



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

*INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE MELATONINA,
GABA Y FLUMAZENIL*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GUSTAVO LOZANO BERNAL



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente Profr. JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER.

Vocal Profra. ANA MARÍA VÁZQUEZ ÁLVAREZ.

Secretario Profra. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ.

1er. Suplente Profra. MARÍA ELENA SÁNCHEZ MENDOZA.

2º. Suplente Profr. JESÚS ARRIETA VALENCIA.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesor: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.



Supervisor técnico: Dra. Ofelia Espejo González.



Sustentante: Gustavo Lozano Bernal.



AGRADECIMIENTOS.

Gracias a **DIOS** por darme fuerza y constancia para alcanzar mis objetivos y realizar esta importante etapa en mi vida. Con mucho amor a mi mama **JOSELIN** por ser un ejemplo de profesionalismo, responsabilidad y dedicación, por todo su inagotable amor, cuidados, apoyo y sabios consejos, a mi papa **GUSTAVO** por su apoyo, ayuda y paciencia. A mi hermana la Dra. **DINA** por su ejemplo de perseverancia y cariño. A mí cuñado el biólogo **MIGUEL** por sus consejos y apoyo incondicional. Con cariño a mi hermosa sobrina **DINNA** eres muy inteligente, tú puedes lograr y sobresalir en todo lo que te propongas en la vida. A la memoria de mis abuelitos **LUCINA** y **MIGUEL** gracias por cuidarnos siempre. Con mucho cariño a **VERÓNICA**, te amo y gracias por todo el apoyo, amor y felicidad que hemos compartido, juntos los retos que vengan serán más fáciles.

A mis profesores del departamento de farmacología, Dra. **ELIA NARANJO** gracias por su invaluable apoyo, cariño, conocimientos y paciencia. A la Dra. **ANA MARIA VÁZQUEZ** y el Dr. **JUAN JOSE MANDOKI** por su tiempo y conocimientos. A la Dra. **ROSARIO** por su amistad y ayuda. A la Dra. **HELGI JUNG** por su apoyo y consejos. A la profesora **RUTH BUSTAMANTE** y el Dr. **ATONATIU GOMEZ** por su amistad y apoyo.

A mis amigas y compañeros con los cuales compartí inolvidables momentos en nuestra estancia en la universidad.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** orgullosamente la mejor universidad de Latinoamérica, que hace posible la realización de estos proyectos de investigación.

Un recuerdo por aquellos seres vivos que ayudan a que la investigación y la ciencia avancen en la búsqueda de nuevas y mejores alternativas terapéuticas para la salud.

Daría todo lo que sé, por saber la mitad de lo que desconozco.

René Descartes.

Lo único que podemos hacer es decidir que hacer con el tiempo que se nos ha dado.

JRR Tolkien.

**Se agradece al proyecto PAPIIT-
DGAPA-UNAM, con Clave: IN205905
por el apoyo otorgado para la realización
de este trabajo.**

ÍNDICE DE CONTENIDO	PÁGINAS
RESUMEN PARA EL XXXIX CONGRESO NACIONAL DE LA AFM	1
ABSTRACT PARA EL CONGRESO INTERNACIONAL DE NEUROCIENCIAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS	7
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS	9
ABREVIATURAS	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1. Interacción farmacológica	17
2.2. Melatonina	24
2.3. Ácido Gamma-aminobutírico (GABA)	39
2.4. Flumazenil	44
2.5. Tracto gastro intestinal	46
3. OBJETIVOS	54
4. HIPÓTESIS	54
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA	56
6. RESULTADOS	74
6.1. Efecto de la melatonina sobre la actividad del músculo liso de duodeno, yeyuno e íleo	74

6.2. Efecto del ácido gamma-aminobutírico sobre la actividad de músculo liso de duodeno yeyuno e íleo	86
6.3. Efecto del flumazenil sobre la actividad del músculo liso de duodeno, yeyuno e íleo	98
6.4. Efecto de la interacción farmacológica entre MEL y GABA	110
6.5. Efecto de la interacción farmacológica entre FLU y GABA	122
6.6. Efecto de la interacción farmacológica entre FLU y MEL	134
7. DISCUSIÓN	146
8. CONCLUSIONES	155
9. BIBLIOGRAFÍA	157
10. ANEXOS.....	164
10.1. Material Tecnológico	164
10.2. Manejo del Polígrafo	165
10.3. Procedimiento de calibración del Polígrafo GRASS Mod.7	170
10.4. Manejo del Software PolyView	171
10.5. Material Reactivo	173

**ÉSTE TRABAJO FUE SELECCIONADO PARA
PRESENTARSE EN EL
XXXIX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS 2006.**

**RESUMEN PARA EL XXXIX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS****INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE MELATONINA, GABA Y FLUMAZENIL**

Lozano Bernal Gustavo^{1*}, Sánchez Solís Verónica^{1*}, Espejo González Ofelia², Naranjo Rodríguez Elia Brosla¹

¹Laboratorio de Neurofarmacología, ²Laboratorio de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. UNAM.

La melatonina (MEL) es una hormona que se sintetiza y libera en la glándula pineal (GP). A la MEL se le han adjudicado diferentes efectos debido a que los organismos tienen diferentes sitios de unión (receptores) a ella, tanto periférica como centralmente. No obstante, el mecanismo por el que se producen estos efectos no es claro. La MEL se libera con un patrón de ritmo circadiano, esta se incrementa durante la noche, alcanzando el valor mas alto 5 horas después de que no hay luz y reduciéndose durante el día. Por otro lado, en el intestino se ha reportado que la MEL produce relajación muscular, efecto producido probablemente por los receptores presentes en este sitio, pero no esclarece el mecanismo de acción. Todos estos datos suscitan la cuestión del papel fisiológico de la MEL sobre las funciones gastrointestinales. Para lograr esclarecer el mecanismo de acción de la MEL se han utilizado diferentes metodologías “In Vivo” e “In Vitro”. Por lo tanto en el presente trabajo nuestro objetivo es aportar información para tratar de dilucidar el posible mecanismo de acción de MEL en tejidos aislados del tracto gastrointestinal (TGI). Para alcanzar el objetivo utilizaremos tejidos aislados (Duodeno, Yeyuno e Íleo) de ratas macho, cepa Wistar de (180-230 g) que se colocaran en un sistema convencional “In Vitro” en donde se obtendrán registros de la actividad espontánea, con la aplicación de las siguientes soluciones: Vehículo, MEL, Ácido δ -amino Butírico (GABA) y Flumazenil (FLU) en concentraciones de 10 a 320 mmol/mL. Los datos y los registros se almacenaran en una computadora y se analizaran mediante el uso del software PolyView. La aplicación de la MEL y GABA sobre la actividad del músculo de duodeno, yeyuno e íleo provocaron un efecto bifásico (relajación-contracción). Con administración de FLU, se observó un efecto de contracción. La interacción MEL-GABA produjo una relajación de los tejidos. La interacción GABA-FLU produjo una relajación seguida de una contracción y por último (efecto bifásico). La interacción MEL-FLU produjo una relajación. Estos datos se correlacionaron mediante una curva porcentaje de relajación-contracción vs logaritmo de concentración para obtener la concentración inhibidora al 50 por ciento (CI50).

*Estudiante.

Proyecto apoyado por: PAPIIT-DGAPA-UNAM, con Clave: IN205905

México, D.F. a 13 de Julio de 2006

Gustavo Lozano Bernal

Laboratorio de Neurofarmacología
Facultad de Química, UNAM

Presente

Estimado colega:

Nos complace informarle que el trabajo libre intitulado:

INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA ENTRE MELATONINA, GABA Y FLUMAZENIL

Autores: Lozano Bernal Gustavo, Sánchez Solís Verónica, Espejo González Ofelia, Naranjo Rodríguez Elia Brosla, fue **ACEPTADO** por el Consejo Científico para presentarse en la modalidad de **Cartel (Área: Farmacología y Toxicología)**, como parte del programa del **XXXIX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

Le recordamos que este evento se llevará a cabo del 22 al 26 de octubre de 2006 en el Hotel Sheraton Baganvillias, Puerto Vallarta, y que para que el resumen enviado sea publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (indexada por CONACYT), requerimos contar con el comprobante de **inscripción del autor principal** al congreso a más tardar el 31 de Agosto.

Los autores serán responsables de colocar el Cartel en el sitio que se les asigne (ver programa en Hotel sede) desde las 09:00 y hasta las 15:00 horas del día Miércoles 25 de octubre. El autor principal estará obligado a permanecer enfrente del cartel y exponer su trabajo a partir de las 11:15 y hasta las 12:45 horas.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.
Favor de confirmar la recepción del comunicado

Atentamente,

Dra. Dea Herrera Ruíz
Directora de Ciencia y Tecnología

**ÉSTE TRABAJO FUE SELECCIONADO
PARA PRESENTARSE EN EL
CONGRESO INTERNACIONAL DE
NEUROCIENCIAS 2006.**

ABSTRACT

Pharmacological interaction among Melatonin, GABA and Flumazenil

Lozano Bernal Gustavo^{1*}, Sánchez Solís Verónica^{1*}, Espejo González Ofelia², Naranjo Rodríguez Elia Brosla¹

¹Laboratory of Neuropharmacology, ²Laboratory of Pharmaceutical Chemistry. Department of Pharmacy. School of Chemistry. National Autonomous University of Mexico.

Melatonin (MEL) is a hormone synthesized and secreted by the pineal gland (PG). MEL has been award different effects due organism have different binding sites (Receptors) peripheral and central to MEL. Although the mechanism used by MEL to produce the effects still unclear. The MEL is released whit a circadian rhythm model, MEL rising in the night, to reach the maximum value five hour after light disappear and diminishing during the day. Moreover in the gut has been reported MEL produced relaxation, effect produced likely by the receptors presents in this place, but did not illustrate the action mechanism. All of these facts imply the physiological roll of MEL over the gastrointestinal functions. For illustrate the mechanism of action of the MEL has been used different methodologies “In Vivo” and “In Vitro”. Therefore in this work our objective is treat to elucidate the possible mechanism of action of MEL in isolated tissues of the gastrointestinal tract (GIT). To overtake the objective we used isolated tissues (Duodenum, Jejunum and Ileum) from male rats, stock Wistar of (180 to 230 g) to put in a conventional system “in Vitro” to obtain registers to the spontaneous electrical activity, with the application of the follow solutions: Vehicle, MEL, Gamma aminobutiric acid (GABA) and Flumazenil in concentrations of 10 to 320 mmol/mL. The records and data will be stored in a computer and analyze with the PolyView™ software. We expect to obtain a direct action with the substances over these tissues to the indicated concentrations.

*Pregraduate Student.

Supported by PAPIIT-DGAPA-UNAM. IN205905.

Thank you for submitting your abstract, Pharmacological interaction among melatonin, GABA and flumazenil., for consideration in the Neuroscience 2006 Program.

Your abstract control number is: 2006-A-4572-SfN.

If you need to print out a copy of your submission or payment receipt, you may return at any time to the abstract submission site (http://www.sfn.org/index.cfm?pagename=app_sso_mem), log in, and click on the finalized submission. You will then be able to view your submission details or scroll to the bottom of the page to view and print your payment details.

The presenting author of this abstract (the first author) will receive an email in early July confirming the status and the sessioning assignment of the abstract. Please note that session assignments are final and cannot be changed.

If you need to make edits of any kind to your submission, you must submit a replacement abstract before May 22, 2006. To do this, return to the abstract submission site (http://www.sfn.org/index.cfm?pagename=app_sso_mem), log in, and click on the finalized submission. Then select the "Unlock Abstract" option. In order to complete the submission of a replacement abstract, you will need to pay the abstract replacement fee of \$75. Once you are done making changes, you must select "Finalize" on the Review My Work page. Please note that once you "Finalize", you will not be able to make any additional changes unless you go through another replacement process and pay an additional \$75 replacement fee.

If you have any questions, please contact the SfN Program Department by email at program@sfn.org or by phone at (202) 962-4000.

NOTE: Submission of an abstract and the \$75 abstract handling fee DOES NOT include registration for the annual meeting. You must register for Neuroscience 2006 separately. Please check www.sfn.org for more information.

ABC= Área bajo la curva.

Ach= Acetilcolina.

AMP= Amplitud de espigas.

ANOVA= Análisis de varianza.

BZP= Benzodiazepinas.

Ca⁺= Ion calcio.

CE= Células enterocromafines.

CIC= Células intersticiales de Cajal.

Cl⁻= Ion cloruro.

DA= Dopamina.

FLU= Flumazenil.

FREC= Frecuencia de eventos contráctiles por minuto.

GABA= Ácido gamma amino-butírico.

GAD= Ácido glutámico descarboxilasa.

GP= Glándula pineal.

HIOMT= Hidroxi-indol-o-metiltransferasa

HPLC= Cromatografía líquida de alta eficiencia.

IL-2= Ínter leucinas 2.

IMEL= [¹²⁵I] 2-iodomelatonina.

LCR= Líquido cefalorraquídeo.

MEL= Melatonina.

MLGI= Músculo liso gastrointestinal.

NA= Noradrenalina.

NAT= N-acetil transferasa.

NSQ= Núcleo supraquiasmático.

RT-PCR= Transcripción reversa de la cadena de polimeraza.

SMRK= Solución de mantenimiento Ringer-Krebs.

SNC= Sistema nervioso central.

SNE= Sistema nervioso entérico.

TGI= Tracto gastro-intestinal.

THR= Tracto retino-hipotalámico.

VIP= Péptido intestinal vaso activo.

5-HT=Serotonina.

7TM= Receptores transmembranales.

1. INTRODUCCIÓN.

El interés por la glándula pineal (GP) como un órgano cerebral, se remonta al siglo III y IV antes de Cristo. Aparentemente Galeno y Pergamon (130-200 D.C.) (Figura No.1) suministraron evidencia de la primera descripción y localización de la glándula pineal en el cerebro, nombrándola “konareion” (Latín “conarium”) debido a su forma cónica, siglos posteriormente fue nombrada “glandula pinealis” o pineal (59). La posición central en el cerebro la convierten en un órgano sin igual, así como su extensa vascularización descrita por Bruxellensis (1515-1564). Posteriormente, el filósofo francés René Descartes (1596-1650) (Figura No.2) (25, 24) en sus textos “Les passions de l’ame”, conceptualizó a la pineal como “El asiento del alma” o como el órgano que coordinaba funciones psicofisiológicas. También ha sido llamado “cuerpo cervical” y “epiphysis cerebri” esto último en referencia a su posición en la parte superior del cerebro de algunos animales. Los avances en microscopía y las técnicas histológicas modernas permitieron la observación de similitudes entre posición de la glándula y los ojos laterales de vertebrados inferiores por lo que también se le llamó “El tercer ojo” (59).

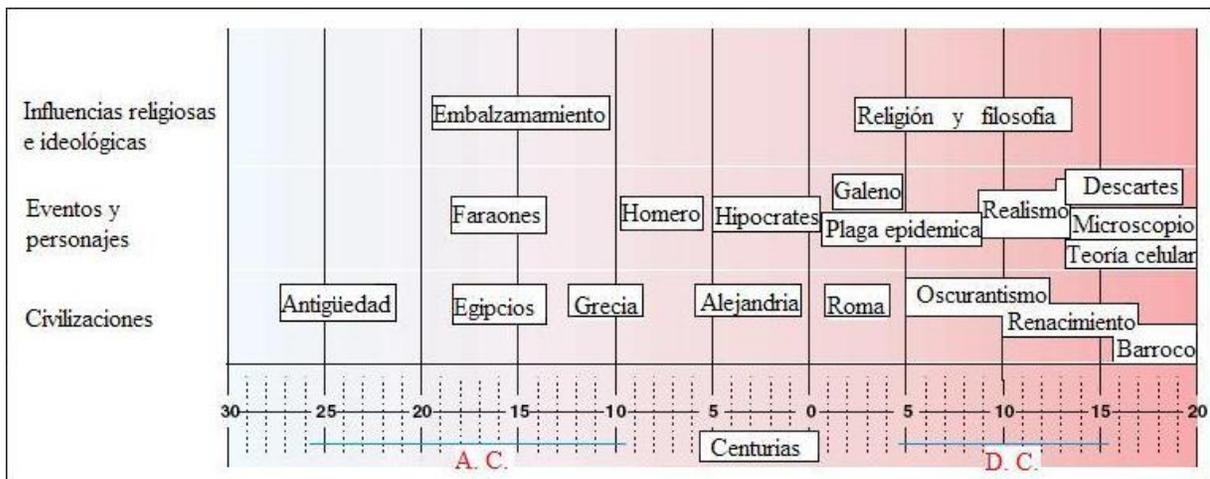


Figura No. 1. Cronología de eventos, personajes y civilizaciones a lo largo de la historia (79).

Durante casi 50 años ha crecido el interés y la investigación por esta glándula y su principal producto de síntesis, la melatonina. No fue sino hasta 1958 que fue identificada y aislada por primera vez, por el dermatólogo norteamericano Aarón Lerner (52), a partir de glándulas pineales de bovinos, como la indolamina N-acetil-5-metoxitriptamina. Fue nombrada melatonina por su habilidad de afectar los melanocitos de la piel de rana y su relación química con la serotonina (65).

Ahora se sabe que es una de las hormonas más ubicuas en los seres vivos, encontrándose desde los humanos hasta los protozoarios y cuyas funciones son de suma importancia desde el punto de vista bioquímico y fisiológico, con prometedoras expectativas terapéuticas (59).

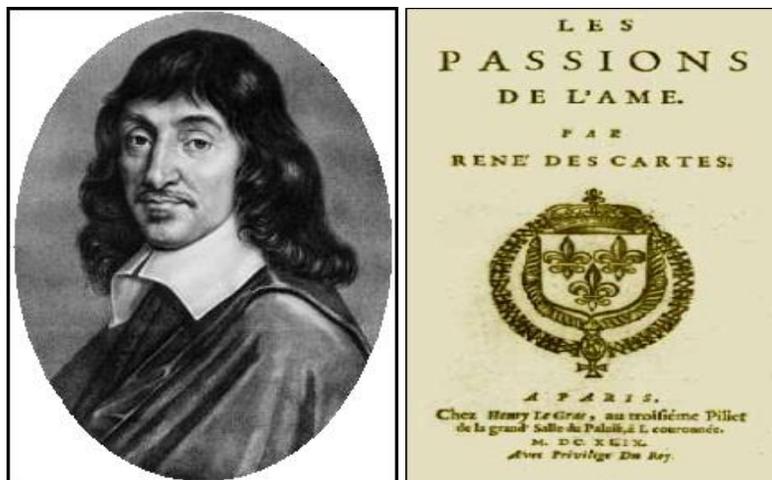


Figura No.2 René Descartes, filósofo francés y su obra, “Les passions de l’âme” (25) (11).

Por este motivo con la intención de aportar nuevos datos para aumentar el conocimiento acerca de la melatonina y tratar de dilucidar su mecanismo de acción, se plantea la utilización de un sistema convencional “In Vitro” en el cual, se pruebe tejido aislado de duodeno, yeyuno e íleo, de rata con: melatonina (MEL), ácido gamma amino butírico (GABA) y flumazenil (FLU) aplicadas en diferentes concentraciones, en forma individual y en

combinación. Los resultados indican que la MEL presenta un efecto inhibitor sobre la contracción en el duodeno, el yeyuno y el íleo. La interacción de MEL-GABA disminuye la actividad contráctil de los tejidos en mayor medida que si se administran de forma independiente. La interacción GABA-FLU presentó efecto de contracción, pero en menor medida que GABA y FLU por separado. La interacción MEL-FLU produjo una inhibición de la respuesta en mayor medida que MEL por si sola. Todas estas interacciones serán de utilidad para tratar de dilucidar el mecanismo de acción de la MEL.

2. ANTECEDENTES.

2.1. INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA

La *interacción farmacológica* se presenta cuando al administrar dos o más fármacos en forma simultánea, secuencial o alternada, uno de ellos o los dos intervienen en la respuesta y duración de la acción del otro, esto puede ocasionar un cambio deseado o bien no deseado en el tipo de respuesta del organismo a un determinado fármaco. La consecuencia de esta interacción puede ser: a) que cada fármaco produzca sus efectos sin modificación aparente de los mismos. b) aumento de sus efectos (sinergismo) c) disminución de sus efectos (antagonismo). Este aumento o disminución de los efectos farmacológicos pueden dar lugar a reacciones adversas o de toxicidad en el organismo. Para el caso de los fármacos que actúan en combinación con un receptor, la consecuencia de la administración simultánea de dos o más sustancias en un tejido con un número determinado de receptores (por ejemplo colinérgicos) es la competencia por la ocupación del receptor. La *teoría del receptor* postula que compuestos o fármacos que producen un efecto, deben interactuar con un elemento celular específico o macromolécula a la que se ha denominado receptor. Dicho efecto se explica con base en la ley de acción de masas ya que la respuesta a un fármaco dependerá del número de receptores ocupados por el mismo. El primer modelo matemático fue planteado por A. J. Clark (citado por 48) el cual permite analizar datos y predecir efectos farmacológicos sobre los tejidos utilizando la cinética enzimática (47) (48).

Así nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cómo es la interacción fármaco-receptor? Está determinada por la interacción entre átomos y moléculas, por uniones químicas de diferente energía como son las fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrogeno y las uniones iónicas o covalentes (37). En general depende de las características químico-

estructurales entre al fármaco y el receptor. Esta interacción puede ser de modo que: 1) interactúa con una enzima, 2) activa una porción inactiva del DNA conduciendo a la síntesis de nuevas proteínas, 3) ser coenzimas facilitadoras de la actividad enzimática, 4) alterar la permeabilidad celular e interactuar con mecanismos acarreadores específicos (33) (37).

Lo anterior nos lleva a plantear la *interacción farmacológica*, como un proceso en el que observamos una competencia entre dos o más fármacos por el mismo sitio receptor, de este modo los efectos que resulten podrán ser sinérgicos, en general una potenciación, o bien efectos antagónicos. Este concepto es de suma importancia para entender los resultados de esta investigación, ya que administramos diferentes fármacos en músculo liso gastrointestinal, sin embargo, nuestra explicación de interacción estaría incompleta si no consideráramos el comportamiento del fármaco y la reacción que genera. El *fármaco agonista* reúne propiedades que le permiten formar un complejo con el receptor y generar un efecto que induce una respuesta, esto como resultado de la interacción directa sobre las propiedades fundamentales del receptor. El fármaco se caracteriza por tener *afinidad* entendiendo esto como la capacidad de un fármaco para unirse a un receptor específico y formar un complejo estable, y *eficacia*, lo que significa que al ocupar al receptor y dependiendo de la concentración a la que se presente, iniciará una serie de reacciones que conducen a un efecto fisiológico (14) (37) (80). Lo que nos lleva al concepto de *agonista parcial*, en el cual la respuesta máxima es menor que la producida por un agonista muy activo, actuando sobre la misma serie de receptores. Cuando está produciendo su respuesta máxima se hallan ocupados todos los receptores, pero su eficacia es tal que el estímulo producido no basta para obtener la respuesta máxima que hubiera sido posible lograr; debido a que ocupa receptores, estará compitiendo con agonistas

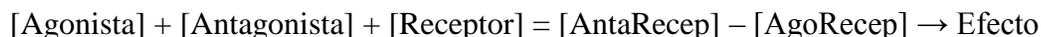
activos, por lo que disminuirá la respuesta del agonista más activo manifestando una propiedad antagonista y agonista al mismo tiempo (14) (80).

