



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“EFECTO DE MELATONINA, AGOMELATONINA Y  
GABA EN PREPARACIONES DE DUODENO AISLADO  
DE RATA”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**AREA: FARMACOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**MED. CIR. MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ VILLEGAS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. EN. C. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**CONTENIDO**

	<b>Página</b>
RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1. Generalidades .....	9
1.2. Melatonina .....	15
1.2.1. Biosíntesis .....	15
1.2.2. Efectos Fisiológicos .....	17
1.3. Agomelatonina .....	21
1.4. Acido Gamma-aminobutírico (GABA) .....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
3. OBJETIVOS .....	28
4. HIPÓTESIS .....	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
6. RESULTADOS.	
6.1. Efecto de la Melatonina sobre la actividad del músculo liso duodenal ..	40
6.2. Efecto de la Agomelatonina sobre la actividad duodenal .....	46
6.3. Efecto de GABA sobre la actividad del músculo liso duodenal .....	52
6.4. Efecto de la interacción entre MEL y GABA .....	56
6.5. Efecto de la interacción entre MEL y FLU .....	60
7. DISCUSIÓN .....	65
8. CONCLUSIONES .....	69
9. REFERENCIAS .....	70
10. ANEXOS .....	82

---

**RESUMEN**

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MEL) es secretada por la glándula pineal (GP) durante la fase de oscuridad del ciclo día-noche. La MEL ejerce una influencia reguladora sobre una variedad de procesos fisiológicos que incluyen a los ritmos biológicos y a las funciones neuroendocrinas. Aunque, se han identificado sitios de unión a MEL en el Sistema Nervioso Central su caracterización fuera de él, no se ha realizado del todo, a pesar de la amplia gama de acciones de la MEL en diversos tejidos. Por ejemplo, la aplicación de MEL “*In Vitro*” reduce la amplitud y la frecuencia de la contracción espontánea de tejidos aislados de estómago, duodeno, íleo, colon, aorta y útero, a través de un efecto inhibitorio sobre ellos. Por otro lado, aunque, se han descrito muchos efectos fisiológicos y farmacológicos de la MEL sobre el músculo liso, su mecanismo de acción no está totalmente definido, así como tampoco se han descrito los efectos de algunos análogos (agonistas) de MEL, por lo que el objetivo del presente trabajo, es analizar el efecto de la MEL, de Agomelatonina (AGOMEL), un bioisómero sintético análogo de MEL y de Ácido Gamaamino-butírico (GABA) sobre la contracción espontánea de músculo liso duodenal de la rata. Para alcanzar este objetivo, los experimentos se realizaron en porciones de duodeno de rata de la cepa Wistar (180-230 g), que fueron colocados en un sistema convencional para registro de tejido aislado, con solución de Ringer-Krebs-Henseleit (PH = 7.4, y a 37 °C). Se administraron concentraciones farmacológicas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de cada una de las sustancias, y se estudió el efecto sobre la contracción espontánea de duodeno. La aplicación de estas concentraciones de MEL, inhibieron la amplitud de contracción de la actividad espontánea del tejido duodenal, en un rango de magnitud que va de 10 al 50% de la contracción duodenal espontánea. Relacionando estos datos a través de una curva logaritmo de la concentración Vs porcentaje de inhibición, se observa una relación lineal, que permitió calcular la concentración de MEL que inhibe el 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) de la actividad muscular espontánea del tejido duodenal, con un valor de 0.005623  $\mu\text{M}$ . La AGOMEL administrada a las mismas concentraciones que MEL, produjo inhibición de la contracción espontánea de forma gradual, obteniendo una  $\text{CI}_{50}$  = 0.004216  $\mu\text{M}$ . Es decir la MEL y su análogo sintético AGOMEL, se comportan en forma similar, mostrando mayor potencia que MEL. El GABA, produce un efecto bifásico (relajación-contracción), en menor grado que MEL y AGOMEL. La interacción con MEL-GABA, produjo una relajación del tejido con aumento significativo en la frecuencia, siendo su amplitud menor que con MEL y GABA solos. Todas estas sustancias producen relajación muscular en mayor o menor grado comparadas con MEL, del tejido duodenal.

**ABSTRACT**

Melatonin (N-acetyl-5-metoxitriptamine) (MEL) is the hormone that is secreted by the pineal gland during the phase of darkness (cycle day-night). MEL exercises a regulating influence on a variety of physiological processes that includes biological rhythms and neuroendocrine functions. Although, MEL receptors has been identified in some places in the Central Nervous System, its characterization out of it, has not been carried out, and in spite of the extensive range of actions of MEL in diverse periphery tissues. For example, the application of MEL *"In Vitro"* reduces the tone and the frequency of the spontaneous contraction of isolated tissues of the stomach, duodenum, ileus, colon, aorta, and uterus; and this is possible through an inhibiting effect on them. On the other hand, many pharmacological and physiological effects of MEL, on smooth muscle have been described, but its mechanism of action has not been all ready described, as well as neither the effects of some analogous (agonists) of it. Therefore, the objective of this work is to analyze the effects of MEL, AGOMEL and GABA about the spontaneous contraction on smooth muscle of rat (duodenum). Leg to reach this objective, the experiments were carried out in male rat duodenum portions of the stump Wistar (180-230g), those portions were placed in a conventional system for the registration of isolated tissue, with solution of Ringer-Krebs-Henseleit (PH=7.4 and to 37° C). Concentrations of 1,2,4,8,16 and 32  $\mu\text{M}$  of each one of the substances were administered to the portions of the duodenum in order to study the effect on the spontaneous contraction of it. The application of these concentrations of MEL caused on the spontaneous activity of the duodenal tissue, an inhibition in the amplitude of the contraction, in a rank of magnitude that goes from 10 to 50% of the spontaneous duodenal contraction, and relating these data through a curve logarithm of the concentration Vs percentage of inhibition. It was observed a lineal relation between MEL and the other substances that permitted to calculate the amount of it that inhibits the 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) of the spontaneous muscular activity of the duodenal tissue, with a value of .005623  $\mu\text{M}$ . AGOMEL administered to the same concentrations, produced inhibition of the spontaneous contraction in a gradual form, obtaining a  $\text{CI}_{50} = .004216$   $\mu\text{M}$ . That is to say, MEL and its synthesized analogous AGOMEL, behaved in similar way, showing that AGOMEL had a greater power than MEL. GABA produces a two-phase effect (relaxation-contraction), to a lesser extent that MEL and AGOMEL. MEL-GABA interaction produced a relaxation of the tissue with significant increment in the frequency, being its amplitude smaller than MEL and GABA alone. All these substances produce muscular relaxation of the duodenal tissue in greater or smaller degree compared to MEL.

## 1. INTRODUCCION

El estudio de la glándula pineal (GP) ha pasado de una etapa de escepticismo y perplejidad a otra en la que ésta glándula es objeto de múltiples estudios científicos, y por lo tanto surge un verdadero interés en descifrar su actividad fisiológica. La descripción anatómica de la GP precedió a la de casi todos los órganos endocrinos; así en el siglo III a.C, el griego Herophilus (325-280) la consideró como la válvula reguladora del flujo de “espíritus” del tercer al cuarto ventrículo. Esta idea persistió hasta el siglo XIX, en que Magendie, aunque también, consideró a la GP como una válvula, estimó que su función residía en regular el flujo del líquido cefalorraquídeo. Entretanto, Galeno, en el siglo II, al describir la anatomía de la GP en detalle, la denominó Konarium (piña, en griego) (157); este autor sugirió que además de su acción sobre el flujo de memoria, la GP daba sostén a la masa de venas cerebrales que recorren la cara posterior y dorsal del diencéfalo; tal idea fue apoyada también por Vesalio algunos siglos mas tarde (1).

Algunas de las concepciones más difundidas sobre la glándula pineal se originaron en la india y fueron popularizadas en el occidente por científicos como Descartes (1596-1650) (39, 40). Este autor en su teoría de los arcos reflejos, consideró a la pineal como parte del sistema que transporta a los espíritus de los animales desde la sangre hacia los ventrículos cerebrales. De esta premisa surgió la idea de que el alma se ubicaba en la GP (Figura No. 1) (39, 40).

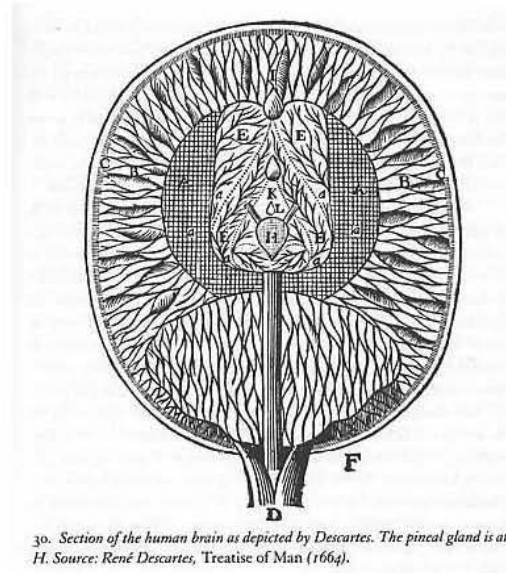


Figura No. 1. Esquema representativo de la Glándula Pineal, realizada por René Descartes 1649 (39).

Aunque probablemente, Herophilus, fue el primero en considerar a la epífisis como el “*asiento del alma*”, esta nomenclatura terminó siendo famosa cuando el filósofo Francés Descartes (Figura No. 2) utilizó este término en sus textos acerca de la pineal y sugirió (39, 40) que la GP controlaba el paso los “*espíritus animales*” en el sistema nervioso y locomotor, por este motivo esta glándula jugaba un papel importante en el movimiento del cuerpo.



Figura No. 2. René Descartes (39,40)

A finales del siglo XIX, se dio a conocer el papel fotosensor de la GP de vertebrados inferiores y su relación con la GP secretora de los mamíferos (5). Simultáneamente, Heubner (1898) y Merburg (1907) [citados por Reiter, 1980 (121)] descubrieron que la GP tenía una relación con el sistema reproductor, basados en sus observaciones de tumores pineales. Por otro lado, el científico Alemán Kappers (68) realizó estudios acerca de la inervación de la glándula por el sistema nervioso simpático en el ganglio simpático cervical superior (GSCs) lo que dio inicio a una amplia investigación. Sin duda alguna los más importantes descubrimientos con respecto a la pineal fueron la identificación y caracterización de la hormona melatonina (MEL) por Lerner y cols., 1958 (85). De miles de GP de bovinos (40,000), estos autores aislaron el componente que era responsable de la aclaración de la piel en los anfibios, por lo que este compuesto fue identificado químicamente como N-acetil-5-metoxitriptamina y denominado “melatonina” (86) basado en su habilidad para contraer (τονοσ = contractor) gránulos de melanina en los melanóforos de estos anfibios (85).

Desde ese momento en adelante, aumentó el interés científico en los estudios de la GP y su principal producto, hasta llegar a la importancia que tienen hoy en día, como es el estudio de los efectos que produce en diferentes tejidos.

Hay evidencia de que los sitios de unión para la MEL no están confinados al cerebro (81) y están también presentes en numerosos órganos y tejidos periféricos, retina (42, 43), bazo (112), vasos sanguíneos (81, 111), conducto deferente (28, 104), riñones y testículos (94, 95). El tracto digestivo de mamíferos y vertebrados representa otra área extrapineal importante para la MEL (15, 64), donde es probablemente sintetizada en las células enterocromafines (118) y han sido identificados sitios de unión a MEL (64), esto sugiere



que la MEL interactúa, tanto en el cerebro como en la periferia con sitios específicos (44, 56). Por lo que el presente estudio pretende examinar si la MEL y análogos como la AGOmelatonina, interactúan en algunos sitios del duodeno de rata afectando sus propiedades contráctiles.

## 1.1. GENERALIDADES

La Glándula Pineal (GP) se encuentra presente en casi todos los vertebrados, a excepción del armadillo y del cocodrilo, constituye una prolongación diencefálica de forma conoidea. La epífisis cerebri (cuerpo pineal) es una glándula impar que representa una pequeña formación triangular–ovalada, ligeramente aplanada en dirección antero-posterior. El ápice de la glándula está dirigida hacia atrás; la base, hacia delante. Esta glándula se sitúa debajo del engrosamiento del cuerpo caloso, en los colículos superiores de la lámina del techo del mesencéfalo, sin cubrirlos, sino llenando con su mayor parte el surco longitudinal entre los mismos. La epífisis está cubierta por la duplicidad de la piamadre encefálica (al separar la piamadre se elimina con ella también la glándula) (122).

En la rata, la GP es una estructura hipotalámica de forma esferoidal, con diámetro no mayor a 2 mm y un peso de hasta 1 mg. La GP reside en la parte más posterior del cerebro y en la línea media, por debajo de la confluencia del seno venoso sagital con los senos venosos laterales, descansando sobre los colículos superiores y oponiéndose a la tienda del cerebelo. En el hombre la GP ocupa la depresión localizada entre los colículos superiores y el mesencéfalo y su peso oscila entre los 50 y 150 mg. (Figura No. 3) (122).

En equinos, elefantes y el hombre, la GP tiende a calcificarse formando depósitos calcáreos, con una base orgánica sobre la que se fijan compuestos inorgánicos del tipo de los carbonatos y fosfatos de calcio y de magnesio (148).

La dimensión longitudinal de la glándula en los adultos humanos alcanza de 1 a 1.2 cm; la transversal, de 5 a 8 mm; el espesor es de 4 a 5 mm; el peso llega hasta 0.25 g. En los niños estas dimensiones son menores. El color grisáceo – rosado común de la glándula puede cambiar en dependencia del grado de llenado de sus vasos sanguíneos. La superficie es un poco áspera y la consistencia es algo densa. (25).

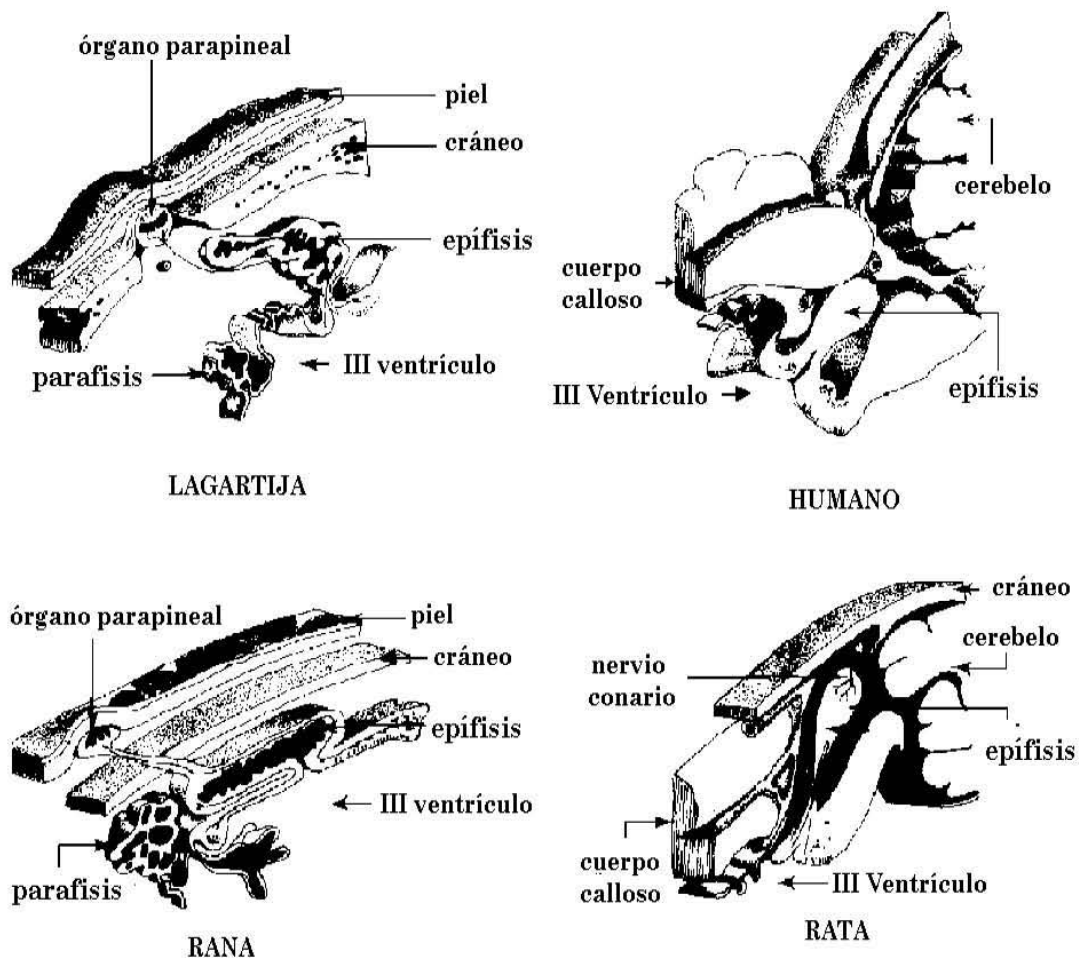


Figura No. 3. Se muestra la relación que guarda la GP con otras estructuras en diferentes especies de animales, tanto inferiores como superiores (122).

Por los lados de su base, la epíffisis del cerebro mediante las *habénulas* (*habenulae*), se continúa con las estrías medulares del tálamo (*striae medullares thalami*) y está unida con el tálamo. En la extremidad de la habénula hay una parte ensanchada denominada *trígono* de la *habénula* (*trigonum habenula*), está unida con el tálamo. En la extremidad de la habénula (*trigonum habenulae*), en cuyo espesor se aloja el núcleo de la habénula (*nucleus habenulae*). Las habénulas derecha e izquierda se unen entre sí mediante la comisura habenular (*comisura habenular*), por delante de la cual y lateralmente a la porción posterosuperior de la cavidad del III ventrículo se sitúa el receso pineal (*recessus pinealis*), que es un remanente de la cavidad de la glándula que existe durante el periodo de desarrollo embrionario (120).

El receso suprapineal (*recessus suprapinealis*) representa una dilatación ciega cuyas partes están formadas, arriba, por el plexo coroideo; y abajo, por la cara superior de la glándula (122).

La epífisis se desarrolla del diencéfalo, en el epítalamo, en forma de una pequeña dilatación a la cual, más adelante se adhieren vasos y en su interior se organiza un sistema de “tubitos” rodeados por elementos del mesénquima. A los 7 años de la vida termina la diferenciación de la epífisis. El parénquima de la glándula está constituida por lóbulos, separados por un estrato fino de trabéculas que penetran en el espesor del órgano desde la túnica conjuntiva que cubre la glándula. Los lóbulos de la glándula están rodeados por tejido gliar, ricamente vascularizado. Con la edad, particularmente en el adulto, la cantidad de células disminuye, aumenta el tejido conjuntivo, y en forma de granillos amarillos se acumula abundante cantidad de sales de calcio, constituyendo la así llamada acérvula cerebral (arena cerebral) (148).

La GP de los mamíferos carece de elementos fotosensibles por lo que la información fótica le llega a través de un sistema cerebral (34, 35) y de una vía neuronal específica (Figura No. 4) la cual se origina en la retina, en su capa ganglionar, de donde surge un conjunto de fibras amielínicas que forman las conexiones en el tracto retinohipotalámico (58, 66, 97). Este tracto se dirige inicialmente hacia el núcleo supraquiasmático, tanto ipsi como contralateral; y posteriormente al hipotálamo lateral donde se agrega al haz prosencefálico medial (66, 97).

Después de atravesar la formación reticular, alcanza las astas laterales de los segmentos espinales torácicos de la médula, sitio de origen de las fibras preganglionares simpáticas, las cuales se dirigen hacia el GSCs. Algunas de las fibras de este ganglio, constituyen los nervios conarii cuyos axones terminan dentro de la GP (68, 71, 99). Estas

fibras son de origen simpático y utilizan noradrenalina (NA) como neurotransmisor. En algunas especies se han identificado fibras parasimpáticas (68,128).

Los mamíferos, poseen una GP única y parenquimatosa, la cual se deriva ontogénicamente del techo de la porción posterior del diencefalo y se sitúa en un lugar profundo del cerebro como parte del epitálamo (122).

En los vertebrados inferiores la GP está constituida por varias estructuras que en su conjunto forman los sistemas pineales; por ejemplo, en los reptiles se encuentra su estructura en el órgano parapineal el cual es una estructura altamente diferenciada que forma un pequeño órgano semejante a un ojo, con cristalino y retina, localizado por debajo de un adelgazamiento óseo del cráneo que recibe el nombre de “tercer ojo” (41). Este órgano parapineal es sensible a la luz, pero no está implicado en la visión discriminativa (98).

En la pineal, de todos los animales incluyendo al hombre se encuentran células similares a los receptores de la retina (98, 113) con polos receptores y polos emisores. Sin embargo, éstas células son funcionales solo en los reptiles y animales inferiores. Aunque los pinealocitos de los mamíferos no responden en forma directa a la luz; estos reciben información luminosa a través de un circuito neuronal, que implica a la retina, hipotálamo y el simpático cervical (66, 113) (Figura No. 4). De tal manera que la información luminosa regula la actividad de la GP en todas las especies animales hasta ahora estudiadas. Debido a esta relación esta glándula se considera un órgano transductor neuroquímico (8), la cual ejerce un papel esencial en la sincronización fotoperiódica de los ritmos biológicos (3, 18, 23, 76).

