la contracción.

Esto permite proponer que en el caso específico del tejido uterino, la MEL ejerce un efecto inhibitorio a través de la disminución en la excitabilidad celular, debido a que la capacidad del tejido uterino para presentar una contracción coordinada y espontánea, requiere de la propagación de un potencial de acción desde un foco de estimulación hacia todo el tejido muscular uterino ^(89,90). El mecanismo de propagación implica que un potencial de acción generado en un miocito, provoque la despolarización de los miocitos adyacentes, iniciándose así, la propagación de un pico de potenciales de acción ⁽⁵⁶⁾. Además de que la contracción se ve interrumpida por la deficiente entrada del ión calcio que ocurre durante esta alteración del potencial de acción.

Los resultados obtenidos en los registros de la contracción uterina inducida por carbacol en presencia de MEL muestran un claro efecto inhibitorio de esta última. No existe en la literatura una descripción del efecto de esta hormona sobre la contracción uterina inducida por carbacol, por lo que este estudio es el primero en explorar el efecto de la MEL bajo estas condiciones.

La MEL inhibe la contracción fásica inducida por carbacol; sin embargo, este efecto es estadísticamente significativo sólo con concentraciones de carbacol en el rango de 5×10^{-8} a 5×10^{-5} M y desaparece a partir de la concentración de carbacol de 10^{-4} M de solución.

Si consideramos que la acetilcolina, así como el carbacol, producen una contracción del músculo liso visceral gracias a que moviliza iones de calcio a través de los siguientes mecanismos:

- a) un incremento de la corriente de entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje (24-28);
- b) liberación de iones de calcio de almacenes intracelulares solamente en contracciones transitorias (106);
- c) Entrada de calcio a través de canales operados por receptor (27);

entonces, es posible que el efecto de la MEL observado en este estudio, en el caso de la contracción provocada por carbacol, sea consecuencia de una reducción en el ingreso de iones de calcio al interior de la célula. Por otra parte, algunos estudios refieren que con bajas concentraciones de acetilcolina se induce una actividad mecánica en el músculo por un mecanismo diferente al utilizado por elevadas concentraciones de este neurotransmisor. Es posible que la actividad mecánica inducida por bajas concentraciones de carbacol se asocien inicialmente con cambios en la frecuencia y duración de los potenciales de membrana, mientras que la actividad mecánica provocada por elevadas concentraciones de carbacol se asocien principalmente con una despolarización sostenida de la membrana o con efectos independientes del voltaje, como la liberación de calcio de almacenes intracelulares (24,88,138).

La curva dosis-respuesta a carbacol en presencia de MEL se desplaza hacia la derecha pero sigue conservando una relación sigmoidea, lo que sugiere que la MEL inhibe la contracción inducida por carbacol por un mecanismo de antagonismo. Al interpretar estas curvas, se observa que es la eficacia y no la potencia del carbacol la que se modifica. Esto se sugiere por la diferencia en las pendientes de ambas curvas (9,192). La pendiente de la curva de carbacol en ausencia de MEL tiene un valor de 27.26 y en presencia de MEL es de 42.01.

Aunque la CE_{50} de carbacol en ausencia y presencia de MEL difieren significativamente (*Cuadro IX*), el comportamiento global del proceso no implica un antagonismo de tipo puramente farmacológico; es decir, que este efecto sea consecuencia de una acción de la MEL sobre los receptores muscarínicos a los que se une el carbacol (112); sin embargo, es posible suponer un antagonismo sobre los canales de Ca^{+2} asociados con los receptores muscarínicos. Si consideramos que la respuesta

inducida por carbacol sobre el músculo uterino está regulada por la estimulación de receptores muscarínicos, los cuales incrementan la movilización de polifosfoinosítidos, liberan ácido araquidónico y modulan los canales de potasio a través de inhibir la adenilato ciclasa ^(112,147). Entonces, las acciones de la MEL para inhibir la contracción provocada por concentraciones bajas de carbacol, ocurriría por la modificación de algunos eventos a nivel del flujo de iones de calcio que promoverían la contracción muscular. En esta situación, este indól se comportaría en consecuencia como un antagonista fisiológico del carbacol ^(9,192).

Aunque también esta acción podría implicar un mecanismo intracelular. Por ejemplo, se reportó que la MEL inhibe la producción de AMPc inducido por forskolín ^(66,67,102). También se sugirió que esta hormona podría actuar a través de bloquear las acciones fisiológicas de la calmodulina ⁽¹⁹⁾.

Finalmente, de nuestros resultados debemos destacar el papel que la MEL mostró al disminuir sólo la amplitud de la contracción fásica provocada por carbacol pero no la frecuencia ni el tono de la contracción (*Cuadro X*). Tales observaciones sugieren que esta hormona actúa a través de un mecanismo inespecífico general asociado a las propiedades miogénicas del tejido, lo cual reduce la excitabilidad celular y provoca una disminución del tamaño y la amplitud de la meseta del potencial de acción, evento en el que el ion calcio juega un papel importante en el músculo liso.

Otros estudios también han analizado el efecto de la oxitocina en presencia de MEL. Por ejemplo, en el estudio realizado por Davis y cols ⁽⁶⁰⁾ se observó que en presencia de una concentración de MEL de 3.72×10^{-4} M/ml se inhibía el 42.2 % de la contracción inducida por una dosis de oxitocina de 1.25×10^{-4} U/ml, mientras que a la misma concentración de MEL, se inhibió el 36.7% y el 37.6% de la contracción provocada por 2.5×10^{-4} U/ml y 5×10^{-4} U/ml de oxitocina, respectivamente. Como se muestra, este efecto es dependiente de la concentración de MEL.

En el presente trabajo, la contracción inducida por oxitocina en presencia de MEL a una concentración de 10^{-6} M también es significativamente menor que cuando se administran las mismas dosis de oxitocina en ausencia de este indol. Este efecto inhibitor es también dependiente de la concentración de MEL aunque en general los resultados son similares, éstos no pueden ser totalmente comparables debido a que difieren en el diseño experimental. Además, en el rango de las

concentraciones de oxitocina empleadas por Davis y cols ⁽⁶⁰⁾, los resultados descritos en este trabajo no muestran un efecto inhibitor de la contracción uterina.

Al igual que sus efectos observados sobre la contracción inducida por carbacol, el efecto inhibitor de la MEL es más evidente con bajas concentraciones de oxitocina (5×10^{-11} a 5×10^{-7} U/ml). También al comparar las curvas dosis-respuesta de oxitocina en ausencia y presencia de MEL, se muestra que esta última se desplaza hacia la derecha (*Fig. 22*), fenómeno que indica un antagonismo por parte de la MEL. El análisis de estas curvas sugiere que la MEL no modifica la potencia de la oxitocina, pero sí la eficacia de este fármaco para inducir la contracción uterina. En este caso, la pendiente de la curva de oxitocina en presencia de MEL (8.05) duplica la pendiente de la curva de oxitocina en ausencia de MEL (4.64).

Al comparar la CE_{50} de oxitocina en ambas situaciones se encontraron que ambas difieren significativamente ($p < 0.05$) (*Cuadro IX*). Estos datos indican que la MEL inhibe la contracción uterina provocada por oxitocina; posiblemente a través de un mecanismo de antagonismo fisiológico; puesto que el comportamiento de las curvas dosis-respuesta no es el descrito para un antagonista farmacológico de tipo competitivo; sino de un antagonismo no competitivo de tipo fisiológico ^(9,192).