Un *agonista no competitivo* evitará que el agonista, en cualquier concentración produzca un efecto máximo en el receptor esto podría deberse a la interacción reversible o irreversible con un componente del complejo para evitar la unión del agonista, de manera que se disminuye o elimina la unión de estos (44). La clasificación continúa con los *agonistas mixtos* que son aquellos fármacos capaces de actuar como agonistas con afinidad y eficacia en distintos receptores, pero que actúan en un mismo sentido pudiendo tener como consecuencia un antagonismo. Un ejemplo de estos es la morfina, que estimula tanto a los receptores μ (μ) como a los receptores sigma (Σ) y kappa (K). Sin embargo, en un *agonista inverso* no podemos hablar de un antagonismo clásico debido a la falta de un receptor específico, como es el caso de las benzodiazepinas (BZP) en donde aun no se demuestra un agonista endógeno; en cambio la ansiedad se antagoniza con las BZP, es decir, un agonista de receptor a BZP que antagoniza un efecto en este caso a la ansiedad (33). Finalmente, tenemos a los *agonistas parciales* que son fármacos que presentan afinidad y eficacia, pero en menor medida que la de un agonista puro o total. Pueden llegar a estimular de forma parcial a un receptor o bien solo estimular a un subtipo de receptores de los que existan para un agonista puro o total. Como ejemplo podemos citar el de la acetilcolina (Ach) el cual se comporta como agonista puro con afinidad y eficacia sin embargo la metacolina (análogo sintético de Ach) es un agonista parcial, presentando *afinidad* pero una eficacia menor a la Ach (37) (47) (80). En los términos anteriores se involucra brevemente a otro tipo de interacción a la que se denomina *antagonismo* el cual es un tipo de interacción en que el conjunto de efectos asociados de dos fármacos, es menor que la suma de los efectos de estos fármacos si actúan por separado. Por lo

que un *antagonista* es un fármaco que posee *afinidad*, pero carece de *eficacia* o de *actividad intrínseca*, esto es, que la sustancia es capaz de unirse específicamente a determinados receptores debido a que tiene los elementos estructurales para hacerlo y formar el complejo con el receptor, pero no induce los cambios necesarios en el receptor para generar una respuesta. Sin embargo, puede bloquear la unión de una molécula endógena impidiendo su unión al receptor (33).

El término de actividad intrínseca, fue propuesto por Ariëns (1954) (citado por 44) para describir la relación que media entre el efecto producido por un fármaco y la concentración de complejos fármaco-receptor. La *eficacia* o *actividad intrínseca* se considera como la capacidad de activar un receptor para generar o inducir una respuesta, considerando también, lo referente a la magnitud de la respuesta, la cual está determinada por el número de receptores ocupados (44) (14) (37).

Retomando el tema del *antagonismo*, encontramos que este, se clasifica en: *antagonismo competitivo*. El cual puede considerarse como una interacción donde un fármaco interactúa en forma *reversible* con una serie de receptores para formar un complejo, pero el complejo antagonista-receptor no desencadena respuesta alguna, la actividad intrínseca del antagonista es nula. Como ejemplo podemos citar a la Ach que al aumentar la dosis desplaza a la atropina del receptor (14) (47).



El *antagonismo no competitivo*, se refiere cuando un antagonista forma un enlace muy potente, casi de forma irreversible a un receptor con uniones de alta energía. El antagonista puede considerarse como *irreversible*, cuando el grado de antagonismo no puede superarse aumentando la concentración del agonista. Esto da como resultado que la cantidad de

receptores disponibles para la interacción esté disminuida y la respuesta máxima también lo estará. El *antagonismo fisiológico* o funcional es el que se observa cuando dos agonistas, actuando en diferentes sitios o receptores, producen efectos opuestos sobre una misma función fisiológica. Un ejemplo podría ser el efecto de la histamina sobre la presión arterial (que estimula al receptor H1) ocasionando vasodilatación e hipotensión (33).

Por último, tenemos al *antagonismo químico*, la principal característica de esta interacción consiste en que las moléculas de un fármaco agonista interaccionan directamente con las moléculas de un antagonista para neutralizar el efecto del agonista. Para ejemplificar lo anterior consideremos a una toxina en particular que puede ser entendida como el compuesto agonista y el antídoto como su antagonista (37).

SINERGISMO

Dentro de las interacciones farmacológicas un concepto de importancia es el *sinergismo* y se define como: el aumento de los efectos específicos de un fármaco por la presencia de otro (33).

El *sinergismo de adición o sumación* está contemplado cuando dos fármacos producen el mismo tipo de respuesta no importando cuál es el mecanismo de acción para tal efecto. El *sinergismo de potenciación* tiene su explicación en la relación directa con el mecanismo de acción de los fármacos y se presenta cuando el efecto conjunto de dos fármacos es mayor que la suma de sus efectos individuales. Finalmente, el *sinergismo de sensibilización* se realiza cuando un fármaco que es aparentemente inactivo para una acción farmacológica específica, es indispensable para que se concrete la acción farmacológica de un segundo fármaco (37).

Estos conceptos muestran el papel tan importante del complejo fármaco-receptor para poder generar un estímulo en el receptor traducándose posteriormente, en una respuesta a

nivel celular cuya magnitud pueda ser medida subsecuentemente con instrumentos electrofisiológicos como lo es el polígrafo el cual es una herramienta de gran ayuda.

EL RECEPTOR.

A principios del siglo XX, existía controversia, respecto al concepto de “Receptor”, por lo que Langley (1852-1926) y Ehrlich (1854-1915) (citado por 44) de forma independiente propusieron un modelo para explicar este concepto. En 1878 llegaron a la conclusión de que “hay una combinación química entre el fármaco y un constituyente de la célula al cual denominaron sustancia receptora” (44) (14) (37).

El concepto, dio pauta para definir al *receptor*, estableciéndose que es una macromolécula de origen proteico que esta presente en la membrana celular o dentro de algunas células blanco, en un determinado número, el cual es capaz de reconocer de forma específica a una única molécula denominada mensajero o bien ligando natural como puede ser una hormona, un neurotransmisor, un factor de crecimiento, un neuromodulador, etc. La consecuencia de tal interacción produce una respuesta específica. La compleja estructura tridimensional de la proteína asegura una gran especificidad de reconocimiento entre las moléculas del ligando y el receptor, los sitios de reconocimiento químico para las sustancias endógenas son susceptibles de ser reconocidos también, por sustancias o fármacos exógenos con estructuras químicas parecidas a las endógenas (65) (37) (80), las características del receptor son la sensibilidad, la selectividad y especificidad (14).

Podemos decir que la *función del receptor* es la de reconocer una señal o molécula química específica y diferenciarla de otras moléculas. La estructura y la integración de los receptores con la función celular probablemente este regida genéticamente. Así la interacción

con fármacos agonistas brinda un estímulo que muy probablemente ocasione un cambio en la conformación de la macromolécula del receptor o del medio que la rodea (14) (47).

MENSAJEROS QUÍMICOS.

La sorprendente especificidad que muestra el receptor con el ligando o molécula mensajero tiene su origen en el concepto de ligando natural, ya que dentro del organismo existen sustancias endógenas que de forma natural se unen con estos receptores formando un complejo que regula y activa las diferentes funciones fisiológicas, por lo tanto un **ligando endógeno** es una sustancia presente en el organismo de forma natural teniendo sus propios receptores como los de Ach, Ácido gamma amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés) y los corticoesteroides, todos éstos son transmisores sinápticos. Un **ligando exógeno** será una sustancia exógena capaz de limitar o inclusive bloquear, la acción de un ligando endógeno por su gran similitud estructural que le permite suplantar al ligando endógeno en su unión al receptor. La **transmisión sináptica** realizada generalmente por neurotransmisores, es la conducción de un impulso a través de una sinápsis, a lo largo de una fibra hacia una estructura proximal o efectora (33) (47).

El **trasmisor** es una sustancia la cual se libera sinápticamente en una neurona y tiene un efecto sobre otras células de forma específica, se caracteriza esencialmente porque se sintetiza en la neurona, se localiza en la terminal presináptica y es liberada por medio de estimulación nerviosa para ejercer su acción. En el sistema nervioso central (SNC) existen sustancias consideradas neurotransmisoras por ejemplo: la Ach, la NA, la serotonina (5-HT), la histamina, el GABA, la glicina y el glutamato, y los de origen peptídico como la sustancia P, encefalinas, endorfinas y el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés). Estas sustancias neurotransmisoras son sintetizadas por una serie de reacciones químicas en la

neurona participando activamente enzimas y cofactores, la síntesis puede ser también a partir de un aminoácido como sucede con la dopamina (DA), o la MEL a partir del aminoácido triptofano (37).

Sabemos que el proceso sináptico involucra un mecanismo en el que intervienen diversas estructuras que resumimos como: a) una membrana excitable eléctricamente, b) un transporte al interior celular de la molécula precursora del neurotransmisor, c) la síntesis enzimática del neurotransmisor, d) almacenamiento en las vesículas presinápticas e) liberación del neurotransmisor, f) unión y estimulación al receptor (37) (47).

La interacción de tipo farmacológica así como a los receptores y neurotransmisores cumplen un importantísimo papel dentro de las funciones de regulación en el organismo, estos procesos celulares son conocidos y estudiados hasta la fecha. Para comprender y analizar los resultados obtenidos experimentalmente en este trabajo es conveniente mencionar las características y propiedades de las sustancias que utilizamos en el experimento.

2.2. MELATONINA (MEL).

Historia.

La MEL fue identificada y aislada en 1958 por el dermatólogo norteamericano Aarón Lerner (54) y ahora se sabe que esta presente como una hormona extensamente difundida en el organismo de los seres vivos y puede ser encontrada en organismos muy diferentes, desde humanos hasta protozoarios, bacterias, hongos, invertebrados (40), e insectos (81), estando presente desde hace millones de años (65). Sin embargo, no es exclusiva del reino animal ya que también se encuentra en plantas, (43). En los humanos esta hormona o N-acetil-5-metoxitriptamina, es un indol secretado por la glándula pineal (GP) (Figura No. 3), cuerpo

pineal o “*epiphysis cerebri*”, desde que se conoce su existencia, a ésta glándula se le han atribuido muchas funciones diferentes, incluso la de ser como la denominó René Descartes el “asiento del alma” (25). Sin embargo, por estudios de anatomía comparada se sabe que la GP es un vestigio de lo que era el tercer ojo en la parte alta posterior de la cabeza en animales inferiores de acuerdo con la escala filogenética y desempeña importantes funciones en el organismo (38) (Figura No.4) No fue sino hasta el siglo XX que Lerner descubrió su intensa actividad fisiológica; y se confirmó la producción de la hormona, MEL.

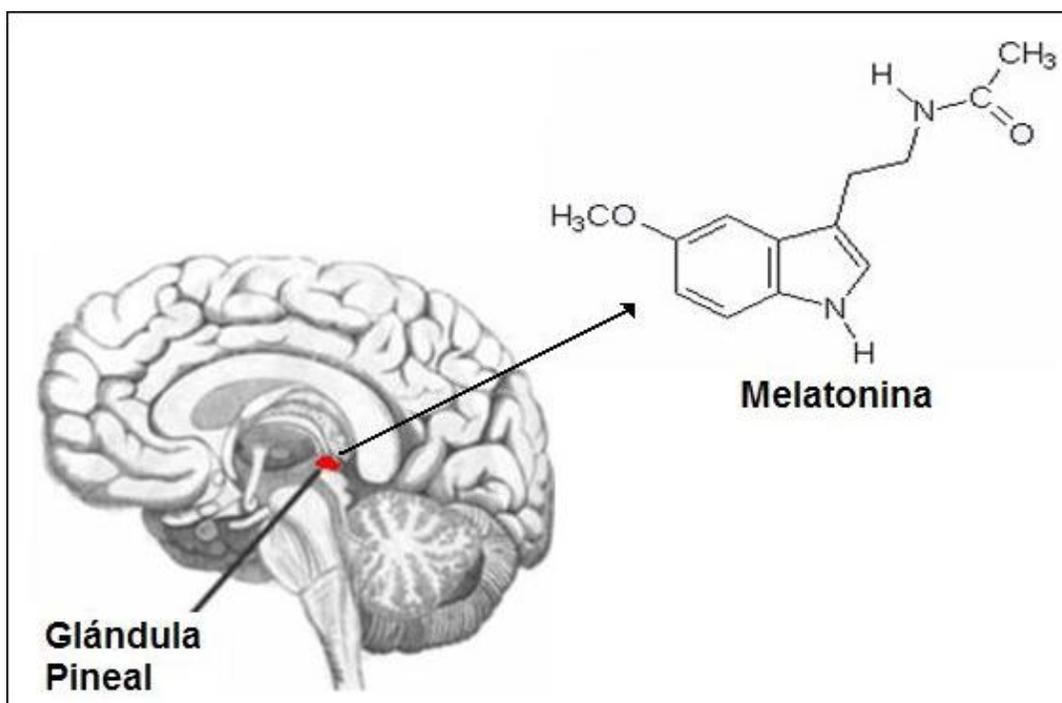


Figura No. 3 La glándula pineal o “*epiphysis cerebri*” en el cerebro humano y la estructura química de la MEL (I2).

Anatomía y morfología de la Glándula Pineal.

El tamaño y la forma de la epífisis difiere entre especies y está presente en la mayoría de los vertebrados, excepto en algunos reptiles y en algunas aves no se ha encontrado alguna

conexión entre el cerebro y la epífisis. (43) De este modo existe un alto grado de variabilidad morfológica incluso entre especies, esta podría ser un reflejo de la adaptación en las funciones de la GP así como de factores ambientales. La clasificación anatómica de la GP más frecuentemente citada es la de Vollrath (citado por 59), ya que la elaboró con base en la posición de la GP relativa al diencéfalo y al tercer ventrículo, así como en su forma y tamaño, la pineal tipo A se localiza sobre la cara dorsal del hipotálamo, ocupando una posición central entre los dos hemisferios cerebrales, con una elongación desde el diencéfalo hasta cerca del cerebelo (11). La GP humana es clasificada como tipo A. (59)

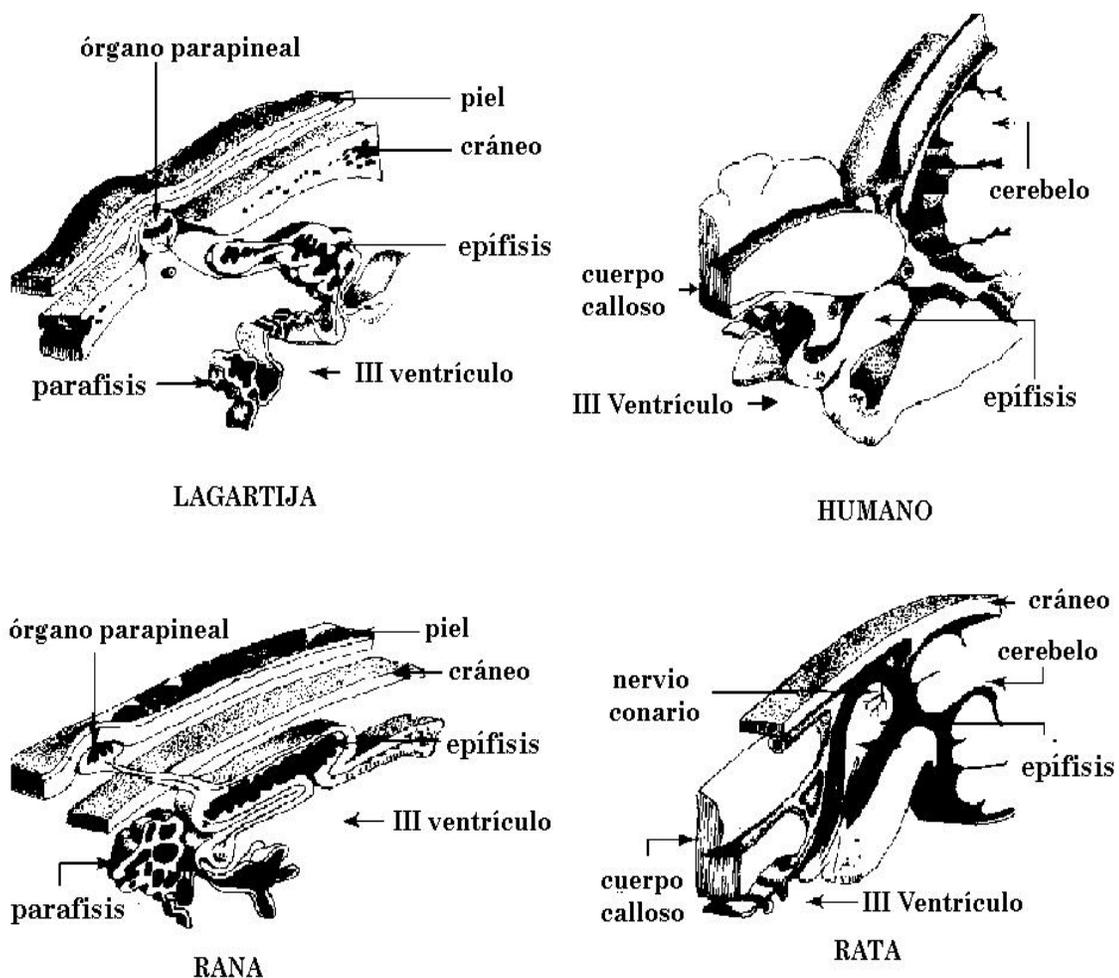


Figura No. 4 De acuerdo a la escala filogenética, relación de la GP con otras estructuras en diferentes especies animales (71).

Tiene un peso aproximado de 100 a 200 mg y en el adulto promedio es de 5-9 mm de longitud, 1 -5 mm de ancho y 3-5 mm de grosor, (43) (59) empezando su desarrollo en el segundo mes de gestación (59). Esto constituye parte del hipotálamo, el cual es un complejo constituido por el cuerpo pineal, las glándulas habenuares y el órgano subcomesural (43) (Figura No. 5)

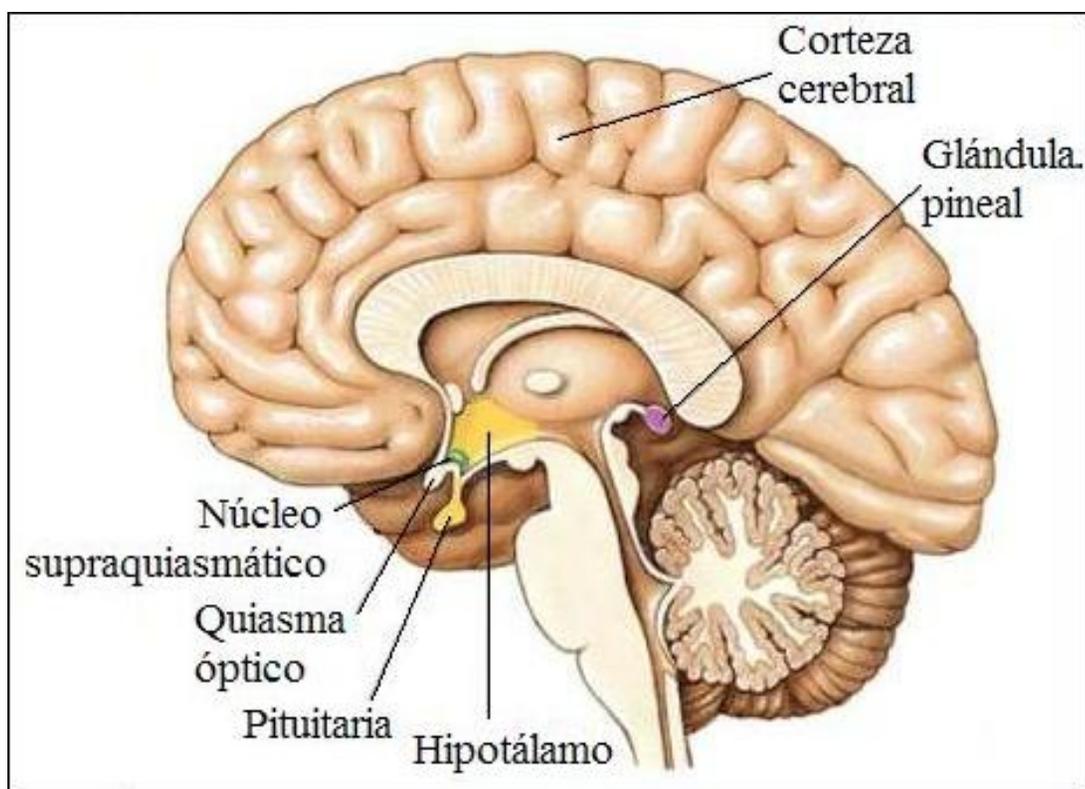


Figura No. 5 Anatomía de la GP y estructuras cerebrales (I3).

Características histológicas de la Glándula Pineal.

La GP humana es descrita como un núcleo central compuesto de lóbulos y una corteza periférica con una distribución difusa de neuronas (59). Histológicamente, la GP está constituida por tres tipos celulares básicos: células parenquimatosas o pinealocitos, células epifisiales y células gliales (Figura No. 6) Los pinealocitos descritos por Del Río Ortega en

1932 (citado por 65), son el tipo celular predominante y producen la MEL junto con otros péptidos. Los pinealocitos humanos tienen un núcleo prominente y una apariencia granular, con procesos citoplasmáticos terminando en capilares fenestrados que le dan una configuración característica de glándula endocrina (59). La GP por su rica vascularización, presenta un elevado flujo sanguíneo, solo superado por el riñón, por lo que esta propiedad facilita la secreción directa de MEL dentro del sistema circulatorio y su contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (65).

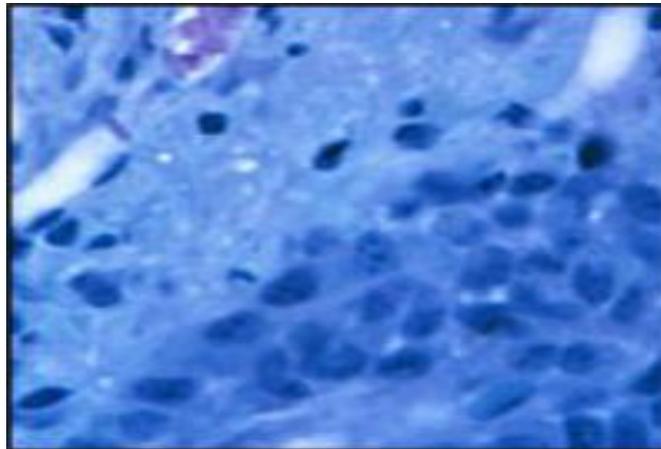


Figura No. 6 Microfotografía de un corte histológico de GP, en la que observamos los pinealocitos y otras estructuras celulares (14).

La Glándula Pineal en la fisiología humana.