Quizá la característica fundamental en las funciones de la GP, sea su variabilidad funcional, es decir, sus acciones dependen de la especie animal, de la época del año y de la hora de día. Por ejemplo, en los vertebrados inferiores actúa sobre la respuesta cromática

dermica a los cambios de la luz ambiental; en los roedores, interviene en la regulación de la función gonadal (83, 145, 146), mientras que en animales superiores, incluyendo al hombre, la GP está vinculada con procesos de conducta (50, 55, 103), consecuencia de algunos cambios en la actividad eléctrica del sistema nervioso central (SNC) que son provocados por hormonas. Así en los mamíferos, la melatonina produce efectos anticonvulsivos (34,35) hipnagógicos (2, 12, 101, 138, 147, 155), sedantes (6, 54), ansiolíticos (55, 103); además de que también, modulan la producción y liberación de varias hormonas (13, 73).

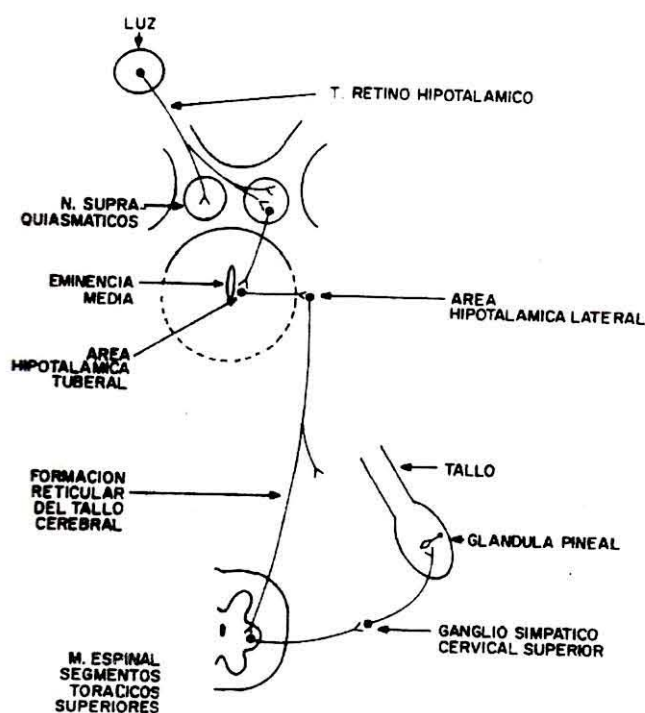


Figura No. 4. La información fótica es recibida por la GP a través de la vía neuronal que se representa en este esquema elaborado con la información de Jacobs y Morgane (1984) (66, 113)

La relación existente entre el fotoperiodo y la GP constituye una ventaja evolutiva que permite a los individuos adaptarse en una forma más eficiente a su entorno ambiental. Entonces, no es de extrañarse que las especies con pineales voluminosas y complejas, sean aquellas que habitan las zonas templadas y polares; donde las condiciones ambientales son

muy variables y extremosas, mientras que las especies con pineales pequeñas y de organización simplificada, habitan en regiones circutropicales. Además, en los animales polares la GP participa en la termorregulación, en la entrada y salida del estado letárgico del sueño y también en hibernación (11, 50, 79, 93).

Quizá la función más estudiada de la GP sea su participación en la reproducción, sobre todo de tipo estacional, la cual está subordinada a la duración diaria de la iluminación. Los mejores estudios sistemáticos sobre este tema han sido efectuados en hámster y carnero (3, 88). En estos animales la pinealectomía conduce a una desincronización de la actividad reproductora en relación al ciclo anual del entorno. Como resultado de ello, la sobrevivencia de las crías se compromete, puesto que las crías nacen en una época del año desfavorable para su supervivencia. La administración de MEL en estos animales restaura el ciclo estacional de la reproducción (46, 61, 67, 141). En términos generales, es posible que las variaciones diarias y estacionales de la secreción de melatonina en todas las especies, constituya un mensaje que sincroniza las funciones propias de la estación, incluyendo la sexual. Los efectos sobre la reproducción ejercidos por la MEL parecen ser consecuencia de una reducción en la secreción de las hormonas hipofisiarias (gonadotrofinas) implicadas en el control de la reproducción (61).

Desde el punto de vista económico, los conocimientos adquiridos de la GP y en particular de la MEL en los mamíferos han permitido proyectar importantes aplicaciones. En días largos, la administración vespertina de MEL, tiene un efecto estimulante sobre la iniciación de la actividad sexual de la oveja; lo que incrementa la disponibilidad de carne de cordero, la producción de leche e incluso el alargamiento del tiempo de crecimiento antes del sacrificio (46).

Debido a estas acciones relacionadas con la iluminación ambiental: la pineal ha sido considerada como un transductor capaz de convertir los estímulos neurales provenientes de

la retina en una respuesta endócrina, productora de hormonas (49). Entre estas se considera que la MEL es el principal producto de secreción de la GP.

## 1.2. MELATONINA.

### 1.2.1. BIOSÍNTESIS.

El primer paso para la biosíntesis de la melatonina es la obtención del triptófano que se encuentra en la circulación. Esto ocurre en contra del gradiente de concentración que implica un transporte mecánico activo. El triptófano, en convertido entonces en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa mitocondrial, esta enzima se encuentra en grandes concentraciones limitando la reacción del triptófano en esta reacción. La actividad de la triptófano hidroxilasa aumenta con la oscuridad alrededor de dos veces más. Posteriormente, la enzima citoplásmica aminoácido descaboxilasa cataliza la descaboxilación del 5-hidroxitriptófano en serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT). La concentración de serotonina en la GP es muy alta, mostrando niveles un poco más bajos durante la oscuridad. Esta caída en los niveles de serotonina durante la noche se debe a su metilación en N-acetilserotonina, también, sucede la metilación del ácido 5-hidroxiindol y asimismo la metilación en 5-metoxitriptófano. El siguiente paso es crucial en la regulación de la síntesis de la MEL. Esta involucra la acetilación de la serotonina en N-acetilserotonina, reacción que es catalizada por la N-acetiltransferasa y el uso de acetil coenzima A como un cofactor. La N-acetilserotonina es transformada en melatonina por las enzimas hidroxindol-0-metiltransferasa, usando a S-adenosil metionina como donador de grupos metilo (8, 77, 78) (Figura No.5).

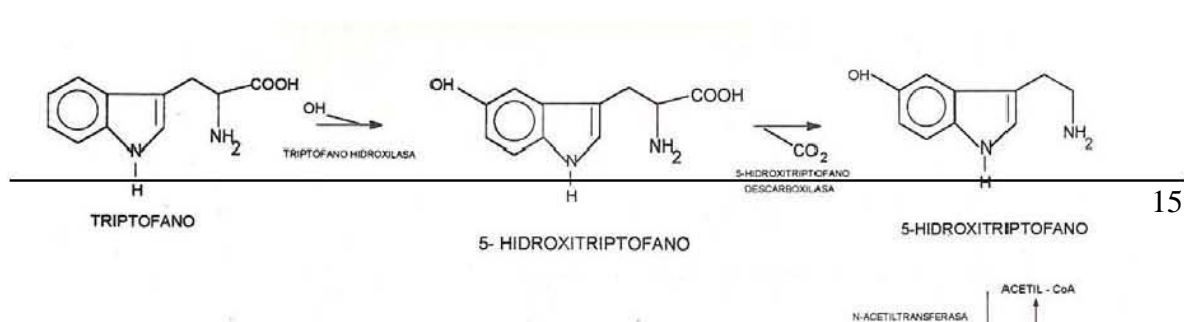




Figura No. 5. Representación de la ruta metabólica de indoles de la GP, que inicia con triptofano , interviniendo 3 diferentes enzimas (152).

La producción de melatonina aumenta aproximadamente de 2 a 15 veces durante la noche.

La principal vía catabólica para la degradación de la melatonina es la hidroxilación en el hígado en la posición 6, seguida de la conjugación, primordialmente con sulfato (70%) y con glucorónido (6%). Una porción también, es convertida en compuestos que no reaccionan como los indoles, lo cual sugiere que los anillos indólicos están abiertos. Además, de la hidroxilación, hay muchas otras vías metabólicas. Una es la formación de N-g-acetil-N-2-formol-5-metoxikinurenamina (25) que puede ser degradada en N-gamma-acetil-5-metoxikurenamina. Estas reacciones se llevan a cabo en el cerebro.

La síntesis de MEL no es exclusiva de la pineal, esta también se presenta en sitios extrapineales (64), como la retina (23, 125) la glándula Harderiana (23, 62) y el intestino (117) de roedores y en humanos, su secreción ocurre en rangos constantes a diferentes edades (52).

A pesar de la similitud estructural entre la serotonina y la melatonina, los receptores a serotonina no muestran afinidad por la melatonina (151). Las concentraciones de serotonina y diversas enzimas en la GP son las más elevadas en humanos, roedores y aves y muestran un ritmo circadiano inverso al de la melatonina, con valores máximos durante la fotofase y menores en la escotofase (Figura No. 6) (14, 124).

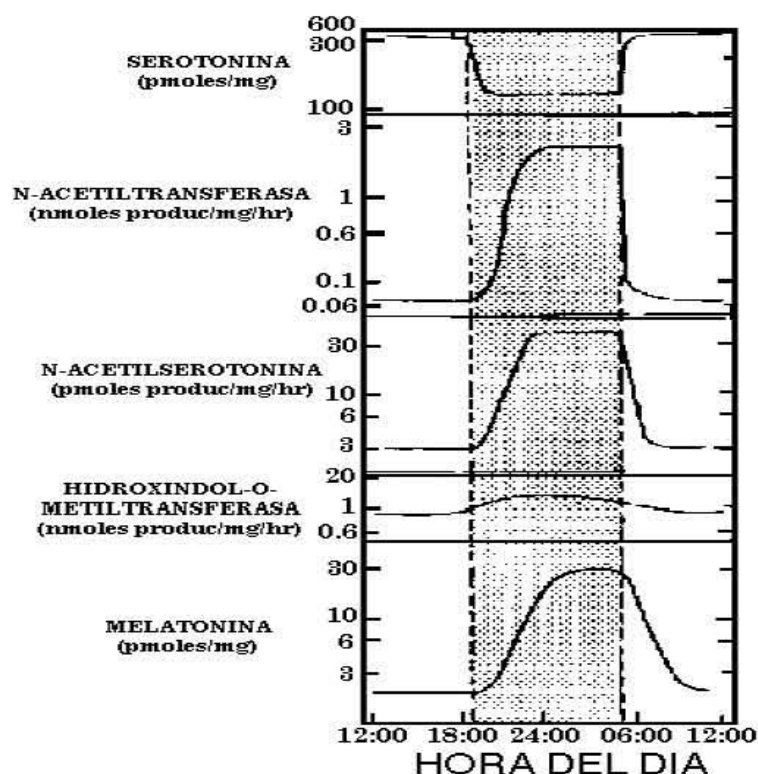


Figura No 6. Esquema que representa la variación en los niveles de MEL siguiendo el ritmo circadiano (51, 76).

### 1.2.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS.

Se han reportado efectos de esta hormona sobre funciones cerebrales y periféricas, y se puede hablar de efectos endocrinos y no endocrinos, como efectos conductuales, efectos metabólicos, efectos sobre la organización y periodicidad circadiana, efectos inmunológicos, y efectos dentro del núcleo celular (27), ya sea regulando la expresión genética o como secuestrador de radicales libres (45), en diversos trastornos, sobretodo los relacionados con la edad (123).

Dentro de las funciones neuroendocrinas destacan las relacionadas con el eje pineal-ovárico en las cuales participa la MEL, siendo los efectos sobre la reproducción de los más importantes, donde se menciona la inhibición de la liberación de factores hipotalámicos (67), los cuales regulan todas las facetas de la reproducción estacional y no estacional. Estas acciones se ejercen tanto en animales como en seres humanos en la pubertad (84, 135).

En los años 50 Kitay y Altschule (74) mostraron que la administración de 100 mg de extractos pineales, durante 14 días, deprimen el crecimiento ovárico e inhiben la ovulación en ratas. Hallazgos similares fueron reportados por Reiter (119), quien además mostró que la pinealectomía provoca la hipertrofia del ovario y de los órganos accesorios en ratas maduras; mientras que este procedimiento quirúrgico en ratas jóvenes provoca una maduración sexual prematura (121). La inyección de extractos de la pineal revierten este efecto (73).

Por otro lado, se ha establecido una relación entre el fotoperiodo y la función gonadal de la pineal desde la década de los años 60's cuando se mostró que los animales jóvenes expuestos a iluminación continua, desarrollan una maduración precoz y en los adultos un aumento en su peso gonadal. Estas respuestas se revierten con el tratamiento a base de extractos pineales (121).

Tanto la síntesis como la secreción de MEL muestran una fluctuación rítmica durante el embarazo y el parto en los seres humanos (75, 144).

Yasin y cols., (154) reportan el efecto regulador inhibitorio de MEL sobre la liberación de hormonas neurohipofisiarias (91). También, se ha reportado un incremento en la concentración de MEL en el líquido folicular con posibles implicaciones fisiológicas en la reproducción (130).

Otros autores, reportan que la administración de MEL provoca cambios importantes en la síntesis y liberación de varios neurotransmisores cerebrales (115). Como resultado de esta acción la aplicación de MEL induce el sueño en gatos (68), gallinas jóvenes (60) y en humanos (33). Además, de poseer una acción potenciadora sobre el sueño provocado por hexobarbital, en el ratón y por pentobarbital en la rata. También, inducen sueño los metoxi-indoles como el 5-metoxitriptofano, cuya aplicación, en ratas pretratadas con barbitúricos, provoca un estado hipnótico característico (63, 139).

Por otro lado, otros estudios realizados por Verne sugieren que la MEL ejerce una acción sedante en ratas (105). Kovacs y cols., (80) mostraron que la MEL en ratas pinealectomizadas a dosis de 100 µg/rata deprime la respuesta simpática a un agente estresor y aún en ausencia de éste, las ratas disminuyen su actividad (80). Por otra parte Datta y King (36) en estudios de aprendizaje muestran que la MEL actúa como inhibidor de la memoria en procesos de atención lo que incrementa el fenómeno de extinción. Este efecto puede ser resultado de una secreción de ACTH/MSH, hormonas que facilitan la retención de respuesta en el aprendizaje (24).

Otro efecto cerebral de la MEL, son sus acciones anticonvulsivantes (12, 108), así Bindon y Rizzo mostraron que los conejos con pinealectomía sufren de convulsiones después de estimular al hipocampo, esta acción no se observó en conejos con falsa pinealectomía (12).

También, la actividad depresora y el poder anticonvulsivo de la difenilhidantoína, diazepam, clordiacepoxido y pentobarbital se reduce significativamente en ratas pinealectomizadas (80). Finalmente, la aplicación de MEL y de los extractos pineales acuosos de bovinos, ejercen efectos anticonvulsivos. Varios estudios muestran que la MEL modifica la respuesta de neuronas epilépticas a los estímulos sensoriales, reduciendo como

consecuencia, los efectos de los reflejos sensoriales los cuales pueden desencadenar la epilepsia (47, 48, 131).

Las acciones hipnóticas, sedantes y anticonvulsivas descritas, son resultado de la acción depresora que la MEL ejerce sobre la actividad eléctrica del SNC (153), y se puntualiza el importante papel que esta hormona ejerce en algunos procesos conductuales, entre los que se incluyen a la ansiedad (102, 103, 129).

También, existe una relación entre la GP y la temperatura corporal, por ejemplo cuando el gorrión doméstico es pinealectomizado el ritmo circadiano normal de temperatura corporal desaparece, este efecto observado en otros animales sugiere que la GP también es un sincronizador de la temperatura (20, 21, 22, 133).

Bailey y May (9) describieron que la MEL reduce ligeramente la liberación de insulina basal; y provoca un decremento significativo de la secreción inducida por la glucosa en los islotes de Langerhans aislados, provenientes de ratones normales e hiperglucémicos; lo que sugiere que la GP ejerce una regulación sobre la secreción de insulina en el páncreas (9). Además, en los animales pinealectomizados los niveles de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) en la pituitaria son más altos con respecto a sujetos sometidos a una falsa pinealectomía.

Las inyecciones de MEL originan una rápida disminución del contenido de esta hormona; lo que modifica la pigmentación de la piel y las características del plumaje de aves y del pelaje de varios animales (85, 106).

Por otra parte, en órganos periféricos diversas investigaciones han mostrado que la MEL inhibe las contracciones espontáneas e inducidas en músculo liso de algunos tejidos como el útero, el duodeno, el conducto deferente de rata y la tráquea de gato (16, 17, 19, 104, 114, 132). Estos efectos se detectan en condiciones “in vitro”; así en experimentos que registran las contracciones de segmentos de útero de ratas se observa que al adicionar

MEL se produce una disminución de la contractilidad espontánea, la cual es dependiente de la concentración de MEL administrada. También, las concentraciones inducidas por la serotonina y por la oxitocina son bloqueadas por la adición de MEL. Es probable que la MEL ejerza una respuesta similar en condiciones “in vivo” (103,104).

El duodeno también, disminuye su contractilidad espontánea en presencia de MEL a concentraciones que oscilan entre 1.25, 5.0, 20, 40, 80, 160  $\times 10^{-9}$  moles, con esta última concentración se observa una inhibición completa de la contractilidad, además, la contracción inducida por la serotonina es inhibida con concentraciones de MEL de 40 a  $160 \times 10^{-9}$  (105). Una situación similar se observa en el músculo liso de la tráquea precontraída con serotonina (102). Se desconoce aún el mecanismo por el cual la MEL ejerce una acción inhibitoria sobre la contracción muscular lisa (106).

### **1.3. AGOMELATONINA**

La AGOMEL es un bioisómero sintético con actividad farmacológica similar a la MEL y debido al importante papel que juega la MEL en funciones sustantivas de la fisiología corporal, tanto en animales como en el ser humano, en el que además interviene en la fisiopatología de diversas enfermedades, es necesario encontrar análogos a ella con gran potencial en la terapéutica.

En la búsqueda de sustancias que presenten, mejores o mayores efectos que la MEL (por su tiempo de vida media tan reducido), en la Fac. de Química de la UNAM, se han sintetizado diferentes compuestos análogos a ella (110), como lo es el caso de un bioisómero de melatonina: la AGOMEL (111).

Recientemente, se ha desarrollado gran interés en el diseño de los ligandos del receptor de la MEL capaces de aumentar o disminuir la respuesta de la misma. Se han diseñado varios derivados de naftaleno como compuestos bioisostéricos de MEL, y varios

de éstos han mostrado ser agonistas potentes para los receptores de MEL (114). Estos datos confirman el interés de los nuevos derivados de naftaleno, como agentes melatoninérgicos (112,113), esto por un lado. Por otro lado, el fenómeno por el que dos compuestos de estructuras relacionadas presentan propiedades biológicas semejantes fue descrito por Friedman como bioisómero (113), que son moléculas o grupos de átomos que por poseer propiedades físicas o químicas análogas, producen una respuesta farmacológica agonista o antagonista.

La síntesis de análogos (agonistas y antagonistas de MEL) para el sitio de unión de MEL ha permitido sostener el papel que ha desempeñado el sistema melatoninérgico en la regulación y organización circadiana. La agomelatonina S20098 se comporta como un cronobiótico debido a su acción en diversos modelos de animales (115,116).

Se ha observado que las posibles aplicaciones terapéuticas podrían estar dirigidas a los desórdenes inducidos por los cambios estacionales.

Dentro de la síntesis de los análogos de MEL que tienen actividad sobre los receptores melatoninérgicos se encuentra una variedad de metoxiindoles y derivados del naftaleno, entre los que destaca por su importancia, la AGOMEL debido a su actividad parecida a la de la MEL (Figura, 7) (110).