La contracción inducida por oxitocina está asociada con la movilización de calcio extracelular e intracelular ^(3,5,7,141,225). Por lo tanto, el efecto de la MEL sobre la contracción fásica inducida por oxitocina (*Cuadro X*), puede ser también dependiente de la concentración de calcio, por modificar la actividad de los canales de Ca^{+2} acoplados a los receptores específicos a oxitocina ⁽¹⁶⁾. Al igual que en la activación muscular espontánea y por carbacol, estos resultados indican que la MEL disminuye el tamaño o la duración del potencial de acción.

La respuesta del músculo liso aislado sometido a estímulos farmacológicos, es el resultado de una serie de eventos, los cuales incluyen a la activación neural, la interacción fármaco-receptor, y esto a su vez implica la activación de canales de calcio que permite la entrada del calcio extracelular (el acoplamiento eléctrico y mecánico entre células musculares, y algunos eventos intracelulares). Por lo tanto, el efecto de un fármaco para inducir o inhibir una contracción muscular puede depender de un mecanismo de acción en cualquiera de las etapas mencionadas ^(24,47).

Usualmente, el primer evento en la secuencia para provocar la contracción muscular, es la formación de un complejo reversible entre moléculas de la sustancia agonista y un receptor específico, el cual se localiza en la membrana celular de las células musculares o nerviosas. Cuando el fármaco actúa directamente sobre el músculo, la interacción agonista-receptor subsecuentemente produce un movimiento de iones de calcio tanto del comportamiento extracelular al activar los canales de Ca^{+2} acoplados a receptores específicos, como de algunos depósitos intracelulares ⁽¹²³⁾. Tal movilización de este ión trae como consecuencia un incremento en la concentración de calcio en la matriz citoplasmática de la célula muscular lisa, el cual sirve para activar el aparato contráctil de actina y miosina y el resultado es una contracción muscular ^(24,143,147,225).

Particularmente, la contracción de la musculatura lisa uterina inducida por fármacos requiere de la movilización de calcio desde fuentes extra e intracelulares hacia la matriz citoplasmática ⁽¹⁴⁷⁾. Entonces, tanto la actividad espontánea como las contracciones provocadas por carbacol y oxitocina, empleados en el presente trabajo, requieren de la movilización del calcio a diversos niveles de eventos en su mecanismo de acción, como respuesta a los cambios de la excitabilidad de la fibra muscular ^(7,24,147). En este estudio, la MEL inhibe tanto la contracción muscular provocada por carbacol como por oxitocina, así como también la actividad espontánea. Estos efectos sugieren que la MEL puede ejercer tal diversidad de efectos al actuar sobre un evento común desencadenado por estos fármacos; una posibilidad es la de modificar la disponibilidad del calcio que participa en la contracción muscular.

Algunos estudios iniciales, los cuales describen el efecto de la MEL sobre la actividad espontánea uterina, sugirieron que la MEL podría bloquear los receptores a la 5-HT ⁽⁸⁰⁾. Sin embargo, estudios más recientes ^(31,78) descartan tal posibilidad.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acción de la MEL, involucrado en la producción del efecto inhibitor sobre la contracción de musculatura lisa, está relacionado con cambios en la excitabilidad celular los cuales regulan los flujos de corrientes iónicas, principalmente de calcio.

En particular, los resultados de los experimentos relacionados con el efecto de esta hormona sobre la contracción provocada por calcio en tejido uterino *in vitro*, muestran que la MEL inhibe este tipo de contracción (**Cuadro X**). Aunque con características diferentes a los otros tipos de contracción provocada; pues en este caso, la que disminuye significativamente es la contracción tónica. Así, cuando la curva dosis-respuesta a calcio en presencia de MEL se desplaza hacia la derecha (**Fig. 33**) lo que ocurre aún con la concentración más alta de calcio empleada (2.5×10^{-5} M). Debido a que las contracciones obtenidas en soluciones libres de calcio son debidas al ingreso de calcio desde el medio extracelular al citoplasma, el efecto observado en estos experimentos sugiere que la entrada de calcio es modificada por MEL, lo que indica un antagonismo de tipo farmacológico de índole competitivo ^(9,192).

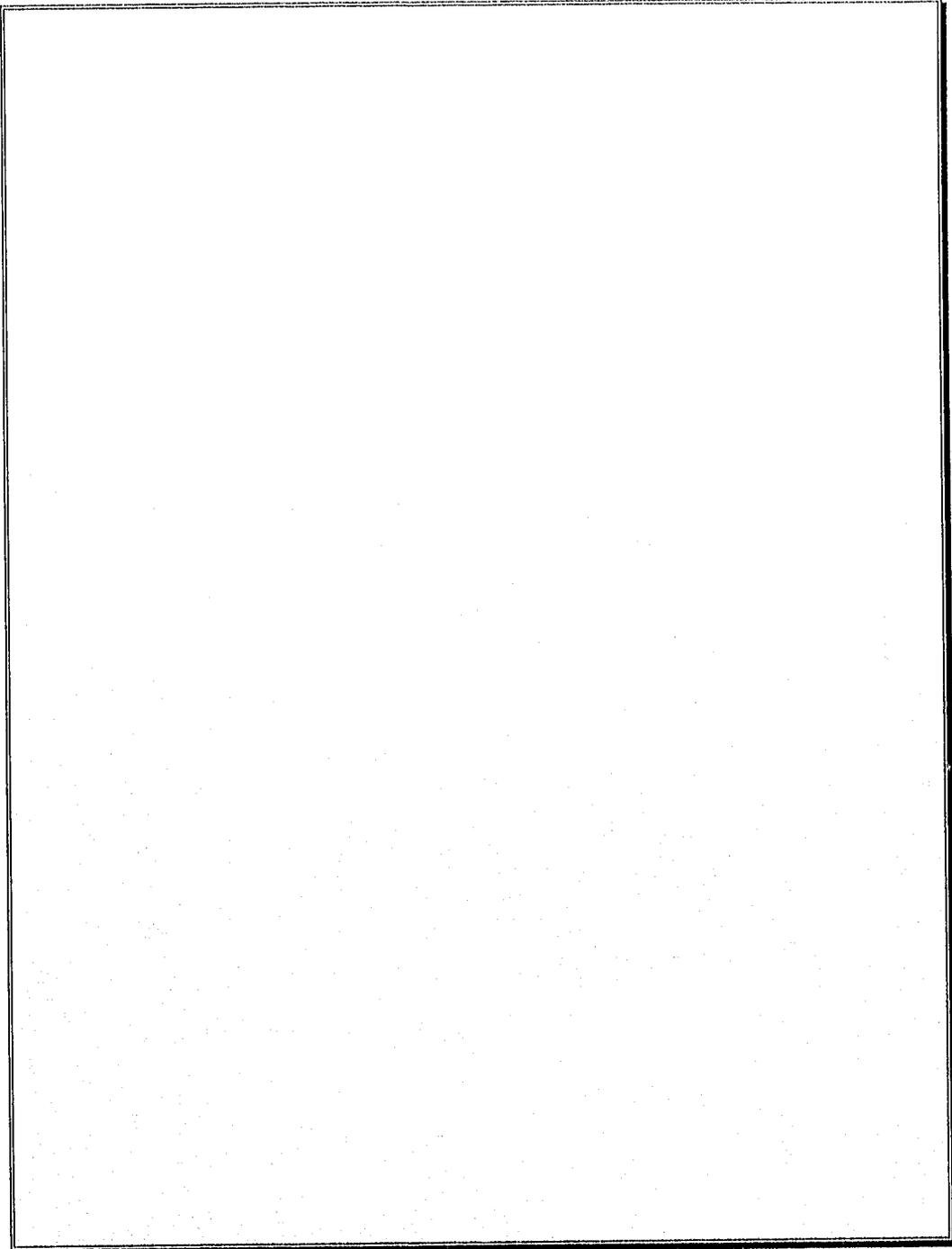
También la eficacia del calcio disminuye puesto que la pendiente de la curva al calcio en presencia de MEL adquiere un valor de 89.08, mientras que en su ausencia es de 94.34. Por otra parte, la CE_{50} también difiere significativamente (**Cuadro IX**). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la MEL modifica la participación del calcio en la contracción del músculo liso uterino. Dado que en estos experimentos se utilizaron tejidos despolarizados para inducir la contracción por calcio, la cual fue antagonizada por MEL, es posible inferir que la MEL podría estar también inactivando los canales de calcio operados por voltaje. Además, el hecho de que en este caso se reduzca la contracción tónica, apoya la hipótesis de que la MEL está actuando a nivel de canales iónicos de calcio.