La GP ejerce una variedad de funciones: como glándula endocrina, como transductor, como regulador de hormonas y como interruptor del ritmo circadiano. Extensas investigaciones en animales relacionan a la MEL con la expresión de los ritmos estacionales, en la modulación de los ritmos circadianos y en la regulación del sueño, además de la fisiología reproductiva, cardiovascular e inmunológica (59) (11).

Melatonina.

El nombre de MEL se refiere a que originalmente fue descubierta como una molécula con habilidad aclaradora sobre los melanocitos de la rana y del pez (Lerner, Case y Takahashi, 1958) (55), además, de la similitud estructural con la serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina). La MEL es sintetizada en la GP, en la retina y otros sitios como el TGI (1), aunque hay muchos otros índoles y péptidos que son sintetizados y secretados por la GP en mamíferos. Axelrod (6) demostró que los pinealocitos poseen toda la maquinaria necesaria para la síntesis de MEL, así el *proceso de síntesis* seguiría el siguiente modelo: el precursor de la síntesis es el aminoácido triptofano, que penetra al pinealocito a través de transporte activo, transportado a través del torrente sanguíneo, este transporte es regulado por los receptores noradrenérgicos. El primer paso consiste en la hidroxilación debida a la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa y posteriormente se descarboxila. Durante este proceso aumenta la concentración de un importante neurotransmisor, la serotonina o 5-HT, la cual después, de una acetilación por la enzima N-acetil-transferasa (NAT) da como resultado la producción de N-acetil serotonina. Finalmente, este sustrato es catalizado por la enzima hidroxindol-5-metiltransferasa (HIOMT) produciendo la indolamina N-acetil-5-metoxitriptamina (MEL) (43). La actividad de la enzima NAT en particular se incrementa de 30 a 70 veces en la noche y en algunas circunstancias es la limitante en la síntesis (1) (43) (Figura No.7).

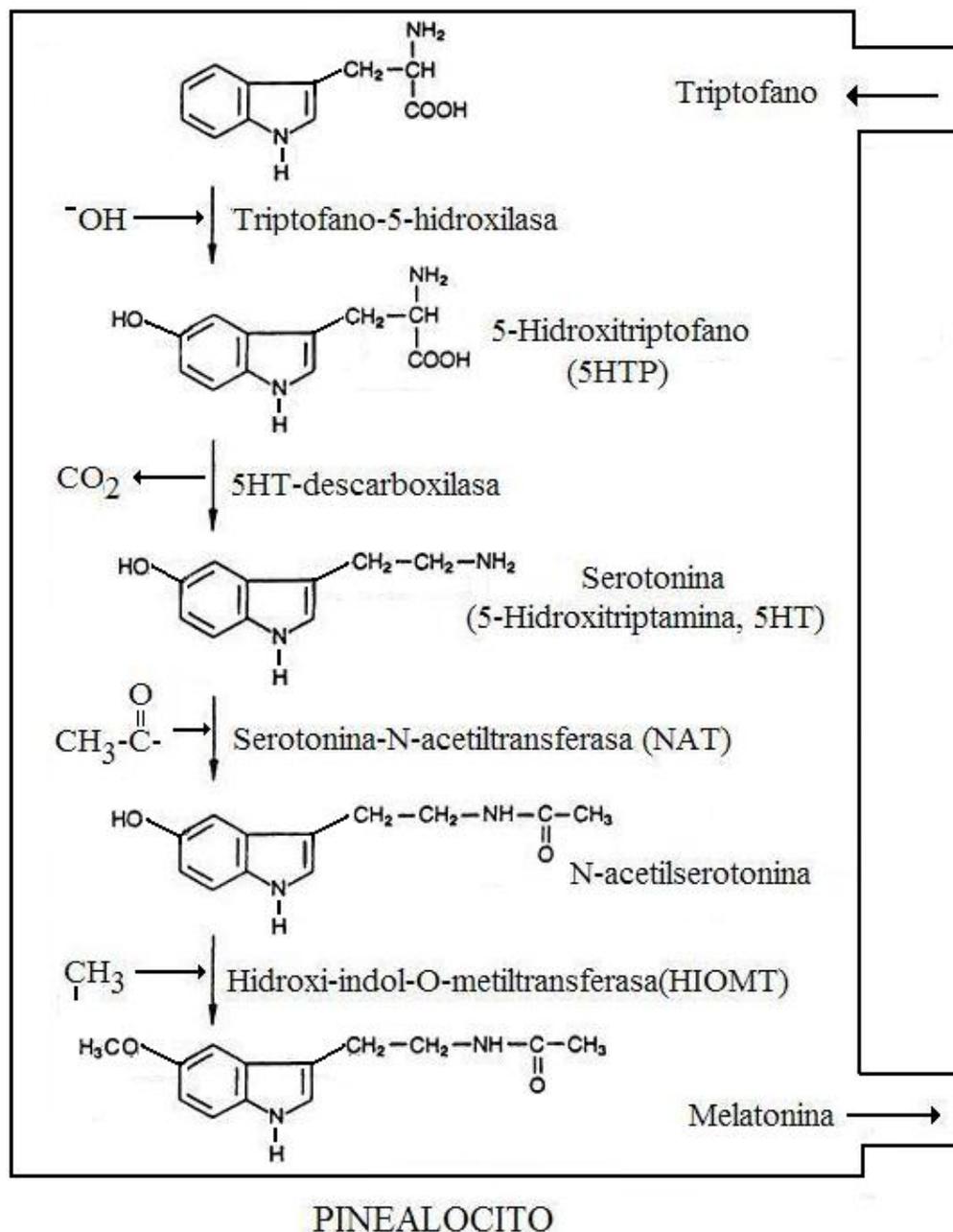


Figura No. 7. Mecanismo de síntesis de la MEL dentro del pinealocito, se muestran las estructuras químicas, productos de síntesis y enzimas involucradas (59).

La MEL es una molécula altamente lipofílica, aunque tiene propiedades hidrofílicas, se almacena en mínima cantidad en la GP y se libera hacia los capilares, donde el 70% se une a albúmina. Cuando la MEL se administra vía intravenosa, el tiempo de vida media plasmática

es de aproximadamente 30 min. Por vía oral su eliminación es bifásica con tiempo de vida media aproximado de 3 y 45 min. La MEL se metaboliza primariamente en el hígado, y en el riñón bajo una hidroxilación se transforma en 6-hidroxi melatonina (59).

Melatonina y Ritmos circadianos.

Podemos explicar el término circadiano como una oscilación cíclica de algún evento o señal cercano a las 24 hrs. (38). El ritmo circadiano es generado por oscilaciones circadianas endógenas dentro del núcleo supraquiasmático (NSQ) también llamado “*reloj biológico*” (1) (60), la GP y el cerebro (20). La síntesis de MEL por la GP es inducida principalmente por el ciclo luz-oscuridad, ya que los niveles de MEL aumentan en humanos sanos durante la fase de oscuridad o al dejar de percibir en la retina estímulos luminosos (36) la secreción esta condicionada a la duración de la fase de oscuridad (1); las concentraciones plasmáticas de MEL empiezan a incrementarse a cantidades detectables de (5 pg/mL) durante la tarde, alcanzando niveles máximos a media noche y empiezan a decaer otra vez con la luz del día o cuando se percibe en la retina un estímulo luminoso (59) (60). (Figura No. 8)

El mecanismo por el que se activa la síntesis de la MEL empieza en la retina del ojo, por donde señales luminosas alcanzan el NSQ actuando vía el tracto retino-hipotalámico (TRH) el cual se origina a partir de células retinales ganglionares, que son intrínsecamente foto-receptivas, y que a su vez contienen un pigmento llamado melanopsina, presentando una sensibilidad máxima a la luz con una longitud de onda de 484 nm. En los mamíferos la organización circadiana está controlada por el NSQ el cual sirve como un “control maestro” de los ritmos conductuales y fisiológicos incluyendo (locomoción, termorregulación, funciones cardiovasculares y procesos endocrinos) (20). Además de un control endógeno, una vez que se detecta nuevamente el estímulo luminoso, se induce la supresión de los niveles de MEL en

humanos, y sugiere que la melanopsina contenida en las células ganglionares esta involucrada en la transmisión del impulso luminoso a la GP, (59) (Figura No.9)

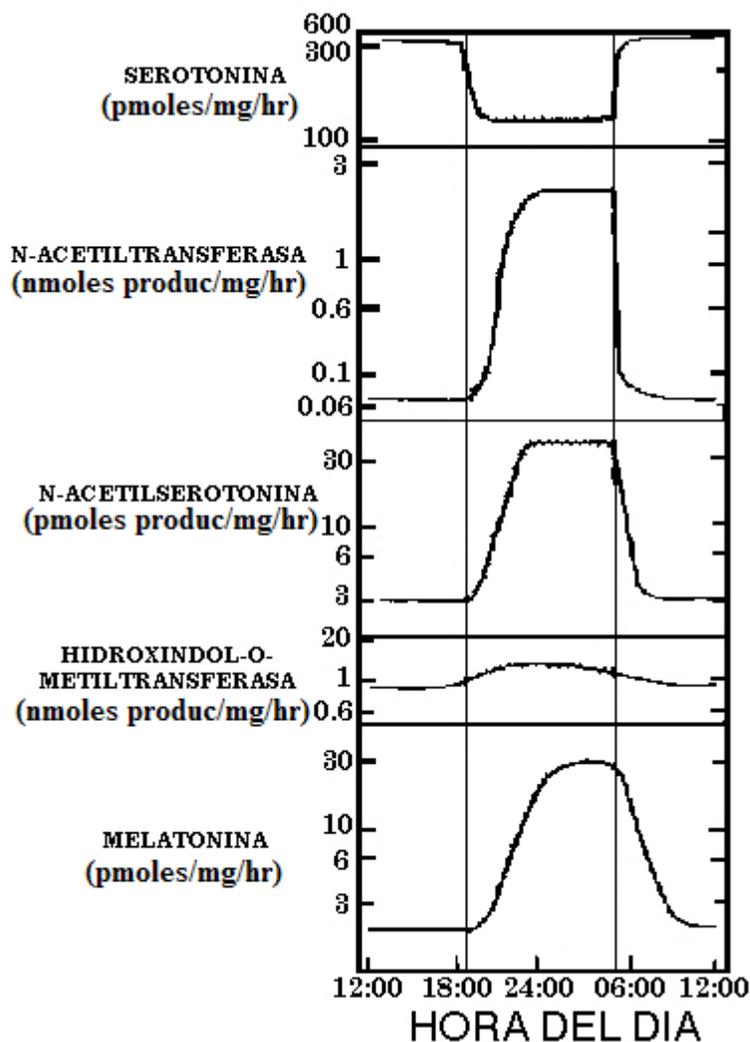


Figura No. 8. Representación de la variación en los niveles de la MEL y sus precursores siguiendo el ritmo circadiano (7).

Inicialmente se había pensado que solo niveles de intensidad luminosa altos podían ejercer un efecto inhibitor en los humanos, pero estudios recientes han mostrado que incluso niveles relativamente bajos de luz (100-300 lux), encontrados normalmente dentro de las casas pueden suprimir la producción de MEL. (1) (Figura No.10) La evidencia de regulación

circadiana en humanos esta hecha con base en estudios que muestran los cambios de fase en estos ritmos, por ejemplo: temperatura corporal, concentración de MEL endógena, y tiempo de sueño, etc. (59)

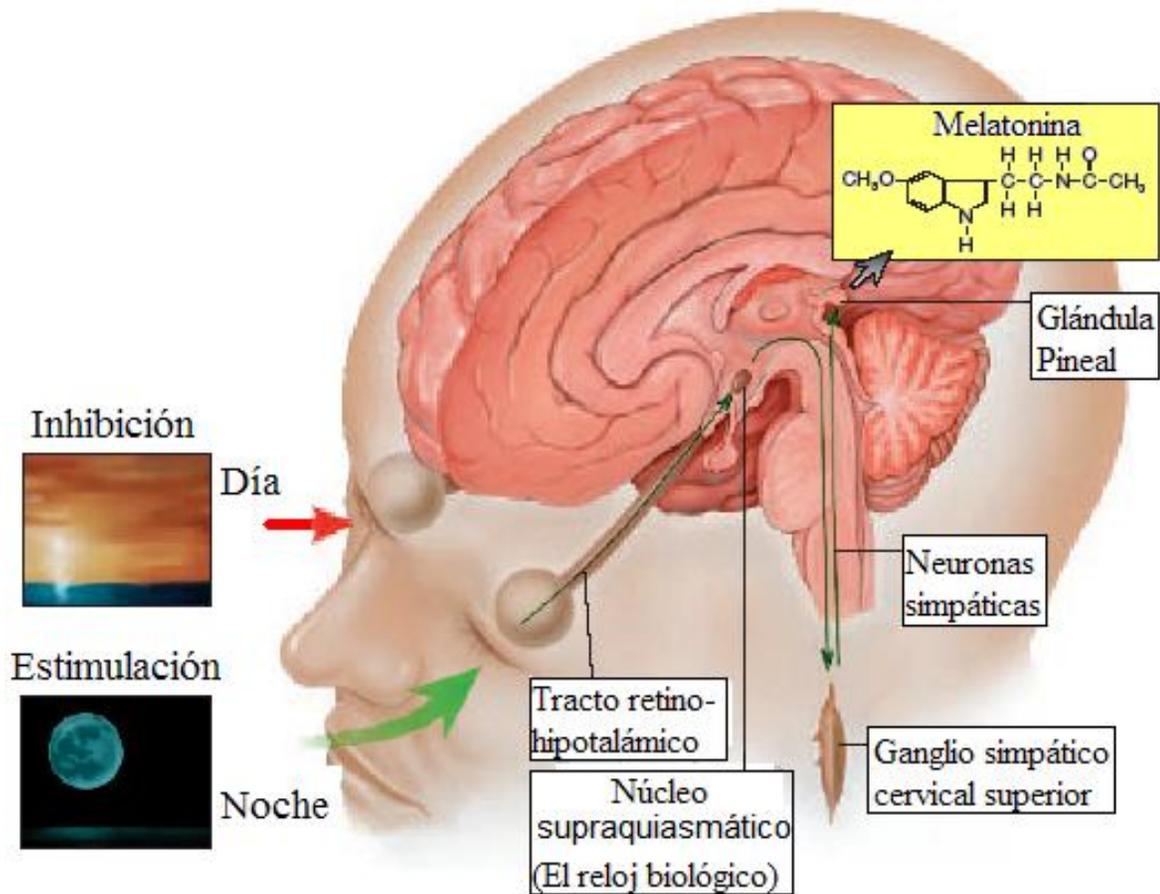


Figura No. 9. El estímulo luminoso alcanza a la GP a través de la vía neuronal deteniendo la síntesis de MEL, y por el contrario la oscuridad la activa de nuevo (79).

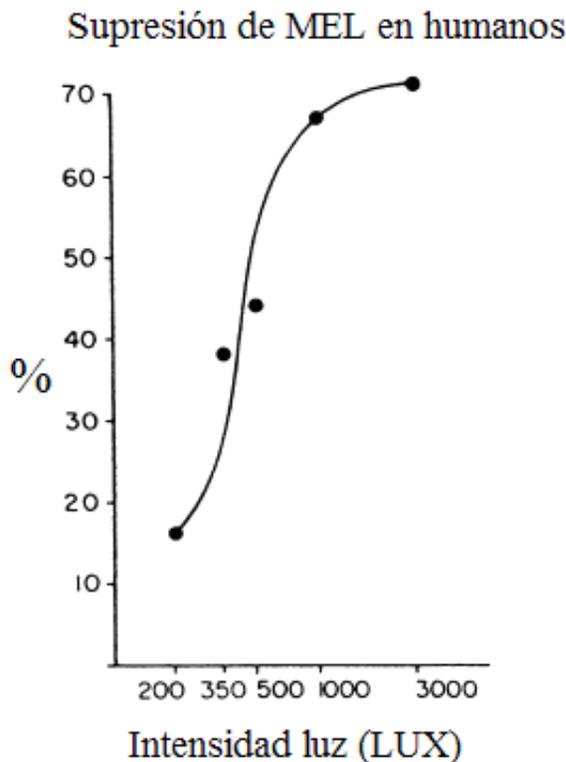


Figura No. 10. Curva intensidad-respuesta, mostrando el máximo porcentaje de supresión de la MEL debida a la luz en diferentes intensidades (59).

Usos de la MEL.

A la MEL se le han sugerido diversos usos, por ejemplo como antioxidante, ansiolítico, analgésico, anticonvulsivante, anti-epiléptico, pero a pesar de esto aún no se ha definido totalmente su mecanismo. En humanos los primeros efectos reportados corresponden a efectos sedativos e hipnóticos. Hace 20 años la GP fue llamada “órgano tranquilizante” (73, 74) debido a las *propiedades hipnóticas* de la MEL, de hecho dosis de 100 µg/Kg. causaban un decremento en la actividad motora en hámster, y efecto sedativo en rata, ratón y gato. La administración de MEL en dosis de (20-200 mg/Kg.) resulta en un *efecto analgésico* en ratón (36). Las propiedades de *anticonvulsivante* se han estudiado en mandriles, ratones, gerbil de Mongolia y humanos. Además inyecciones sistémicas de MEL disminuyen las crisis

convulsivas que son seguidas de la aplicación local de varios agentes epileptogénicos (pentilentetrazol) en el cerebro de rata, por lo que se sugiere un *efecto anti-epiléptico* (36) reportado en dosis de 25 µg por 13 semanas (60). Recientemente se le ha adjudicado a MEL un *efecto ansiolítico* Golombek y cols., (Citado por 36) reportó que a dosis de (1 mg/Kg) mostraba un efecto ansiolítico en ratas con MEL, también, Naranjo-Rodríguez y cols., (66) reportaron el efecto ansiolítico de MEL a (1.0 y 2.0 mg/Kg) lo que permite sugerir que ésta aumenta la actividad ansiolítica de las BZP. Por otra parte la MEL y el ritmo circadiano aunque son endógenos están altamente regulados por el ambiente, lo que ha sugerido el uso de MEL como un agente para *prevenir el insomnio*, y otras categorías relacionadas con el ciclo sueño-vigilia, que pueden considerarse dentro de “Trastornos del ritmo circadiano” (20) (1) (60), estos estudios indican que la administración de MEL es un promisorio agente terapéutico para el tratamiento de desórdenes del sueño, sincronizando nuevamente el ritmo circadiano (1). Otra posible aplicación de MEL en estudios clínicos involucra el tratamiento de desórdenes emocionales estacionales, en humanos una de las propiedades más interesantes de MEL es su aplicación en el tratamiento de los síntomas del *jet-lag* en viajes trans-meridianos (36) (1) (60). También, se ha estudiado un mecanismo de acción contra el daño por radicales libres, la MEL que es altamente difusible y puede unirse al núcleo de la célula ha mostrado ser un *poderoso antioxidante* comparado con el glutatión, el manitol, la vitamina C (59) (11) (60) y es equipotente a la vitamina E (70). Esta bien documentado que agentes anti-inflamatorios no esteroidales como la indometacina presentan toxicidad en el tracto gastro-intestinal y recientes investigaciones demuestran el beneficio de la MEL en la *prevención y reparación de úlceras en estómago y duodeno* de rata, ya que cuando se compara contra omeprazol y ranitidina resulta ser menos eficiente que el primero pero más eficiente que el segundo, la

MEL esta presente en el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el colon, en donde se sabe que influencia la secreción de bicarbonato en el estómago y protege del daño causado por radicales hidroxilo y limita la generación de radicales peróxido, en dosis de 60 mg / Kg. por vía intraperitoneal (i.p.) (70) también, ha sido reportada su eficacia para tratar lesiones gástricas causadas por reperfusión isquémica (19) (Figura No. 11). Como un tratamiento alternativo en la enfermedad de *Alzheimer*, ya que ayuda en la estabilidad y conservación de los canales de neurofibrilla responsables de las sinapsis neuronales (59) (45).

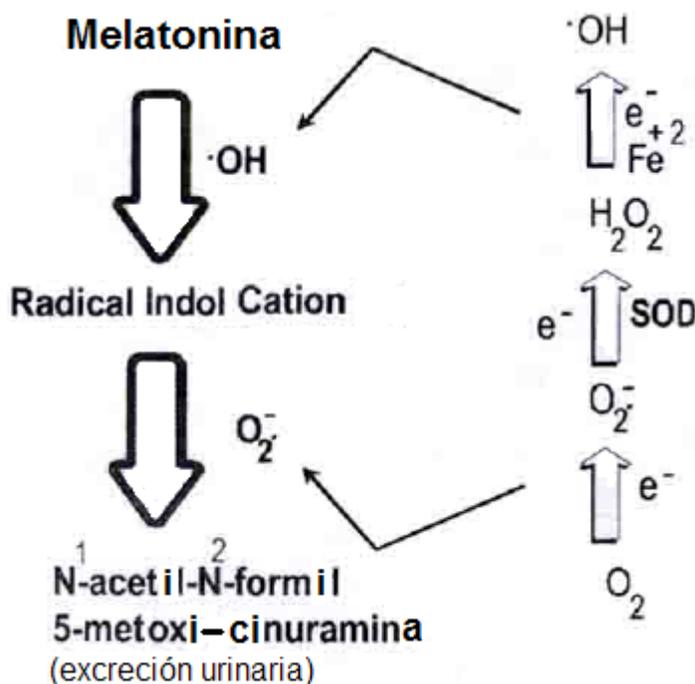


Figura No. 11. Representación del mecanismo involucrado en la eliminación de radicales libres de oxígeno por medio de la MEL (65).

Melatonina y Sistema Inmunológico.

Existen muchas investigaciones relacionan a la MEL con la modulación del sistema inmune. Poon y Pang (Citado por 59) sugieren muchos mecanismos de acción para la MEL, con base en la detección de receptores a MEL en órganos linfoides y linfocitos. Otros estudios

en animales también, han demostrado que la MEL presenta propiedades oncostáticas las cuales pueden disminuir el crecimiento y el progreso de tumores, este efecto oncostático es especialmente marcado en tumores dependientes de hormonas reproductivas (senos y ovario), posiblemente por antagonismo de la mitogénesis mediada por estrógenos. Estudios “In Vitro” en humanos han mostrado un efecto inhibidor dosis-dependiente de la línea celular MCF-7 responsable de un cáncer de seno. Otros estudios clínicos de muchos tipos de tumores también han mostrado que la administración de MEL con bajas dosis, incrementa la efectividad disminuida de las IL-2 en pacientes que no toleraban o respondían a los tratamientos convencionales (59) (11).

Receptores a Melatonina.