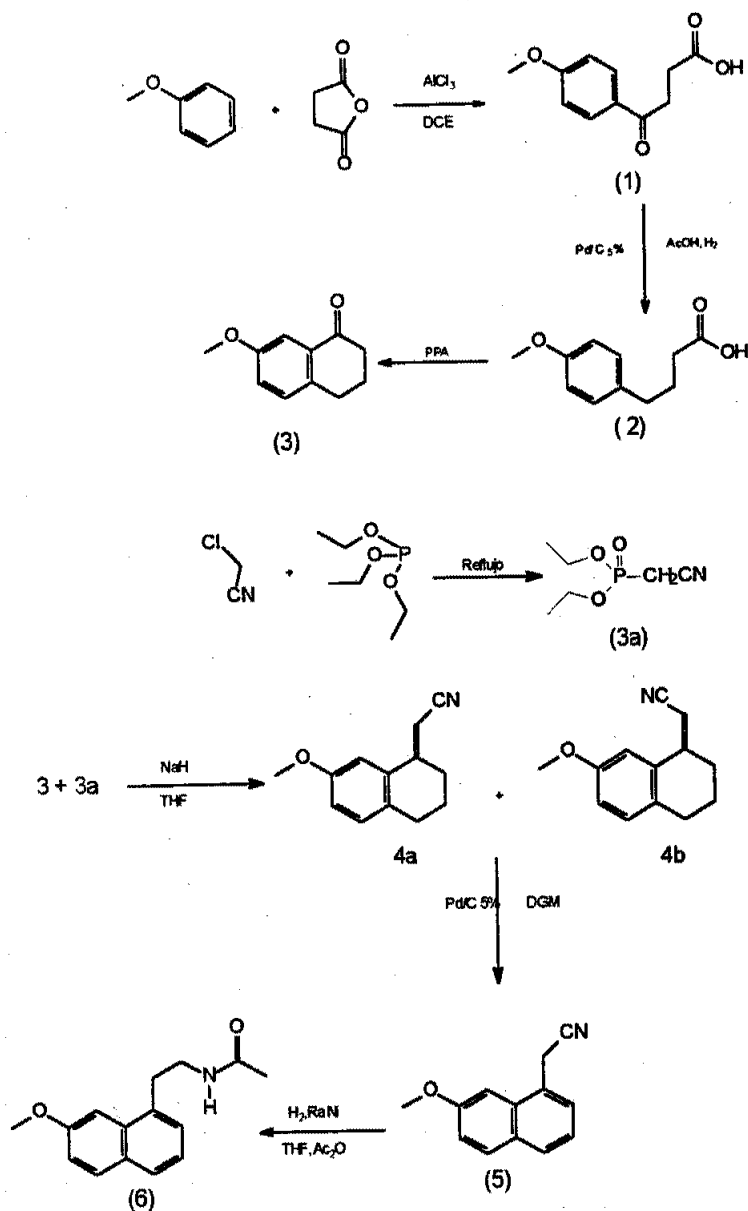


Figura No. 7. Síntesis de Agomelatina (111)

#### 1.4. ACIDO GAMMA-AMINO-BUTÍRICO (GABA)

El GABA, es el mayor inhibidor presináptico localizado en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Entérico (SNE), su localización en estos sistemas y en diferentes regiones intestinales sugiere su importancia fisiológica como neurotransmisor autonómico entérico (117). El GABA y la enzima limitante para su síntesis, glutamato ácido-decarboxilasa (GAD) se han localizado a través de diversos estudios, así,



inmunohistoquímicamente (118 ), se muestra que las fibras nerviosas y los cuerpos celulares que pasan a través del tracto gastrointestinal (TGI), contienen GABA y que la mayor densidad de este neurotransmisor se localiza en el plexo mientérico o en el músculo circular, lo que sugiere que el GABA funciona como comunicador interneural (119).

En la GP, hay sustancias que modulan la producción, síntesis y liberación de MEL, como el glutamato, el GABA, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (117) y el AMPc activado por NA (125,126), se plantea la similitud que existe entre los efectos producidos por MEL con los producidos por sustancias GABA-érgicas como sedación, hipnosis, propiedades ansiolíticas y anticonvulsivas, esta relación sugiere un nexo entre la GP a través de sus indoles y los sistemas GABA-érgicos. Esta relación, inicialmente, fue postulada por Romijn (127) y posteriormente, por Cardinali y cols., (128) quienes sugirieron que la GP es un órgano tranquilizante, otras evidencias neuroquímicas apoyan esta sugerencia (129,130).

Una evidencia muy importante en esta relación fue aportada por los estudios de Marangos y cols. (131) quienes mostraron que la MEL reduce la unión de [<sup>3</sup>H]-diazepan de sitios de unión específicos en las membranas de cerebro de rata. Para estos autores se trata de una interacción de la MEL con el complejo benzodiazepina-ionóforo-receptor-GABA(132).

Estos autores señalan parte del hecho de que las benzodiazepinas (BZP) y los barbitúricos son capaces de mejorar la neurotransmisión GABAérgica debido a que uno de los componentes del complejo receptor supramolecular del GABA, reconoce sitios con los que interactúan varias sustancias entre las que se encuentran las propias BZP y los barbitúricos (133), esto sugiere que los efectos sedantes y anticonvulsivos de estos fármacos, son el resultado de una modulación de la actividad del receptor GABA-érgico (131). La actividad de este tipo de receptor se ve incrementada por sustancias como los

ansiolíticos (77), los anticonvulsivos (82), los relajantes musculares, los sedantes hipnóticos (74), pero, se disminuye por algunas  $\beta$ -carbolinas ansiogénicas (131).

Los autores Coloma y Niles, (32) mostraron que la MEL aumentaba la unión del GABA en membranas de células nerviosas cerebrales In Vitro.

Por otro lado los investigadores Bayer y cols. (10) han mostrado que en el sistema nervioso entérico, el GABA es modulador de la actividad mecánica espontánea y que esta modulación depende del segmento del tracto intestinal y de la especie estudiada.

Estos antecedentes permiten plantear por una lado que la MEL podría actuar probablemente a través del sistema gabaérgico a nivel central y/o periférico, ya que en ambos sistemas existe actividad neuronal GABA.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Entre los efectos a nivel central planteados para la MEL, se propone la disminución de la excitabilidad celular; y en consecuencia, la modificación de la función del calcio (142, 143).

A nivel periférico o específicamente en sistema nervioso entérico, “In vitro” la MEL inhibe la contracción de tejido con musculatura lisa, este efecto puede estar asociado a la disminución de la excitabilidad celular; sin embargo, el mecanismo por el cual produce este efecto aún es motivo de discusión.(57, 70, 92, 89).

Estudios realizados con el propósito de caracterizar el efecto farmacológico de la MEL sobre la contracción espontánea en duodeno de rata y otros tejidos de músculo liso, han reportado una inhibición de la actividad contráctil, que podría ser mediada por receptores membranales de alta afinidad (44, 89, 92), o bien que podría ser consecuencia de un efecto sobre los canales de calcio activados por voltaje.

Estos antecedentes nos muestran claramente que la hormona MEL produce una diversidad de efectos sobre contracción espontánea en algunos tejidos periféricos. Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual ejerce tales efectos, quedando mucho por aclarar

Por lo tanto en un intento para dilucidar y caracterizar el efecto de esta hormona en el tejido duodenal y desde un enfoque farmacológico, realizamos estudios en tejido aislado con sustancias que como el GABA actúa a través de receptores a GABA intestinal y que ya ha sido utilizada para plantear el posible mecanismo de acción de MEL y con AGOMEL que aún no se conoce su mecanismo

de acción, pero que planteamos que posiblemente actúe a través de receptores a MEL o GABA.

Entonces, el problema de investigación del presente trabajo se expresa en los siguientes términos:

”La MEL disminuye la actividad espontánea del músculo liso intestinal. Si la AGOMEL es un bioisómero análogo, es posible que actúe de la misma manera que la MEL

### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la respuesta de la melatonina sobre el músculo liso duodenal.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar el efecto de la MEL sobre la actividad contráctil de duodeno aislado de rata.
2. Caracterizar el efecto de la AGOMEL sobre la actividad contráctil de duodeno aislado de rata.
3. Caracterizar el efecto de GABA sobre la actividad contráctil de duodeno aislado de rata.
4. Determinar la interacción de la MEL y GABA en duodeno aislado de rata.

### **4. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

1. Si la MEL disminuye la contracción espontánea del músculo liso duodenal, entonces la AGOMEL lo debería hacer de manera similar.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MATERIAL.

<b>Material</b>	<b>Marca</b>
<b>Equipo</b>	
Polígrafo (Figura No.13)	Grass RPS7C8-79-D
Transductor de fuerza isométrica	Grass FT03C
Pre-amplificador de corriente directa	Grass 7P1F
Software Polyview	Grass
Sistema "In Vitro" convencional, para baño de tejido aislado (15 mL de volumen total)	
Recirculador	Comfort
Cronómetro	Badenia
Micropipeta 0.5-10 microlitros	Eppendorf
Micropipeta 20-200 microlitros	Eppendorf
Micropipeta 100-1000 microlitros	Eppendorf
<b>Convencional</b>	
Pipeta graduada 10 ml	Pyrex
Matraz aforado 100 ml	Kimax
Matraz aforado 1000 ml	Pyrex
Matraz Erlenmayer 125 ml	Pyrex
Vaso de precipitados 50 ml	Pyrex
Vaso de precipitados 250 ml	Pyrex
Vaso de precipitados 1000 ml	Pyrex
Vaso de precipitados 3500 ml	Pyrex
Probeta graduada 100 ml	Pyrex
Tabla con corcho	
Hilo de seda 000	(Anacap Davis-Geck)
Caja de Petri	Pyrex
Pipeta	
<b>Sustancias</b>	
Glucosa $C_6H_{12}O_6$	Merck-MéxicoS.A
Bicarbonato de sodio $NaHCO_3$	J.T Backer
Cloruro de sodio $NaCl$	J.T Backer
Cloruro de potasio $KCl$	J.T Backer
Fosfato ácido de potasio $KH_2PO_4$	Mallinckrodt A.R
Sulfato de magnesio $MgSO_4$	J.T Backer
Cloruro de calcio $CaCl_2$	J.T Backer
Agua destilada	
Polietilenglicol	Merck-Schuchardt

Alcohol etílico J.T Backer

**Curación**

Aguja calibre 22 (0.80mm x 1 1/4) Jeripak  
 Jeringa 60 ml Terumo

**Instrumental quirúrgico**

Portaagujas Hergom  
 Pinza roma Surgean  
 Tijera curva Stainless

*Preparación de la solución Ringer-Krebs*

Para preparar la solución Ringer primero es necesario preparar las soluciones Stock

	<b>Sustancia</b>	<b>mM</b>	<b>ml / L</b>	<b>PM</b>	<b>Stock</b>
1	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	11	2g / L	180.16	
2	NaHCO <sub>3</sub>	20	200 ml	82.97	8.4 g / L
3	NaCl	120	120 ml	58.43	58.44 g / L
<b>4</b>	<b>KCl</b>	4.6	4.6 ml	74.55	7.45 g / 100 ml
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	1.2 ml	136.03	13.6 g / 100 ml
6	MgSO <sub>4</sub>	1.2	1.2 ml	246.49	24.6 g / 100 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	1.5	1.5 ml	147.02	14.7 g / 100 ml

En un matraz aforado de 1000 ml se adiciona suficiente agua destilada, se pesan los dos gramos de glucosa y se agrega al agua del matraz, se procede a agregar en mililitros por litro de las soluciones stock, como se muestra en la tabla anterior, señalados en la tercera columna de la tabla que se muestra arriba, siguiendo el orden de las sustancias, primero la número uno, la dos, y así sucesivamente hasta llegar al cloruro de calcio, que debe ser agregado al último para evitar la precipitación de las sales. La solución se calienta a 37°C, se burbujea la solución con gas carbónico (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) para obtener un pH de 7.4. Las soluciones se prepararon en diferentes grupos:

Grupo Vehículo

Grupo Agomelatonina

Grupo Melatonina

Grupo GABA

Para la administración de los análogos de melatonina y agomelatonina, se utilizó una solución vehículo en la que se solubilizó la sustancia problema, la solución vehículo contenía:

Polietilenglicol	40%
Alcohol etílico	20%
Agua destilada	40%

Se coloca la solución problema en un vaso de precipitado, se le adiciona la solución vehículo,

## **5.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (180-230 g de peso) (Harlan, México, SA de CV, Se anexa carta de Bioética). Se mantuvieron por una semana en las siguientes condiciones del laboratorio (temperatura ambiente =  $20 \pm 2$  °C, 40-70% de Humedad), tuvieron acceso libre al agua. Se privaron de alimento (8-12 h) antes de realizar el experimento, fueron mantenidas en cajas individuales de borosilicato (40 X 30 X 20 cm). El ciclo luz-oscuridad fue de 10/14 h hrs (luz de 08:00 – 18:00 hrs). Los experimentos se realizaron entre los meses de verano-otoño.

## **5.3. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO.**

Después de un periodo de habituación de una semana a las condiciones de laboratorio antes mencionadas, se llevaron a cabo las sesiones de registro, Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, y después se les realizó una incisión de aproximadamente 10 cm en la línea media abdominal (Figura No. 7), se localizó la unión del estómago con el intestino (píloro), se identificó, (Figura No. 8) se cortó y extirpó el tejido (duodeno) (Figura No. 9), se sujetó el intestino firmemente con la pinza roma y se separó del mesenterio cuidadosamente hasta obtener de 5 a 6 cm, de esta porción del intestino. Una vez obtenido el duodeno se



colocó en una caja de Petri con solución Ringer a 37° (Figura No. 10) que contenía una solución Ringer Krebs-Henseleit 142).



Figura No. 7. Se realiza una incisión de aproximadamente 10 cm en la línea media abdominal

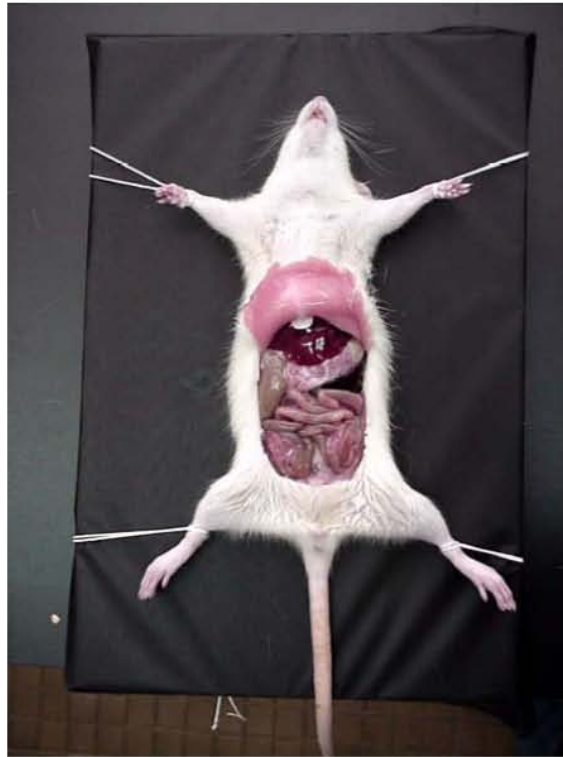


Figura No.8. Se identifica el duodeno.



Figura No. 9. Se extirpa el tejido (duodeno)



Figura No. 10. Una vez extraído el duodeno se disecó, se seccionó en 4 fragmentos de 1 cm de longitud cada uno.

Los fragmentos proximal y distal al estomago, se seleccionaron para realizar los registros de la actividad contráctil en cada uno de los experimentos realizados.

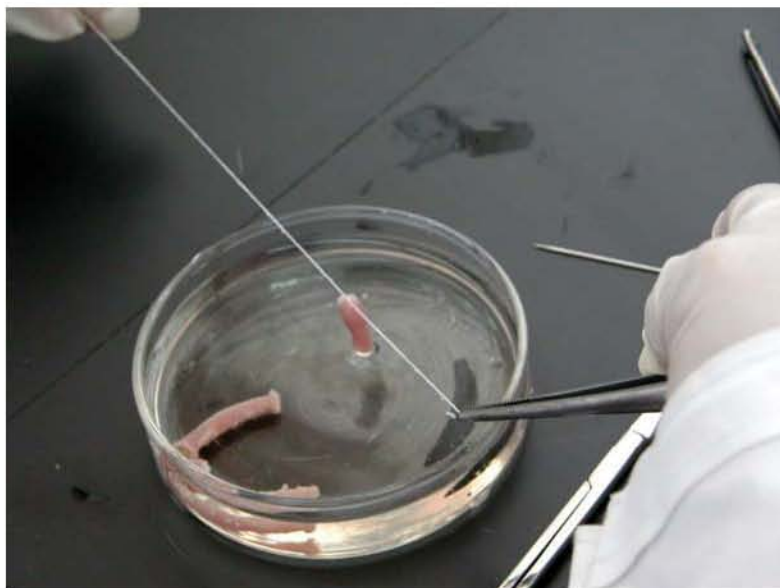


Figura 11. Se ató una porción de hilo de seda en un extremo



Figura No. 12. Atadura de un hilo de seda a cada extremo del segmento de tejido.

A cada extremo del segmento seleccionado de tejido duodenal, se ató una porción de hilo de seda 000 (Anacap Davis-Geck) (Figura No. 11, 12) y se colocó dentro de una cámara de vidrio (Sistema “In Vitro” convencional) para baño de tejido aislado (15 mL de volumen total) llena con solución Ringer-Krebs-Henseleit a 37 °C y también burbujeada con una mezcla de gas carbónico.

Un extremo de la preparación se sujetó a un transductor de fuerza isométrica; y a su vez a un pre-amplificador de corriente directa el cual es parte integrante de un polígrafo (Figura No.13). El otro extremo del tejido se fijó a la base de la cámara y se le dio la tensión adecuada para obtener las señales de la actividad espontánea requeridas. Este equipo registró por un lado, en papel la respuesta de la actividad espontánea a una velocidad de barrido de 5 mm/min, y por otro lado se capturaron los datos en una computadora PC con la ayuda del software PolyView. El sistema de registro se calibró de tal manera que 2 cm de

desplazamiento de la plumilla inscriptora, correspondía a 1 g de fuerza (2 cm = 1g). Posterior al procedimiento de calibración, se colocaron los tejidos duodenales para su registro.



Figura No. 13. Polígrafo (Grass RPS7C8-79-D)

#### **5.4. REGISTRO.**

Antes de iniciar cualquier registro, el segmento de tejido duodenal permaneció durante al menos una hora en la solución de Ringer-Krebs-Henseleit con el propósito de alcanzar 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 1g. A continuación se procedió a realizar el registro de la contracción espontánea basal.

El registro se realizó en 8 segmentos de tejido duodenal, provenientes de 4 ratas diferentes. El registro basal o control se obtuvo durante un periodo de 5 min previos a la

administración de MEL a concentraciones de 0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016, 0.032  $\mu\text{M}$  (SIGMA), con los cuales se obtuvieron registros de 5 min también (postadministración), y se consideraron “tratamientos”. La aplicación de MEL, AGOMEL a concentraciones antes mencionadas (Fac. de Química. UNAM), GABA (SIGMA) y FLU (SIGMA), se realizó en un volumen constante (10, 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{L}$  en 15 mL de baño) con micropipetas (Eppendorf). Entre cada aplicación de las diferentes concentraciones de las sustancias, se lavaron los tejidos con solución Ringer-Krebs-Henseleit, y 15 min después del lavado, se aplicó la siguiente concentración en forma creciente.

Para su aplicación la MEL se disolvió en 20% Propilenglicol, 20% Etanol y 10% de agua y se preparó inmediatamente antes de su aplicación.

Los datos de la mayoría de los registros se capturaron en una PC y con la ayuda del software PolyView se analizaron.

En la primera parte del experimento se administro MEL (Sigma & Aldrich) y posteriormente se estudio el efecto de AGOMEL, mientras que en una segunda parte de experimentos se realizó la aplicación de GABA y por último en una tercera parte se realizó la interacción de GABA y MEL (Sigma & Aldrich), para explorar el efecto sobre la actividad muscular duodenal, comparándola y combinándolas.

## **5.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

En la lectura de los registros de la contracción en cada uno de los experimentos se cuantificó durante 5 min. la frecuencia de la actividad contráctil (Número de contracciones); la amplitud de la contracción y la contracción tónica.

Así, del registro obtenido se midió la amplitud (fuerza) de la contracción expresándola en mm y el número de contracciones presentes durante cada uno de los 5 min de registro. La amplitud en mm corresponde a la tensión en gramos ( $20 \text{ mm} = 2 \text{ cm} = 1 \text{ g}$ ) para obtener la magnitud de la fuerza de contracción.

Posteriormente, se calculó el porcentaje promedio de respuesta máxima obtenida en cada uno de los tejidos, tanto para la frecuencia como para la amplitud de la contracción. Se calculó el porcentaje de disminución; considerándose el valor promedio del registro control como el 100% de la contracción, y el promedio correspondiente obtenido con cada una de las concentraciones de cada sustancias.

El porcentaje de disminución se obtuvo al sustraer el valor obtenido en cada una de las concentraciones para cada sustancia aplicada al 100 % de la respuesta basal. Para cada uno de los ensayos “In Vitro”, se obtuvo la concentración de inhibición media (CI50) la cual corresponde a la concentración de cada una de las sustancias que inhibe al 50 % de la contracción máxima. Este valor se obtuvo por regresión lineal de la relación logaritmo de la concentración Vs el porcentaje de inhibición.

Para todos los casos se calcularon las curvas concentración Vs respuesta para analizar el efecto de cada sustancia sobre la actividad espontánea de músculo liso duodenal (143; 144).

Los resultados que se presentan reflejan el promedio de las contracciones presentadas durante el tiempo de los registros (control o basal y con tratamiento por 5 min.). Los valores expresado para el conjunto de los tejidos son el promedio  $X \pm$  el error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico de los datos, se utilizaron pruebas de potencia-eficiencia de tipo, los universos poblacionales se distribuyen normalmente.

Se utilizó la prueba de “t de Student” para muestras independientes, para el análisis de los resultados del porcentaje de disminución provocado por MEL sobre la actividad espontánea (145,146).



## 6. RESULTADOS

### 6.1. EXPERIMENTO 1

#### EFECTO DE LA MEL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL TEJIDO DUODENAL

Después, de un periodo de 60 minutos de equilibrio en solución Ringer-Krebbs-Henseleit, el tono de la respuesta muscular alcanzó una línea basal que se mantuvo durante realización del experimento.