Este efecto guarda analogía con la acción de la MEL sobre la liberación de dopamina en retina ⁽²²⁶⁾ y el hipotálamo ⁽²³¹⁾. Tales efectos dan origen a la idea de que el efecto de la MEL, tanto a nivel central como periférico, puede estar asociado con mecanismos que modifican la introducción de calcio al interior de la célula ⁽¹⁴¹⁾. Así, es probable que el mecanismo de acción de la MEL sea indistinto en SNC y músculo liso; y que la sensibilidad a esta hormona en diferentes tejidos descritos por Harlow y Weekley ⁽⁷⁸⁾ está asociada a microambientes iónicos propios de cada una de las estructuras biológicas ⁽²²⁷⁻²³¹⁾.

El presente trabajo no permite discriminar si la MEL bloquea la función de los canales iónicos de calcio, o si su participación es a nivel intracelular, por ejemplo, acoplándose a calmodulina ⁽⁵²⁾.

Aún cuando los resultados obtenidos en este estudio muestran un efecto farmacológico inhibitor sobre la musculatura lisa uterina; el efecto fisiológico en el que participa la MEL directamente en este tejido no se ha discernido completamente.

Finalmente, es importante indicar que la variabilidad en la actividad muscular del tejido uterino entre cada uno de los ensayos realizados en este estudio, puede ser debido a la ubicación del marcapaso de la actividad espontánea, la cual puede encontrarse en cualquiera de los dos cuernos uterino, además, esta dispersión de valores ha sido observada en los estudios realizados por otros autores (87).



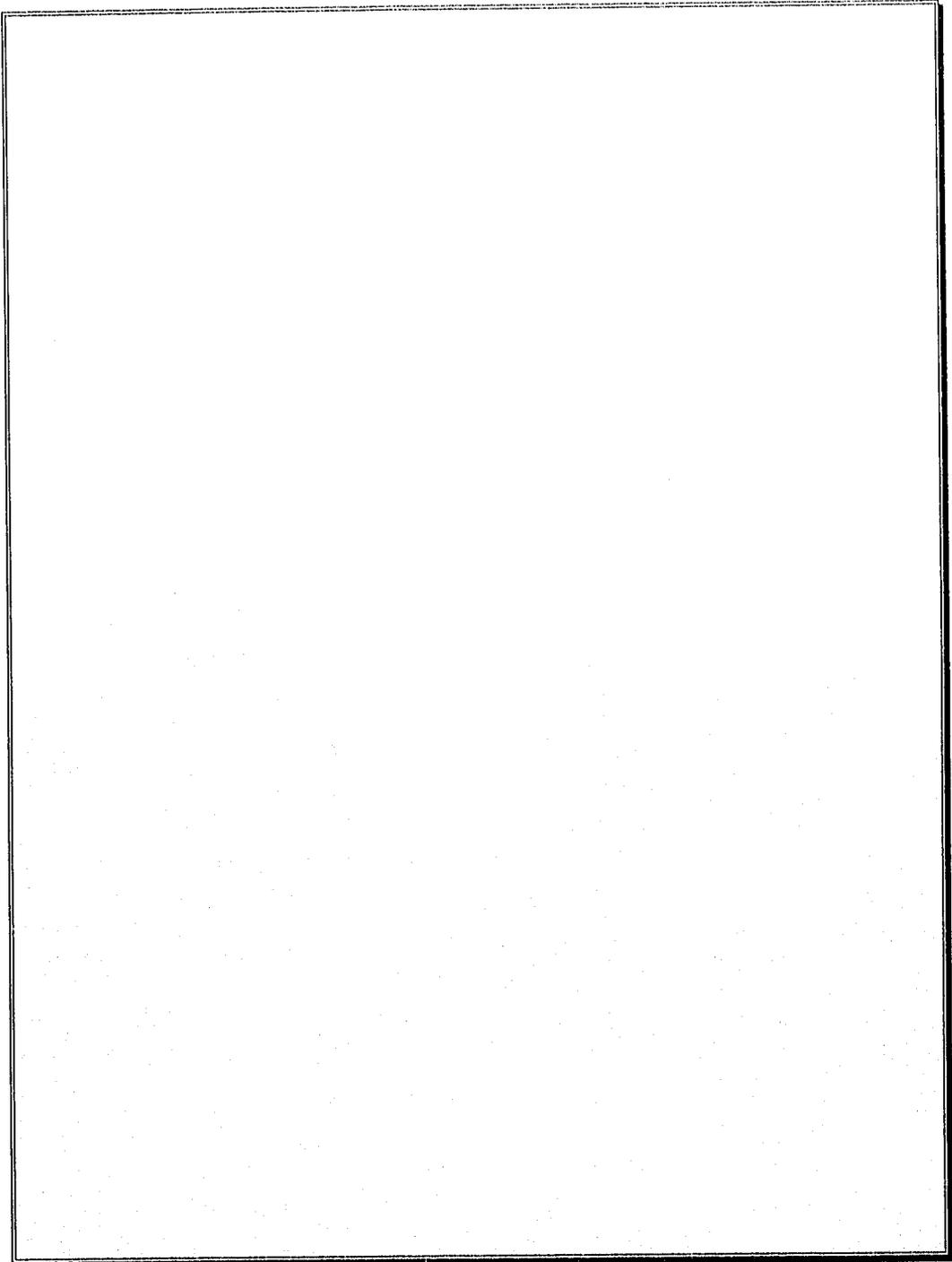
CONCLUSION

Los resultados del estudio así como su análisis y discusión, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La MEL posee un efecto inhibitor sobre la contracción uterina tanto espontánea, como provocada por carbacol y oxitocina.
2. Sin embargo, la MEL sólo provoca la disminución de la contracción fásica, sin provocar una disminución significativa en la frecuencia de contracción ni en la contracción tónica en cualquier tipo de activación de la musculatura uterina.
3. El mecanismo por el cual se ejerce este efecto está asociado a la disminución de la excitabilidad celular, por lo que en base a estos resultados puede suponerse que la MEL provoca una disminución en la amplitud y duración de la meseta del potencial de acción, motivo por el cual sólo es inhibida la contracción fásica del tejido uterino, sin modificar ni su tono ni la frecuencia de la contracción.
4. Por la disminución de la contracción fásica de la contracción espontánea o provocada por carbacol u oxitocina, y considerando el acoplamiento excitación-contracción, se infiere que la MEL participa modificando el potencial de acción, donde puede bloquear la entrada de calcio del exterior al interior de la célula.
5. La disminución observada en presencia de MEL de la contracción tónica provocada por calcio en un medio libre de calcio y rico en potasio, apoya la participación de la MEL en la disminución del flujo de entrada del calcio durante la meseta del potencial de acción, mecanismo mediado probablemente a través de canales iónicos de calcio dependientes de voltaje.