Los receptores a MEL en la retina, están implicados en la regulación de las funciones visuales y los localizados en el NSQ, en los efectos de la MEL sobre el ritmo circadiano pero existe evidencia de que la MEL puede acceder a sitios en el citosol y el núcleo para mediar una variedad de efectos celulares en los tejidos sin los receptores acoplados a la membrana (28). El desarrollo del compuesto radioactivo [¹²⁵I] 2-iodomelatonina (IMEL) como un ligando específico de alta actividad, ha permitido la identificación de sitios de unión, con características de alta afinidad, saturables, reversibles y específicas, en las membranas celulares principalmente en NSQ, el pars tuberalis de la glándula pituitaria, la retina y el cerebro (1). La retina de aves y mamíferos según Dubocovich y Takahasi (29) contiene sitios de unión de alta afinidad. La clonación del primer receptor de alta afinidad a MEL se realizó a partir de melanoforos de piel de rana y la del receptor a MEL de oveja y humano fue reportado en 1994 por Reppert y cols., (Citado por 1) con una similitud estructural del 80% (1). Pero la discrepancia en los perfiles farmacológicos de los sitios de unión permitió a Dubocovich

(citado por 49, 28) clasificar en dos familias de receptores a MEL (*MT1* y *MT2*) con base en las propiedades cinéticas y farmacológicas de unión a IMEL. El receptor *MT1* ha mostrado ser un receptor de alta afinidad a IMEL y se ha pensado que está involucrado en funciones renales, inducción del sueño y ritmos circadianos (11). La activación del receptor *MT1* inhibe la adenilciclase y consecuentemente decrecen los niveles de 3',5' AMP cíclico vía unión a proteínas G. El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos del receptor *MT1* sustenta su división en tres subtipos: *ML1a*, *ML1b* y *ML1c* (1) aunque fue tipificada una cuarta familia a partir de una clonación parcial de la secuencia de ADN de "Xenopus laevis" (60). Además se ha pensado que la influencia de MEL en el NSQ así como los ciclos circadianos y reproductivos son mediados vía el receptor *ML1a* (11). El análisis de las secuencias totales del receptor revela la presencia de siete segmentos hidrofóbicos consistentes con la arquitectura de los receptores acoplados a proteínas G. Así, por medio de hibridación "In Situ" *ML1a* ha sido detectado en el NSQ de hámster, ratón y rata, así como en el pars tuberalis de oveja y ratón. Estudios adicionales usando transcripción reversa de la cadena de polimerasa (RT-PCR) identifican a *ML1a* en la corteza, el tálamo y el hipocampo en humanos. El receptor *ML1b* se expresa altamente en retina, hipocampo y cerebro esto sugiere que este subtipo interviene en los efectos de MEL en la retina (60) y regula los ritmos circadianos en mamíferos (11). El receptor *ML1c* ha sido detectado por lo general en vertebrados no mamíferos (60) y se piensa que ejerce funciones similares a los subtipos anteriores, en humanos ha sido identificado solamente en una línea celular embrionaria de riñón (11).

El receptor *MT1* posee sitios de unión característicos en retina, cerebro de pollo y pars tuberalis, y un sitio de unión aparentemente distinto que ha sido descrito en hipotálamo de hámster. El receptor *MT2* se caracteriza por una baja afinidad a IMEL (1-3 nM)

contrariamente el precursor de MEL el N-acetilserotonina muestra una alta afinidad (60) se cree que esta acoplado a proteínas G para mediar la transducción de señales de forma similar al receptor MT1, pero su importancia fisiológica permanece aun desconocida (11). Con base en los estudios del ritmo circadiano de la secreción de MEL, se ha predicho también, un ritmo circadiano de la densidad del número de receptores, debido al alto número de receptores que se manifiestan previamente a la desaparición de la luz, puede esperarse que la densidad de sitios de unión de MEL cambie durante el día, pero las razones de las enormes discrepancias reportadas permanecen sin explicación. Después de más de 30 años de investigación la hipótesis de que “MEL actúa a través de la unión a un receptor en la membrana del cerebro” es aceptada, otra posibilidad es que una vez que la MEL entra en la célula ésta es metabolizada en más compuestos potentes los cuales actúan directamente o a través sus propios receptores (49).

2.3. ÁCIDO GAMMA-AMINO BUTIRICO (GABA).

Historia.

El ácido gamma-amino butírico (GABA) (Figura No. 12) fue identificado por primera vez como constituyente químico del SNC en 1950, los niveles de GABA en el cerebro y médula espinal alcanzan concentraciones del orden milimolar (80). El complejo receptor GABA_A fue el primer sitio de unión descubierto por McDonald y Olsen en 1994 (citado por 26) el segundo receptor GABA_B fue descrito por Hill y Bowery en 1981, (citado por 26) finalmente, GABA_C fue identificado por Johnston y cols., en 1975; Bormann en 2000 (citado por 26).

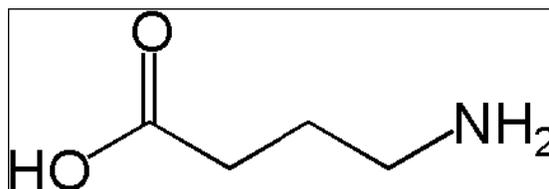


Figura No. 12. Estructura química del GABA (15).

Importancia del GABA en la fisiología.

El receptor GABA_A puede ser regulado para inducir respuestas mediante moduladores positivos o negativos de tipo BZP, barbitúricos o esteroides. Ahora se sabe que algunos desórdenes neuropsiquiátricos, como la ansiedad, la epilepsia, del sueño y convulsivos han sido efectivamente tratados con agentes terapéuticos que modifican la acción de GABA en el receptor. Además, existe evidencia que indica la existencia de una relación entre MEL y el sistema GABA-érgico en el SNC, por ejemplo, la MEL incrementa las concentraciones de GABA en el hipotálamo, además de incrementar el flujo de GABA en muchas regiones del cerebro (84). También, ha sido utilizado en experimentos para investigar la “eficacia negativa” de receptores (21).

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio dentro del SNC de los mamíferos y desempeña un papel fundamental en la modulación de la actividad neuronal, (Figura No. 13) actúa como neurotransmisor de numerosas interneuronas locales, como por ejemplo: las células en cesto del cerebelo y del hipocampo, células de Purkinje del cerebelo, células granulares del bulbo olfatorio y células amacrinas de la retina. También, es frecuente que las neuronas GABA-érgicas coexpresen neuropéptidos transmisores (80) (67) (26). Como consecuencia de la amplia distribución y utilización de GABA y glutamato, ambos transmisores están involucrados indirecta o directamente en la mayoría de las funciones del SNC, así el descubrimiento del lugar específico de unión para las BZP que se encuentra en la

subunidad γ_1 del receptor GABA_A, constituyó una pieza importante del complejo canal de cloruro-receptor GABA (80).

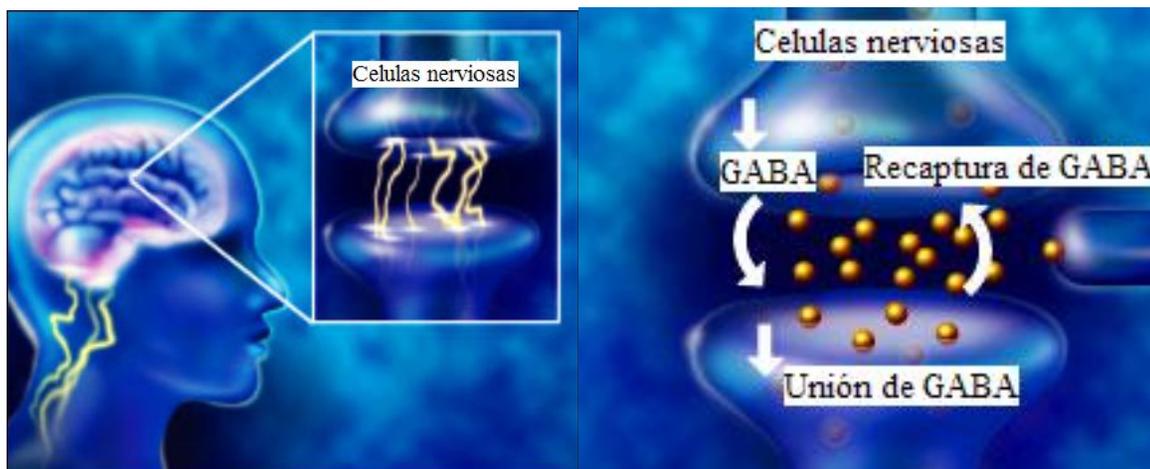


Figura No. 13. El GABA se encuentra presente como neurotransmisor inhibitorio dentro del SNC (16).

La disfunción de la transmisión sináptica mediada a través de GABA en el SNC, conduce, a desórdenes en el sistema nervioso, por ejemplo, una hipoactividad está ligada a epilepsia, convulsiones, ansiedad, estrés, desórdenes del sueño y depresión. Por el contrario una hiperactividad esta asociada con la esquizofrenia (67).

Síntesis.

El GABA se biosintetiza a partir de glutamato siguiendo una vía catalizada por la descarboxilasa del aminoácido L-glutamato, en su mayor parte el GABA y el glutamato que se utilizan como neurotransmisor derivan de la glutamina existente en las células gliales (80) (Figura No. 14).

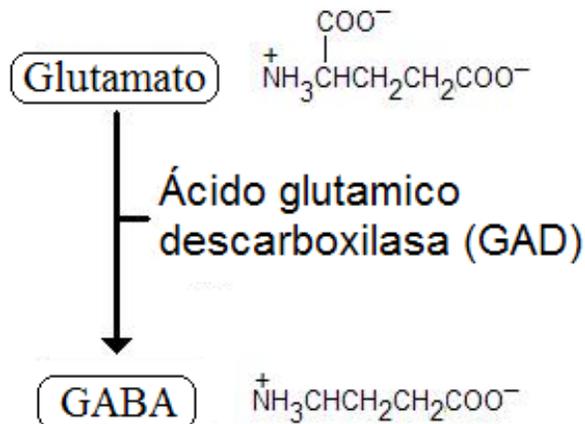


Figura No. 14. La síntesis del GABA a partir de glutamato y la enzima GAD (17).

Receptores.

El GABA interactúa con diferentes sistemas receptores que están ubicados tanto en el astrosito como en la neurona, de esta forma se conocen tres subtipos del receptor GABA. (GABA_A y GABA_C) de características ionotrópicas y (GABA_B) de características metabotrópicas. El receptor GABA_A , (Figura No. 15) también denominado por su estructura complejo canal de cloruro-receptor GABA, es una unidad pentamérica de localización postsináptica, es activado por ligando ya que contiene un canal de acción que es modulado por la unión a GABA (50) (10) (67), regula la magnitud de la neurotransmisión inhibitoria rápida, que es un proceso fundamental en la actividad cerebral y cuyas células expresan este receptor en sus membranas, razón por la que es el receptor más abundante (50), puede ser modulado alostéricamente por fármacos tipo BZP, barbitúricos, anestésicos y por los alcoholes (12) también por hipnóticos de tercera generación como (imidazopiridinas) que actúan a través de este receptor. Se han descrito siete clases de subunidades polipeptídicas (α , β , γ , δ , ϵ , θ y ρ) y múltiples isoformas. El receptor GABA_B , tiene localización presináptica y postsináptica y pertenece a la familia de receptores metabotrópicos, con siete regiones proteínicas

transmembranales, acoplados a proteínas G (10) (67). Además, media la inhibición presináptica sobre terminales nerviosas y la inhibición postsináptica en pericardio y dendritas. Para que este receptor sea operativo debe dimerizarse y formar una especie química compuesta por la unión de sus dos subunidades $GABA_{BR_1}$ y $GABA_{BR_2}$. Las proteínas que componen el heterodímero están expresadas ampliamente a través de: neuronas, en el cerebro, médula espinal y ganglios dorsales (67). Existe un tercer receptor $GABA_C$, activado por análogos de GABA y al igual que el receptor $GABA_A$ también es un canal del ión cloruro (Cl^-) sin embargo, es insensible al efecto de la bicuculina (antagonista) y al efecto modulador de las BZP, los barbitúricos, alcoholes (10). Los tres tipos de receptores están involucrados en generar procesos de sueño-vigilia (26).

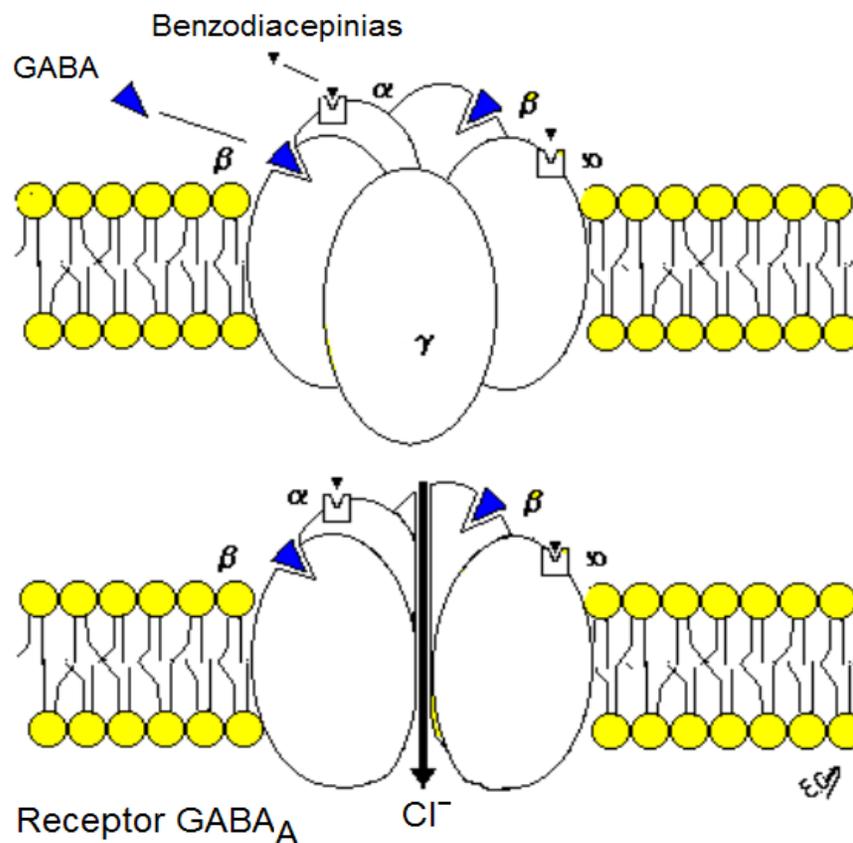


Figura No. 15. Representación de los sitios de unión del receptor $GABA_A$ (18).

2.4. FLUMAZENIL (FLU).

Historia.

El flumazenil (FLU) (Figura No. 16) está relacionado, en general a la historia y desarrollo de las BZP, que son el grupo farmacológico más empleado en el tratamiento de la ansiedad. La ansiedad es una respuesta fisiológica normal ante situaciones estimulantes nuevas o amenazantes del ambiente, que permite al organismo adaptarse, ofreciendo una respuesta que lo prepara y adapta frente a dichos estímulos. Existen muchos fármacos eficaces en el tratamiento de la ansiedad cuya eficacia radica en el efecto depresor sobre la actividad del SNC y por lo tanto de forma inespecífica en su acción ansiolítica, entre ellos encontramos a los derivados opiáceos, los antimicóticos o los anticonvulsivantes. La primera BZP clínica fue el clordiazepóxido en 1957, y en 1963 el diazepam con un gran éxito (80).

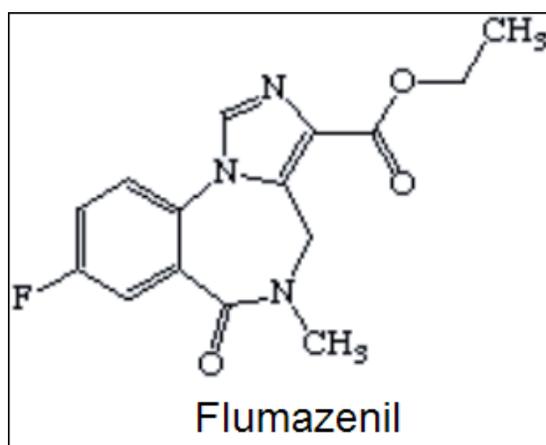


Figura No. 16. Estructura química del FLU (19).

Usos.

El FLU derivado benzodiazepínico, es un antagonista competitivo específico del receptor de BZP, en la terapéutica es utilizado para neutralizar los efectos sedantes, neurológicos o electrofisiológicos, debido a la administración de dosis elevadas de BZP y

agonistas inversos (46) (13), también se ha reportado la inhibición del efecto de analgesia debida a MEL (36). En caso de sobredosis con BZP pueden aparecer efectos tóxicos sobre el sistema nervioso y respiratorio que pueden llegar al coma, este riesgo se incrementa notablemente con la asociación del alcohol y otras sustancias (80).

En los últimos años ha sido una herramienta importante en la investigación del mecanismo farmacológico sobre los efectos producidos por fármacos que actúan sobre el complejo receptor GABA/BZP (31) (83).

Las BZP son en general sustancias lipófilas que constituyen varias familias en función de su estructura y ejercen básicamente acciones farmacológicas como: ansiolítica, relajante muscular, anticonvulsivante, hipnótica, para el tratamiento del insomnio y para el tratamiento del jet-lag (80). Se ha establecido que FLU revierte las acciones farmacológicas aquí mencionadas (31). También, se ha documentado que el FLU tiene un significativo efecto a corto tiempo en el tratamiento de la encefalopatía hepática, causada por enfermedades del hígado o falla hepática, y en pacientes con cirrosis presenta un pronóstico favorable (58) (83). Ensayos clínicos evalúan también su uso en el mejoramiento de funciones cognoscitivas en pacientes con Alzheimer (72).

Mecanismo de acción de Benzodicepinas (BZP).

Las BZP mimetizan los efectos del GABA. La acción del GABA permite la entrada del Cl⁻ dentro de las neuronas, por lo que genera una hiperpolarización de la neurona, a consecuencia de esto, la neurona se vuelve menos susceptible a los estímulos activadores generándose un estado de inhibición. Es posible potenciar este efecto mediante las BZP que ejercen su acción sobre el sitio benzodicepínico del complejo receptor GABA_A, efecto que no se produce en ausencia de GABA. Las BZP modifican la disposición estructural del receptor,

potenciando el efecto de apertura del canal Cl^- por la acción del GABA a esto se le conoce como modulación alostérica. Se sabe que existen al menos, cinco subtipos de sitios benzodiazepínicos que modulan alostéricamente el receptor $GABA_A$ (80).

2.5. TRACTO GASTRO-INTESTINAL (TGI).

El aparato digestivo suministra al organismo agua, electrolitos y nutrientes. Para ello es necesario: a) el movimiento del alimento a través del tubo digestivo, b) secreción de jugos digestivos y digestión de los alimentos, c) absorción de agua, electrolitos y productos digestivos, d) circulación sanguínea, e) control por los sistemas nervioso y hormonal (38).

Anatomía.

El TGI esta integrado por los siguientes órganos, en orden descendente: 1) Se inicia en la **boca**, en donde se realiza el proceso de masticación. 2) El **esfínter faringoesofágico** permite que el alimento pase desde la faringe hacia la parte superior del esófago, originándose una onda peristáltica que empuja el bolo alimenticio hacia el interior del esófago. 3) El **esófago** tiene la función de conducir los alimentos desde la faringe al estómago y presenta dos tipos de movimientos peristálticos, primarios y secundarios, la parte superior del esófago esta compuesta de músculo estriado y la parte inferior por músculo liso, regulado principalmente por el nervio vago. 4) En el extremo inferior del esófago, el músculo circular se encuentra engrosado y funciona como un **esfínter gastroesofágico**, cuya función es evitar el reflujo del contenido gástrico el esófago. 5) El **estómago** tiene una función motora, ya que almacena alimentos para enviarlos en porciones pequeñas al tubo digestivo, mezcla los alimentos con las secreciones gástricas hasta obtener el quimo y vacía progresivamente el contenido estomacal. 6) El **esfínter pilórico** se localiza en la apertura distal del estómago, su función principal es el

control del vaciamiento gástrico. El peristaltismo en el intestino delgado esta comprendido por movimientos de propulsión, en cuyas ondas peristálticas impulsan el quimo a través del intestino delgado, esta controlado por señales nerviosas y hormonales. 7) El **duodeno** y el **yeyuno** están compuestos por músculo liso, en estos segmentos se realizan principalmente procesos enzimáticos de digestión y absorción intestinal, por ejemplo, el de las proteínas, grasas, aminoácidos, iones sodio (Na^+), Cl^- y agua, bajo la influencia de las enzimas proteolíticas de la secreción pancreática, mediante las células epiteliales, que consisten principalmente en cientos de microvellosidades que se proyectan desde la superficie de cada célula.

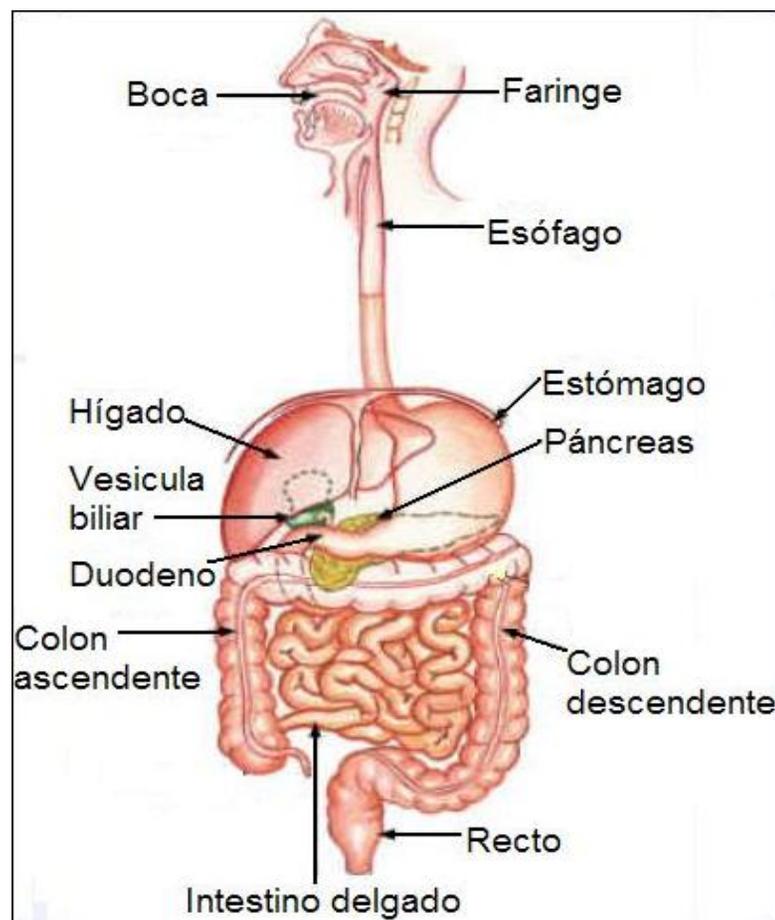


Figura No.17. Anatomía general del TGI en el humano (79).

8) El *íleo* también está compuesto por músculo liso y sus células epiteliales de la superficie de las vellosidades, así como del resto del intestino grueso, tiene la capacidad de secretar iones bicarbonato en intercambio para absorber iones Cl^- . 9) En el *colon* se absorben la mayor parte del agua y los iones en su parte proximal y en la parte distal se almacenan los materiales fecales (38) (Figuras No.17 y 18).