Tanto la frecuencia (FREC) como la amplitud (AMP) y el Área Bajo la Curva (ABC) durante el registro de las respuestas, mostró cierta variabilidad en los diferentes segmentos. Se obtuvieron FREC y ABC (absoluto y porcentajes) promedios que fueron de  $0.42 \pm 0.2$ , por segundo; mientras que la AMP tuvo un rango de  $0.40 \text{ g} \pm 0.02$ . (Figura No. 14).

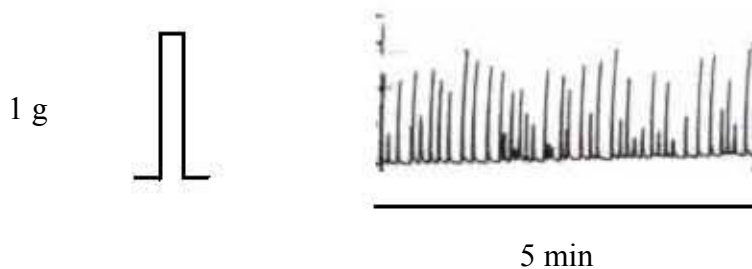


Figura No. 14. Registros de la actividad contráctil basal espontánea de un segmento duodenal. Se muestra el pulso de calibración equivalente a 1 g. La línea inferior corresponde a la escala de tiempo (5 min).

Al administrar concentraciones crecientes de MEL, aplicadas a la cámara donde estaba sumergido el tejido, inicialmente, se presentó un incremento de la respuesta para disminuir posteriormente, en forma gradual la AMP, FREC y ABC de la contracción espontánea del

tejido duodenal (Figura No.15) lo que indica que este efecto es dependiente de la concentración de MEL administrada. Así, en presencia de diferentes concentraciones de MEL, los valores obtenidos para FREC, AMP y ABC se muestran en el cuadro 1 y gráficas 1, 2 y 3.

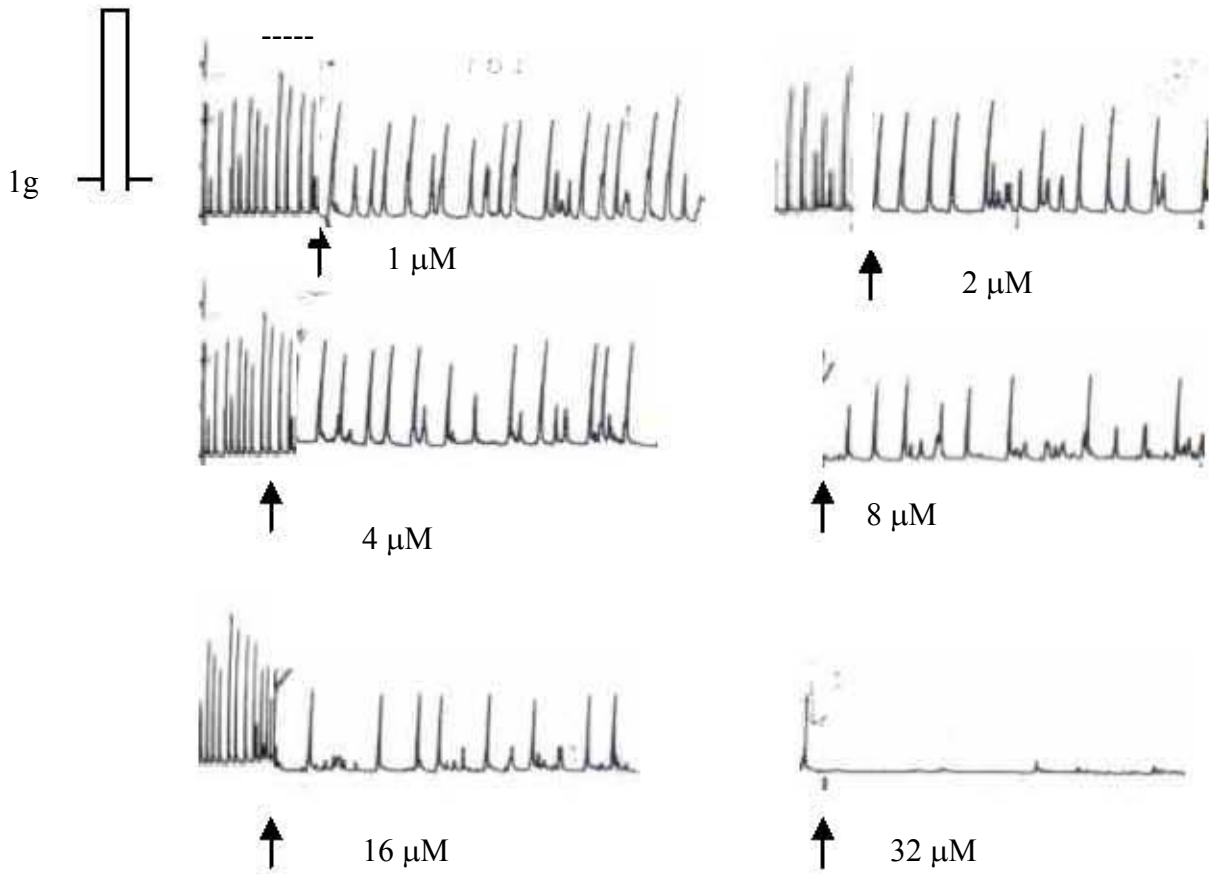


Figura No. 15. Contracción duodenal con administración de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de MEL, la flecha indica el momento de la administración.

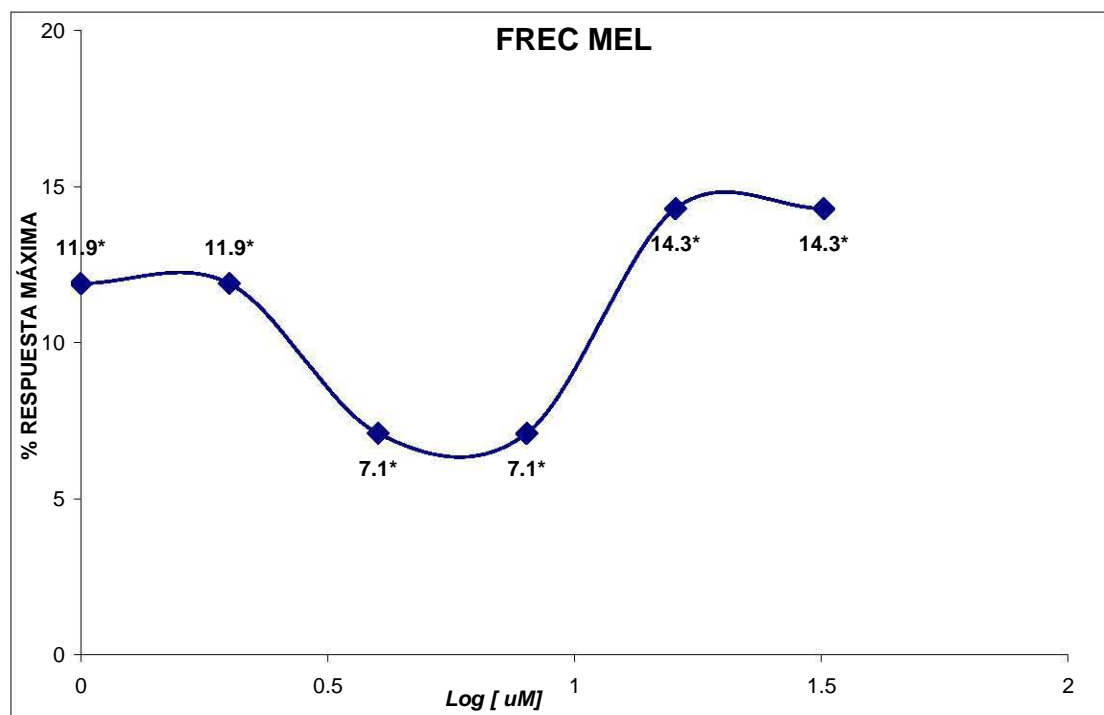
CUADRO No. 1

MEL $\mu\text{M}$	Log [ ]	FREC (seg)	% FREC	E.E.M	X AMP g.	% AMP	E.E.M.	X ABC	% ABC
0	0	0.42	100	-	0.40	100	-	32.35	100
1	0	0.37*	88.1	0.002	0.49*	122.5	0.283	39.99	123.62
2	0.30	0.37*	88.1	0.027	0.34	85	0.239	33.07	104.08
4	0.602	0.39*	92.9	0.023	0.36	90	0.245	30.61	94.62
8	0.903	0.39*	92.9	0.045	0.29*	72.5	0.243	25.36*	78.39*
16	1.2041	0.36*	85.7	0.041	0.28*	70	0.188	20.38*	63.00*
32	1.5051	0.36*	85.7	0.021	0.20*	50	0.104	7.37*	22.78*

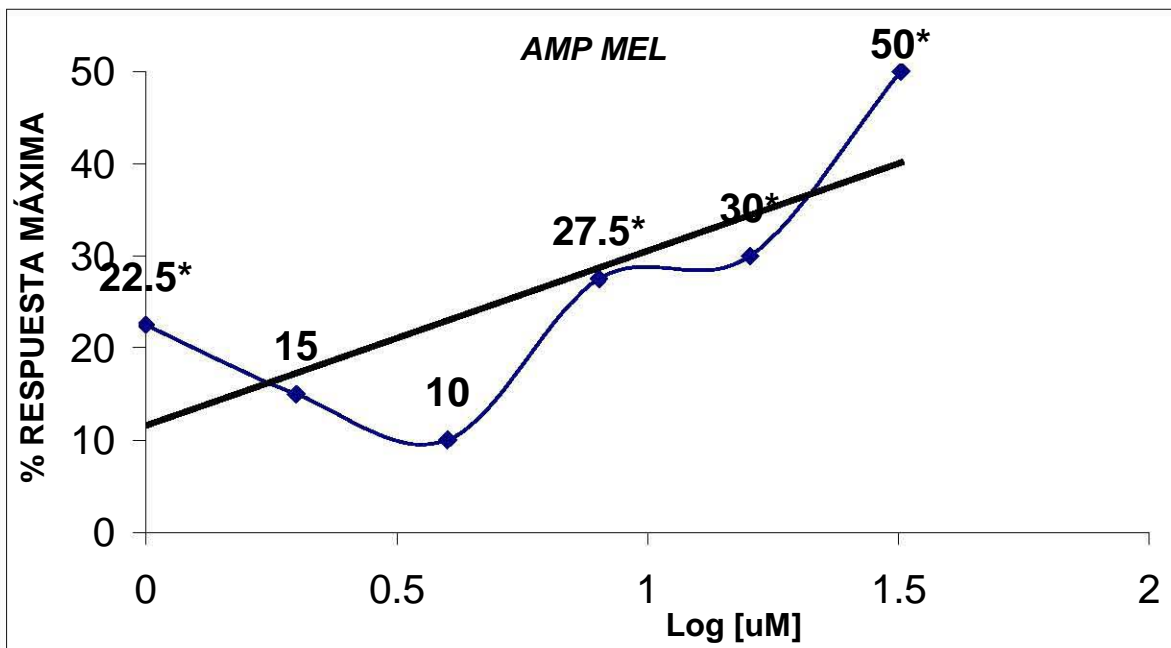
FREC, AMP, ABC y sus respectivos porcentajes de contracción de duodeno con MEL a diferentes concentraciones.

E.E.M. = Error Estándar de la Media

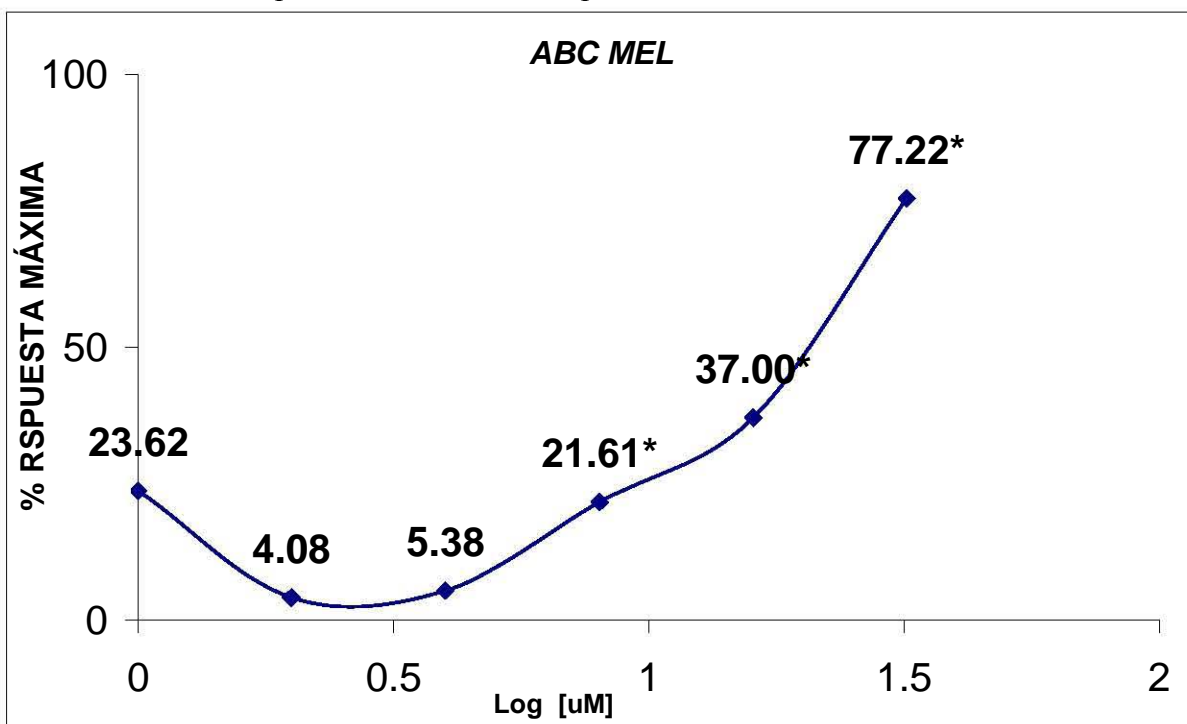
P < 0.05 = \* (Nivel de significancia)



Gráfica No. 1. Curva dosis-respuesta gradual de MEL a las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  sobre la frecuencia de contracción y porcentaje de respuesta máxima en duodeno. Los datos de cada punto corresponden a la diferencia del valor obtenido en cada concentración con respecto al 100 % de la respuesta basal.



Gráfica No. 2. Curva dosis-respuesta gradual con MEL a las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$ . Los datos de cada punto corresponden a la diferencia del valor obtenido en cada concentración con respecto al 100 % de la respuesta basal.



Gráfica No. 3. Porcentaje de respuesta (ABC) de duodeno con MEL 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$ . Los datos de cada punto corresponden a la diferencia del valor obtenido en cada concentración con respecto al 100 % de la respuesta basal.

Los datos se expresaron como  $X \pm$  E.S.M. El análisis estadístico utilizando la t de Student pareada mostró que la diferencia observada en la FREC de la contracción basal la cual es considerada el 100% de la respuesta y la diferencia de respuesta obtenida a las diferentes concentraciones de MEL fue significativa  $P < 0.05$ .

La adición de MEL en concentraciones graduales al tejido dentro de la cámara, provocó un incremento inicial y posteriormente una disminución gradual de las contracciones del tejido duodenal (Gráfica 2).

El efecto producido por la MEL sobre la contracción espontánea del tejido duodenal consistió en la inhibición de AMP de la contracción, en un rango de magnitud que va de 10 al 50% de la contracción duodenal espontánea (Cuadro 1) cuando estos datos se relacionan a través de una curva logaritmo de la concentración Vs porcentaje de inhibición, se observa una relación lineal (Gráfica 2). Con esta curva se calculó la [MEL] que inhibe el 50% (CI50) de la actividad muscular espontánea del tejido duodenal, obteniéndose un valor de  $5.623 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ . También, esta curva sugiere la existencia de una relación lineal entre la [MEL] y la disminución de la contracción muscular; lo que indica que el efecto inhibitor de la MEL es gradualmente dependiente de la concentración (Gráfica 3).

Para analizar gráfica y cuantitativamente el efecto de la MEL sobre la actividad espontánea, se realizó una transformación matemática de los datos a porcentajes, para ello se consideró el valor de la AMP basal o de la FREC basal de la contracción como el 100%, y los parámetros registrados en presencia de MEL se refirieron como un porcentaje de la contracción máxima, de la FREC máxima o del ABC máxima. Con los valores obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad espontánea que produjeron los diferentes

concentraciones de MEL en tejido duodenal.

La prueba estadística mostró que la diferencia observada entre la AMP basal y la AMP a las concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{M}$  de MEL no es significativa, mientras que es significativa  $P < 0.05$  a las concentraciones de 1, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$ .

El análisis estadístico mostró que la diferencia observada en la inhibición de la contracción en ABC basal y en las diferentes concentraciones de MEL es significativa  $P < 0.05$ , a partir de la administración de 8  $\mu\text{M}$  (Cuadro 1).

## 6.2. EXPERIMENTO 2.

### EFECTO DE LA AGOMEL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL TEJIDO DUODENAL

Los resultados de este experimento se obtuvieron bajo condiciones similares al experimento 1.

Tanto la frecuencia FREC, AMP y ABC durante el registro de las contracciones, mostraron cierta variabilidad en los diferentes segmentos. Se obtuvieron FREC, AMP y ABC promedios basales (Figura No. 16) y promedios con cada una de las concentraciones en valores absolutos y porcentajes (Cuadro 3).

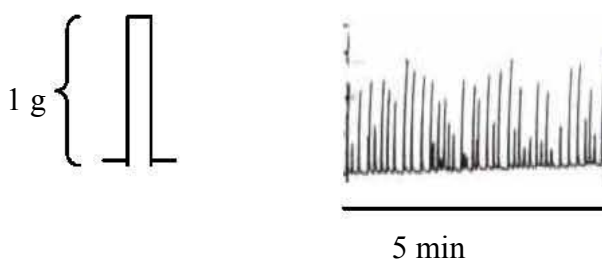


Figura No 16. En el registro se observa el tono basal y las contracciones duodenales. Se muestra el pulso de calibración equivalente a 1 g, y el tiempo de duración.

Al administrar concentraciones crecientes de AGOMEL, aplicadas a la cámara donde estaba sumergido el tejido, se presentó una disminución de forma gradual de la AMP y ABC de la contracción espontánea del tejido duodenal (Figura No. 17) lo que indica que este efecto es dependiente de la concentración de AGOMEL administrada, sin embargo la FREC se presentó sin cambios significativos.

Así, en presencia de diferentes concentraciones de AGOMEL, los valores obtenidos para FREC, AMP y ABC se muestran en el cuadro 2 y gráficas 4, 5, 6.

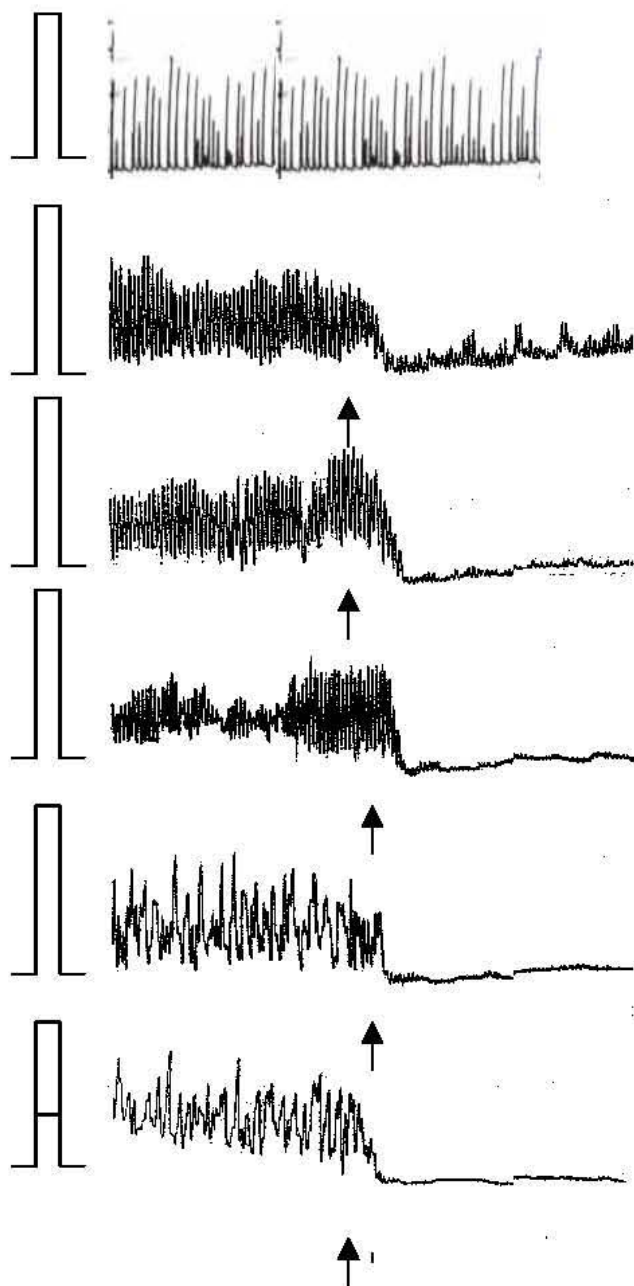


Figura No. 17. Registro de respuesta duodenal donde se observa la inhibición de la contracción duodenal con 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de AGOMEL, la flecha indica el momento de la administración. El tiempo de registro fue de 5 min pre y postadministración. El pulso de calibración es de 1 g de tensión, que equivale a 2 cm de desplazamiento de la pajilla inscriptora.