Aunque el presente estudio no pretende ser concluyente en relación al mecanismo de acción de la MEL, su importancia radica en que pone de manifiesto que en tejidos periféricos, la MEL ejerce sus efectos farmacológicos a través de modificar la función del calcio como segundo mensajero, lo que puede contribuir a explorar el papel de la MEL en el mecanismo de transducción de señales del calcio en células excitables.

Sobre esta idea, se pueden orientar diversos estudios, también en tejidos periféricos, en los que se analice el efecto de la MEL en presencia de diversos bloqueadores de canales de calcio como es el caso de nifedipina, felodipina, nitrendipina, verapamil o diltiazem, entre otros, asociando también el efecto en presencia del ionóforo de calcio A23187 y del agonista de canales de calcio Bay K 8644. Sin embargo, si se trata de aproximarse a la comprobación de una hipótesis más concluyente en relación a la participación de la MEL en el bloqueo del flujo de canales iónicos de calcio, es indispensable realizar estudios que analicen las corrientes de flujos iónicos como es el caso de la técnica de fijación de voltaje en porciones de membrana (patch-clamp).



REFERENCIAS

1. **Abdel-Latif AA.** Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messenger and contraction in the mammalian iris smooth muscle: historical perspectives and current status. *Life Sci* 1989;45:757-786.
2. **Aleshansky MA, Neff NH.** Studies on the control of pineal indole synthesis: cyclic nucleotides, adenylate cyclase and phosphodiesterase. *J Neural Transm (suppl)* 1978;13:81-115.
3. **Alexandrova M, Soloff MS.** Oxytocin receptors and parturition. I. Control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. *Endocrinology* 1980;106:730-735.
4. **Alexandrova M, Soloff MS.** Oxytocin receptors and parturition. II. Concentrations of receptors for oxytocin and estrogen in the gravid and nongravid uterus at term. *Endocrinology* 1980;106:736-738.
5. **Alexandrova M, Soloff MS.** Oxytocin receptors and parturition. III. Increases in estrogen receptor and oxytocin receptor concentrations in the rat myometrium during prostaglandin F_{2α}-induced abortion. *Endocrinology* 1980;106:739-743.
6. **Anton-Tay F, Chou C, Anton S, Wurtman RJ.** Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* 1968;162:277-278.
7. **Anwar K, Sanborn BM.** Changes in intracellular free calcium in isolated myometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of guanine nucleotide-sensitive proteins. *Endocrinology* 1989;124:17-23
8. **Arndt J.** Mammalian pineal. *Pineal Res Rev* 1985;3:161-213.
9. **Ariens EJ.** Molecular pharmacology. New York: Academic Press, 1964.
10. **Ariëns-Kappers J.** Short history of pineal discovery and research. *Prog Brain Res* 1979;52:3-22.
11. **Augustine GJ; Charlton MP, Smith SJ.** Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann Rev Neurosci* 1987;10:633-693.
12. **Axelrod J.** The pineal Gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974;184:1341-1348.
13. **Axelrod J, Weissbach H.** Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960;131:1312.
14. **Barlow-Warden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen DL, Poeggeler B.** Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1996;26:497-502.
15. **Barrera Mora B.** El modelo cartesiano de la función pineal. *Salud Mental* 1987;10:22-26.
16. **Batras S.** Effect of oxytocin on calcium influx and efflux in the rat myometrium. *Eur J Pharmacol* 1986;120:57.
17. **Batras S, Bengtsson B.** Effects of diethylstilbestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. *J Physiol* 1978;276:329-342.
18. **Bentez-King G, Huerto-Delgado L, Anton-Tay F.** Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res* 1990;9:209-220.
19. **Bentez-King G, Huerto-Delgado L, Anton-Tay F.** Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res* 1991;557:289-292.

20. **Blondoni M, Jutisz M, Ribot G.** Characterization and partial purification of a substance in the pineal gland which inhibits cell multiplication in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1976;437:577-588.
21. **Binkley S, MacBride SE, Klein DC, Ralph CL.** Pineal enzymes: regulation of avian melatonin synthesis. *Science* 1973;181:273-275.
22. **Blask DE, Hill SM.** Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm (suppl)* 1986;21:433-449.
23. **Blustein MP.** Calcium transport and buffering in neurons. *TINS* 1988;11:438-443.
24. **Bolton TB.** Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979;59:606-718.
25. **Bolton TB, Clark JD.** Effects of histamine, high potassium and carbachol on ^{42}K efflux from longitudinal muscle on guinea-pig intestine. *J Physiol* 1981;320:347-361.
26. **Bolton TB, Clark JD, Kitamura K, Lang RJ.** Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. *J Physiol* 1981;320:363-379.
27. **Bolton TB, Kitamura K.** Evidence that ionic channels associated with the muscarinic receptor of smooth muscle may admit calcium. *Br J Pharmacol* 1983;78:405-416.
28. **Brading AF, Sneddon P.** Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig taenia coli stimulation with carbachol. *Br J Pharmacol* 1980;70:229-240.
29. **Brooks DS, Cassone VM.** Daily and circadian regulation of 2- ^{125}I iodomelatonin binding in the chick brain. *Endocrinology* 1992;131:1297-1304.
30. **Bruderman I, Rahaminoff R.** Alterations in tracheobronchial smooth muscle activity following melatonin. *J Appl Physiol* 1967;23:938-943.
31. **Bubenick GA, Dhanvantari S.** Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *J Pineal Res* 1989;7:378-381.
32. **Calvo J, Boya J.** Ultrastructural study of the embryonic development of the pineal gland of the chicken (*Gallus gallus*). *Acta Anat* 1979;103:39-79.
33. **Calvo J, Boya J.** Evolution and nature of the dense bodies in chicken pinealocytes. *Acta Anat* 1979;103:212-225.
34. **Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira AM, Saavedra JM.** Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. *Endocrinology* 1994;135:373-378.
35. **Cardinal DP.** Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981;2:327-354.
36. **Cardinal DP, Freire F.** Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formation in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 1976;2:317-322.
37. **Cardinali DP, Hyyppä MT, Wurtman RJ.** Fate of intracisternally injected melatonin by the rat brain. *Neuroendocrinology* 1973;12:30-40.