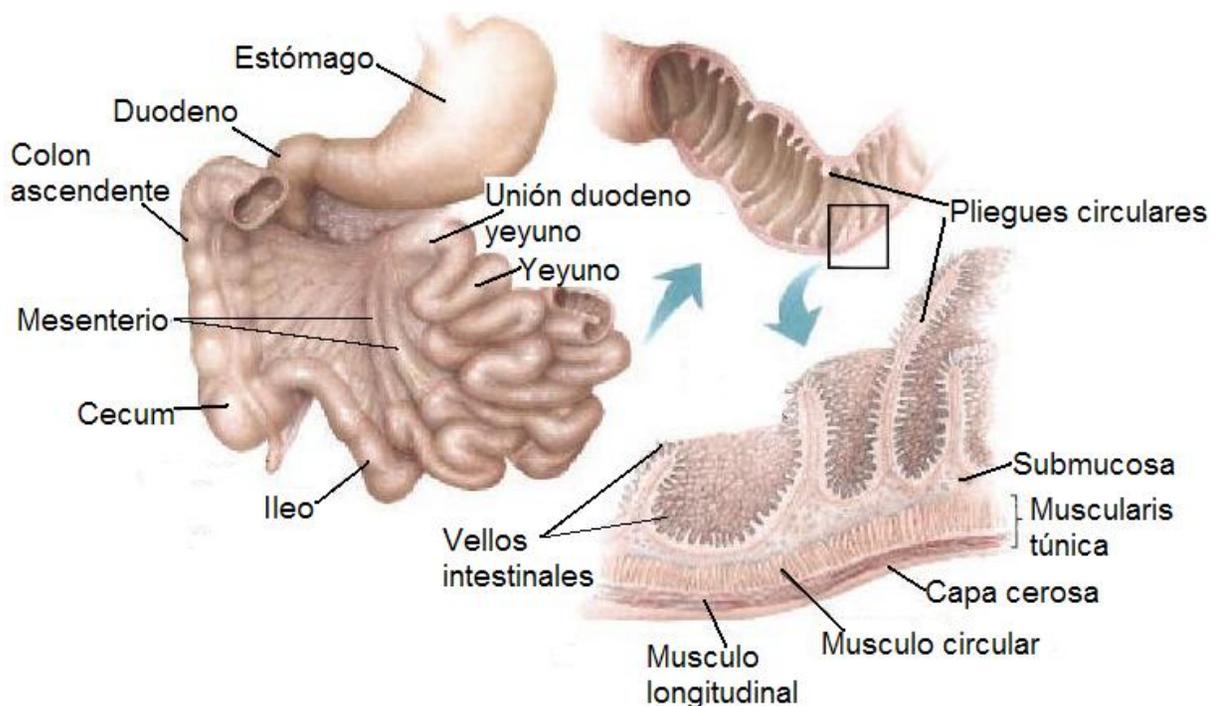


Figura No. 18. Órganos del TGI duodeno, yeyuno e íleo (79).

Músculo liso gastrointestinal (MLGI).

El MLGI está compuesto de fibras musculares individuales lisas, con una longitud de 200 a 500 micras y 2 a 10 micras de diámetro. Dentro de cada capa de fibras se presentan numerosas conexiones eléctricas que permiten el paso de iones desde una célula hacia la siguiente, por lo que las señales eléctricas pueden viajar con facilidad entre las fibras. Cada

capa muscular representa una red ramificada de “haces” musculares lisos por lo que cada capa funciona como un sincitio (38).

Fisiología.

El músculo liso del TGI presenta una actividad eléctrica casi continua aunque lenta y se manifiesta por dos tipos de ondas eléctricas: a) ondas lentas y b) espigas. La mayor parte de las contracciones gastrointestinales ocurren de manera rítmica y depende casi por completo de la frecuencia de las ondas lentas del potencial de membrana del músculo liso (ritmo eléctrico básico), se cree que la actividad de la bomba Na^+ y K^+ , sea la causante de estas ondas lentas, en donde solo se permite la entrada del ion Na^+ , no de calcio (Ca^{2+}) (38).

Potenciales de espiga.

Son potenciales de acción, que ocurren automáticamente cuando el potencial de membrana en reposo es de -40 mV (el potencial de membrana en reposo es de -65 a -50 mV), estos potenciales se general debido a que en el MLGI los canales encargados de los potenciales de acción, permiten la entrada de cantidades especialmente grandes de iones Ca^{2+} , junto con cantidades pequeñas de Na^+ denominándoseles canales de Ca^{2+} y Na^+ . La apertura y cierre de estos canales de calcio es más lenta que los de sodio, lo que explica la duración más prolongada de los potenciales de acción (38).

Contracción del músculo liso.

En el músculo liso pueden presentarse 2 tipos de contracciones: tónicas y rítmicas. Las tónicas no están relacionadas con el ritmo eléctrico básico, suelen durar minutos u horas, cuanto mayor sea la frecuencia mayor será el grado de la contracción. También, pueden ser causadas por hormonas que causan la despolarización sin producir potenciales de acción (38).

Anatomía del Sistema Nervioso Entérico (SNE).

El TGI tiene un sistema nervioso intrínseco, también es denominado sistema nervioso intestinal o entérico (SNE), estructuralmente y funcionalmente es como un cerebro, que comienza en el esófago y se extiende durante toda su trayectoria (34) las neuronas entéricas están clasificadas como ganglios transmisores parasimpáticos (35). La estructura del SNE esta dispuesta principalmente por dos plexos ganglionares: A) Externo, mientérico o de Auerbach, el cual esta situado entre dos capas musculares de la *muscularis externa*, una longitudinal y otra circular, contiene las neuronas responsables de controlar la motilidad gastrointestinal y mediar la salida de enzimas con órganos adyacentes. B) Interno, submucoso o de Meissner, el cual se sitúa en la capa submucosa, contiene células sensoriales que se comunican con las neuronas del plexo mientérico, así como fibras motoras que estimulan la secreción gastrointestinal de las células de las criptas epiteliales en el lumen del intestino, así como el flujo sanguíneo local. El plexo mucoso, contiene finos empaquetamientos de nervios conectados con el plexo submucoso. El plexo submucoso contiene menos neuronas por ganglio que el plexo mientérico, a su vez existen fibras simpáticas y parasimpáticas que los conectan (34) (35). La unión eléctrica entre las células del músculo liso, permiten alterar rápidamente el potencial de membrana de aún aquellas células que no tienen contacto directo con las neuronas y asegurar que grandes regiones del intestino respondan a estímulos nerviosos (35) (Figura No.19). La estimulación de los sistemas simpático y parasimpático, puede activar o inhibir funciones del TGI (38). Además de las neuronas y las células gliales del SNE, el intestino contiene células intersticiales de Cajal (CIC) que están localizadas entre los nervios terminales y células del músculo liso y funcionan como intermediarios que transmiten señales desde las fibras nerviosas hacia el músculo liso, otra función que se les

atribuye, es la de establecer el ritmo de la peristalsis del intestino a través de su influencia en las ondas eléctricas lentas (35).

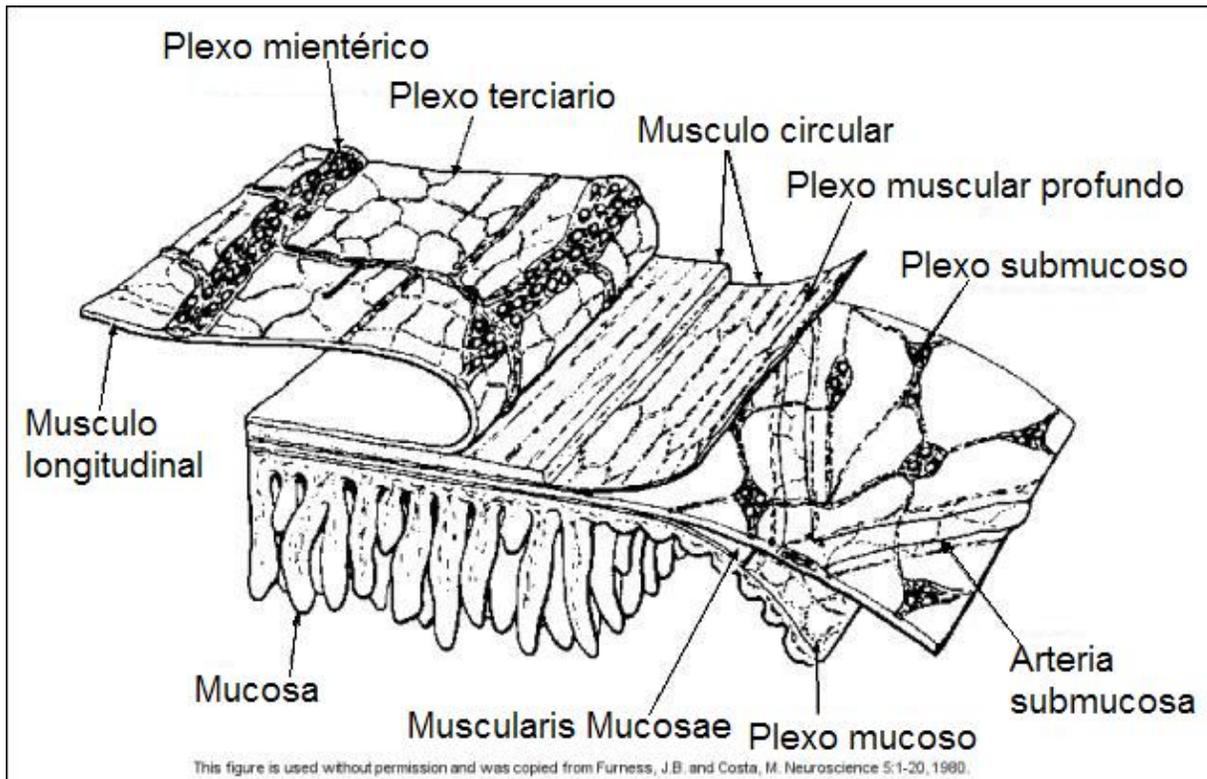


Figura No. 19. Esquema que representa los distintos plexos musculares que componen al SNE (34).
Control autónomo.

Está constituido por el sistema parasimpático sacro y parasimpático craneal. Casi todo el parasimpático craneal está incluido en los nervios vagos, esta fibra suministra una amplia inervación a esófago, estómago, páncreas y primera mitad del intestino grueso (poca inervación a intestino delgado). El parasimpático sacro, se origina en los segmentos sacro segundo, tercero y cuarto de la médula espinal y pasa con los nervios pélvicos hacia la mitad distal del intestino grueso (38). El nervio vago es normalmente responsable de dirigir el SNE para que realice sus funciones (35).

Inervación simpática.

Las fibras simpáticas del TGI se originan en la médula espinal, inervando el tracto digestivo en general, las terminaciones nerviosas simpáticas secretan NA. Al estimular el sistema simpático se inhibe la actividad del TGI, por lo que se puede detener por completo el desplazamiento de los alimentos (38) (Figura No. 20).

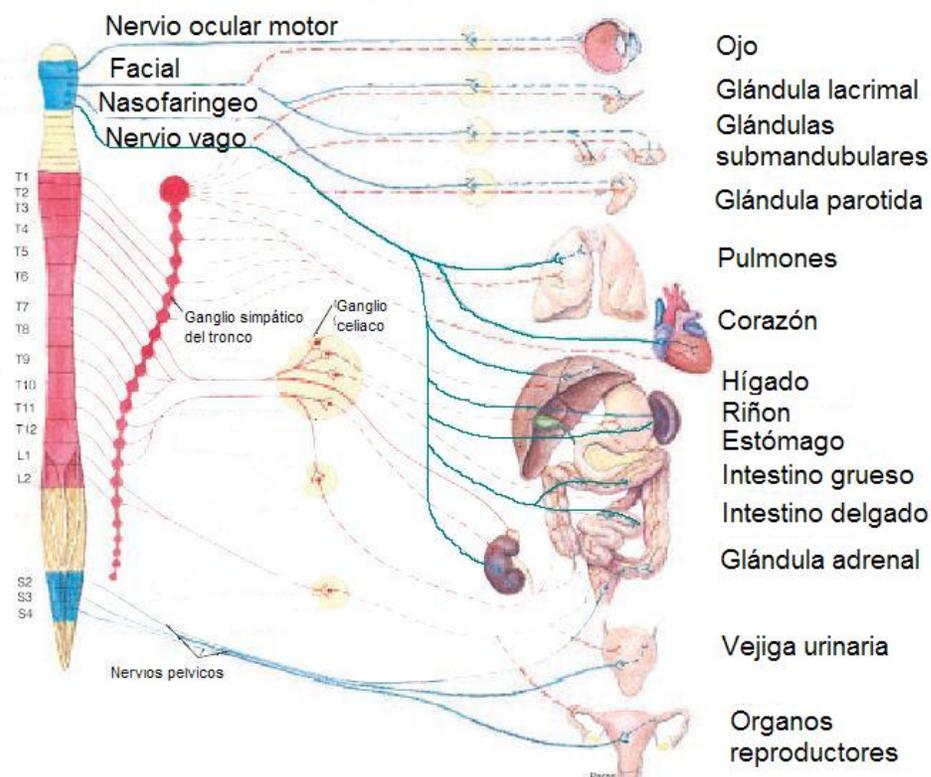


Figura No. 20. El control nervioso y su relación con los diferentes órganos. Se destaca la inervación por parte del nervio vago sobre el TGI (79). Melatonina y el tracto gastrointestinal.

La MEL y las enzimas que la sintetizan han sido encontradas en el TGI sugiriendo una biosíntesis “In Situ” en los tejidos del intestino (52). Puede considerarse al TGI como la mayor fuente de MEL extrapineal, ya que en algunos animales las concentraciones de MEL en el TGI sobrepasan los niveles sanguíneos por 10-100 veces, el tracto digestivo contribuye

significativa y particularmente durante el día (17). La MEL es producida en las células enterocromafines gastrointestinales ricas en serotonina y puede ser liberada a la vena porta postprandialmente, la MEL puede actuar en las funciones de epitelio gastro intestinal y del músculo liso, también puede actuar sincronizando los procesos digestivos (17).

3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el posible efecto y la interacción de MEL, GABA y FLU en músculo liso (duodeno, yeyuno, íleo) “In Vitro”.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Registrar la actividad normal de Duodeno, Yeyuno e Íleo.
2. Registrar la actividad del duodeno, el yeyuno e íleo con aplicación de MEL, GABA y FLU en forma independiente.
3. Determinar la interacción entre MEL y GABA en duodeno, yeyuno e íleo
4. Determinar la interacción entre MEL y FLU en duodeno, yeyuno e íleo
5. Determinar la interacción entre GABA y FLU en duodeno, yeyuno e íleo

4. HIPÓTESIS.

HIPÓTESIS GENERAL

La hipótesis general se establece de la siguiente manera:

Si la MEL y el GABA disminuyen el peristaltismo del músculo liso y en este evento participan los receptores a GABA, entonces, este comportamiento será revertido por un antagonista de receptores a GABA, como lo es el FLU.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. La MEL y el GABA inhiben los movimientos espontáneos del músculo liso del tejido gastrointestinal de forma dosis dependiente.
2. El FLU revierte los efectos de MEL y GABA.

3. La interacción farmacológica MEL y GABA revierte los efectos de MEL.
4. La interacción farmacológica FLU y GABA potencia los efectos de GABA.
5. La interacción farmacológica FLU y MEL revierte los efectos de MEL.

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

EQUIPO DE LABORATORIO.

- Cámaras para tejido aislado en estudios “In Vitro” convencionales. (Marca: Pyrex) (Fotografía No.6)
- Recirculador de agua. (Marca: NESLAB)
- Transductores de fuerza isométrica. (Marca: GRASS Inc.) Modelo: FT03C
- Polígrafo. (Marca: GRASS Inc.) Modelo: 7 (Fotografía No.7)
- Software PolyView. (Marca: GRASS Inc.) Modelo: Versión 2.0 (Figura No. 33)
- Computadora con procesador Intel Celeron. (Marca: Genérica)
- Balanza Analítica. (Marca: Mettler Toledo)

Ver anexos para más detalles de las características del equipo.

MATERIAL DIVERSO.

- Equipo completo de disección. (Marca: Miltex)
- Mesa de disección.
- Cajas de Petri. (Marca: Pyrex)
- Vaso de precipitados de 100mL. (Marca: Pyrex)
- Matraz volumétrico de 10 mL. (Marca: Pyrex)
- Matraz volumétrico de 1000 mL. (Marca: Pyrex)
- Cronometro (Marca: Smiths)
- Micropipeta con un rango de capacidad de 0.5 a 10 μ L. (Marca: Eppendorf)
- Micropipeta con un rango de capacidad de 10 a 100 μ L. (Marca: Eppendorf)

- Micropipeta con un rango de capacidad de 100 a 1000 μL . (Marca: Eppendorf)
- Soportes con tensores milimétricos fabricados en bronce.
- Pipeta volumétrica de 10 mL. (Marca: Pyrex)
- Hilo de seda. (Marca: Anacap-Davis Geck)
- Aguja calibre 22. (Marca: Jeripak)

MATERIAL REACTIVO.

- MEL. (N-acetil-5-metoxitriptamina). (Laboratorio: SIGMA).
- GABA (ácido gamaamino butírico). (Laboratorio: SIGMA)
- FLU. (Laboratorio: SIGMA)
- Carbógeno. (Marca: INFRA)
- Polietilenglicol. (Laboratorio: Merck-México, S.A. de C.V.)
- Glucosa $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Laboratorio: Merck-México, S.A. de C.V.)
- Bicarbonato de sodio NaHCO_3 . (Laboratorio: J. T. Baker)
- Cloruro de sodio NaCl . (Laboratorio: J. T. Baker)
- Cloruro de potasio KCl . (Laboratorio: J. T. Baker)
- Fosfato de potasio KH_2PO_4 (Laboratorio: Mallinkrodt A. R.)
- Sulfato de Magnesio MgSO_4 (Laboratorio: J. T. Baker)
- Cloruro de calcio CaCl_2 . (Laboratorio: J. T. Baker)
- Agua destilada. (Facultad de Química. UNAM).
- Solución de mantenimiento Ringer-Krebs (SMRK).

La composición de la solución SMRK se realizó de acuerdo a la siguiente tabla.

Sustancia	mili moles	Cantidad por litro	Peso molecular g/mol
Glucosa	11	2 g/L	180.16
NaHCO ₃	20	200 mL	82.97
NaCl	120	120 mL	58.43
KCl	4.6	4.6 mL	7.45
KH ₂ PO ₄	1.2	1.2 mL	136.03
MgSO ₄	1.2	1.2 mL	246.49
CaCl ₂	1.5	1.5 mL	147.02

Tabla. 1 Componentes y cantidades constituyentes de la solución Ringer-Krebs (14).

Ver anexos para más detalles de las características de los reactivos.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Los experimentos se realizaron en duodeno, yeyuno e íleo aislado de rata, utilizando 20 ratas. Se seleccionaron ratas macho adultas cepa Wistar las cuales fueron adquiridas en Harlan, México, S.A. de C.V. con un peso comprendido entre 170 y 230 g. Las cuales permanecieron en cajas de policarbonato de (40 X 30 X 20cm.) transparente con alimento (nutrí cubos de RAT CHAW) y agua de forma libre e ininterrumpida; permanecieron en el laboratorio por un periodo aproximado de una semana para su adaptación. Las condiciones ambientales fueron: temperatura ambiental controlada (20°C a 24°C) y ciclos luz oscuridad de 10/14 horas (8:00 / 18:00 h con luz). Los experimentos se realizaron durante los meses de julio y agosto.

Posteriormente, al periodo de adaptación de una semana en el laboratorio, el día anterior a la realización del experimento una rata fue aislada y mantenida en un ayuno de 12 a 14 horas previas a la hora programada para realizar el experimento. El mantener a la rata en ayuno es con el fin de que el intestino no contenga bolo alimenticio lo cual podría afectar al

tejido en cuestión. De acuerdo al programa trazado, el experimento se inicia a las 9:00 horas, la rata aislada es sacrificada por medio de dislocación cervical.

PROCEDIMIENTO DE DISECCION Y MANEJO DEL TEJIDO.

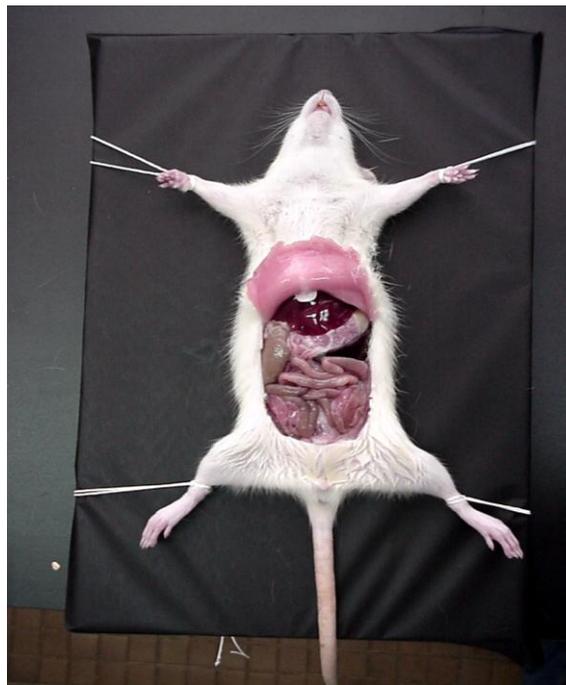
Una vez que ha sido fijada en la mesa de disección se realiza una incisión a nivel del abdomen seguida de dos cortes paralelamente a lo largo del abdomen (Fotografía No. 1).



Fotografía No.1 Disección de la rata sacrificada a nivel de la cavidad abdominal.

Se procede a identificar el estómago y ubicar el esfínter pilórico (el cual se localiza en la unión distal estomago/duodeno) (Fotografía No.2 y Figura No.21). A partir de este punto se seleccionan aproximadamente 5 cm. de tejido correspondiente al duodeno en roedores, el cual es inmediatamente retirado de la cavidad intestinal y se coloca en la caja de Petri la cual contiene SMRK a una temperatura de 37 °C. Si de acuerdo al programa se desea analizar la

respuesta en el yeyuno el procedimiento dicta que, a partir del esfínter pilórico se miden 5 cm. de tejido, del mismo modo que para el duodeno, sin embargo esta vez es a partir de esta distancia previamente tomada, se seleccionan los 5 a 10 cm. posteriores. Esta porción corresponde al yeyuno el cual se ubica enseguida de la fracción comprendida por el duodeno. Por otra parte si de acuerdo al programa ahora requerimos de la fracción que corresponde al íleo, podemos auxiliarnos de dos procedimientos; uno es localizar la fracción correspondiente al yeyuno y a partir de este continuar hacia la región distal del intestino, descartando aproximadamente los primeros 15 cm. de tejido y seleccionando una porción de aproximadamente de 10 cm. El otro procedimiento consiste en identificar el colon y a partir de éste regresar sobre la fracción proximal del intestino hasta aproximadamente 10 a 15 cm. en la cual podremos ubicar nuevamente al íleo.



Fotografía No.2 Reconocimiento e identificación del tracto gastrointestinal de la rata, en la cavidad intestinal.