CUADRO No. 2

AGOMEL $\mu\text{M}$	Log [ ]	X FREC (seg)	% FREC	X ♠AMP	% AMP	E.E.M.	X ABC	% ABC
0	0	0.45	100	68.13	100	-	643.73	100
1	0	0.45	100.00	57.28	84.07*	0.08	207.41	32.22*
2	0.30	0.52	115.56	42.81	62.84*	0.05	276.87	43.01*
4	0.602	0.48	106.67	45.51	66.80*	0.06	150.44	23.37*
8	0.903	0.49	108.89	42.91	62.98*	0.05	199.62	31.01*
16	1.2041	0.48	106.67	39.48	57.95*	0.03	165.06	25.64*
32	1.5051	0.44	97.78	46.30	67.96*	0.01	128.87	20.02*

Se presenta la FREC, AMP, ABC y sus respectivos porcentajes de respuesta de duodeno con AGOMEL a diferentes concentraciones.

E.E.M. = Error Estándar de la Media

$P < 0.05 = *$  (nivel de significancia)

**Nota:**  $0\mu\text{M} = \text{BASAL}$

♠Unidades de AMP= gramos.

ABC= Sin unidades

En el análisis estadístico los datos se expresaron como  $X \pm$  E.S.M. estadístico realizado, usando la t de Student pareada mostró que la diferencia en la AMP de la contracción basal y con las diferentes concentraciones de AGOMEL es significativa.

La adición de AGOMEL en concentraciones graduales al tejido dentro de la cámara, provocó una disminución de la respuesta del tejido duodenal, o sea produjo una relajación gradual.

Los efectos “relajantes” de la respuesta de contracción provocados por AGOMEL se manifestaron principalmente durante la contracción (Grafica 5).

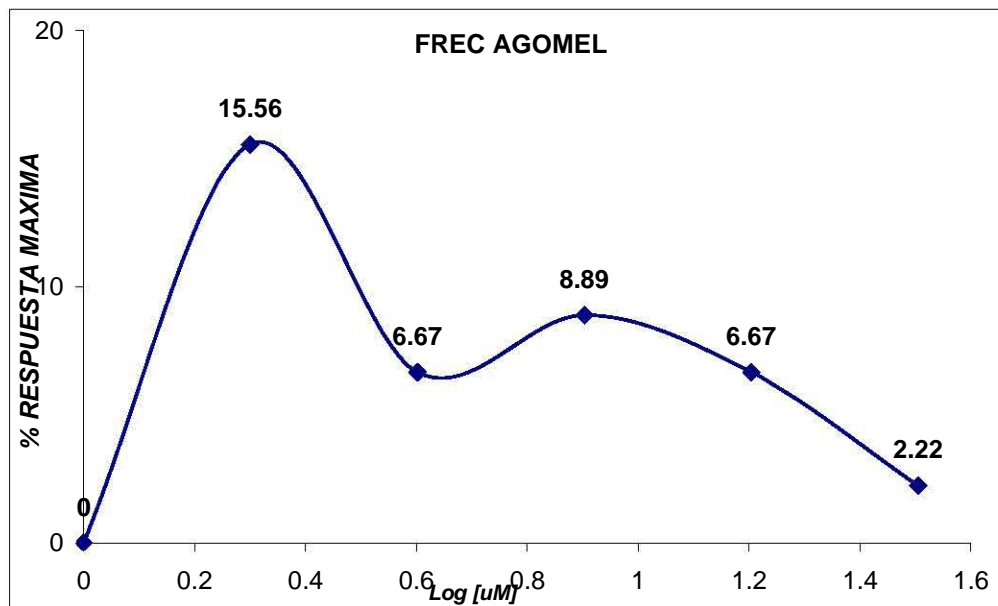
El efecto producido por AGOMEL sobre la contracción espontánea del tejido duodenal

consistió en la inhibición de AMP de la contracción, en un rango de magnitud que va de 15.93 al 32.04% de la contracción duodenal espontánea (Cuadro 2) cuando estos datos se relacionan a través de una curva logarítmica: Log de la concentración Vs % de Respuesta Máxima (RM), se traza una línea recta en la pendiente mediante una transformación matemática de los datos a porcentajes, para ello se consideró el valor de la AMP basal de contracción como el 100%, (Gráfica 5). Con esta curva se calculó la [AGOMEL] que inhibe el 50% de la actividad muscular espontánea del tejido duodenal, obteniéndose un valor de  $CI_{50} = 4.2169 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ . También, esta curva sugiere la existencia de una relación lineal entre la [AGOMEL] y la disminución de la contracción muscular; lo que indica que el efecto inhibitor de la AGOMEL es gradualmente dependiente de la concentración (Gráficas 3 y 7).

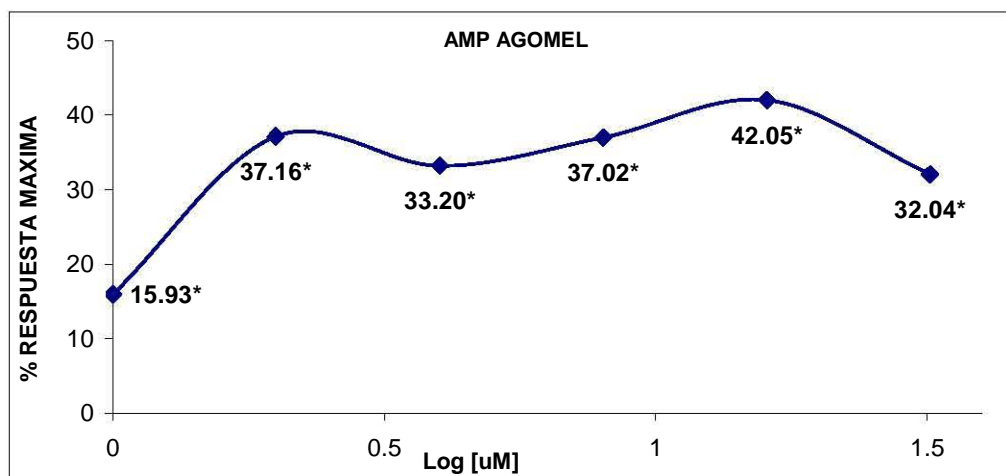
Para analizar la FREC y determinar cuantitativamente el efecto de la AGOMEL sobre la actividad espontánea, los datos se refirieron como un porcentaje de la inhibición (relajación) máxima, de la FREC máxima o del ABC máxima. Con los valores obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad espontánea que produjeron los diferentes concentraciones de AGOMEL.

La prueba estadística t Student mostró que la diferencia en la AMP y en el ABC es significativa  $P < 0.05$  a todas las concentraciones de AGOMEL.

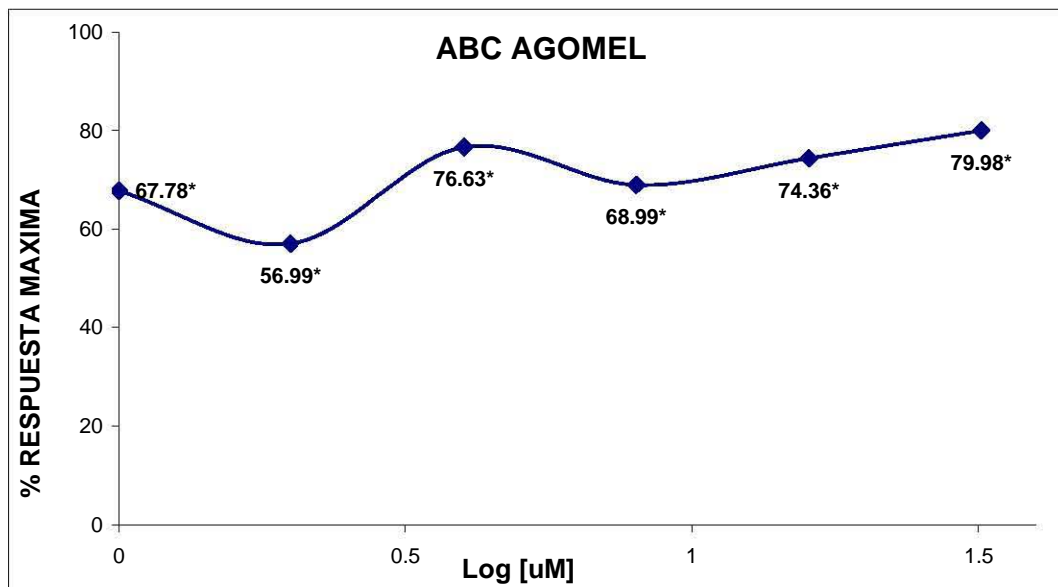
El análisis estadístico mostró que la diferencia observada en la inhibición de la contracción en ABC basal y en presencia de diferentes concentraciones de AGOMEL es significativa  $P < 0.05$  a partir de la administración de  $1 \mu\text{M}$  (Cuadro 2 y gráfica 6)



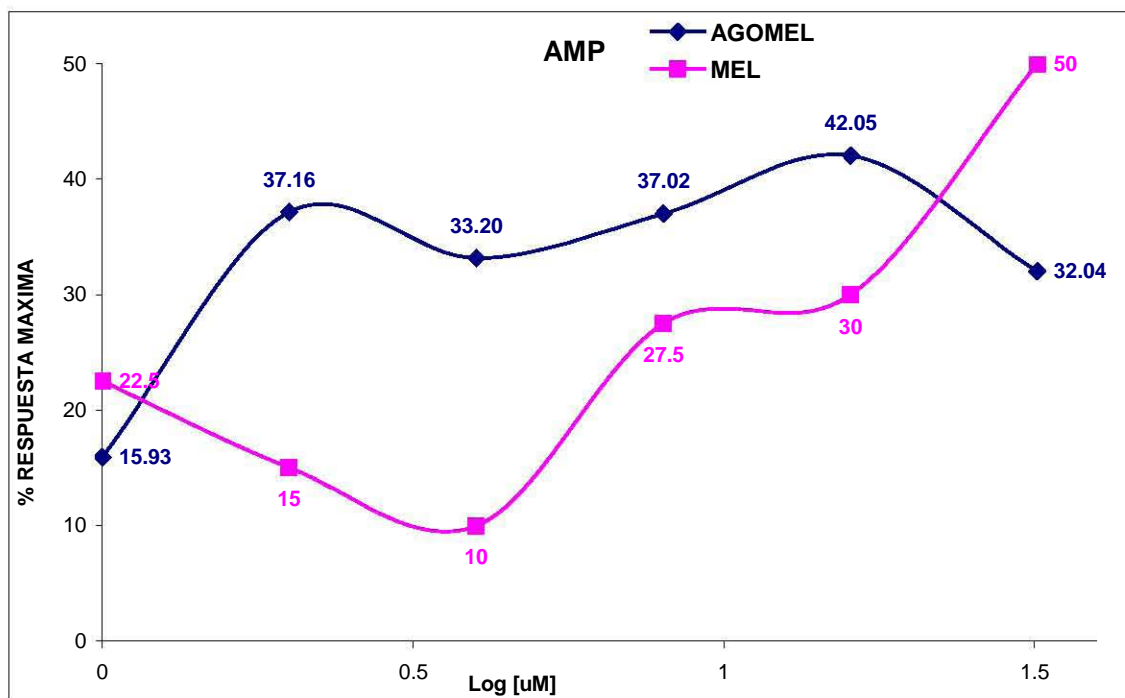
Gráfica No. 4. Curva dosis-respuesta gradual con AGOMEL a diferentes concentraciones sobre la FREC de contracción y porcentaje de respuesta máxima en duodeno.



Gráfica No. 5. Curva dosis-respuesta gradual con AGOMEL a diferentes concentraciones sobre el porcentaje de la AMP de respuesta de duodeno.



Gráfica No. 6. Porcentaje de relajación (ABC) de duodeno con AGOMEL a diferentes concentraciones y su correspondiente curva dosis-respuesta gradual.



Gráfica No. 7. Se representa la respuesta comparativa en porcentaje de AMP de la contracción de duodeno con MEL (■) y AGOMEL (◆) a diferentes concentraciones.

### 6.3. EXPERIMENTO 3

#### EFFECTO DEL ACIDO GAMMA-AMINOBUTIRICO (GABA) SOBRE LA CONTRACCIÓN DUODENAL.

Los registros se obtuvieron de la misma forma que los experimentos anteriores tanto la FREC como la AMP y ABC durante el registro de las contracciones, mostraron cierta variabilidad en los diferentes segmentos. Se obtuvieron FREC, AMP y ABC promedios (absoluto y porcentajes) que se muestran en el cuadro 3.

Al administrar las diferentes concentraciones de GABA, se presentó un cambio gradual de la AMP, FREC y ABC de la contracción espontánea del tejido duodenal (Figura No.18) lo que indica que este efecto es dependiente de la concentración de GABA administrada.

La FREC de la contracción, también, disminuyó de forma gradual en relación al incremento de las concentraciones de GABA aplicadas a la cámara donde estaba sumergido el tejido (Gráfica 8).

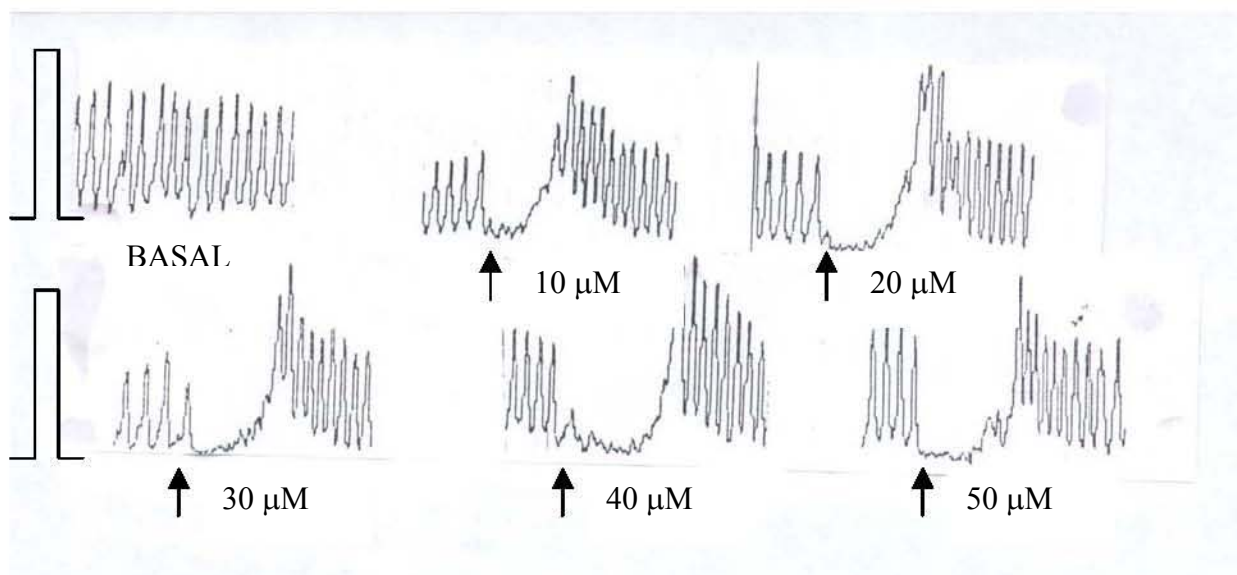


Figura No. 18. Contracción duodenal con administración de 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu\text{M}$  de GABA; las flechas indican el momento de la administración. . El tiempo de registro fue de 5 min pre y postadministración. El pulso de calibración es de 1 g de tensión, que equivale a 2 cm de desplazamiento de la pajilla inscriptora.

Así en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de GABA, la frecuencia fue de 0.33/seg., con 20 fue de 0.33/seg., con 30 de 0.34/seg., con 40 mM fue de 0.33/seg. y con 50  $\mu\text{M}$  fue de 0.34/seg. (Cuadro 3).

**CUADRO No. 3**

GABA $\mu\text{M}$	Log [ ]	E.E.M.	X Frecuencia (seg)	% Frecuencia	X Amplitud	% Amplitud	X ABC	% ABC
0	0	-	0.38	100	0.46	100	321.09	100
10	1	0.051	0.33	86.8*	0.47	103.7	367.70	114.51
20	1.3	0.053	0	0.33	0.44	97.3	323.88	100.87
30	1.4	0.159	7	0.34	0.47	97.3	386.32	120.32*
40	1.6	0.065	0	0.33	0.47	103.6	400.51	124.73*
50	1.6	0.127	9	0.34	0.47	103.0	454.77	141.63*

Efecto producido por GABA sobre FREC, AMP y ABC, con sus porcentajes respectivos a diferentes concentraciones en duodeno.

E.E.M. = Error Estándar de la Media

$P < 0.05 = *$  (nivel de significancia)

En el análisis estadístico los datos se expresaron como  $X \pm$  E.S.M. se utilizó la t de Student que mostró diferencias significativas en la FREC de la contracción basal así como en las diferentes concentraciones de GABA ( $P < 0.05$ ).

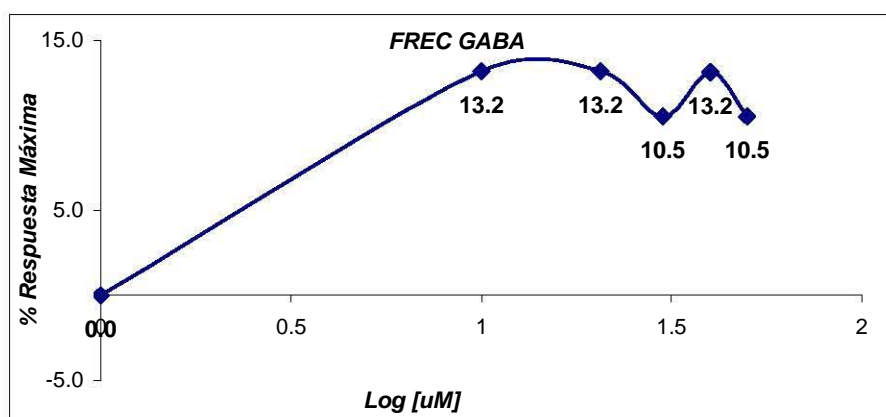
La adición de GABA al tejido dentro de la cámara en concentraciones graduales, provocó un aumento del ABC de las contracciones del tejido duodenal.

Los efectos de la respuesta de contracción provocados por GABA se manifestaron

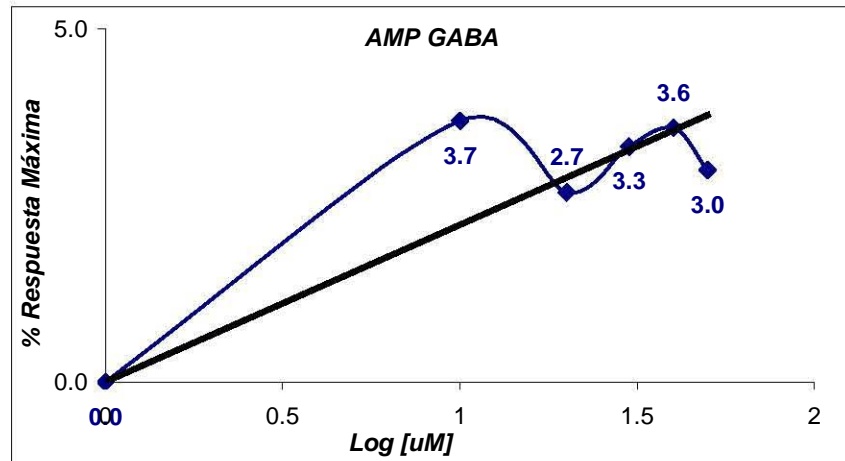
principalmente durante la contracción (Figura No. 18).

El efecto producido por GABA sobre la contracción espontánea del tejido duodenal consistió en el aumento de ABC de la respuesta duodenal espontánea, (Cuadro 3) cuando estos datos se relacionan a través de una curva logarítmica: log de la concentración Vs % de RM, se observa una relación lineal. Para analizar la gráfica y determinar cuantitativamente el efecto de GABA sobre la actividad espontánea, se realizó una transformación matemática de los datos  $X \pm E.S.M.$  y porcentajes, para ello se consideró el valor de la AMP basal o de la FREC de la contracción como el 100%, por lo que estos parámetros registrados en presencia de GABA se refirieron como un porcentaje de la Respuesta Máxima, de la FREC máxima o del ABC máxima (gráficas 9 y 10). Con los valores obtenidos, se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad espontánea que produjeron las diferentes concentraciones de GABA en tejido duodenal (Cuadro 3).