38. **Cardinali DP, Larin F, Wurtman RJ.** Action spectra for effects of light on hydroxyindole-methyltransferases in rat pineal, retina, and harderian gland. *Endocrinology* 1971;91:887-886.
39. **Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ.** Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972;91:1213-1218.
40. **Cardinali DP, Nagle CA, Freire F, Rosner JM.** Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1975;18:72-85.
41. **Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM.** Uptake and effects of melatonin on the synthesis of proteins by the rat cerebral cortex. *Life Sci* 1973;13:823-833.
42. **Cardinali DP, Vacas MI.** Feedback control of pineal function by reproductive hormones -a neuroendocrine paradigm. *J Neural Transm (suppl)* 1978;13:175-201.
43. **Cardinali DP, Vacas MI.** Norepinephrine turnover in pineal gland and superior cervical ganglia. Changes after gonadotrophin administration to castrated rats. *J Neural Transm* 1979;45:273.
44. **Cardinali DP, Vacas MI, Boyer EE.** Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 1979;105:437-441.
45. **Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM.** Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by pertussis toxin sensitive G protein. *Endocrinology* 1989;125:2670-2676.
46. **Carnelro RCG, Cipolla-Neto J, Mankus RP.** Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:614-619.
47. **Carston ME.** Prostaglandin and oxytocin: their effects on uterine smooth muscle. *Prostaglandins* 1974;5:33-39.
48. **Castilla-Serna L, Cravioto J.** Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. México: Editorial Trillas, 1991, 442.
49. **Castilla Serna, L,** "Paquest" (paquete estadístico para PC), V 1.0, 1992.
50. **Catterall WA.** Structure and function of voltage sensitive ion channels. *Science* 1988;242:50-61.
51. **Cavallo A.** Plasma melatonin rhythm in normal puberty: interactions of age and puberal stages. *Neuroendocrinology* 1992;55:372-379.
52. **Chavez JL, Huerto-Delgado F, Anton-Tay F, Benitez-King G.** Unión de la melatonina-H3 a calmodulina integrada a liposomas por el método de ultrafiltración rápida. XIV Congreso Nacional de Farmacología, 24-27 de Noviembre de 1991, México, D.F., p. 28.
53. **Claustrat B, Grœun J, Garry Pfi, Rousset B, Sassolas G.** A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recording in six normal young men. *J Pineal Res* 1986;3:301-310.
54. **Claustrat B, LeBars D, Braun J, Thivella P, Mallo C, Arendt J, Chazot G.** Plasma and brain pharmacokinetic studies in humans after intravenous administration of cold or ¹¹C labelled melatonin. En: Reiter JRJ, Pang SF, eds. *Advances in pineal research.* New York: John Libbey Co LTD, 1989; 305-310.
55. **Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M.** Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 1978;274:894-895.

38. **Cardinali DP, Larin F, Wurtman RJ.** Action spectra for effects of light on hydroxyindole- methyltransferases in rat pineal, retina, and harderian gland. *Endocrinology* 1971;91:887-886.
39. **Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ.** Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972;91:1213-1218.
40. **Cardinali DP, Nagle CA, Freire F, Rosner JM.** Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1975;18:72-85.
41. **Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM.** Uptake and effects of melatonin on the synthesis of proteins by the rat cerebral cortex. *Life Sci* 1973;13:823-833.
42. **Cardinali DP, Vacas MI.** Feedback control of pineal function by reproductive hormones -a neuroendocrine paradigm. *J Neural Transm (suppl)* 1978;13:175-201.
43. **Cardinali DP, Vacas MI.** Norepinephrine turnover in pineal gland and superior cervical ganglia. Changes after gonadotrophin administration to castrated rats. *J Neural Transm* 1979;45:273.
44. **Cardinali DP, Vacas MI, Boyer EE.** Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 1979;105:437-441.
45. **Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM.** Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by pertussis toxin sensitive G protein. *Endocrinology* 1989;125:2670-2676.
46. **Carneiro RCG, Cipolla-Neto J, Mankus RP.** Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:614-619.
47. **Carsten ME.** Prostaglandin and oxytocin: their effects on uterine smooth muscle. *Prostaglandins* 1974;5:33-39.
48. **Castilla-Serna L, Cravioto J.** Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. México: Editorial Trillas, 1991, 442.
49. **Castilla Serna, L.** "Paquest" (paquete estadístico para PC), V 1.0, 1992.
50. **Catterall WA.** Structure and function of voltage sensitive ion channels. *Science* 1988;242:50-61.
51. **Cavallo A.** Plasma melatonin rhythm in normal puberty: interactions of ago and puberal stages. *Neuroendocrinology* 1992;55:372-379.
52. **Chavez JL, Huerto-Delgado F, Anton-Tay F, Benitez-King G.** Unión de la melatonina-H3 a calmodulina integrada a liposomas por el método de ultrafiltración rápida. XIV Congreso Nacional de Farmacología, 24-27 de Noviembre de 1991, México, D.F., p. 28.
53. **Claustrat B, Greun J, Garry Ph, Roussel B, Sassolas G.** A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recording in six normal young men. *J Pineal Res* 1986;3:301-310.
54. **Claustrat B, LeBars D, Braun J, Thivolle P, Mallo C, Arendt J, Chazot G.** Plasma and brain pharmacokinetic studies in humans after intravenous administration of cold or ¹¹C labelled melatonin. En: Roiter JRJ, Pang SF, eds. *Advances in pineal research.* New York: John Libbey Co LTD, 1989; 305-310.
55. **Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M.** Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 1978;274:894-895.

56. **Cole** WS, Garfield RE, Kirkaldy JS. Gap junction and direct intracellular communication between rat uterine smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1985;249(Cell Physiol 18):C20-31.
57. **Crankshaw** DJ. The sensitivity of the longitudinal and circular muscle layers of the rats myometrium to oxytocin in vitro during pregnancy. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:773-777.
58. **Dafny** N. Electrophysiological evidence of photic, acoustic and central input to the pineal body and hypothalamus. *Exp Neurol* 1977;55:449-457.
59. **Daniel** EE, Janis RA. Calcium regulation in the uterus. *J Pharmacol Ther Exp* 1975;1:695.
60. **Davis** RH, McGowan L, Uroskie TW. Inhibition of pitocin-induced contractility by melatonin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;138:1002-1004.
61. **Del Zar** MM, Martinuzzo M, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane-B2 production by melatonin. Evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:246-251.
62. **Descartes**. *Las pasiones del alma*. Argentina: M. Aguilar Editor, 1963, 195.
63. **Dubocovich** ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 1988;2:2765-2773.
64. **Dubocovich** ML. Presynaptic receptors in the visual system. *Ann N Y Acad Sci* 1990;604:82-95.
65. **Dubocovich** ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *TIPS* 1995;16:50-56.
66. **Dubocovich** ML, Takahashi JS. Use of 2-[125I]-iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1987;84:3916-3920.
67. **Duncan** MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 1989;125:1011-1018.
68. **Ebadi** M, Hexum TD, Pfeiffer RF, Gocitrapong P. Pineal and retinal peptides and their receptors. *Pineal Res Rev* 1989;7:1-156.
69. **Eloranta** E, Timisjarvi J, Nieminen M, Ojutkangas V, Leppaluoto J, Vakkuri O. Seasonal and daily patterns in melatonin secretion in female reindeer and their calves. *Endocrinology* 1992;130:1645-1652.
70. **Enrenkranz** JRI., Tamarkin L, Comito F, Johnsonbaugh RE, Bybee DE, Loriaux L, Cotler GB. Daily rhythms of plasma melatonin in normal and precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:307-310.
71. **Fariello** RG, Bubenik GA. Melatonin-induced changes in the sensory activation of acute epileptic foci. *Neurosci Lett* 1976;3:151-155.
72. **Fariello** RG, Bubenik GA, Brown CM, Grotz LJ. Epileptogenic action of intraventricularly injected antimelatonin antibody. *Neurology* 1977;27:567-570.
73. **Fellenber** AJ, Phillipon G, Soamark RF. Measurement of urinary production rates of melatonin as an index of human pineal function. *Endocr Res Commun* 1980;7:167.
74. **Figueroa** JP, Honneibier MBOM, Jenkins S, Nathanielsz PW. Alteration of 24-hours rhythms in myometrial activity in the chronically catheterized pregnant rhesus monkey after a 6-hours shift in the light dark cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:648-654.