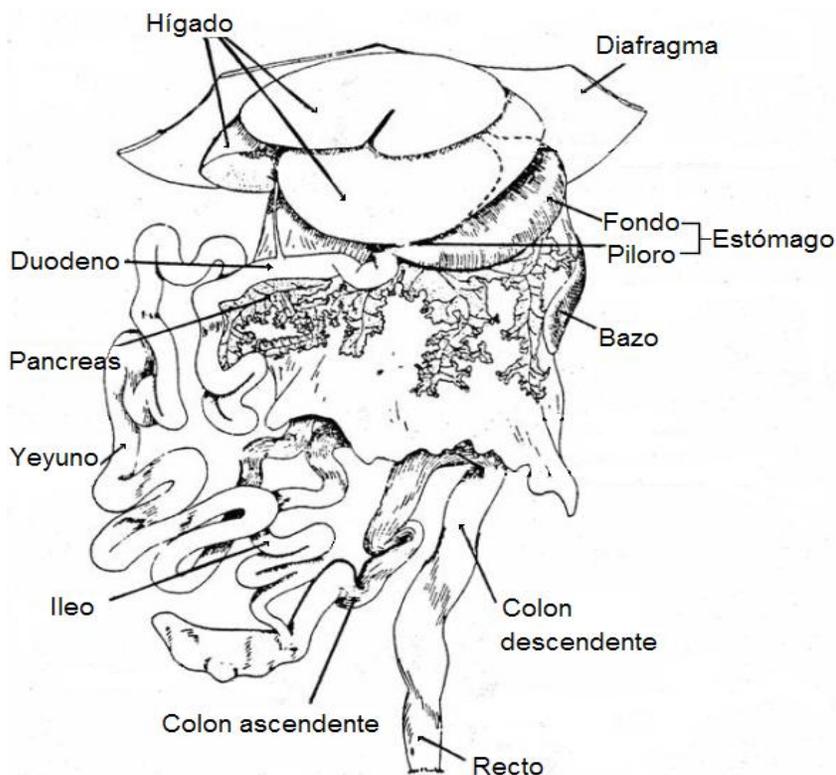


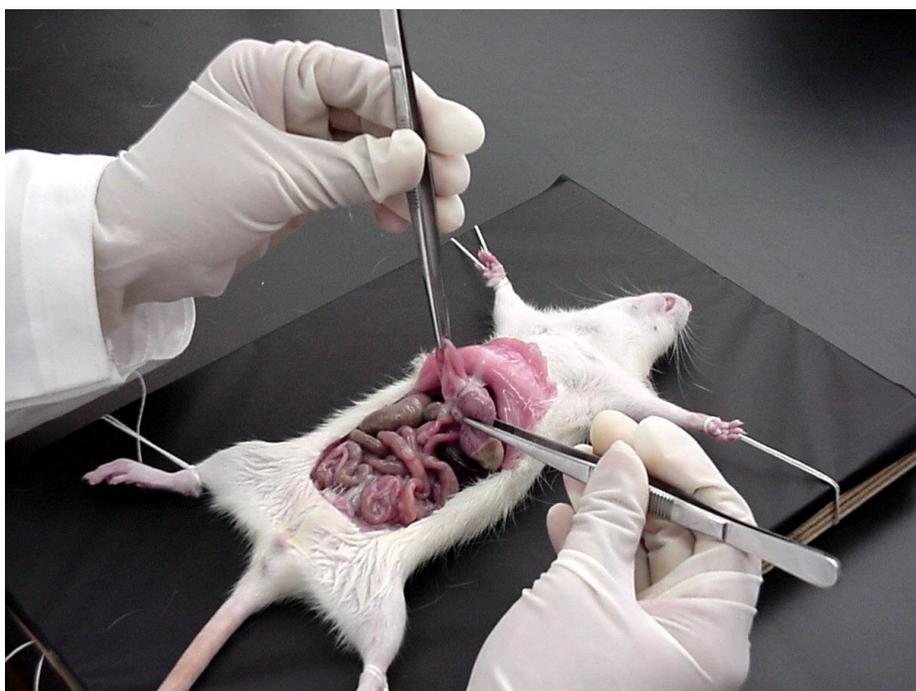
Figura No. 21. Anatomía del TGI de la rata (I10).

Cualquiera que sea el tejido en cuestión existen puntos críticos, para que el tejido se conserve en las mejores condiciones. Los factores a destacar son:

- a) Desde que se realiza el sacrificio de la rata hasta la extracción del tejido se recomienda que trascurren como máximo 3 minutos, con el fin de evitar que el tejido se vea afectado por factores como el ambiente o la temperatura.
- b) La manipulación del tejido debe ser mínima, nunca deberá ser empleada demasiada tensión al momento de la extracción debido a que las fibras musculares pueden verse dañadas irremediablemente.

Para extraer el fragmento de tejido que corresponde a nuestro experimento según el programa, primero se debe tomar el tejido por un extremo con pinzas, las cuales deberán tener

un recubrimiento de teflón en la punta para evitar aplicar corriente estática al tejido; no debe ser aplicada demasiada fuerza al pinzar el tejido ya que también podría ser dañado. Realizar un corte transversal al tejido, justo al lado de la pinza, medir la distancia o porción de tejido que será utilizada, según sea el caso y tomar con las pinzas el extremo opuesto; en donde se realiza un corte semejante al anterior. Este procedimiento de extracción también se aplica para la manipulación de yeyuno e íleo (Fotografía No.3).



Fotografía No.3 Extracción de los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de la rata.

Una vez concluido lo anterior, el tejido cualquiera que sea la fracción que fue seleccionada, es depositado en una caja de Petri con la SMRK que se encuentra a una temperatura de 37° C y oxigenado con carbógeno, a continuación, se retira el exceso de tejido mesenterico, con la precaución de no exceder el corte y dañar el tejido que recubre al duodeno,

de igual forma se debe tomar esta precaución al retirar el exceso de tejido cuando se manipule el yeyuno y el íleo (Fotografía No. 4).



Fotografía No.4 Músculo liso del tracto gastrointestinal correspondiente al duodeno, los segmentos se encuentran sin mesenterio.

Después de la extracción del fragmento de tejido, y estando éste en la caja de Petri, se corta en otros segmentos de aproximadamente un centímetro de longitud. Los fragmentos proximal y distal al estómago son seleccionados ya que estos serán utilizados para los registros de actividad en los experimentos. Los segmentos proximal y distal se fijan con hilo de seda (Anacap Davis-Geck) de cada uno de sus extremos en forma diagonal teniendo cuidado de no obstruir la luz del segmento. Este procedimiento se aplica también al momento de utilizar el yeyuno o el íleo (Fotografía No. 5).



Fotografía No.5 Atadura con hilo de seda a cada extremo de los segmentos de tejido.

El segmento de tejido es colocado dentro de una cámara de vidrio (Sistema “In Vitro” convencional), uno de los extremos del hilo es sujetado al fondo de la cámara y el otro extremo a un gancho ubicado en el transductor de fuerza isométrica (GRASS Inc.), la cámara se llena inmediatamente con SMRK (con un volumen de 10 mL a 37° C de temperatura) y burbujeada con gas carbógeno. El transductor de fuerza isométrica se encuentra montado previamente, sobre un soporte de bronce el cual cuenta con un tensor milimétrico y con el que se puede controlar la tensión ejercida al tejido, el transductor a su vez esta conectado a un preamplificador (GRASS Inc.) el cual esta acoplado a un amplificador (GRASS Inc.) constituyendo así la parte principal de adquisición de datos registrados por el polígrafo (GRASS Inc.) (Fotografía No. 6).

En el sistema contamos con cuatro cámaras de vidrio, del mismo modo, el polígrafo cuenta con cuatro preamplificadores y cuatro amplificadores, responsables de la amplificación de las señales, los segmentos proximales serán colocados en las dos primeras cámaras de vidrio y corresponderán al conjunto preamplificador-amplificador (Ver anexo 10.2) número 1 y 2, los segmentos distales subsecuentes corresponderán al conjunto preamplificador-amplificador 3 y 4, de acuerdo a la numeración establecida en el polígrafo.



Fotografía No.6 Cámara para estudio convencional “In Vitro” (abajo), transductor de fuerza isométrica (GRASS INC) y tensor milimétrico.

Los datos generados por el experimento son transferidos por el polígrafo a través de una interfase (GRASS Inc.) y registrados en tiempo real para su posterior análisis en una computadora mediante la utilización del software PolyView (GRASS Inc.). El polígrafo

registra por su parte en papel la respuesta de la actividad espontánea a una velocidad de 10 mm. / min. (Fotografía No. 7).



Fotografía No.7 Polígrafo (GRASS modelo 7), computadora de monitoreo en tiempo real y cámaras para estudio “In Vitro” convencionales.

Una vez que se colocó el tejido en la cámara se le proporciona una tensión moderada a través del tensor milimétrico y se deja estabilizar por un periodo de 30 min. esto es con el propósito de que alcance un equilibrio con la SMRK-carbógeno y la temperatura del recirculador de agua, con el fin de obtener una posterior línea basal, tanto en el registro del polígrafo, como en el software de la computadora. Una vez transcurrido el tiempo mencionado y de que se obtiene una línea basal estable, se grabaran con el programa PolyView en la memoria de la computadora 5 min. de la respuesta generada, ya transcurrido este tiempo se adicionó MEL, GABA o FLU según fue el caso y se grabaran otros 5 min. de respuesta de tejido.

Para el caso de las interacciones MEL-GABA, MEL-FLU, GABA-FLU también se toman 5 min. de registro basal y posteriormente 5 min. de registro con la interacción para analizar el efecto. Cabe mencionar que entre un registro y otro, el tejido debe ser lavado con SMRK-carbógeno a 37° C, hasta obtener nuevamente la línea y el comportamiento basal de la respuesta que se observó al inicio del registro, esto nos permitirá asegurar que no hay una acumulación de alguna de las sustancias cada vez que realizamos un nuevo registro.

METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE DATOS CON EL SOFTWARE POLYVIEW.

Este tipo de software nos permite realizar un análisis detallado de los datos obtenidos durante los registros de actividad de los diferentes segmentos de tejido, sometidos a estudio con los reactivos antes mencionados. Cabe mencionar que los parámetros que se eligieron para realizar el análisis, fueron los siguientes: Área bajo la curva (ABC), Frecuencia de espigas (FREC) y Amplitud del evento o espiga (AMP) (5) (Figura No. 22).

Marca: GRASS Instrument Division. Versión 2.1

Modelo: PolyView. Data acquisition and Analysis System.

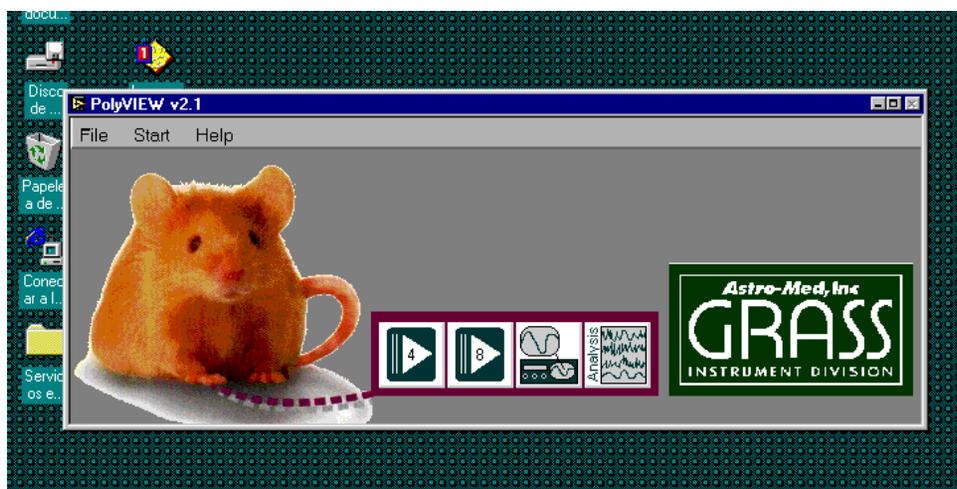


Figura No.22 Ventana principal de ingreso al software de monitoreo, registro y análisis PolyView (5).

REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Seleccionando el icono de análisis se podrán revisar solamente archivos con la extensión **BIN**.

Primero se selecciona el archivo que se desea ver y se oprime el botón **OPEN**. Si quiere revisar un archivo diferente del que se ha mostrado oprima el botón **QUIT** y a continuación se mostrará la ventana de dialogo **NEW FILE**, en ésta se presenta la lista de los archivos disponibles que pueden ser desplegados otra vez (Figura No. 23) (5).

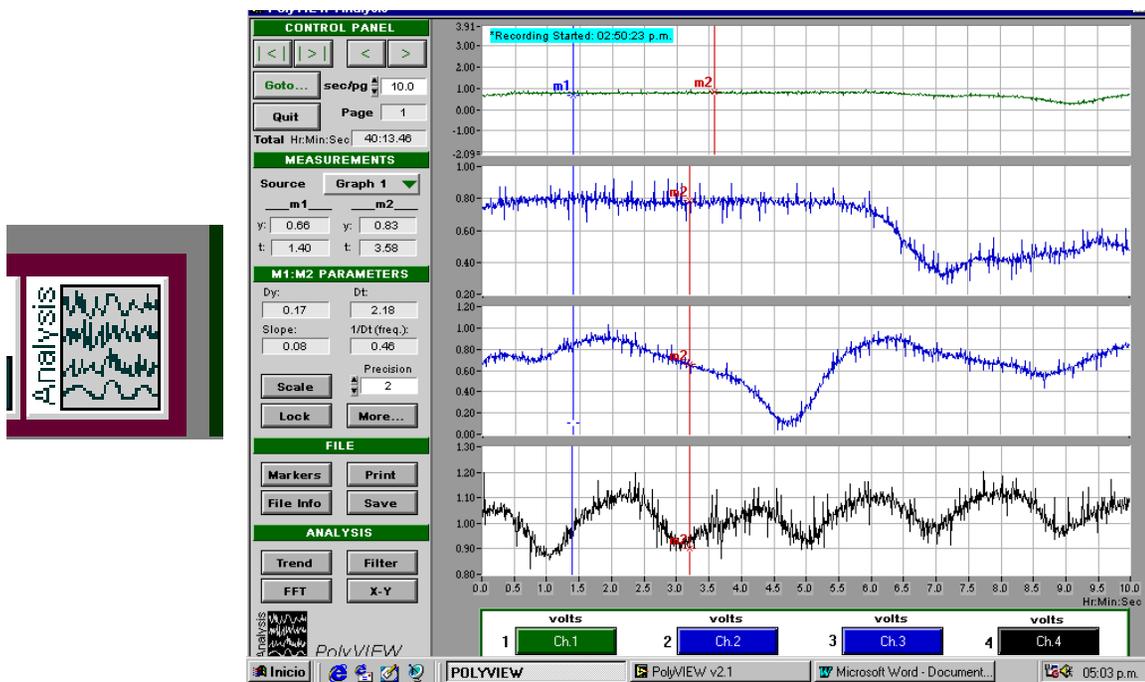


Figura No.23 Icono de inicio de análisis y pantalla principal de análisis de datos, que muestra todos los botones de control y los valores correspondientes a la posición de los cursores (5).

Botones de control en el panel de análisis de datos.

- **CONTROL PANEL** El movimiento dentro del archivo, se realiza a través de los botones indicados con las flechas; del mismo modo como pasar páginas en una carta real.

1. Las Flechas de Control (<, >) nos permiten mover adelante o atrás los registros contenidos en las páginas.
 2. Controles del eje Y. La escala del eje Y se establece para funcionar automática y continuamente siempre, o automáticamente sólo una vez. Una vez que se establece la escala Y con el control *AUTO* seleccionando en el modo *ALWAYS*, la escala del eje Y para cada canal es establecida por el software PolyView para ajustar los datos en cada página automáticamente (5).
- **CONTROL MORE.** Este botón provee información adicional la cual comprende ABC, FREC y AMP, con base en los segmentos de las ondas, los cuales están definidos por la posición de los cursores en la fuente del canal seleccionado, por ejemplo el canal 1, 2, etc. Los segmentos de las ondas que serán analizados automáticamente, empiezan con el primer dato puntual en la posición del cursor **m1** (línea vertical de color azul) y terminan con el dato puntual inmediato antes del cursor **m2** (línea vertical de color rojo) (5) (Figura No. 24)

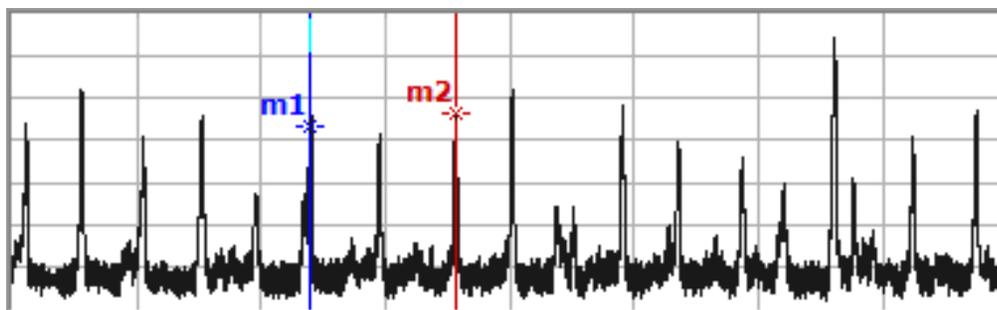


Figura No.24 Ejemplo de la posición de los cursores a lo largo de un registro; la posición del cursor m1 siempre debe anteceder al cursor m2 (5).

Procedimiento para medición de ABC.

1. Channel. Muestra el canal fuente seleccionado, el cual puede ser 1, 2, 3, 4, según se haya establecido. El análisis no puede ser realizado utilizando los cuatro canales a la vez; por lo que se deberá realizar uno por uno, con los datos almacenados.
2. Min. Muestra el punto mínimo dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Por lo cual debemos colocar el cursor m1 en el valor mínimo a la izquierda de los registros de datos que nos sea posible.
3. Máx. Muestra el punto máximo dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Debemos colocar el cursor m2 en el punto o valor más bajo a la derecha del registro de datos.
4. Área. Una vez que los cursores m1 y m2 han sido colocados de acuerdo a lo indicado en los párrafos anteriores, activamos la función de análisis con el botón “more”. En este punto se despliega una ventana adicional la cual nos muestra varias columnas; una de estas columnas esta nombrada como “Area” la cual muestra el valor para el ABC del segmento seleccionado.

Procedimiento para medir frecuencia (FREC).

1. Dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Debemos colocar el cursor m1 en la parte o valor superior de la primera espiga, a la izquierda de los registros de datos.
2. Dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Debemos colocar el cursor m2 en la parte o valor más alto de la espiga inmediata a la derecha del registro de datos.

3. Frecuencia. Una vez que los cursores m1 y m2 han sido colocados de acuerdo a lo indicado en los párrafos anteriores, activamos la función de análisis con el botón “more”. En este punto se activa una ventana adicional; la columna nombrada como “BPM” muestra el valor de frecuencia en número de eventos por min. Si dividimos este valor entre 60 obtendremos el número de eventos por seg.

Procedimiento para medir Amplitud de espigas (AMP).

1. Dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Debemos colocar el cursor m1 en la parte o valor superior de la primera espiga, a la izquierda de los registros de datos.
2. Dentro del rango delimitado por la posición de los cursores. Debemos colocar el cursor m2 en la parte o valor más alto de la espiga inmediata a la derecha del registro de datos.
3. Amplitud. Una vez que los cursores m1 y m2 han sido colocados de acuerdo a lo indicado en los párrafos anteriores, activamos la función de análisis con el botón “more”. En este punto se activa una ventana adicional; las columnas nombradas como “M1 amp” y “M2 amp” muestra el valor de amplitud de las espigas.

MÉTODO ESTADÍSTICO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS.

La prueba de hipótesis se basa en los valores estimados de parámetros como la desviación estándar y/o promedio poblacional. En esta se manejan dos hipótesis conocidas como nula y alterna. Las pruebas de hipótesis se dividen en: pruebas paramétricas las cuales se aplican a variables continuas con una distribución normal, podemos mencionar al análisis de

varianza o ANOVA (por sus siglas en inglés) y las no paramétricas ya que no utilizan los valores de promedio o desviación estándar, como lo es la prueba de Chi cuadrada (X^2) (78).

Análisis de varianza (ANOVA).

En ocasiones es necesario comparar y evaluar los resultados cuando intervienen más de dos grupos en el estudio. La prueba de ANOVA es la opción para realizar este tipo de comparaciones, ya que es una técnica de análisis estadístico que permite resolver la ambigüedad que representa la estimación de diferencias significativas cuando se hace mas de una comparación; se utiliza cuando se involucran tres o mas grupos como sucede con los experimentos de este trabajo. En términos generales consiste en la obtención de dos estimaciones independientes de la varianza, una basada en la variabilidad entre grupos (varianza entre grupos) y otra en la variabilidad dentro de los grupos (varianza dentro del grupo). La prueba de ANOVA fue empleada en los parámetros correspondientes a los resultados de ABC y AMP, con un nivel de significancia de 5% o $P= 0.05$ ya que en los estudios de grupos múltiples es deseable conocer si hay o no una indicación de significancia. Para realizar las operaciones de esta prueba se utilizo el software Statgraphics Ver. Plus 5. Posteriormente al cálculo de ANOVA, se empleo una prueba complementaria al análisis que en este caso es la prueba de Shaffé, la cual permite realizar una comparación de las medias entre los diferentes grupos (15) (39) (42).

CHI cuadrada (X^2).

El estadístico X^2 proporciona una medida de la discrepancia existente entre la frecuencia observada y la frecuencia esperada (77).

El nivel de significancia es el valor porcentual de la probabilidad de que la diferencia en los resultados sea debida a la variabilidad biológica, donde el valor numérico máximo que

indica el límite de esta probabilidad es del 5% o $P= 0.05$. Por lo que los valores de P menores o iguales a 0.05 ($P<0.5$) son considerados como probabilidades suficientemente pequeñas para rechazar la hipótesis de que la diferencia es debida a la variabilidad biológica. Si el valor de P sobrepasa este límite la duda es suficientemente grande como para aceptar la posibilidad de que la diferencia sea debida a la variabilidad biológica aleatoria (78). Si bajo esta hipótesis el valor calculado de X^2 , es mayor que algún valor crítico (como 0.95 o 0.99 que son los valores críticos de de los niveles 0.05 y 0.01 de significancia), se concluirá que las frecuencias observadas difieren significativamente de las frecuencias esperadas y se rechaza H_0 al nivel de significancia correspondiente; si no es así se acepta. En nuestros experimentos aplicamos la prueba X^2 para el análisis de los resultados correspondientes al parámetro de FREC (77) (62).

6. RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

EFFECTO DE LA MEL, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al período de estabilidad de 30 min. del tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzó una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejido se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView se detalla en el capítulo de materiales y metodología (10.4). La escala de calibración fue de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.25).