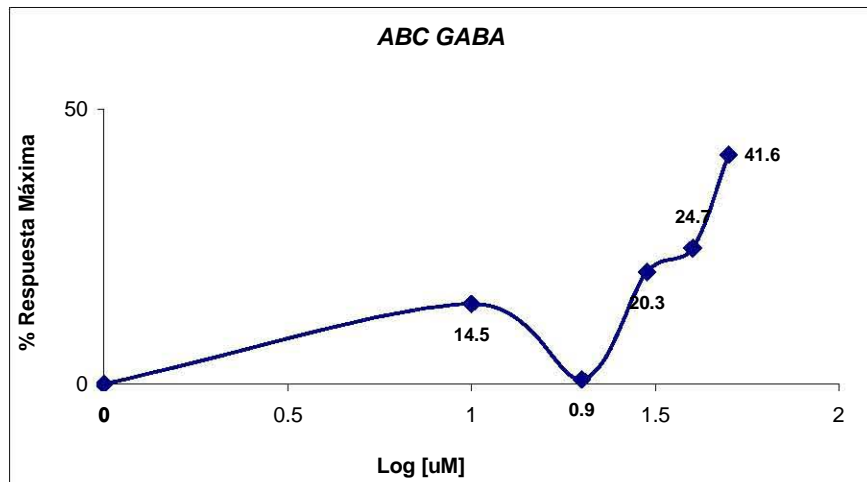
El análisis estadístico mostró que la diferencia observada en la AMP de la contracción basal y en presencia de las diferentes concentraciones de GABA no es significativa  $P < 0.05$  en todas las concentraciones.



Gráfica No. 8. Curva dosis-respuesta gradual de GABA a diferentes concentraciones sobre la FREC de contracción y porcentaje de respuesta máxima en duodeno.



Gráfica No. 9. Curva dosis-respuesta gradual con GABA a diferentes concentraciones sobre AMP y porcentaje de relajación de duodeno.



Gráfica No. 10. Porcentaje de relajación ABC de duodeno con GABA a diferentes concentraciones y su correspondiente curva dosis-respuesta gradual.



#### 6.4. EXPERIMENTO 4.

### EFFECTO DE LA INTERACCION DE MELATONINA Y GABA SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA DUODENAL

De la misma forma que en los experimentos anteriores, el tono de la contracción duodenal alcanzó un nivel basal, el cual se mantuvo durante el tiempo que duró el experimento. La administración simultánea de concentraciones crecientes de GABA asociada a MEL (32  $\mu$ M) ocasionaron una modificación de la respuesta, que mostró una relación directa con cada una de las diferentes concentraciones de GABA administrada (Figura No.19).

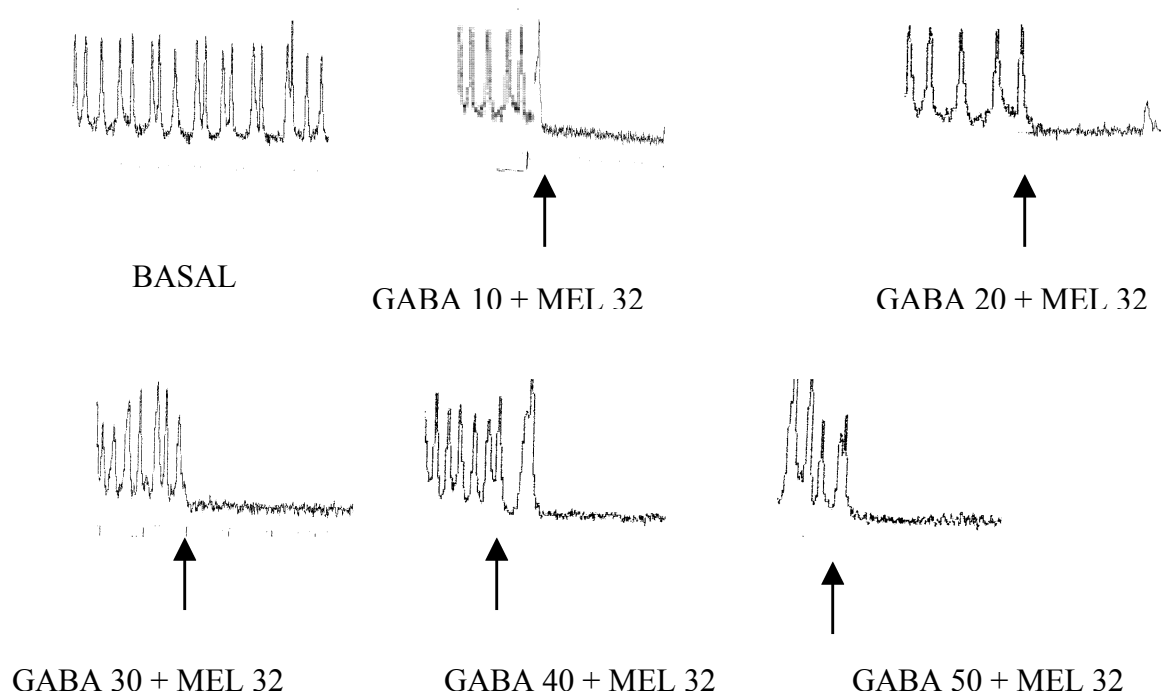


Figura No. 19. En los registros se observa la respuesta de la contracción duodenal basal y con 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ M de GABA asociadas a 32  $\mu$ M (concentración constante) de MEL. . El tiempo de registro fue de 5 min pre y postadministración. El pulso de calibración es de 1 g de tensión, que equivale a 2 cm de desplazamiento de la pajilla inscriptora. Las flechas indican el momento de la administración.

CUADRO No. 4

Log GABA	GABA+MEL ( $\mu$ M)	E.E.M.	X FREC (seg)	% X FREC	X AMP	% X AMP	X ABC	% X ABC
0	0	-	0.16	100	0.51	100	155.95	100
1	1:32	0.025	0.29	181.25*	0.50	98.04	59.86	38.38*
1.301	2:32	0.081	0.34	212.50*	0.49	96.07	97.14	62.29*
1.477	3:32	0.072	0.31	193.75*	0.53	103.92	130.1	83.42*
1.602	4:32	0.061	0.26	162.50*	0.54	105.88	133.59	85.66
1.698	5:32	0.085	0.21	131.25*	0.50	98.03	175.52	112.55

FREC, AMP y ABC con porcentaje respectivos, provocados por MEL+GABA a diferentes concentraciones en duodeno.

E.E.M. = Error Estándar de la Media

P < 0.05 = \* (nivel de significancia)

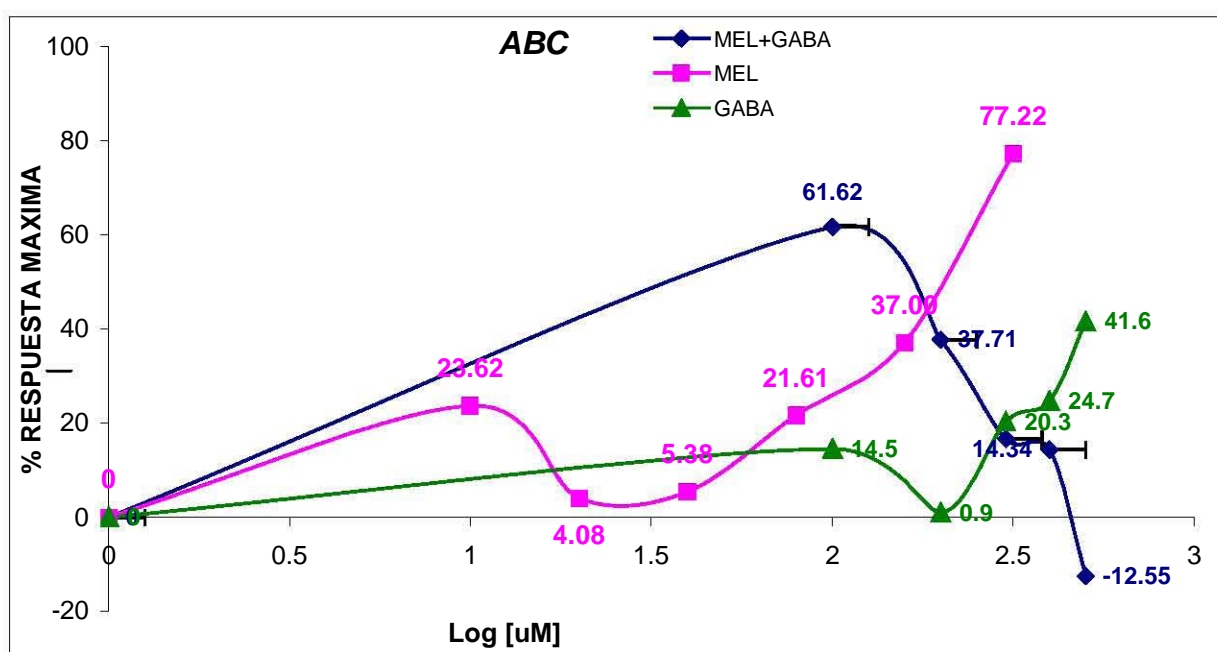
Todos los resultados en todos los experimentos, se transformaron en porcentajes de la máxima respuesta, para cada uno de los tejidos. En el cuadro 5 se muestra el porcentaje de RM correspondiente a cada una de las concentraciones de MEL y GABA (Cuadro 4).

En el caso de ABC de la repuesta duodenal, la menor concentración de GABA más MEL (Cuadro 5) provocó una respuesta promedio de 59.86 g.  $\pm$  0.1; mientras que con 20  $\mu$ M de concentración, se obtuvo un promedio de 97.14 g.  $\pm$  0.1, en la concentración de 30  $\mu$ M de GABA y MEL (32  $\mu$ M) el ABC disminuyó a 130.1 g.  $\pm$  0.1 con respecto a la basal, a 40  $\mu$ M de GABA; el ABC fue de 133.59 g.  $\pm$  0.1 y por último a la mayor concentración de GABA 50  $\mu$ M con MEL (320  $\mu$ M), el ABC fue de 175.52 g.  $\pm$  0.1 (Gráfica 11).

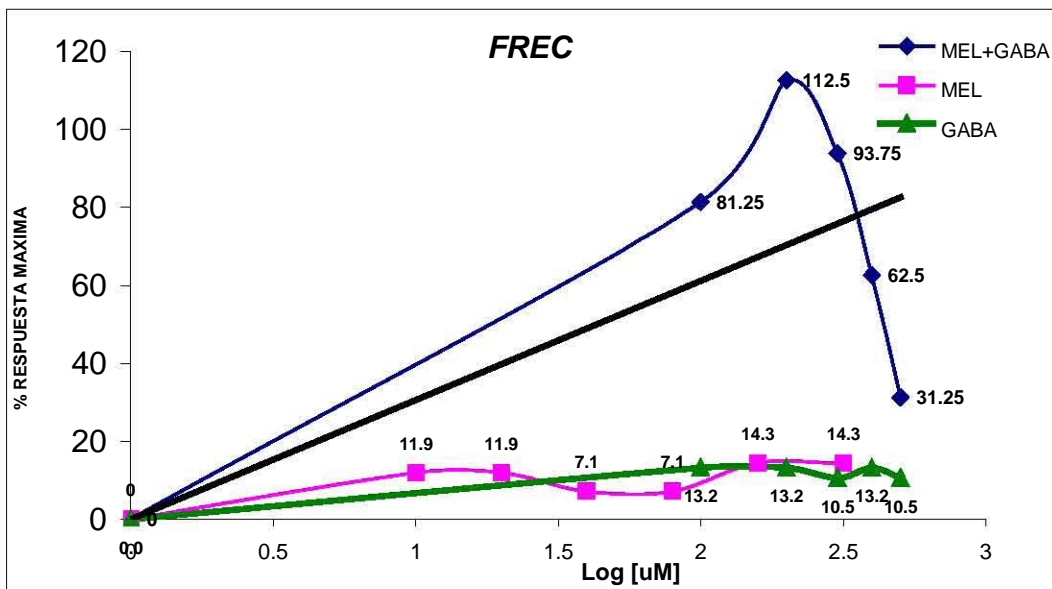
Con respecto a la frecuencia la respuesta se presentó de forma inmediata. Al añadir esta combinación de sustancias se produjo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de contracción en relación a la producida por las sustancias administradas en forma aislada, cuadro 4 y Grafica 12.

Por otro lado, en el cuadro 4 y en la gráfica 13 se muestran los valores obtenidos al adicionar ambas sustancias donde se observa disminución de la AMP en relación a la producida por las sustancias administradas en forma aislada.

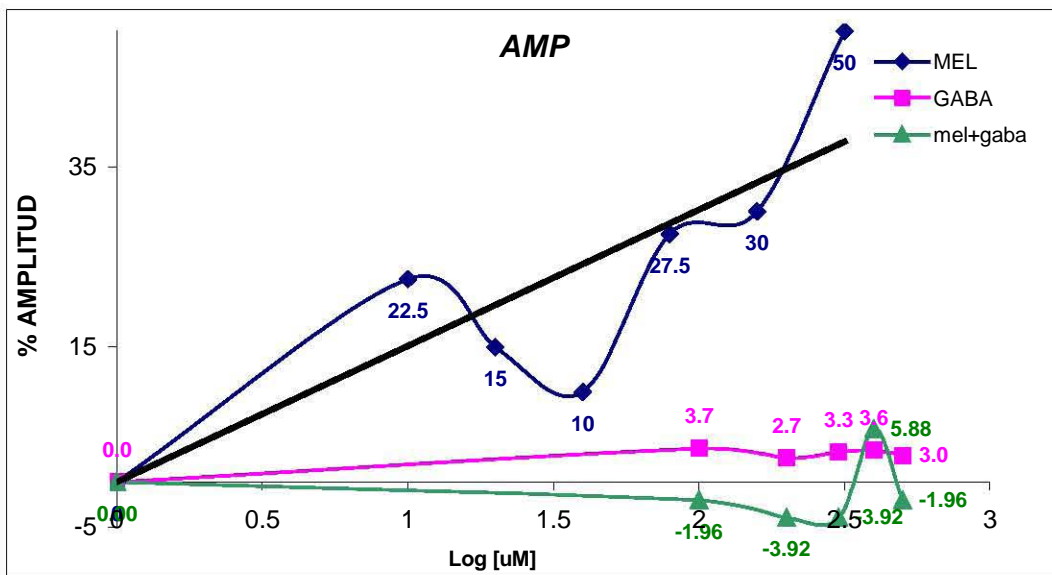
Al calcular la concentración inhibidora efectiva 50 de MEL en ausencia de GABA a partir de la curva obtenida, se obtuvo un valor de  $5.623 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ; mientras que en presencia de GABA, la CI50 obtenida para MEL+GABA fue mucho mayor que la obtenida para MEL, por lo que se observa un desplazamiento de la curva hacia la derecha. El efecto se observa con todas las concentraciones (Gráfica 12).



Gráfica 11. Comparación del porcentaje de respuesta ABC de MEL (concentración cte.) más GABA a concentraciones crecientes (◆), esta curva se desplaza a la derecha con respecto a la curva de MEL en ausencia de (■)GABA.



Gráfica No. 12 Frecuencias modificadas por la administración asociada de MEL 32 µM mas diferentes concentraciones de GABA, relación del efecto en ausencia y presencia de cada fármaco (N=8).



Gráfica No. 13. Porcentaje de la amplitud máxima de la actividad muscular inducida por MEL+GABA (▲) y por MEL [32 µM] en ausencia de GABA (◆) y por GABA a diferentes concentraciones en ausencia de MEL (■) en duodeno de rata (N=8)

## 6.5. EXPERIMENTO 5.

### EFFECTO DE LA INTERACCION DE MELATONINA Y FLUMAZENIL SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA DUODENAL

Para analizar el efecto de la MEL y FLU, se realizaron experimentos de la misma forma que en los experimentos anteriores, en donde el tono de la contracción muscular alcanzó un nivel basal, la cual se mantuvo durante el tiempo que duró el experimento. La administración de las diferentes concentraciones de MEL y FLU a concentración constante (32  $\mu$ M). Se observa una modificación gradual a las diferentes concentraciones de MEL, tal variación (relajación) también, mostró una relación directa con la concentración de FLU administrada (Figura No. 20).

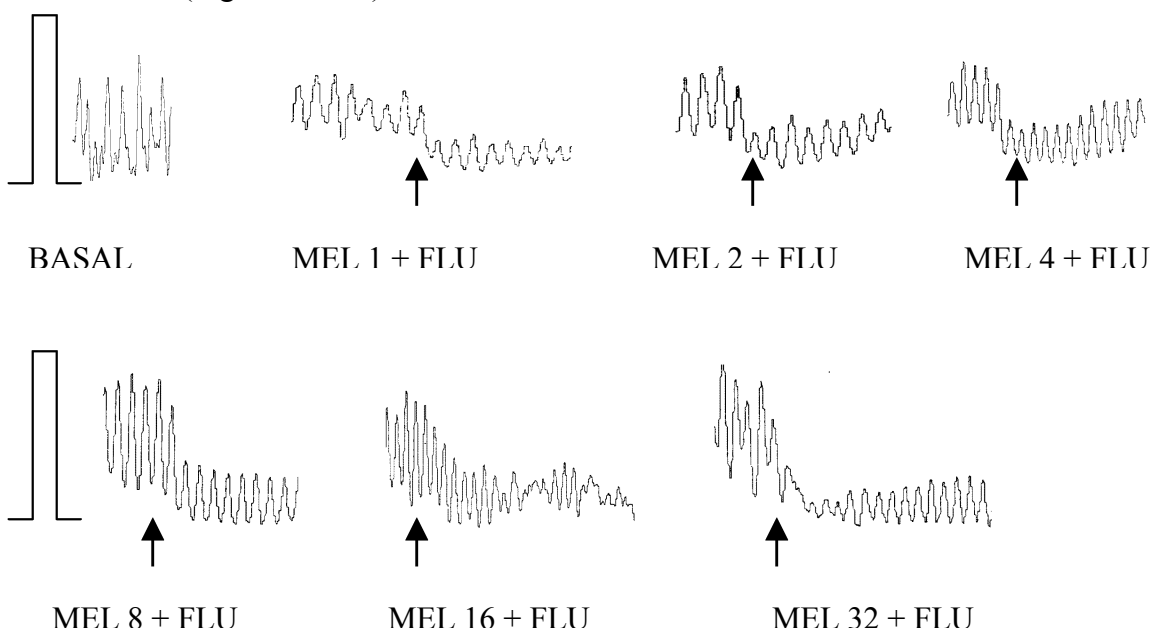


Figura No. 20.. En los registros se observa la respuesta de la contracción duodenal basal y con 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu$ M l de MEL asociadas a 32  $\mu$ M de FLU. . El tiempo de registro fue de 5 min pre y postadministración. El pulso de calibración es de 1 g de tensión, que equivale a 2 cm de desplazamiento de la pajilla inscriptora.

CUADRO No. 5

MEL+FL								
Log [MEL]	U ( $\mu$ M)	E.E.M.	X FREC	% X FREC	X AMP	% X AMP	X ABC	% X ABC
	0:0	-	0.33	100	0.524	100	885.97	100
0	1:32	0.09	0.46	139.4*	0.524	100	654.67	73.89
1	2:32	0.09	0.44	133.3*	0.489	93.3	560.39	63.25
1.301	4:32	0.01	0.46	139.4*	0.535	102.0	659.27	74.41
1.477	8:32	0.04	0.49	148.5*	0.570*	108.6	628.2	70.91
1.602	16:32	0.002	0.44	133.3*	0.543	103.4	428.32	48.34
1.698	32:32	0.03	0.44	133.3*	0.544	103.6	201.72	22.77

FREC, AMP y ABC modificadas por la administración asociada de MEL a concentraciones crecientes mas FLU 32  $\mu$ M.

E.E.M. = Error Estándar de la Media

P < 0.05 = \* (nivel de significancia)

Con respecto a la frecuencia la respuesta se presentó de forma inmediata. Al añadir esta combinación de sustancias se produjo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de contracción con respecto a la basal y en relación a la producida por las sustancias administradas en forma aislada, cuadro 5 y Grafica 14.

Todos los resultados en todos los experimentos, se transformaron en porcentajes de la máxima respuesta, para cada uno de los tejidos. En el cuadro 5 se muestra el porcentaje de respuesta, correspondiente a cada una de las concentraciones de MEL y FLU.

Por otro lado, en la gráfica 15 se muestran los valores obtenidos al adicionar ambas sustancias donde se observa disminución de la AMP en relación producida por las sustancias administradas en forma aislada.

En el caso de la fuerza o tono de la contracción duodenal, la respuesta obtenida por

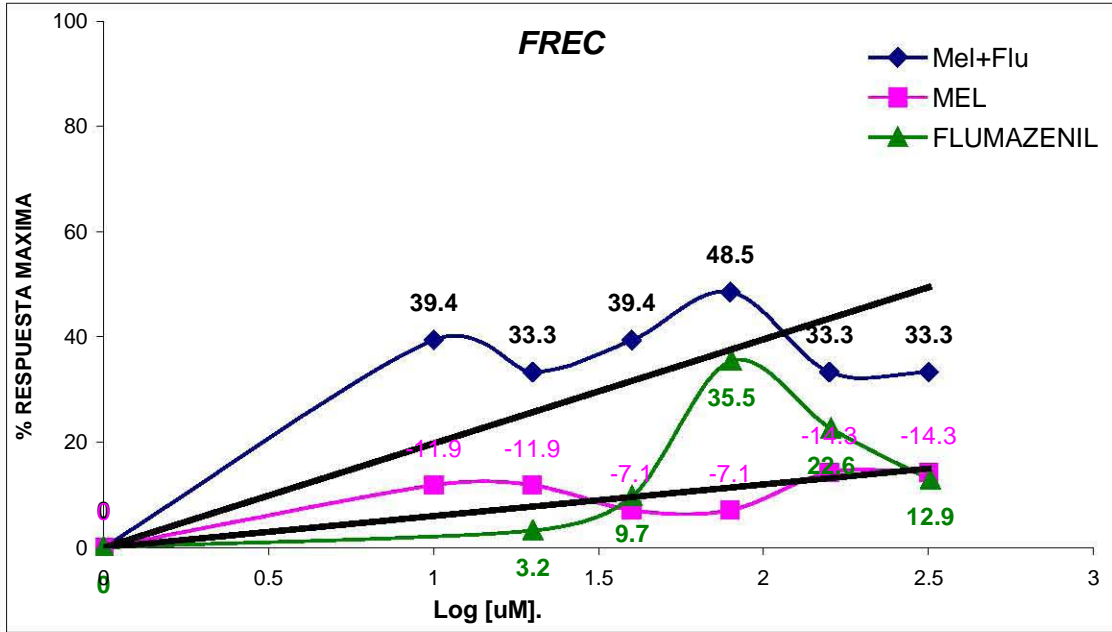
---

MEL en presencia de FLU consistió en una disminución inicial y un aumento posterior de amplitud de la contracción, en un rango de magnitud que va de  $-6.7\%$  al  $+3.6\%$  de la respuesta, como se muestran en el cuadro 5, cuando estos datos se relacionan a través de una curva logarítmica: Log de la concentración Vs % R M, se observa que la curva semeja en la porción superior una sigmoidea y se observa una relación lineal (Grafica 15).