75. Foley PB, Cairncross KD, Foldes A. Pineal indoles: significance and measurement. *Neurosci Biobehav Rev* 1986;10:273-293.
76. Franchi AM, Gimena MF, Cardinali DP, Vacas MI. Melatonin, 5-methoxytryptamine and some of their analogs as cyclo-oxygenase inhibitors in rat medial basal hypothalamus. *Brain Res* 1987;405:384-388.
77. Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 1982;215:1396-1398.
78. Harlow HJ, Weekley BL. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small large intestine. *J Pineal Res* 1986;3:277-284.
79. Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 1993;132:285-292.
80. Hertz-Eshel M, Rahamimoff R. Effect of melatonin on uterine contractility. *Life Sci* 1965;4:1367-1372.
81. Hinkle PM, Kinsella PA. Regulation of thyrotropin-releasing hormone binding by monovalent cations and guanyl nucleotides. *J Biol Chem* 1984;259:3445-3449.
82. Hirata F, Hayaishi D, Tokuyama T, Senoh S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 1974;249:1311-1313.
83. Hoffman RA, Reiter RJ. Pineal Gland: influence on gonads of melatonin and related indolamines. *Science* 1965;148:1609-1611.
84. Holmes SW, Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br Pharmacol* 1982;76:95-101.
85. Houghton DC, Walker DW, Young IR, McMillan IC. Melatonin and the light-dark cycle separately influence daily behavioral and hormonal rhythms in the pregnant ewe and sheep fetus. *Endocrinology* 1993;133:90-98.
86. Houghton DC, Young IR, McMillan IC. Evidence from hypothalamic control of the diurnal rhythms in prolactin and melatonin in the fetal sheep during late gestation. *Endocrinology* 1995;136:218-223.
87. Hurwitz L, Futspatrick DE, Debbas G, Landon EJ. Localization of calcium pump activity in smooth muscle. *Science* 1973;178:384-386.
88. Hurwitz L, Weissinger J. Effects of variations in extracellular acetylcholine and calcium ion concentration on the operational level of calcium channels in intestinal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214:581-588.
89. Huszar G, Roberts JM. Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:225-237.
90. Huszar G, Walsh MP. Biochemistry of the myometrium and cervix. In: R.M. Wynn & W.P. Jolie ed.; *Biology of the uterus*. 2nd ed., USA: Plenum medical Book Company, 1989; 355-402.
91. Kamm KE, Stull JT. Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol* 1989;61:299-313.
92. Kanaki H, Weiss GB. Calcium release in smooth muscle. *Life Sci* 1988;42:111-122.

93. **Kno LWL, Weiz J.** Release of gonadotrophin-releasing hormone (Gn-RH) from isolated, perfused medial-basal hypothalamus by melatonin. *Endocrinology* 1977;100:1723-1726.
94. **Kennaway DJ, Blake P, Webb HA.** A melatonin agonist and N-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenamine accelerate the reentrainment of the melatonin rhythm following a phase advance of the light-dark cycle. *Brain Res* 1989;495:349-354.
95. **Kiveliä A, Kauppila A, Leppäluoto J, Vakkuri O.** Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. *J Clin Endocrinol Metabol* 1989;69:1065-1068.
96. **Klein OC, Moore RY.** Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retina hypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979;174:245-262.
97. **Kopin JJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H.** The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961;236:3072-3075.
98. **Krall JF, Sweenen JL, Korenman SG.** Hormonal control of uterine contraction: characterization of cyclic amp-dependent membrane properties in the myometrium. *Biochem Biophys Acta* 1976;448:578-588.
99. **Krause DN, Dubocovich ML.** Melatonin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1991;31:549-568.
100. **Laitinen JT, Castrén E, Vakkuri O, Saavedra JM.** Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 1989;124:1585-1587.
101. **Laitinen JT, Flügge G, Saavedra JM.** Characterization of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 1979;105:437-441.
102. **Laitinen JT, Saavedra JM.** Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with actions and guanine nucleotides. *Endocrinology* 1990;126:2110-2115.
103. **Laitinen JT, Saavedra JM.** Differential sensitivity to cations of the melatonin receptors in the rat area postrema and suprachiasmatic nuclei. *J Neurochem* 1990;55:1450-1453.
104. **Laitinen JT, Viswanathan M, Vakkuri O, Saavedra JM.** Differential regulation of the rat melatonin receptors: selective ago-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* 1992;130:2139-2144.
105. **Lalane C, Mironneau C, Mironneau J, Savineau JP.** Contractions of rat uterine smooth muscle induced by acetylcholine and angiotensin II in Ca^{+2} -free medium. *Br J Pharmacol* 1984;81:317-326.
106. **Lane EA, Mess HB.** Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:1214-1216.
107. **Lang U, Aubert ML, Sizonenko PC.** Location of melatonin receptors. *Pediatr Res* 1981;15:80.
108. **Laudon M, Zisapel N.** Characterization of central melatonin. *FEBS Lett* 1986;197:9-12.
109. **Laughlin GA, Loucjs AB, Yen SSC.** Marked augmentation of nocturnal melatonin secretion in amenorrheic athletes, but not in cycling athletes: unaltered opioidergic or dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1321-1326.
110. **Launay JM, Lemaitre BJ, Husson HP, Creux C, Hartman L, DaPrada M.** Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci* 1982;31:1487-1494.

111. **Leach C, Thorburn G.** A comparison of the inhibitory effects of melatonin and indomethacin on platelet aggregation and thromboxane release. *Prostaglandins* 1980;20:51-56.
112. **Lieber D, Marc S, Harbon S.** Pharmacological evidence for distinct muscarinic receptor subtypes coupled to the inhibition of adenylate cyclase and to the increased generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;262:800-809.
113. **Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2587.
114. **Lerner AB, Case JD, Heinselman RV.** Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 1959;81:6084-6085.
115. **Lewy AJ, Sack RL, Miller LS, Hoban TM.** Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science* 1987;235:352-354.
116. **Lu KS, Lin H.** Cytocchemical studies on cytoplasmic granular elements in the hamster pineal gland. *Histochemistry* 1979;61:177-187.
117. **Maestroni GJM, Corti A, Pierpaoli W.** The pineal gland and the circadian, opiateergic, immunoregulatory role of melatonin. *Ann N Y Acad Science* 1987;496:67-77.
118. **Maestroni GJM, Corti A, Pierpaoli W.** Role of the pineal gland in immunity. III: Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiateergic mechanism. *Immunology* 1988;63:465-469.
119. **Mallo C, Zaidaw R, Galy G, Vermeulen E, Braun J, Chazot G, Claustrat B.** Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur J Clin Pharmacol* 1990;38:197-301.
120. **Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sondhein D, Paul SM, Skolnick P, Goodwin FK.** Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and brain metabolite, N-acetyl-5-methoxykynurenamine. *Life Sci* 1981;29:259-267.
121. **Marshall JM.** The physiology of the myometrium. In: *The uterus*. Norris HJ, Herting AT, Abell MR, ed. Baltimore, USA: The Williams & Wilkins Company, 1973; 89-109.
122. **Matsumoto T, Hess DL, Kaushal KM, Valenzuela GJ, Yellon SM, Ducsay CA.** Circadian myometrial and endocrine rhythms in the pregnant rhesus macaque: Effects of constant light and timed melatonin infusion. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1777-1784.
123. **Matsumoto K, Ichida MK.** Opposite effects of Bay K 8644 and nifedipine on the inhibitory effect of Ca^{+2} on rat myometrium. *Eur J Pharmacol* 1987;140:295-301.
124. **Maurizi CP.** The therapeutic potential for tryptophan and melatonin: possible roles in depression, sleep, Alzheimer's disease and abnormal aging. *Med Hypotheses* 1990;31:233-244.
125. **Maywood ES, Hastings MH.** Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 1995;136:144-153.
126. **Messenger EA, Warner AE.** The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. *Br J Pharmacol* 1977;61:607-614.
127. **Miller RJ.** Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987;235:46-52.