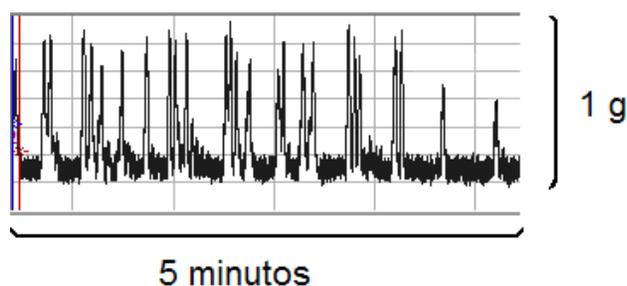


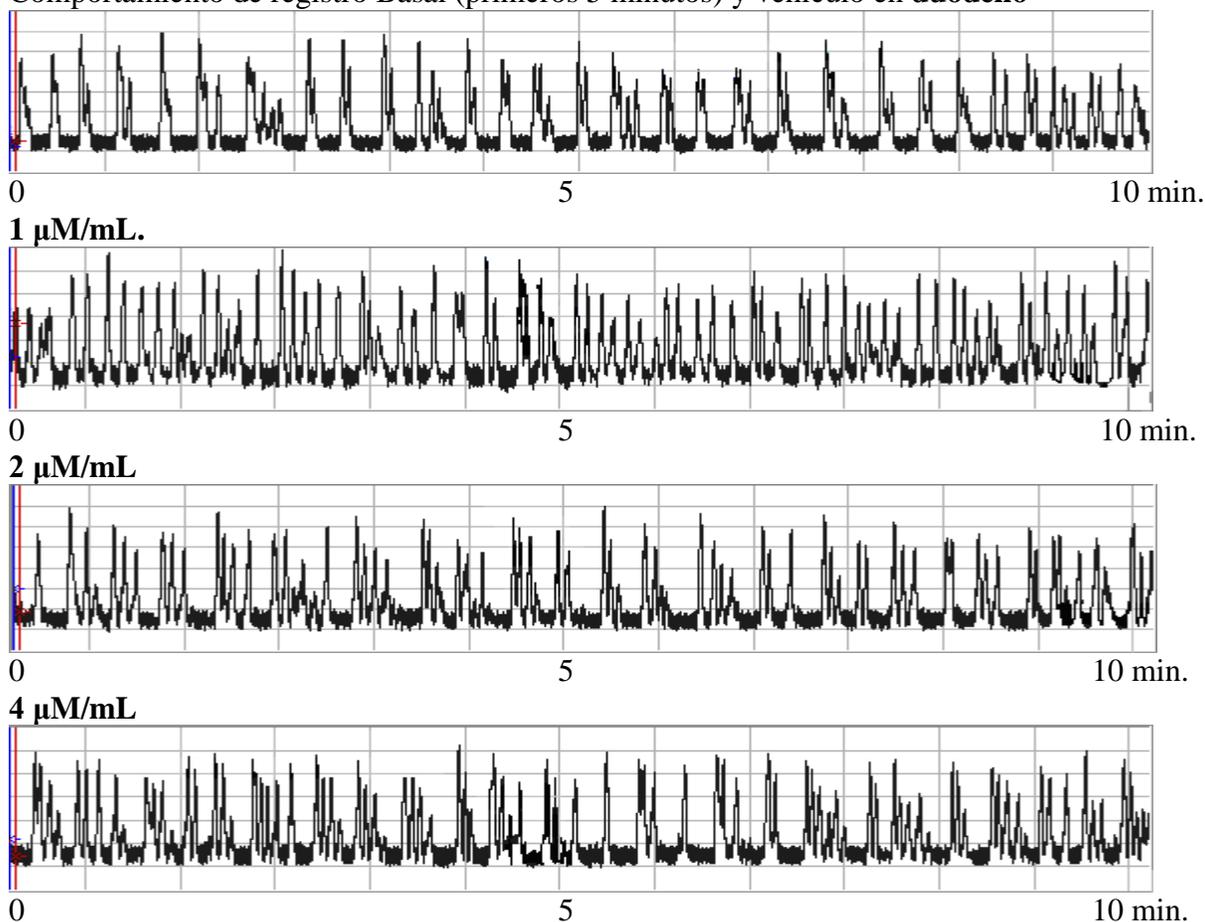
Figura 25. Muestra el registro digital obtenido por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

Los parámetros utilizados para el análisis son: Área Bajo la Curva (ABC), Frecuencia (FREC) y Amplitud de las espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó MEL a las concentraciones de 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para

duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

El **ABC** (Tabla No.2 y Gráfico No.1), en la porción correspondiente al duodeno y el yeyuno, al adicionar la MEL a las concentraciones indicadas, se observó inicialmente un incremento de la actividad espontánea del tejido seguida por una disminución de forma gradual. En el íleo se observó que solo se presenta una relajación de forma gradual, lo que indica que este efecto, es consecuencia directa y dependiente de la concentración de MEL aplicada. El registro digital para el duodeno con MEL puede ser apreciado en la Figura No.26, el de yeyuno en la Figura No. 27 y el de íleo en la Figura No.28.

Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **duodeno**



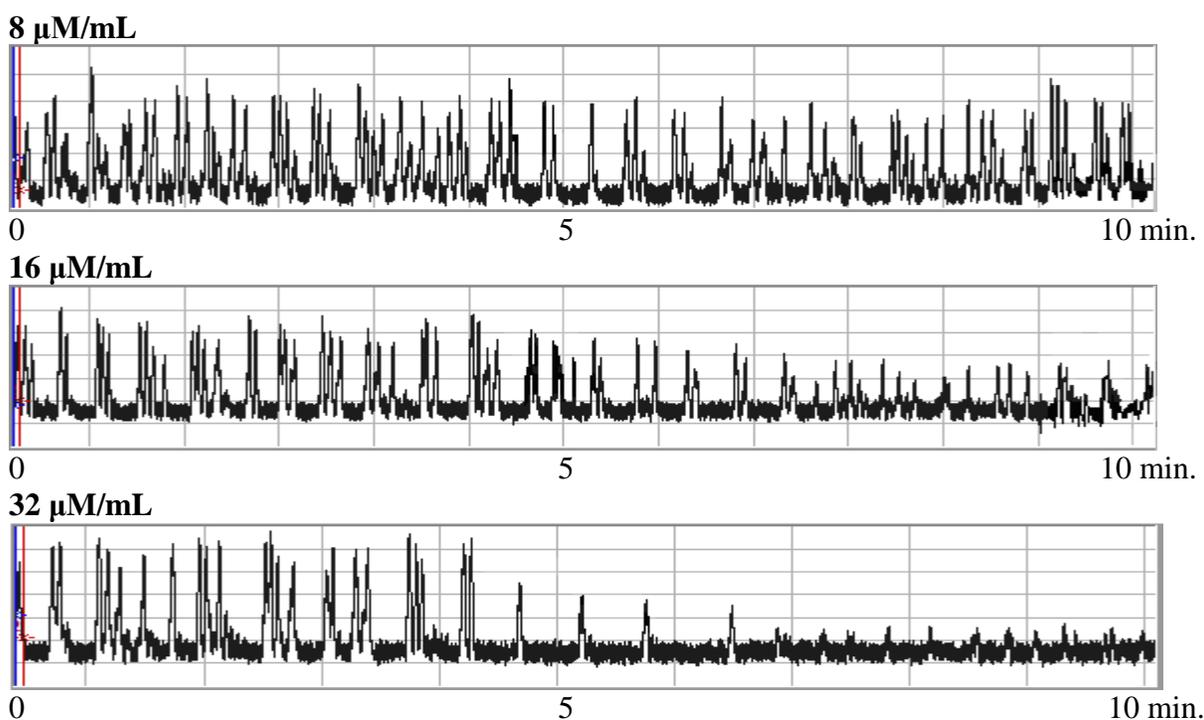
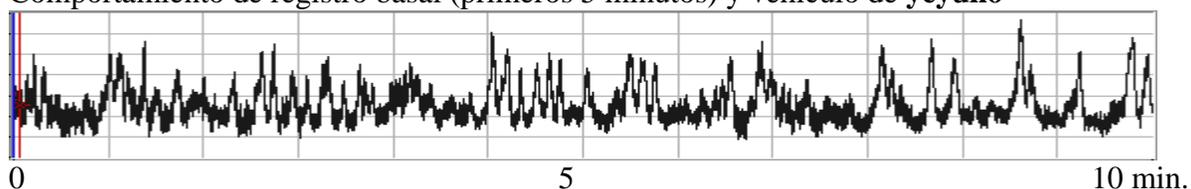


Figura 26. Registros digitales de actividad de duodeno con MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

La FREC de eventos contráctiles espontáneos del tejido, ocurridos durante el registro, en la porción correspondiente al duodeno y al yeyuno, al adicionar MEL a las concentraciones ya indicadas, se observó inicialmente un incremento de la actividad seguida por una disminución de forma gradual. En el íleo se observó que solo se presenta una disminución de la FREC de forma gradual. Por lo que este efecto, es consecuencia directa y de forma dependiente de la concentración de MEL aplicada (Tabla No.3 y Gráfico No.2)

Comportamiento de registro basal (primeros 5 minutos) y vehículo de **yeyuno**



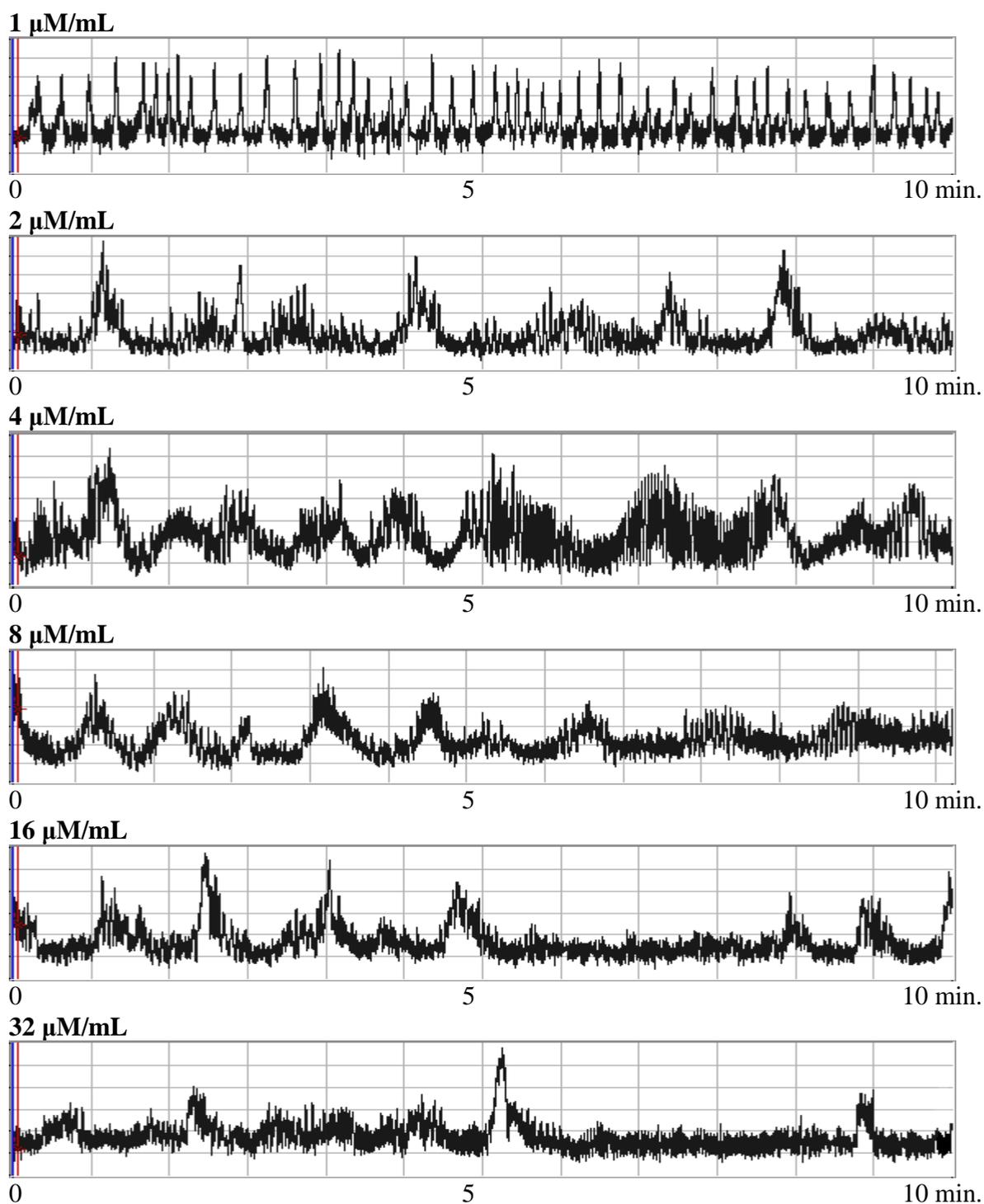
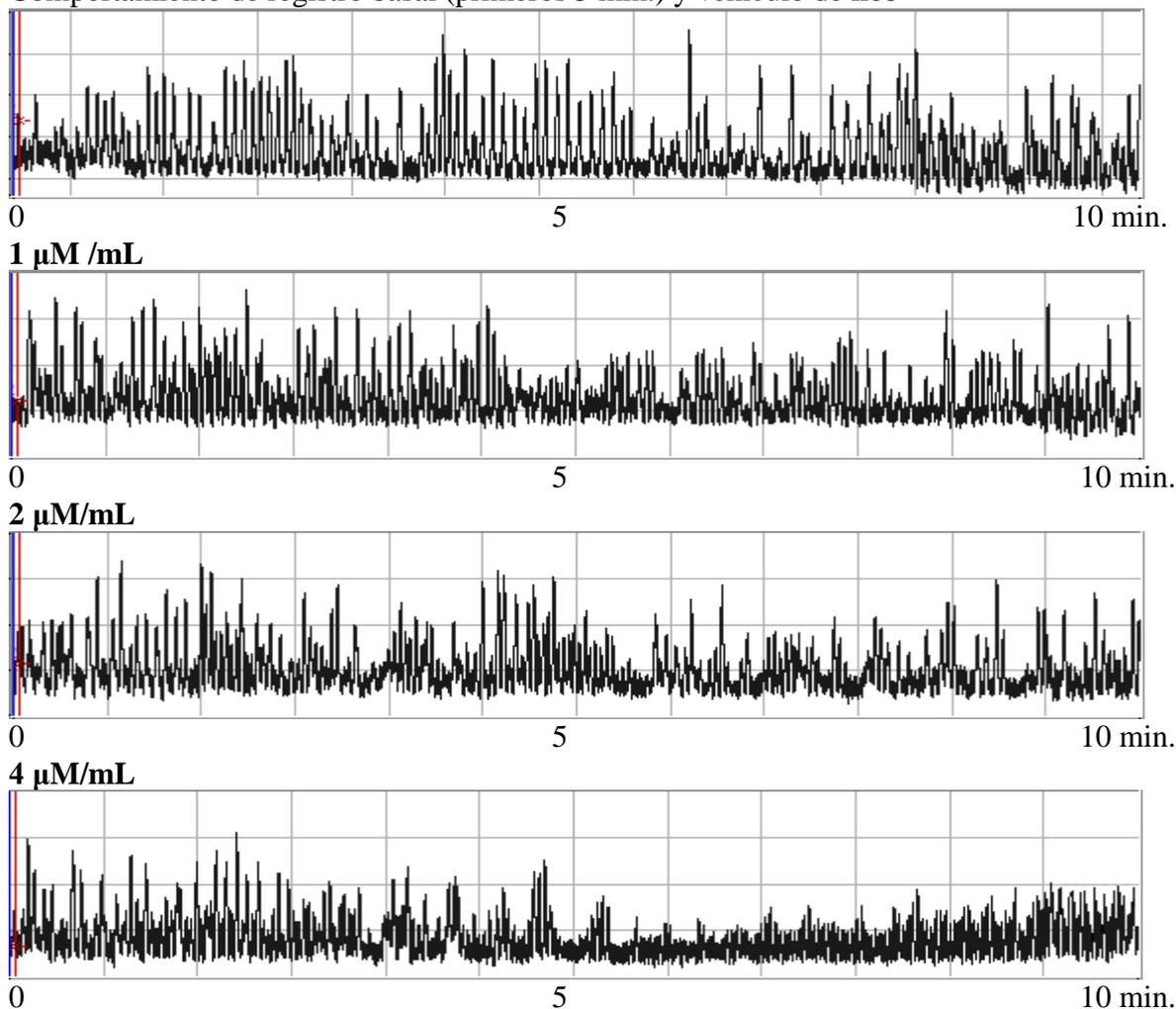


Figura 27. Registros digitales de actividad de yeyuno con MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

La AMP de las espigas registradas, cuando se adiciona la MEL, a las concentraciones indicadas, se observó inicialmente un incremento de ésta, seguida por una disminución gradual, en la porción correspondiente al duodeno y el yeyuno. En el íleo se observó que solo se presenta una relajación de forma gradual, lo que indica que este efecto, es como consecuencia directa y de forma dependiente de la concentración de MEL aplicada (Tabla No.4 y Gráfico No.3).

Comportamiento de registro basal (primeros 5 min.) y vehiculo de íleo



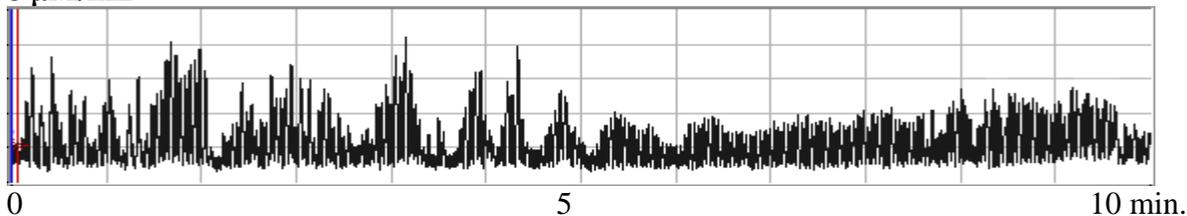
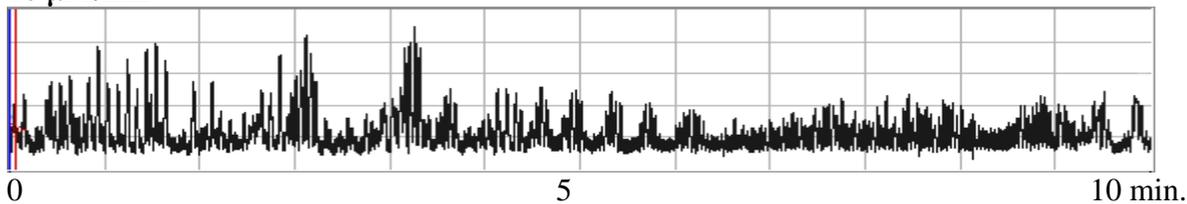
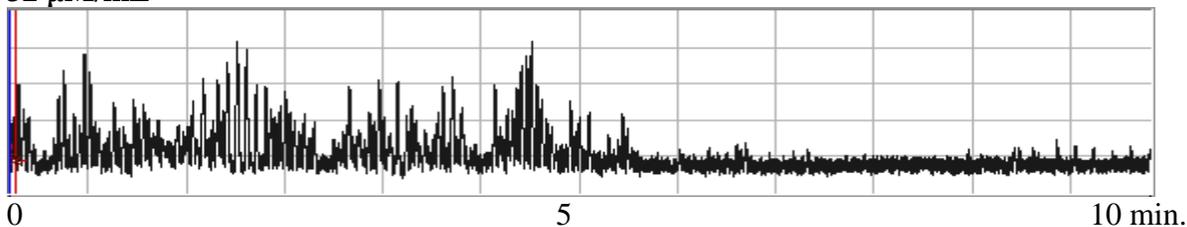
8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 

Figura 28. Registros digitales de actividad de íleo con MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
MEL	% Basal	<i>Duodeno</i>		<i>Yeyuno</i>		<i>Íleo</i>	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	433.780	100.00	709.610	100.00	611.960	100.00
vehículo	99.82	408.690	94.00	708.960	99.91	609.930	99.67
1	100.10	556.080	128.00	882.940	124.43	556.060	90.87
2	100.03	483.920	111.00	797.870	112.44	474.690	77.57
4	100.07	479.100	110.00	734.430	103.49	457.230	74.72
8	99.80	429.400	99.00	761.990	107.38	395.650	64.65
16	100.00	253.510	58.00	626.070	88.23	396.920	64.86
32	99.78	182.480	42.00	428.180	60.34	250.690	40.97

Tabla 2. Porcentajes promedio de ABC con diferentes concentraciones de MEL para duodeno, yeyuno e íleo.

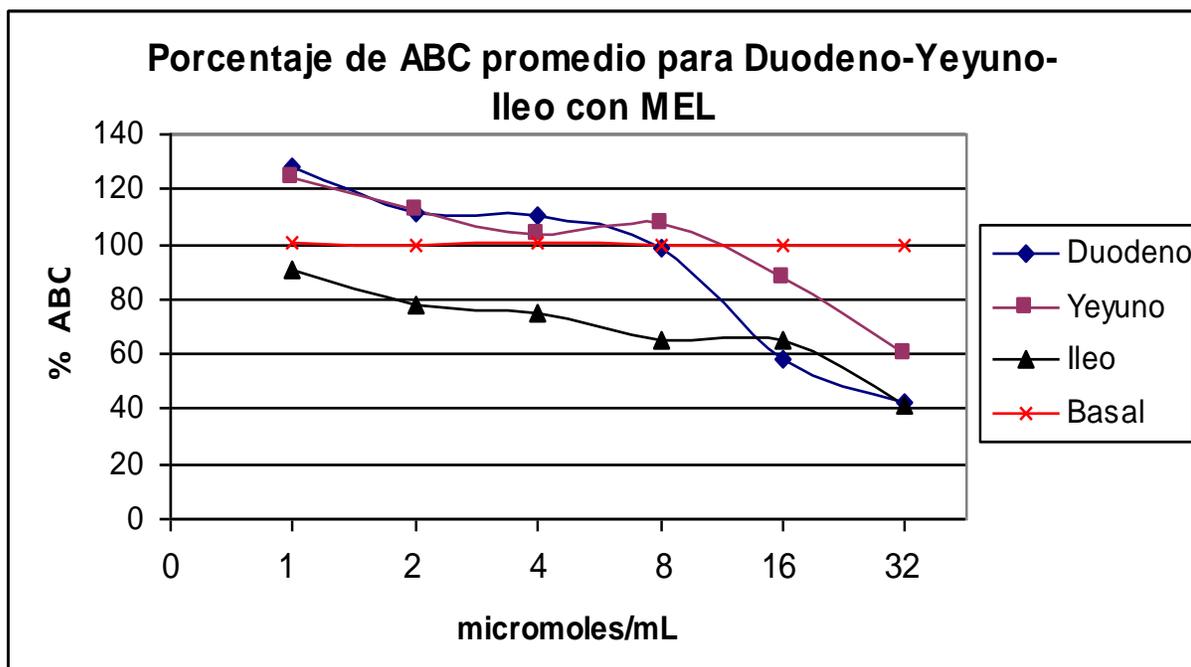


Gráfico 1. Promedio de porcentajes de ABC vs. diferentes concentraciones de MEL con duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de FREC/seg.							
MEL	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M/mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.117	100.00	0.112	100.00	0.264	100.00
vehículo	100.00	0.117	100.00	0.112	100.00	0.264	100.00
1	101.30	0.123	105.71	0.126	112.54	0.218	82.59
2	100.96	0.158	135.71	0.158	141.19	0.209	79.07
4	100.00	0.114	97.85	0.196	175.52	0.210	79.45
8	100.07	0.091	77.85	0.128	114.33	0.192	72.51
16	100.24	0.077	65.71	0.136	121.79	0.201	76.04
32	100.00	0.025	21.42	0.146	130.44	0.081	30.64

Tabla 3. Porcentajes promedio de FREC vs. diferentes concentraciones de MEL con duodeno, yeyuno e íleo.