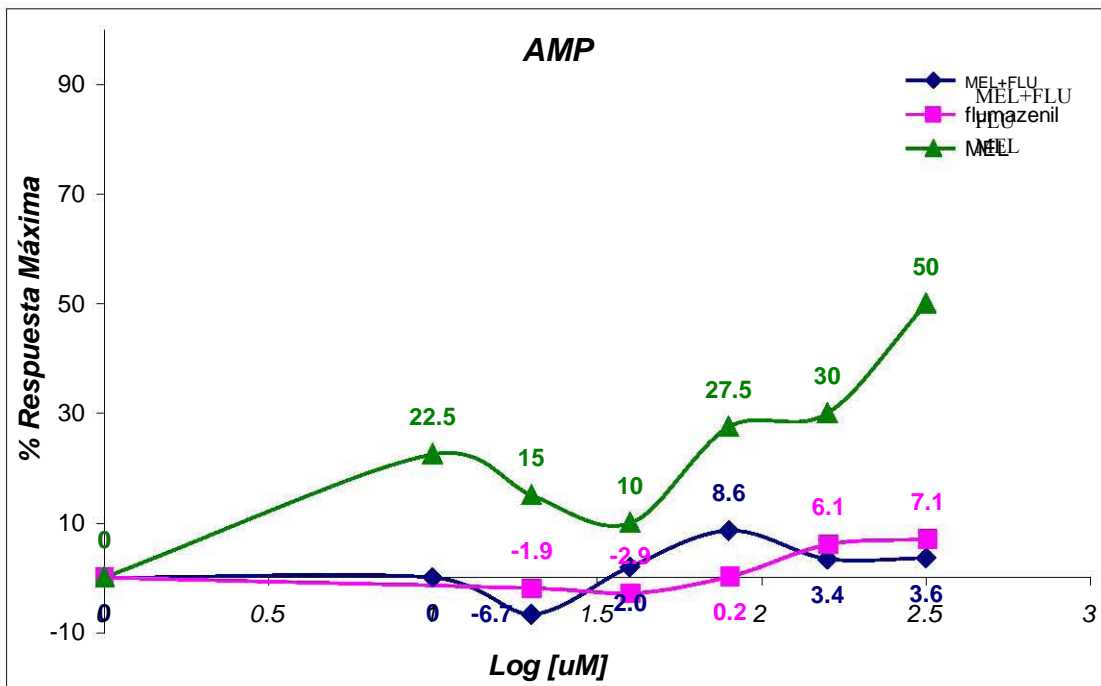
Para analizar la grafica y determinar cuantitativamente el efecto de la MEL asociada a FLU sobre la actividad espontánea, se realizó una transformación a porcentajes de los datos, para ello se consideró el valor de la amplitud basal de la contracción como el  $100\%$ , por lo que estos parámetros registrados se refirieron como un porcentaje de la respuesta máxima.

En el caso de la ABC de la contracción muscular duodenal, la menor concentración de MEL mas FLU provocó un promedio de  $73.89\%$  en ABC; mientras que en la siguiente concentración, la respuesta fue de  $63.25\%$ ; con  $40\ \mu\text{M}$  de MEL y FLU (Cte.) el ABC fue  $74.41\%$ ; en la siguiente concentración de  $80\ \mu\text{M}$  de MEL con FLU el ABC fue de  $70.91\%$ ; con  $160\ \mu\text{M}$  de MEL con FLU la respuesta fue de  $48.34\%$  y por ultimo en la mayor concentración de MEL  $320\ \mu\text{M}$  con FLU constante, el ABC fue de  $22.77\%$  (Gráfica 16).

Al calcular la concentración efectiva 50 (en presencia de MEL y en ausencia de FLU) a partir de la curva obtenida, se obtuvo un valor de  $5.623 \times 10^{-3}\ \mu\text{M}$ ; la CE50 obtenida para MEL+FLU fue mucho mayor que la de MEL. La diferencia entre ambas curvas, indica un gran desplazamiento de la curva hacia la derecha. El efecto se observa con todas las dosis.

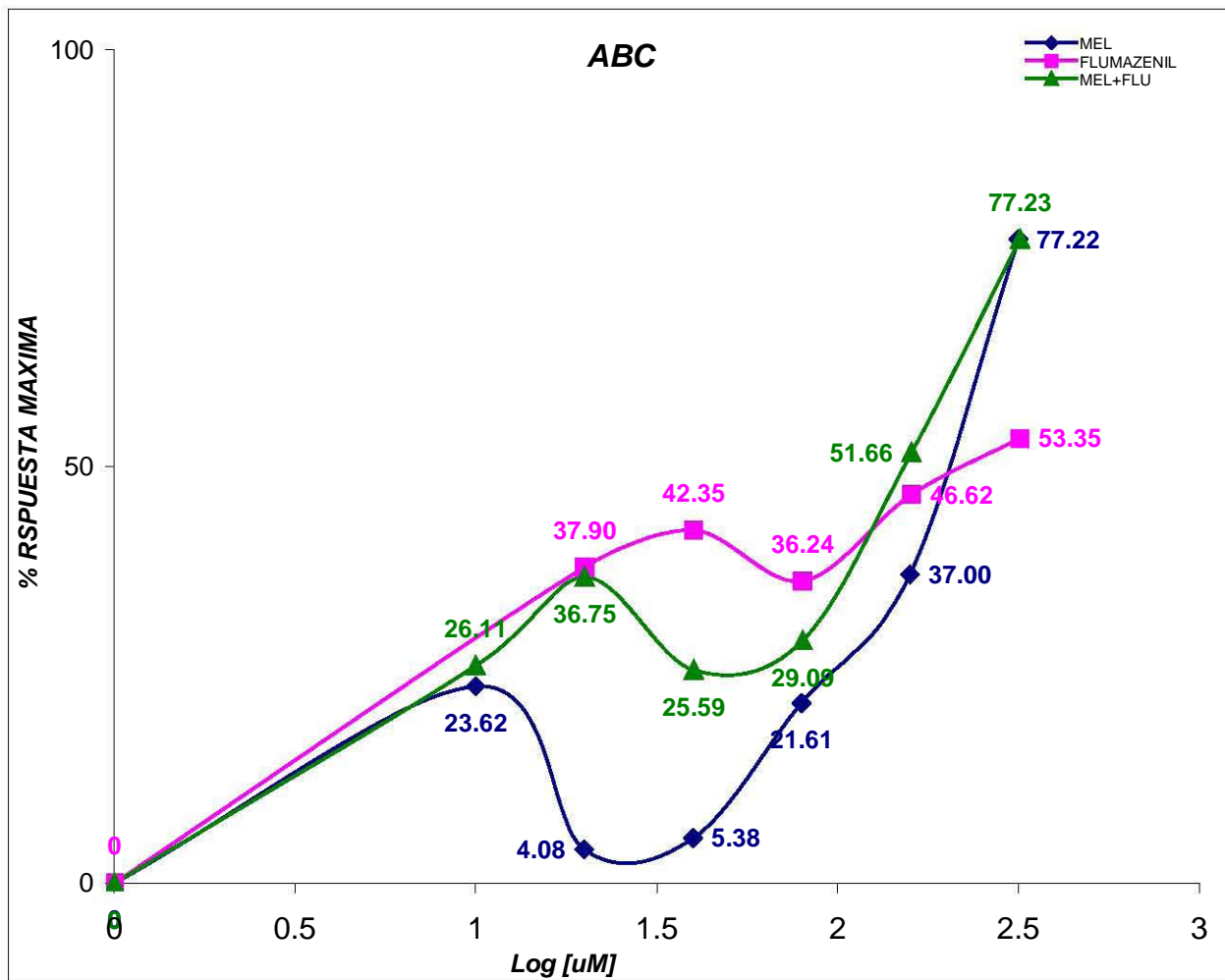


Gráfica No. 14. Porcentaje de la frecuencia de actividad muscular inducida por MEL a diferentes concentraciones mas FLU en concentración constante ( ) y por MEL [320µM] en ausencia de FLU ( ) y por Flumazenil en ausencia de MEL ( ) en duodeno de rata (N=8)



Gráfica No.15. Porcentaje de AMP máxima de la actividad muscular inducida por MEL+FLU ( ) por FLU a diferentes concentraciones en ausencia de MEL ( ) y por MEL en concentraciones crecientes en ausencia de FLU ( ) en duodeno de rata (N=4)





Gráfica 16. Porcentaje de ABC máxima de la actividad muscular inducida por MEL+FLU (▲), por FLU a diferentes concentraciones en ausencia de MEL (■), y por MEL en concentraciones crecientes en ausencia de FLU (◆) en duodeno de rata (N=4)

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se caracterizó el efecto de MEL, AGOMEL Y GABA, en preparaciones de duodeno aislado de rata. En este tejido, mediante la aplicación de concentraciones farmacológicas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  para MEL, y AGOMEL y para GABA, concentraciones de 10, 20, 30 40 y 50  $\mu\text{M}$ , se obtuvieron curvas de concentración contra porcentaje de respuesta en forma gradual (140) y de esta forma se obtuvieron las concentraciones de inhibición de la respuesta al 50 % (CI50) para las sustancias utilizadas.

En resumen con todas las sustancias, realizamos dos tipos de experimentos, uno en el que se analizó, el efecto que producían en el duodeno aislado de rata cuando se aplicaban de forma independiente, y otro en el que se analizó el efecto de las mismas sustancias cuando se aplicaban simultáneamente y así, caracterizar el efecto de interacción de fármacos con las relaciones MEL-GABA, MEL-FLU y GABA-FLU.

Cabe mencionar que el FLU, se utilizó como control positivo para semejar el efecto de GABA y caracterizar su interacción con MEL en la contracción de duodeno aislado ya que es una antagonista de GABA (26, 38).

La aplicación de la MEL sobre la contracción espontánea, presentó un efecto bifásico, ya que a bajas concentraciones produjo contracción del tejido y a altas concentraciones, relajación del mismo. Inicialmente se presentó un incremento para disminuir significativamente ( $p < 0.05$ ), la AMP, FREC y ABC, en forma gradual y dependiente de la concentración. Con 1  $\mu\text{M}$  de MEL se inhibe el 22.5 % de la AMP de la contracción espontánea, en tanto que la concentración máxima de MEL empleada (32  $\mu\text{M}$ ) si provocó una inhibición de la respuesta, mayor al 50%, con una reducción del 14.3 % en la FREC. La

disminución de la AMP, FREC y ABC analizadas estadísticamente son significativas ( $P < 0.05$ ).

Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores y con otros tejidos, así por ejemplo Harlow (57), Semercioz (132) reportan ambos, que la MEL inhibe la actividad espontánea de los tejidos duodenal y urinario.

Sin embargo, también, hay estudios (89) que muestran que la MEL no modifica la FREC de la contracción espontánea del intestino delgado, de manera similar a lo que reporta Semercioz en conducto urinario (132), pero la mayoría de los autores muestran resultados similares a los encontrados en este estudio.

En esta parte del experimento el análisis de la relación concentración-respuesta refleja una  $CI_{50}$  de  $0.005623 \mu\text{M}$ , así como una relación gradual entre la concentración de MEL en el parámetro de la AMP de la respuesta duodenal, de tal manera que puede inferirse que la MEL disminuye la AMP de la contracción de manera dependiente de la concentración ( $p < 0.05$ ).

Desde hace más de 30 años, los estudios realizados con músculo liso mostraron el efecto inhibitor que la MEL ejerce sobre la contracción espontánea de diversas especies y tejidos como útero (31, 154), duodeno de ratas (114), íleo (16), intestino delgado (57, 117), así como en conducto deferente de rata (104) y tejido bronquial (19). La magnitud del efecto inhibitor difiere entre si en estos estudios, sugiriendo con ello que cada uno de los tipos de musculatura lisa muestran una sensibilidad propia al efecto de MEL. Todos estos estudios han contribuido a caracterizar los efectos de la MEL sobre las propiedades mecánicas y eléctricas del músculo liso, sugiriendo una acción a nivel neurogénico y miogénico (17, 104), sin embargo, el mecanismo por el cual ejercen estos efectos aún no está totalmente claro.

Por otro lado, las respuestas obtenidas cuando se aplicó AGOMEL al tejido aislado a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$ ), fueron de inhibición de la contracción del duodeno, por lo que inferimos que produce un efecto similar al producido por MEL sobre este tejido. Esta respuesta de inhibición de la contracción por AGOMEL es mayor a la producida por MEL, lo que podría hablar de que la AGOMEL es “más potente” que la MEL en este tejido. Este es el primer reporte que se tiene con AGOMEL en tejido aislado.

Los resultados obtenidos con GABA (10, 20, 30 40 y 50  $\mu\text{M}$ ), sobre la actividad espontánea de duodeno presentaron un efecto bifásico transitorio, caracterizado por relajación seguido de una contracción. Los datos obtenidos para FREC, AMP y ABC concuerdan con los obtenidos por Kistev y cols., (82), Bayer y cols., (10). Este efecto se ve potenciado con la interacción de MEL asociado a GABA en este experimento.

Los principales efectos de la MEL se han asociado a eventos mediados a través de receptores membranales (43, 44), tanto a nivel del SNC como en tejidos periféricos (91); sin embargo, se han descrito también, otros mecanismos que incluyen procesos intracelulares (10a, 135a).

En el presente trabajo, la amplitud de la contracción inducida por MEL (32  $\mu\text{M}$ ) en presencia de GABA fueron significativamente menores que cuando se administran las mismas concentraciones de MEL en ausencia de GABA. Estos resultados permiten pensar que la MEL provoca un efecto que se disminuye conforme se incrementa el número de receptores ocupados, el comportamiento de la relación concentración- respuesta es mediada por un antagonismo farmacológico (competitivo o no) a nivel de receptor, sugiriendo que la MEL podría actuar tanto en receptores a GABA como en sus propios receptores (MEL) en tejido duodenal. En lo que respecta a los receptores a MEL en el tracto gastrointestinal de diversas

especies, Lee y Pang mostraron la presencia de receptores de baja afinidad en el ratón (84a). Por otro lado, las concentraciones utilizadas de MEL fueron de tipo farmacológico, porque a estas dosis se visualiza mejor el efecto que a dosis fisiológicas.

En cuanto a la administración de MEL en presencia de FLU, el efecto inhibitor inducido por MEL fue menor ( $p < 0.05$ ). El análisis de las curvas sugiere que el FLU modifica la actividad de receptores a GABA (96).

## 8. CONCLUSIONES

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 espontánea duodenal, dependiente de la concentración.
2. El efecto de la MEL sobre la contracción espontánea del músculo liso duodenal provoca una disminución de la AMP de la contracción de forma bifásica, siendo un efecto concentración dependiente.
3. La MEL reduce la FREC y ABC de la contracción espontánea del músculo liso duodenal dependiente de la concentración.
4. La AGOMEL, obtenido por ruta alterna, produce un efecto inhibitor de la contracción espontánea de músculo liso duodenal.
5. La AGOMEL posee mayor potencia pero menor eficacia que la MEL.
6. La MEL más GABA, disminuyen la actividad contráctil espontánea de duodeno que con MEL o GABA independientes.
7. La MEL más FLU producen inhibición de la respuesta contráctil, en menor grado que MEL sola.

---

**9. BIBLIOGRAFIA**

1. Adam C and Tannery P. Oeuvre de Descartes. Vol. XI, Librairie Philosophique J. Vrin, Paris, 1974.
2. Albertson TE, Peterson SL, Stark LG, Lakin ML, Winters WD. The aniconvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacol.*, 20:61-66,1981.
3. Arent J. Melatonin. *Clin. Endocrinol.*, 29:205-229, 1988.
4. Ariens EJ. *Molecular Pharmacology, a basis for drugs design.* 10: 429-529, 1966.
5. Ariens-Kappers, J. Short history of pineal discovery and research. *Prog. Brain. Res.*, 52:3-22, 1979.
6. Attemburrow ME, Cowen PJ, Sharpley LA. Low dose improves sleep in healthy middle-aged subjects. *Psychopharmacol.*, 126: 179-181, 1996.
7. Avendaño C. *Introducción a la Química Farmacéutica.* 3ª. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A. 1991, pp. 57-58.
8. Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science.* 1184: 1341-1348, 1974.
9. Bailey CJ, Atkins, TW and Matty, A.J. Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm. Res.*, 5:21-28, 1974.
10. Bayer S, Crenner F, Aunis D, and Angel F. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon. *Life Sci.*, 7 (8):911-925, 2002.
- 10a. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res.*, 40 (1): 1-9, 2006.
11. Bhatnagar KP, Hilton FK. Observations on the pineal gland of the big brown bat. *Eptesicus fucus*: possible correlation of melanin intensification with constant darkness. *Anat Rec.*, 240 (3):367-76, 1994.
12. Bindoni M and Rizzo R. Hippocampal evoked potentials and convulsive activity after electrolytic lesions of the pineal body, in chronic experiments on rabbits. *Arch. Sci Biol. (Bologna).* 49:223-233,1965.
13. Binkley S. *The Pineal: Endocrine and Nonendocrine Function.* Prentice Hall; Englewood Cliffs, NJ. 1988.
14. Binkley S, MacBride SE, Klein DC, Ralph CL. Pineal enzymes regulation of avian melatonin synthesis. *Science.* 181: 273-275, 1973.

15. Bubenik GA, Brown LG and Grotta LJ. Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia*, 33:662-663, 1977.
16. Bubenik, G.A. The effects of serotonin, N-acetylserotonin, and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestine. *J. Pineal Res.* 3:41-54, 1986.
17. Bubenick GA and Dhanvantari S. Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *J. Pineal Res.*, 7:378-381, 1989.
18. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, and Rollag MD. Action spectrum for melatonin regulation in humans: Evidence for a novel circadian photoreceptor. *J. Neurosci.*, 21:6405-6412, 2001.
19. Bruderman I, Rahamimoff R. Alterations in tracheobronchial smooth muscle activity follow melatonin. *J Appl. Physiol.*, 23: 938-943, 1967.
20. Cagnacci A, Elliot JA, and Yen SSC. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core body temperature in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74.: 447-452. 1992
21. Cagnacci A, Soldani R and Yen SSC. The effect of light on core body temperature is mediated by melatonin in women *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76: 1036-1038, 1993.
22. Cagnacci A, Soldani R, Laughlin GA, and Yen SSC. Modification of circadian body temperature rhythm during the luteal menstrual phase: role of melatonin. *J. Appl. Physiol.*, 80: 25-29, 1996.
23. Cardinali DP, Larin F and Wurtman RJ. Action spectra for effects of light on hydroxyindole-methyltransferases in rat pineal, retina, and harderian gland. *Endocrinol.*, 91:887-886, 1971.
24. Cardinali DP., Nagle CA., Rosner JM. Uptake and effects of melatonin on synthesis of proteins by the rat cerebral cortex. *Life Sci.*, 13:823-833, 1973.
25. Cardinali DP. Melatonin: a mammalian pineal hormone. *Endocrin. Rev.*, 12: 327-354, 1981.
26. Cardinali DP, Lowenstein PR, Rosenstein RE, Gonzalez-Solveira C, Keller-Sarmiento MI, Romeo HE and Acuña-Castroviejo D. Functional links between benzodiazepine and GABA receptors and pineal activity. *GABA and Endocrine Function*. Giorgio Racagni and Alfredo O. Donoso (eds). Raven Press. New York, 1986, pp.155-164.
27. Carlson LL, Weaver DR, and Reppert SM. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinol.*, 125:2670-2676, 1989.