128. **Minneman KP, Wurtman RJ.** The pharmacology of the pineal gland. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1976;16:33-51.
129. **Mironneau C, Mironneau J, Savineau JP.** Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a Ca^{+2} -free solution. *Br J Pharmacol* 1984;82:735-743.
130. **Mitchell MD, Bibby JG, Sayers L, Anderson ABM, Turnbull AC.** Melatonin in the maternal and umbilical circulations during human parturition. *Br J Obstet Gynecol* 1979;86:29-31.
131. **Moore RY.** Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Res* 1973;49:403-409.
132. **Moore RY, Lenw NJ.** A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 1972;146:1-14.
133. **Morgan PT, Barrett P, Howell E, Helliwell R.** Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994;24:101-146.
134. **Morton DJ, Potgieter B.** Relationships between methoxyindoles and hydroxyindoles formed from 5-hydroxytryptamine in the pineal gland. *J Endocr* 1982;95:253-256.
135. **Nahorski SR.** Inositol polyphosphates and neural calcium homeostasis. *TINS* 1988;10:444-448.
136. **Naranjo-Rodríguez EB, Vega L, Reyes C, Perusquia M, Campos G, Ponce H.** Efecto de la melatonina sobre la contracción neurogénica de la porción prostática del conducto deferente de rata. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, 3-7 de Septiembre de 1989, Oaxtepec, Mor. México.
137. **Naranjo-Rodríguez EB, Prieto-Gómez B, Reyes Vázquez C.** Melatonin modifies the spontaneous multiunit activity recorded in several brain nuclei of freely behaving rats. *Brain Res Bull* 1991;27:595-601.
138. **Nathanson NM.** Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* 1987;10:195-236.
139. **Nir I, Hirschmann N.** The effect of thyroid hormones on rat pineal-indol-amine metabolism in vitro. *J Neural Transm* 1978;42:83
140. **Ohya Y, Sperelakis N.** Tocolitic agents act on calcium channels current in single smooth muscle cells of pregnant rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:580-585.
141. **Olivieri G, Daya S.** The effect of calcium on rat pineal N-acetyltransferase activity in pineal homogenates. *Med Sci Res* 1992;20:303-304.
142. **Oksche A.** Evolution of the pineal complex: correlation of structure and function. *Ophthalmic Res* 1984;16:88-95.
143. **Palomar MM, Hicks JJ.** Contracción uterina. Mecanismo, regulación y farmacología. *Ginecol Obst Mex* 1990;58:303-309.
144. **Pang ST.** Melatonin concentration in blood and pineal gland. *Pineal Res Rev* 1985;3:115-159.
145. **Pang SF, Brown GM, Grotta LJ, Chambers JW, Rodman RL.** Determination of N-acetylserotonin and melatonin activities in the pineal gland, retina, harderian gland, brain and serum of rats and chickens. *Neuroendocrinology* 1977;23:1-13.
146. **Partiff AG, Klein DC.** Sympathetic nerve endings protect against acute stress-induced increase in N-acetyltransferase (E.C.2.3.1.5) activity. *Endocrinology* 1976;99:480-854.

147. **Parkington** HCM, **Coleman** HA. Ionic mechanism underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988;15:657-665.
148. **Pearse** AGE, **Takor** TT. Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. *Fed Proc* 1979;38:2288-2299.
149. **Quastel** MR, **Rahamimoff** R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenal. *Brits J Pharmacol* 1965;24:455-461.
150. **Quay** WB. The pineal gland. En: **Weiss** L, editor. *Cell and tissue biology*. Germany: Urban & Schwzenberg Inc, 1988, 996-1007.
151. **Raikhlin** NT, **Kvetnoy** IM, **Tolkachev** VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975;255:344-345.
152. **Rasmussen** H, **Barret** PQ. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev* 1984;64:938-984.
153. **Rasmussen** H, **Waisman** DM. Modulation of cell function in the calcium messenger system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1983;95:111-148.
154. **Reiss** M, **Davis** RH, **Sideman** MB, **Plichta** ES. Pineal gland and spontaneous activity of rats. *J Endocrinol* 1963;28:127-128.
155. **Reiter** RJ. Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol* 1973;35:305-328.
156. **Reiter** RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Moll Cell Endocrinol* 1991;79:C153-C158.
157. **Reiter** RJ. Remembrance: growing up with the pineal gland: early recollections. *Endocrinology* 1992;131:2039-2041.
158. **Reiter** RJ, **Poeggeler** B, **Tan** DX, **Chen** LD, **Manchester** LC, **Guerrero** J. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993;15:103-116.
159. **Reiter** RJ, **Tan** DX, **Poeggeler** B, **Menéndez-Peláez** A, **Chen** LD, **Saarela** S. Melatonin as free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann New York Acad Sci* 1994;719:1-12.
160. **Reppart** SM, **Klein** DC. Mammalian pineal gland: basic and clinical aspects. En: *The endocrine functions on the brain*. **Mota** M, ed. Raven pres, new York, USA, 1980: 327-371.
161. **Reyes-Vázquez** C. Interaction of norepinephrine and sympatetic cervical ganglion input in the rat pineal body. *Exp Neurol* 1988;90:223-231.
162. **Reyes-Vázquez** C, **Prieto-Gómez** B. The rat pineal exhibits two electrophysiological patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. *J Pineal R* 1986;3:213-222.
163. **Rillo** AG, **Reyes-Vázquez** C, **Bermúdez-López** C, **Castilla-Serna** L. La contracción uterina inducida por carbacol es inhibida por melatonina. *Ginecol Obstet Mex* 1993;61:40-44.
164. **Rillo** AG, **Hardy-Pérez** A, **Vega-Mondragón** L. Aplicación de la teoría de receptores al efecto inhibitor de melatonina en tejido uterino de rata. *Ciencia Ergo Sum* 1995;2:61-68.
165. **Rodín** AE. Growth and spread of walker 256 carcinoma in pinealectomized rats. *Cancer Research* 1963;23:1545-1548.

166. Rogawski MA, Roth RH, Aghajanian GK. Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase. *J Neurochem* 1979;32:1219-1222.
167. Rollag MD, Morgan RJ, Niswender GD. Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinology* 1978;102:1-8.
168. Rönnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Markainen H, Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:493-496.
169. Roshental NE. Editorial: plasma melatonin as a measure of the human clock. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:225-226.
170. Rublin RP. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol Rev* 1970;22:389-428.
171. Rubio A, Guerrero JM, Reiter JR, Osuna C. Involvement of α and β -adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-Acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* 1993;132:393-398.
172. Sandyk R. The pineal gland and the clinical course of multiple sclerosis. *Intern J Neuroscience* 1992;62:65-74.
173. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tjagas N. Is the pineal gland involved in the pathogenesis of endometrial carcinoma. *Intern J Neuroscience* 1992;62:89-96.
174. Sandyk R. Postpartum psychosis and the pineal gland. *Intern J Neuroscience* 1992;62:101-105.
175. Sandyk R, Kay SR. Abnormal EEG and calcification of the pineal gland in schizophrenia. *Intern J Neuroscience* 1992;62:107-111.
176. Seltzer A, Viswanathan M, Saavedra JM. Melatonin-binding sites in brain and caudal arteries of the female rat during the estrous cycle and after estrogen administration. *Endocrinology* 1992;130:1896-1902.
177. Shanahan TL, Czeisler CA. Light exposure induces equivalent phase shifts of the endogenous circadian rhythms of circulating plasma melatonin and core body temperature in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:227-235.
178. Shaw D, Goldman BD. Influence of prenatal photoperiods on postnatal reproductive responses to daily infusions of melatonin in the siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 1996;136:4231-4236.
179. Shaw D, Goldman BD. Gender differences in influence of prenatal photoperiods on postnatal pineal melatonin rhythms and serum prolactin and follicle-stimulating hormone in the siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 1995;136:4237-4246.
180. Silman RE, Leono RM, Hooper RJL, Preece MA. Melatonin, the pineal gland and human puberty. *Nature* 1979;282:301-303.
181. Skore DJ, Masson-Pévet M, Pévet P. Seasonal changes in melatonin binding sites in the pars tuberalis of male european hamsters and the effect of testosterone manipulation. *Endocrinology* 1992;132:1682-1686.
182. Smith BJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *TINS* 1988;11:458-464.
183. Smulders AP, Wright EM. Role of choroid plexus in transport of melatonin between blood and brain. *Brain Res* 1980;191:555-558.