- 
28. Carneiro RCG, Toffoleto O, Cipolla-Neto J and Markus RP. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 257:73-77, 1994.
  29. Castilla Serna L y Cravioto J. Estadística simplificada para la Investigación en Ciencias de la Salud. México, Editorial Trillas, 1991, pp. 442.
  30. Castilla Serna, L "Paquest" (paquete estadístico para PC). V 1.0, 1992.
  31. Cole WS, Garfield RE and Kirkaldy JS. Gap junction and direct intracellular communication between rat uterine smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 249 (Cell physiol 18):c20-31, 1985.
  32. Coloma FM and Niles LP. Melatonin enhancement of [3H]-aminobutyric acid and on [3H]-muscicol binding in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 37:1271-1274, 1988.
  33. Cramer HJ, Rudolph J, Consbruch U and Kendel K. On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. *Adv Biochem. Psychopharmacol.*, 11:187-191, 1974.
  34. Dafny, N. Electrophysiological evidence of photic, acoustic and central input to the pineal body and hypothalamus. *Exp. Neurol.*, 55:449-457, 1977.
  35. Dafny N. Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sci.*, 26:737-742, 1980.
  36. Datta C and King MG. Melatonin: Effects on brain and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 4:451-458, 1980.
  37. Davanger S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Immunocytochemical localization of GABA in cat myoenteric plexus. *Neurosci. Lett.*, 73:27-32, 1987.
  38. Defeudis FV. Psychoactive agents and GABA-receptors. *Pharmacol. Res. Commun.*, 15:29-39, 1983.
  39. Descartes, R, 1649, *Les passions de l'âme*, Amsterdam. (In French.) Reprinted in AT, vol. XI. English translation in CSM, vol. I.
  40. Descartes R. (1596-1650). *L'homme et un traité de la formation du foetus René Descartes*. Reproduction : Num. BNF de l'éd. de, Cambridge: Omnisys, [1990] (French books 1601-1700;56.10). 1 microfilm. Reprod. de l'éd. de Paris: chez Charles Angot, 1664. Publication : 1995, pp. 448.
  41. Dodt E. The third eye-superstition and reality. En *European Pineal Study Group*. Number 11. P. Pévet (Ed), EPSG. Estrasburgo, Francia. 1984, pp. 3-18.
  42. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulador of dopamine release en the retina. *Nature*. 306:782-784, 1983.

- 
43. Dubocovich ML, and Takahashi JS. Use of 2[<sup>125</sup>I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3916-3920, 1987.
  44. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol. Sci.*, 16:50-56, 1995.
  45. Ebadi M, Exum TD, Pfeiffer RF and Gocitrapon P. Pineal and retinal peptides and their receptors. *Pineal Res. Rev.*, 7:1-156, 1989.
  46. Eloranta E, Timisjarvi J, Nieminen M, Ojutkangas V, Leppaluoto J and Vakkuri O. Seasonal and daily patterns in melatonin secretion in female reindeer and their calves. *Endocrinol.*, 130:1645-1652, 1992.
  47. Fariello RG and Bubenik GA. Melatonin induced changes in the sensory activation of acute epileptic foci. *Neurosci. Lett.*, 3:151-155, 1976.
  48. Fariello RG Bubenik GA, Brown CM and Grota LJ. Epileptogenic action of intraventricular injected antimelatonin antibody. *Neurol.*, 27:567-570, 1977.
  49. Figueroa JP, Honneibier MB, Jenkins S and Nathanielsz PW. Alteration of 24-hours rhythms in myometrical activity in the chronically catheterised pregnant rhesus monkey after a 6-hours shift in the light dark cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163:648-654, 1990.
  50. Florant G, Green R, Abel T, Hartzell S, Tamarkin. L and Brainard G. Melatonin profile in marmots: the influence of catecholamines, hibernation, and light. *J. Pineal. Res.*, 7:105-113, 1989.
  51. Foley PB, Cairncross KD, Foldes A. Pineal Indoles: significance and measurement. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 10:273-293, 1986.
  52. Fourtillan JB, Brisson M, Fourtillan M, Ingrad I, Decourt JP and Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 280: E11-E22; 2001.
  53. García-Rillo, Reyes-Vázquez C. El calcio participa en el efecto inhibitor de la melatonina sobre la contracción muscular del útero de rata estrogenizada. Tesis de Posgrado. Facultad de Medicina. UNAM. 1996.
  54. Garfinkel M, Laudon M, Nof D and Zisapel N. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet.* 346: 541-544, 1995.
  55. Golombek DA, Martini M and Cardinali DP. Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *Eur. J. Pharmacol.*, 237:231-236, 1993.
  56. Hagan RM. And Oakley Melatonin comes of age? *Trends Pharmacol. Sci.* 16:81-83, 1995.

57. Harlow HJ. Effect of melatonin on the force of spontaneous contraction of in vitro rat small large intestine. *J. Pineal Res.*, 3: 277-284, 1986.
58. Hendrickson AE, Wagoner N and Cowaan M. An autoradiophic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Z. Zellforsch.*, 135:1-26, 1972.
59. Hills JM, Jessen KR and Myrsky R. An inmu histochemical history of the distribution of enteric GABA containing neurones of the rat and guinea pig intestine. *Neurosci.*, 22:301-312, 1987.
60. Hishikawa AY, Cramer H and Khulo H. Natural and melatonin-induced sleep in young chickens. A behavioural and electrographic study. *Exp. Brain Res.*, 7:84-94, 1969.
61. Hoffman RA and Reiter RJ. Pineal Gland: influence on gonads of melatonin and related indolamines. *Science*. 148:1609-1611, 1965.
62. Holmes SW, and Sugden D. The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 56:360P, 1976.
63. Holmes SW and Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br. Pharmacol.*, 76:95-101, 1982.
64. Huether G The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 49:665-669, 1993.
65. Huszar G and Roberts JM. Biochemistry and Pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142:225-237, 1982.
66. Jacobs RL and Morgane PJ.: Retinohypothalamic connections in Cetacea. *Nature*. 203:778-780, 1984.
67. Kao LWL and Weis J. Release of gonadotrophin-releasing hormone (Gn-Rh) from isolated, perfused medial-basal hypothalamus by melatonin. *Endocrinol.*, 100:1723-1726, 1977.
68. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the ephiphysis cerebri in the albino rat. *Z. Zellforsch.*, 52:163-215, 1960.
69. Kappers JS, Schade VP.: Structure and function of the ephiphysis cerebri. *Prog. Brain Res.*, 10:233-23, 1965.
70. Kennaway DJ and Hugel HM. Melatonin binding sites: are they receptors? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 88:1-9, 1992.

- 
71. Kenny GCJ.: The “nervus conarii” of the monkey. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 23:563-470, 1961.
  72. Kerr IB and Ong J. GABA and GABA-receptors in the enteric nervous system. *Neuropharmacol.*, 23: 835-836, 1984.
  73. Kinson GA, MacDonald NE and Liu CC. The effects of melatonin and serotonin on blood flow fraction and testosterone metabolism in selected organs of the male rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 51:313-318, 1973.
  74. Kitay JI and Altschule MD. Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinol.*, 55: 782-784, 1954.
  75. Kivela A, Kauppila A, Lepaluoto J, Vakkuri O. Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. *J. Clin Endocrinol. Metab.*, 69:1065-1068, 1989.
  76. Klein DC and Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus, *Brain Res.*, 174:245-262, 1979.
  77. Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland, in: Evered D. Clark (eds.). *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal*, Ciba Foundation Symposium, vol. 117, Pitman, London, 1985; pp. 39-56.
  78. Klein DC, Coon SL, Rseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iubone M, Rodríguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill G, Cassone VM and Baler R. The melatonin rhythm generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Rec Progr. Horm. Res.*, 52: 307-358, 1997.
  79. Kocsard-Varo G. Role of the pineal gland in hibernators: a concept proposed to clarify why hibernators have to leave torpor and sleep. *Med. Hypotheses*. 54(4):645-7, 2000.
  80. Kovacs GL, Galari I, Telegdy G and Lissac K. Effects of melatonin and pinealectomy on avoidance and exploratory activity in the rat. *Physiol. Behav.*, 13:349-355, 1974.
  81. Krause DN, Barrios VE and Ducles, S.P. Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur. J. Pharmacol.* 276(3):207-213, 1995.
  82. Kristev AD, Damianka PG, Spassov VA and Turiiski VI. Effects of GABA<sup>B</sup> receptor antagonist on spontaneous and on GABA-induced mechanical activity of guinea-pig smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, 431(3):339-344, 2001.
  83. Lacoste V and Wetterberg L. Individual variations of rhythms in morning and evening types with special emphasis on seasonal differences. In: L. Wetterberg, (eds). *Light and Biological Rhythms in Man*, Pergamon Press, New York, 1993, pp, 287-304.

- 
84. Laughlin GA, Loucs AB and Yen SSC. Marked aumentation of nocturnal melatonin secretion in amenorrheic athletes, but not in cycling athletes : unaltered opioidergic or dopaminergic blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 73:1321-1326, 1991.
- 84a. Lee PP and Pang SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol. Signals.*, 2(4): 181-93, 1993.
85. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH and Mori N.: Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 80:2587-2595, 1958.
86. Lerner AB and Case JD. Melatonin. *Fed. Proc.*, 19: 590-593, 1960.
87. Lira-Rocha A, Espejo-González O and Naranjo-Rodríguez EB. Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. *Eur. J. Med. Chem.*, 37(12):945-951, 2002.
88. Lu KS, Lin H. Cytochemical studies on cytoplasmic granular elements in the hamster pineal gland. *Histochem.*, 61:177-187, 1979.
89. Lucchelli MG, Santagostino-Barbone & Tonini M. Investigation into the contractile response of melatonin in the guinea pig isolated proximal colon; the role of 5-HT-4 and melatonin receptors. *Brit. J. Pharmacol.*, 121:1775-1781, 1997.
90. Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sondhum D, Paul SM, Skolmck A and Goodwin FK. Inhibition of diazepam binding by triptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-Acetil-5-Methoxy kynurenamine. *Life Sci.*, 29:259-267, 1981.
91. Martin JE, Mckeel DW and Sattler C. Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells. *Endocrinol.*, 110: 1079-1084,1982.
92. Merle A, Delangre Ph, Renard P, Lesieur D, Cuber JC, Roche M and Pellissier S. Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153. *J. Pineal Res.*, 29:116-124, 2000.
93. McNulty JA, Fox LM, Spurrier WA. A circannual cycle in pinealocyte synaptic ribbons in the hibernating and seasonally reproductive 13-lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Neurosci. Lett.*, 13:119(2):237-40, 1990.
94. Molinari EJ, North PC and Dubocovich ML. Localization and characterization of ML-2 binding sites whit 2-[<sup>125</sup>I]-MCA-NAT to CNS and peripheral tissues of various species . *Soc. Neurosci. Abstr.*, 20:1168, 1994.
95. Molinari EJ, North PC and Dubocovich ML. 2-[<sup>125</sup>I]-Iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetil-triptamine: a selective radioligand for characterization of melatonin ML<sub>2</sub> sites. *Eur. J. Pharmacol.*, 301:159-168, 1996.
-

- 
96. Monasterolo La, Trumper L and Elías MM. Reversal of benzodiazepine-induced renal vasculature relaxation with flumazenil. *Eur. J. Pharmacol.*, 449(1):155-158, 2002.
  97. More, R.Y., Lerner, N.J.: A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 146:1-14, 1972.
  98. Moore, R.Y. Retinohypothalamic projection in mammals: A comparative study. *Brain Res.*, 49:403-409, 1973.
  99. Moore RY. The innervation of the pineal gland. *Prog Reprod. Biol.*, 4:1-29, 1978.
  100. Morgan PJ, Lawson W, Davidson G and Howell HE. Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine pars tuberalis cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 5: R3-R8, 1989.
  101. Myers BL and Badia P. Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanisms and interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19: 553-571, 1995.
  102. Naranjo-Rodríguez EB and Reyez-Vázquez C. Análisis conductual y electrofisiológico de las interacciones entre la Melatonina y los sistemas Gabaérgicos cerebrales. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM. 1991.
  103. Naranjo-Rodríguez EB, Osornio AO, Hernández-Avitia E, Mendoza-Fernández V and Escobar A. Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxytryptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 24(1):117-29, 2000.
  104. Naranjo-Rodríguez EB, Vega L, Reyes C, Perusquia M, Campos G y Ponce H. Efecto de la melatonina sobre la constracción neurogénica de la porción prostática del conducto deferente de rata. XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, 3-7 de Septiembre de 1989. Mor. México.
  105. Nava F and Carta G. Melatonin reduces anxiety induced by lipopolysaccharide in the rat. *Neurosci. Lett.*, 307, 57-60, 2001.
  106. Nordun JJ, Lerner AB. The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 45:768-774, 1977.
  107. Olesen PH. The use of bioisosteric groups in lead optimization. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 4(4):471-8, 2001.
  108. Olsen R and Lee-Lundberg F. Convulsant and anticonvulsant drug binding sites related to the GABA receptor-onophore system. In Morselli PL, Loscher W, Meldran B, Reynolds EH. (eds). *Neurotransmitters, Seizures and Epilepsy*. Raven Press. New York. 1981, pp 165-173.

- 
109. Palemar MM y Hicks JJ. Contracción Uterina. Mecanismo, regulación y farmacología. *Gynecol, Obst. Mex.*, 5:303-309, 1990.
  110. Pérez Castillo VH, Lira Rocha AS. Síntesis alterna y evaluación de la actividad contráctil de la Agomelatonina (Bioisómero de la Melatonina). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2004.
  111. Persengiev SP. 2-[<sup>125</sup>I]-Iodomelatonin binding sites in rat adrenal: pharmacological characterization and subcellular distribution. *Life Sci.* 51:647-651, 1992.
  112. Poon AMS and Pang SF. 2-[<sup>125</sup>I]-Iodomelatonin binding sites in spleens of guinea-pig. *Life Sci.* 50:1719-1726, 1992.
  113. Provencio I, Rodríguez IR, Jiang G, Hayes E.F, Moreira EF and Rollag MD. A Novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.*, 20; 600-605, 2000.
  114. Quastel MR and Rahamimoff R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-Hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Brit. J. Pharmacol.*, 24:455-461, 1965.
  115. Quay WB. The pineal gland. En: Weiss L (Ed.) *Cell and tissue biology.* Germany: Urban & Schwzenberg Inc. 996-1007, 1988.
  116. Quirion R. High density of (3H) Ro 5-4864 "Peripheral" benzodiazepine binding sites in the pineal gland. *Eur. J. Pharmacol.*, 102:559-560, 1984.
  117. Raikhlin NT, Knevtoy IM and Tolkachev VN. Melatonin may be synthesised enterochromafin cells. *Nature.* 255:344-345, 1975.
  118. Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Kadagidze ZG and Zokolov V. Immunomorphological studies on synthesis of melatonin in enterochromaffin cells. *Acta Histochem. Cytochem.* 11:75-77, 1978.
  119. Reiter RJ. Involvement of pineal indoles and polypeptides with the neuroendocrine axis. *Prog. Brain Res.*, 39:281-287, 1973.
  120. Reiter RJ, Morgan WW and Talbot JA. Seizures in rats induced by pinealectomy: influence of diazepam, chlorodiazepoxide, diphenylhydantoin and pineal substances. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 202:219-230, 1973.
  121. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, 1: 109-131, 1980.
  122. Reiter RJ.: Anatomy of the pineal gland of the mammals. In: *The pineal.* Vol. 6. Reiter, R. J. (Ed). Eden Press. 1981, pp.14-40.

- 
123. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menéndez-Peláez A, Chen LD and Saarela S. Melatonin as free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann. New. York Acad. Sci.*, 719:1-12, 1994.
  124. Reiter R. *The pineal gland*. Ed.: Elsevier Science publishing, Nueva York, 1983.
  125. Reppert SM, Godson C., Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt S, and Gudsella JF. Molecular characterization of second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92; pp. 8734-8738. 1995.
  126. Reyes-Vázquez C and Dafny N. Interaction of norepinephrine and superior cervical ganglion input in the rat pineal body. *Exp Neurol.*, 90: 522-528, 1985.
  127. Reyes-Vázquez C, Prieto-Gómez B, Aldes L and Dafny N. The rat pineal exhibits two patterns of response to microiontophoretical norepinephrine application. *J. Pineal Res.*, 3: 213-222, 1986.
  128. Romijn H.J. Parasympathetic innervation of the rabbit pineal gland. *Brain Res.*, 55: 431-436, 1973.
  129. Romijn H. Is the pineal gland a tranquilizing organ?. *Life Sci.*, 23:2257-2274, 1978.
  130. Ronnberg L, Kauppila A, Leppaluoto J, Markainen H. and Vakkuri O, Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71:493-497, 1990.
  131. Rudeen PK, Philo RC and Symmes SK. Antiepileptic effects of melatonin in the pinealectomized Mongolian gerbil. *Epilepsia*. 21(2):149-154. 1980.
  132. Semercioz A, Onur R, Ayar A, Orhan I. The inhibitory role of melatonin on isolated guinea-pig urinary bladder. An endogenous hormone effect. *BJU*. 94(9):1373-6, 2004.
  133. Shanahan TL and 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. Metabol.*, 72:227-235, 1991.
  134. Sieghart W. Multiplicity of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:407-411, 1989.
  135. Silman RE, Leone RM, Hooper RJL and Prece MA. Melatonin, the pineal gland and human puberty. *Nature*, 282:301-303, 1979.
  - 135a. Soto-vega E, Meza I, Ramírez-Rodríguez G, and Benítez-King G. Melatonin stimulates colmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J. Pineal Res.*, 37 (2): 98-106, 2004.



- 
136. Spadoni G, Balsamini C, Diamantini G, Di Giacomo B, Tarzia G, Mor M, Plazzi PV, Rivara S, Lucini V, Nonno R, Pannacci M, Fraschini F and Stankov BM. Conformationally restrained melatonin analogues: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, evaluation of the biological activity, and molecular modeling study. *Med Chem.*, 20;40(13):1990-2002.
  137. Stankov B and Reiter RJ. Melatonin receptors: current status, facts and hypotheses. *Life Sci.*, 40:971-982, 1990.
  138. Stone BM, Turner C, Mills SL, and Nicholson AN. Hypnotic activity of melatonin. *Sleep*. 23: 663-669, 2000.
  139. Sugden D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227: 587-591, 1983.
  140. Tallarida RJ, Jacob LS. The dose-response relation in pharmacology. USA: Springer-Verlag (Ed)., 2000, pp. 207.
  141. Valenti S and Massimo Giusti. Melatonin Participates in the control of testosterone secretion from rat testis. An Overview of our experience. *Ann N.Y. Sci.*, 966:284-289, 2002.
  142. Vanecek J, and Klein DC. Sodium-dependent effects of melatonin on membrane potential of neonatal rat pituitary cells. *Endocrinol.*, 131: 939-946, 1992.
  143. Vanecek J and Klein DC. Melatonin inhibits gonadotropin-release hormone-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> neonatal rat pituitary cells. *Endocrinol.*, 130:701-707, 1992.
  144. Velásquez E, Esquifino AL, Zueco JA, Ruiz and Albusac JM. Evidence that circadian variations of circulating melatonin levels in fetal and suckling rats are dependent on maternal melatonin transfer. *Neuroendocrinology*; 55:321-326, 1992.
  145. Vondrasova D, Hájek I and Illnerova H. Exposure to long summer days affects the human melatonin and cortisol rhythms. *Brain Res.*, 759:166-170, 1997.
  146. Vondrasova D, Hájek I, Illnerova H. Adjustment of the human melatonin and cortisol rhythms to shortening of the natural summer photoperiod. *Brain Res.*, 816:249-253, 1999.
  147. Wehr TA. The duration of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 73:1276-1280, 1991.
  148. Welsh MG. Pineal calcification: structural and Functional aspects. *Pineal Res. Rev.*, 3:41-68, 1985.

- 
149. Wermuth CG. The practice of Medicinal Chemistry. Academic Press. 1996; pp. 204-207.
  150. Witt-Enderby PA, Massana MI. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor *Endocrinol.*, 139(7):3064-3071, 1998.
  151. Wurtman RJ, Axelrod J. The pineal gland. *Sci. Am.*, 213:50-60, 1965.
  152. Wurtman RJ, Axelrod J and Kelly DE. The pineal. Academic Press. New York. London. 1968.
  153. Wurtman RJ. The effects of light on man and other mammals. *Ann. Rev. Physiol.*, 37:467-483, 1975.
  154. Yasin SA, Costa A, Besser Gm, Hucks D, Grossman A and Forsling ML. Melatonin and its analogs inhibit the basal and stimulated release of hypothalamic vasopressin and oxytocin in vitro. *Endocrinology* ; 132:1329-1336, 1993.
  155. Zeitzer JM, Daniels JE, Duffy JF, Klerman EB, Shanahan TL, Dijk DJ, Czeisler CA. Do plasma melatonin concentrations decline with age. *Am. J. Med.*, 107: 432-436, 1999.
  156. Zisapel N, Laudon M. Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res.* 272: 378-381, 1983.
  157. Zrenner, C. Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: a history In: R.J. Reiter, (Eds), *Pineal Research Reviews III*, Alan R. Liss, New York, 1985, pp. 40.

# **A N E X O S**

## **ABREVIATURAS**

GP = Glándula Pineal

MEL = Melatonina

AGOMEL = Agomelatonina

GABA = Acido Gamma-aminobutírico

FLU = Flumazenil

GAD = Glutamato ácido-descarboxilasa

GSCs = Ganglio Simpático Cervical Superior

NA = Noradrenalina

SNC = Sistema Nervios Central

SNE = Sistema Nervioso Entérico

RM = Respuesta Máxima

VM = Ventromedial

DM = Dorsomedial

TGI = Tranco Gastrointestinal

BZD = Benzodicepinas

AMPc = Adenosin Monofosfato ciclico