184. **Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ.** Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation?. *Science* 1979;204:1313-1315.
185. **Stankov B, Biella G, Panara C, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, Cozzi B, Fraschini F.** Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology* 1992;130:2152-2159.
186. **Stankov B, Fraschini F, Reiter RJ.** Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev* 1991;16:245-256.
187. **Stankov B, Reiter RJ.** Melatonin receptors: current status, facts and hypotheses. *Life Sci* 1990;40:971-982.
188. **Sugden D.** Aggregation of pigment granules in single cultured *Xenopus laevis* melanophores by melatonin analogues. *Br J Pharmacol* 1991;104:922-927.
189. **Sugden D.** Melatonin: binding site characteristics and biochemical and cellular responses. *Neurochem Int* 1994;24:147-157.
190. **Sugden AL, Sugden D, Klein DC.** Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J Biol Chem* 1986;261:11608-11612.
191. **Sugden D.** Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;227:587-591.
192. **Tallarida RJ, Jacob LS.** *The dose-response relation in pharmacology.* USA: Springer-Verlag ed., 1979, 207.
193. **Tamarkin L, Baird CJ, Almeida DFX.** Melatonin a coordinating signal for mammalian reproduction. *Science* 1985;227:714-720.
194. **Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, et. al.** Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 1982;216:1003-1005.
195. **Tareilus E, Breer H.** Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neurochem Int* 1995;26:539-558.
196. **Thompson C, Stinson D, Smith A.** Seasonal affective disorder and season-dependent abnormalities of melatonin suppression by light. *Lancet* 1990;336:703-706.
197. **Toro L, Stefani E, Erukar S.** Hormonal regulation of potassium currents in single myometrial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2892-2895.
198. **Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP.** Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS* 1988;11:431-437.
199. **Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Cardinali DP.** Melatonin increases cGMP and decreases cAMP levels in rat medial basal hypothalamus in vitro. *Brain Res* 1981;225:207-211.
200. **Vacas MI, Koller Sarmiento MI, Cardinali DP.** Pineal methoxyindoles depress calcium uptake by rat brain synaptosomes. *Brain Res* 1984;194:166-168.
201. **Valenti S, Guido R, Giusti M, Giordano G.** In vitro acute and prolonged effects of melatonin on purified rat Leydig cell steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate production. *Endocrinology* 1995;136:5357-5362.

202. **Vanacek J, Klein DC.** Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca^{2+} in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992a;130:701-707.
203. **Vanacek J, Klein DC.** Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992b;131:939-946.
204. **Vanacek J, Klein DC.** Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca^{2+} in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992;130:701-707.
205. **Vanacek J, Klein DC.** Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992;131:939-946.
206. **Vanacek J, Klein DC.** A subpopulation of neonatal gonadotropin-releasing hormone-sensitive pituitary cells is responsive to melatonin. *Endocrinology* 1993;133:360-367.
207. **Vanacek J, Pavlik A, Illnerova H.** Hypothalamic melatonin receptors sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 1987;435:359-362.
208. **Vaughan GM, Allen JP, Tullis W, Siler-Khodr TM, De la Poña A, Sackman JW.** Overnight plasma profiles of melatonin and certain adenohypophysal hormones in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:566-571.
209. **Velázquez E, Esquifino AI, Zúeco JA, Ruiz Albusac JM, Blázquez E.** Evidence that circadian variations of circulating melatonin levels in fetal and suckling rats are dependent on maternal melatonin transfer. *Neuroendocrinology* 1992;55:321-326.
210. **Vesley DL.** Melatonin enhances guanylate cyclase activity in a variety of tissue. *Mol Cell Biochem* 1980;35:55-58.
211. **Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM.** Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6200-6203.
212. **Waldhauser F, Boepple PA, Schemper MJ, Mansfield MJ, Crowley WF.** Serum melatonin in central precocious puberty is lower than in age-matched prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:793-796.
213. **Waldhauser F, Frisch H, Waldhauser M, Weiszenbacher G, Zeitlhuber U, Wurtman R.** Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. *Lancet* 1984;8372:362-365.
214. **Walsh DA, Van Patten SM.** Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J* 1994;8:1227-1236.
215. **Weaver DR, Carlson LL, Reppert ST.** Melatonin receptors and signal transduction in melatonin-insensitive population of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Brain Res* 1990;506:353-357.
216. **Wehr TA.** The duration of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1276-1280.
217. **Weissbech H, Redfield BG, Axelrod J.** Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochem Biophys Acta* 1960;43:352-353.
218. **Weissbech H, Redfield BG, Axelrod J.** The enzymatic acetylation of serotonin and other naturally occurring amines. *Biochem Biophys Acta* 1961;54:190-192.

219. **White** BH, Klein DC. Developmental appearance of pineal adrenergic -> guanosine 3',5'-monophosphate response is determined by a process down-stream from elevation of intracellular Ca^{2+} ; possible involvement of a diffusible factor. *Endocrinology* 1993;132:1026-1034.
220. **Wright** MR, lerner AB. On the movement of pigment granules in frog melanocytes. *Endocrinology* 1960;66:699-609.
221. **Wurtman** RJ, Axelrod J. The pineal gland. *Sci Am* 1965;213:50-60.
222. **Wurtman** RJ, Axelrod J, Potter LT. The uptake of 3H-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 1974;143:314-318.
223. **Yasin** SA, Costa A, Bessar GM, Hucks D, Grossman A, Forsling ML. Melatonin and its analogs inhibit the basal and stimulated release of hypothalamic vasopressin and oxytocin *in vitro*. *Endocrinology* 1993;132:1329-1336.
224. **Young** RC, Leone RM, Francis P, Stovell P, Silman RE. Melatonin is metabolized to N-acetylserotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:114-119.
225. **Young** RC, Smith LH, Anderson NC. Passive membrane properties and inward calcium current of human uterine smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1132-1139.
226. **Zatz** M, Mullen DA. Does calcium influx regulate melatonin production through the circadian pacemaker in chick pineal cells?. Effects of nitrendipine, Bay K 8644, Co^{2+} , Mn^{2+} , and low external Ca^{2+} . *Brain Res* 1988;463:305-316.
227. **Zatz** M, Romero JA. Effects of calcium-free medium on the induction of serotonin N-acetyltransferase in the rat pineal. *Biochem Pharmacol* 1978;27:2549-2553.
228. **Zisapel** N. Melatonin receptors revisited. *J Neural Transm* 1988;73:1-5.
229. **Zisapel** N, Egozi Y, Laudon M. Inhibition of dopamine release by melatonin. Regional distribution in the rat brain. *Brain Res* 1982;246:161-163.
230. **Zisapel** N, Laudon M. Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus *in vitro*: inhibition by melatonin. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;104:1610-1616.
231. **Zisapel** N, Laudon M. Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res* 1983;272:378-381.