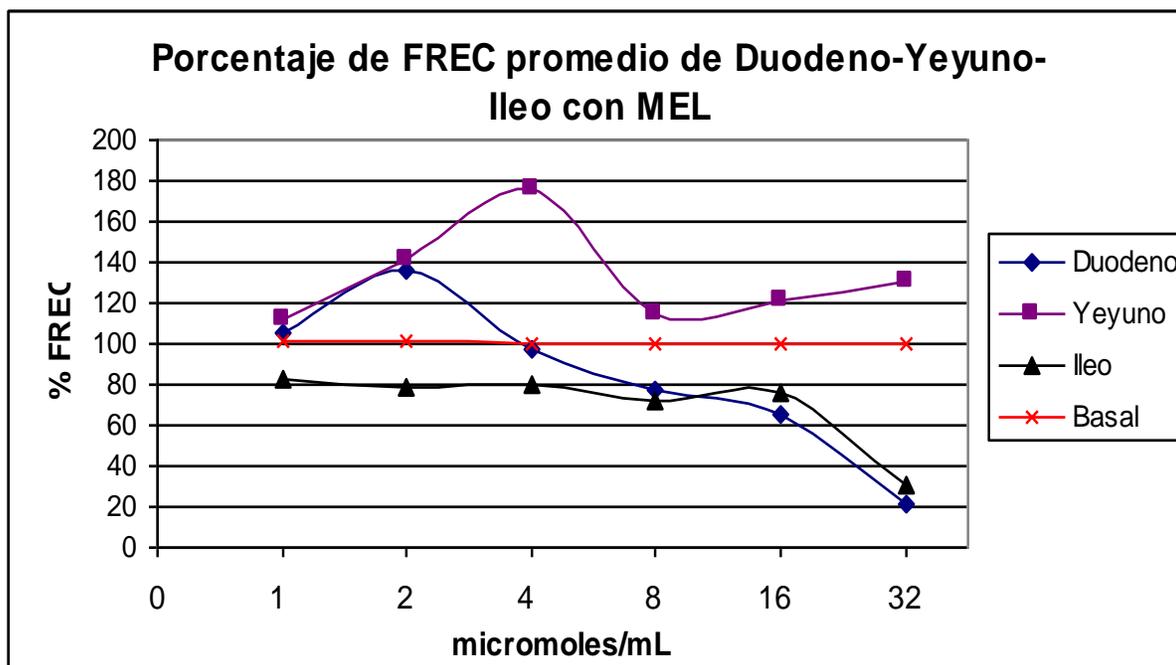


Grafico 2. Promedio de porcentajes de FREC vs. diferentes concentraciones de MEL con duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de AMP							
MEL	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M/mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	4.730	100.00	5.420	100.00	5.710	100.00
vehículo	100.04	4.740	100.21	5.410	99.81	5.700	99.82
1	99.99	4.380	92.60	5.790	106.83	5.000	87.57
2	99.95	5.470	115.64	7.410	136.72	5.050	88.44
4	100.00	5.190	109.72	6.160	113.65	4.300	75.31
8	100.12	4.030	85.20	5.300	97.79	4.910	85.99
16	100.07	4.340	91.75	5.470	100.92	3.960	69.35
32	100.05	4.080	86.25	5.160	95.21	3.000	52.54

Tabla 4. Porcentajes promedio de AMP con diferentes concentraciones de MEL con duodeno, yeyuno e íleo.

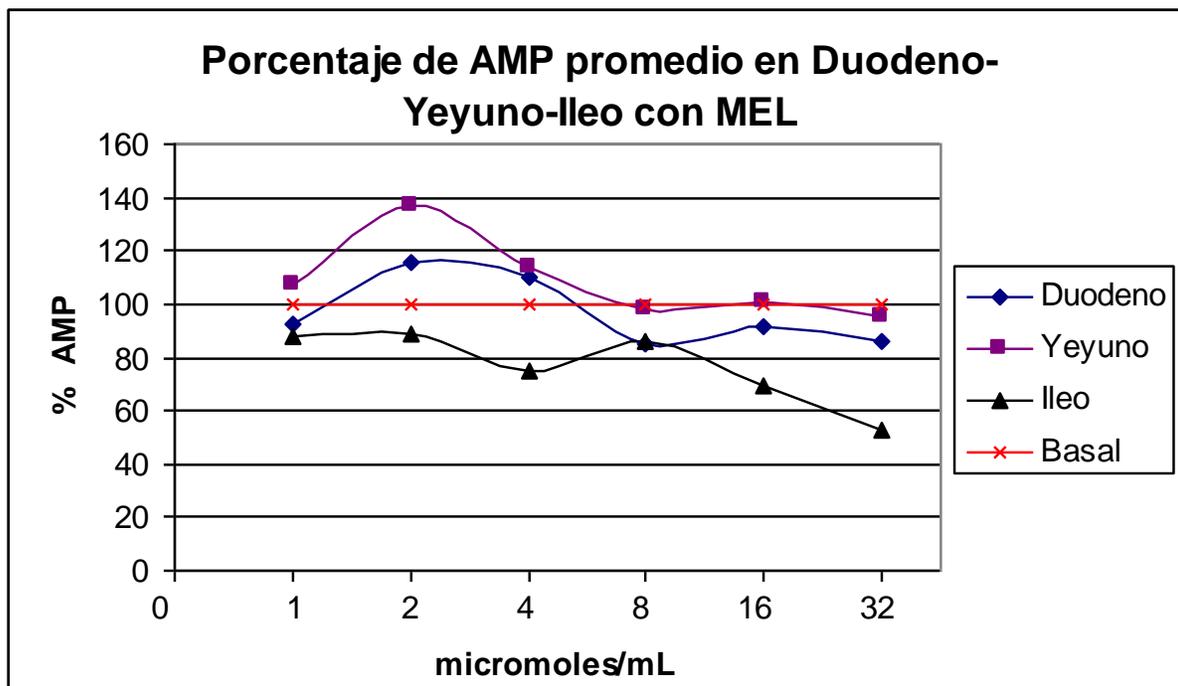


Grafico 3. Promedio de porcentajes de AMP vs. diferentes concentraciones de MEL con duodeno, yeyuno e íleo.

La adición de MEL en diferentes concentraciones provocó un incremento inicial y posteriormente una disminución gradual de la actividad muscular en el tejido duodenal y en el yeyuno, sin embargo en la porción correspondiente al íleo observamos solamente una disminución gradual de la respuesta. El efecto producido por la MEL sobre la respuesta del tejido en duodeno, yeyuno e íleo consistió en la disminución de la ABC hasta casi el 60 % con respecto a la basal (Tabla No.2). A partir de los datos de ABC, se obtuvo la curva dosis-respuesta gradual, graficando el logaritmo de la concentración vs. porcentaje de relajación. Con este grafico se calculó la concentración de MEL a la que se inhibe el 50% (CI50) de la actividad muscular espontánea del tejido. Para el duodeno se obtuvo como resultado un valor de $CI_{50}=301.99 \mu\text{M/mL}$ (Grafico No.4). Para el yeyuno su valor es de $CI=1230.27 \mu\text{M/mL}$ (Grafico No.5). Y para el íleo el valor encontrado es $CI=263.03 \mu\text{M/mL}$ (Grafico No.6). La

tendencia de estas curvas sugiere la existencia de una relación lineal entre la concentración de MEL y la disminución de la actividad muscular espontánea, indicando un efecto inhibitor de la MEL.

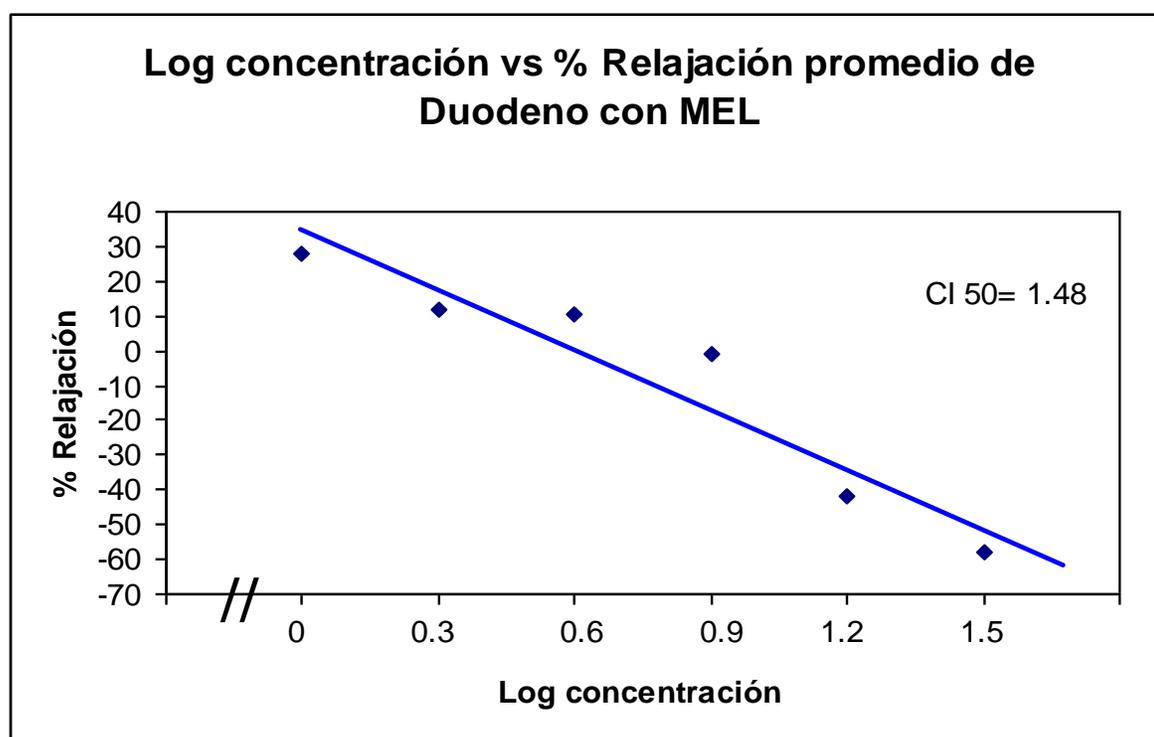


Grafico 4. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con diferentes concentraciones de MEL. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2= 0.9065$

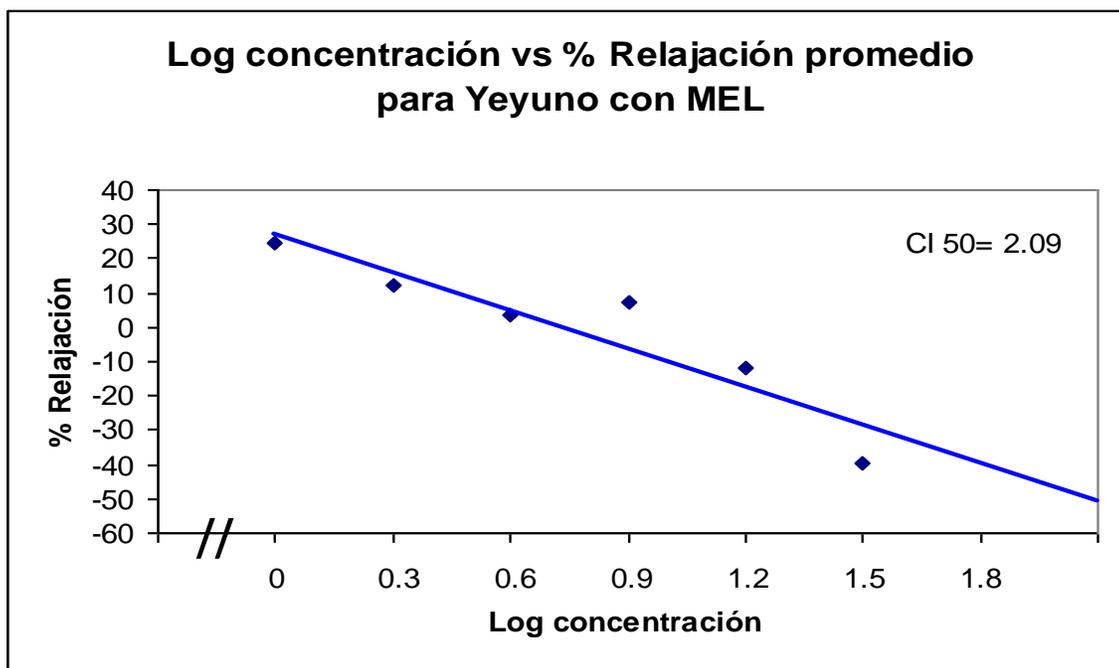


Gráfico 5. Curva dosis-respuesta gradual de yeyuno con MEL. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.8561$

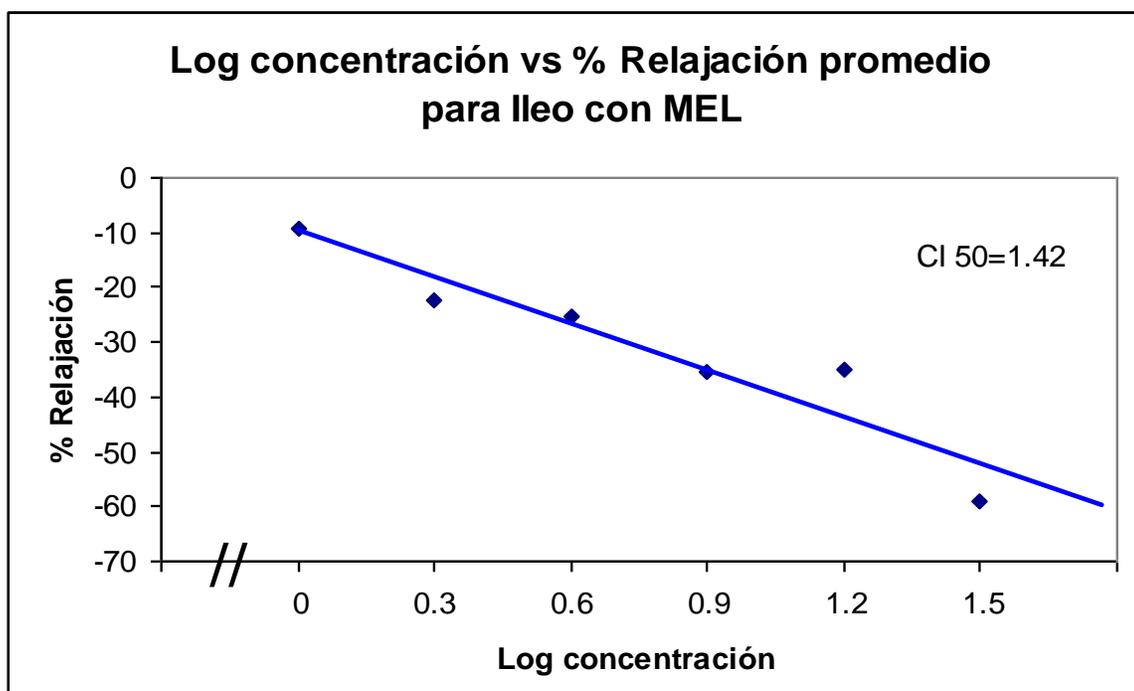


Gráfico 6. Curva dosis-respuesta gradual de íleo con MEL. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.9003$

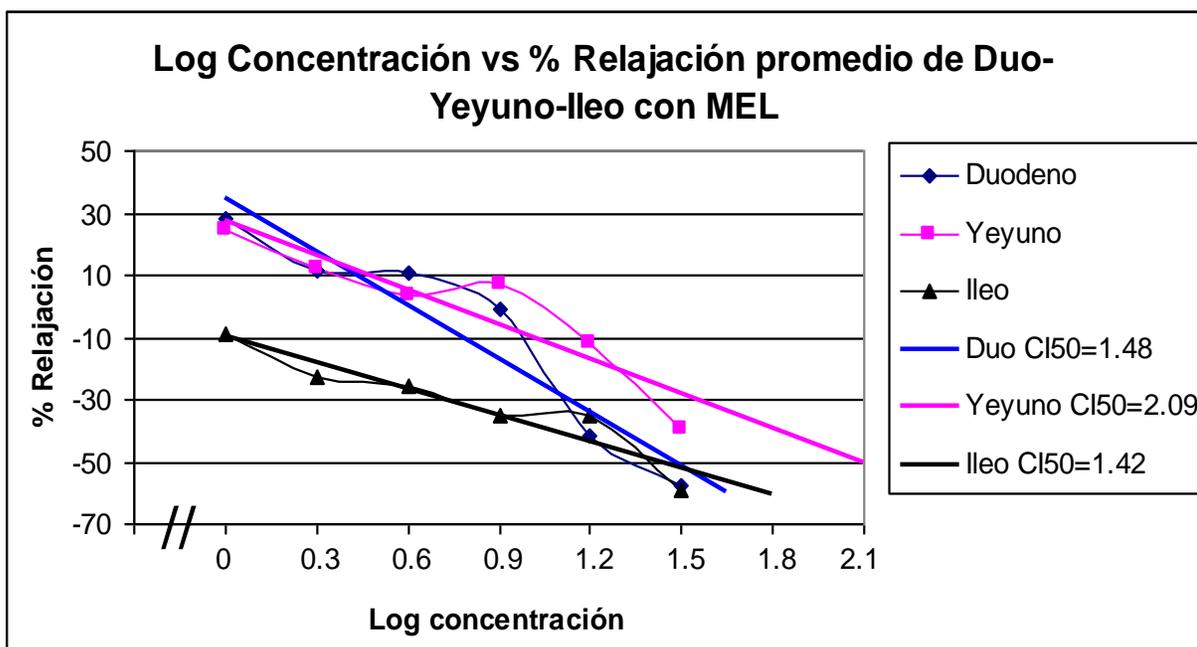


Grafico 7. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con MEL. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración.

6.2. EXPERIMENTO 2

EFFECTO DEL GABA, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al periodo de estabilidad de 30 min. del tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzó una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejidos se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView como se detalla en el capítulo (10.4). La escala de calibración es de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.29).

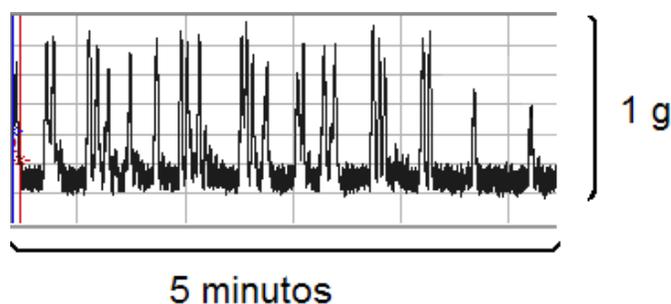
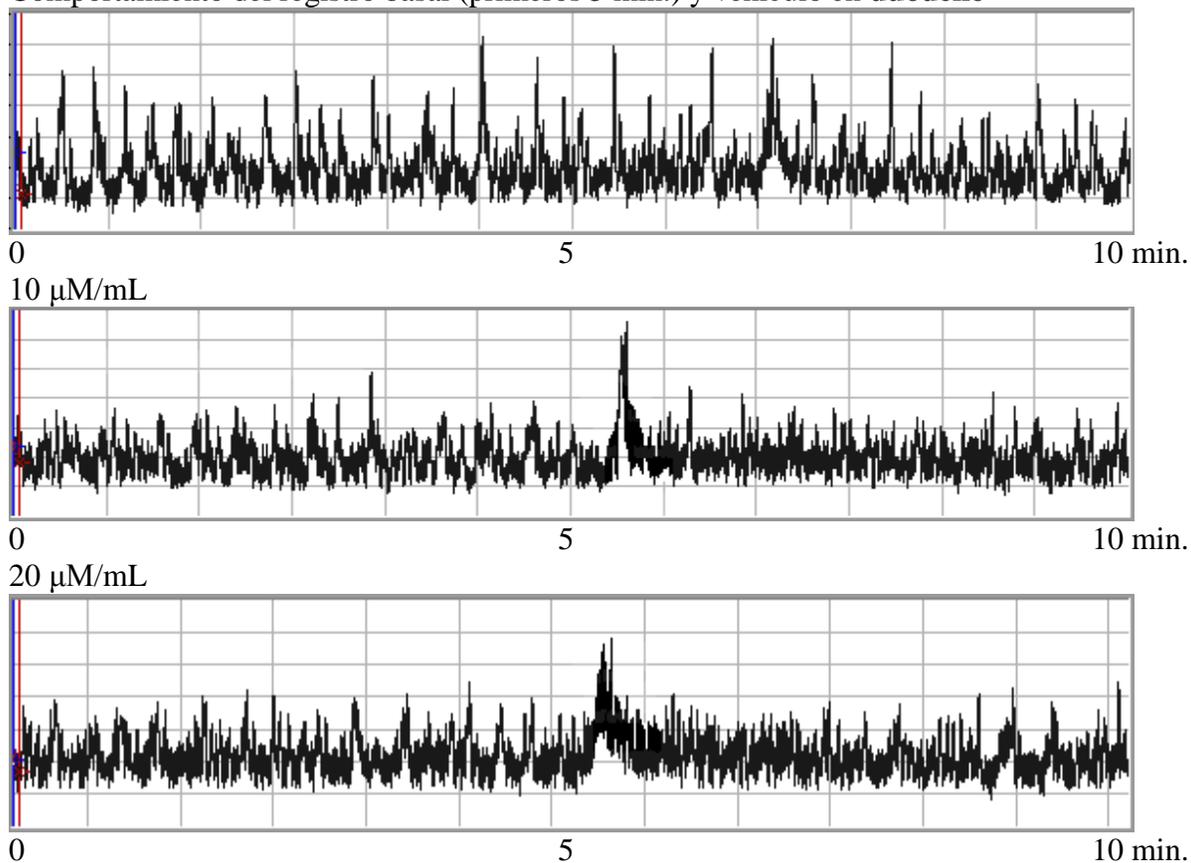


Figura 29. Muestra el registro digital registrado por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

Los parámetros utilizados para el análisis de los resultados obtenidos son: Área Bajo la Curva (ABC), la Frecuencia (FREC) y la Amplitud de espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó GABA a las concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{M}/\text{mL}$, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

El **ABC** (Tabla No.5 y Gráfico No.7), en la porción correspondiente al duodeno y el yeyuno, al adicionar el GABA a las concentraciones indicadas se observó inicialmente un incremento, de la actividad espontánea del tejido de forma gradual con respecto a la basal. En el íleo se observó que se presenta al inicio una disminución de la respuesta, seguida de un aumento de forma gradual, lo que indica que estos efectos, son consecuencia directa y dependiente de la concentración de GABA aplicada. El registro digital para el duodeno con GABA puede ser apreciado en la (Figura No.29), el de yeyuno en la (Figura No. 30) y el de íleo en la (Figura No.31).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **duodeno**



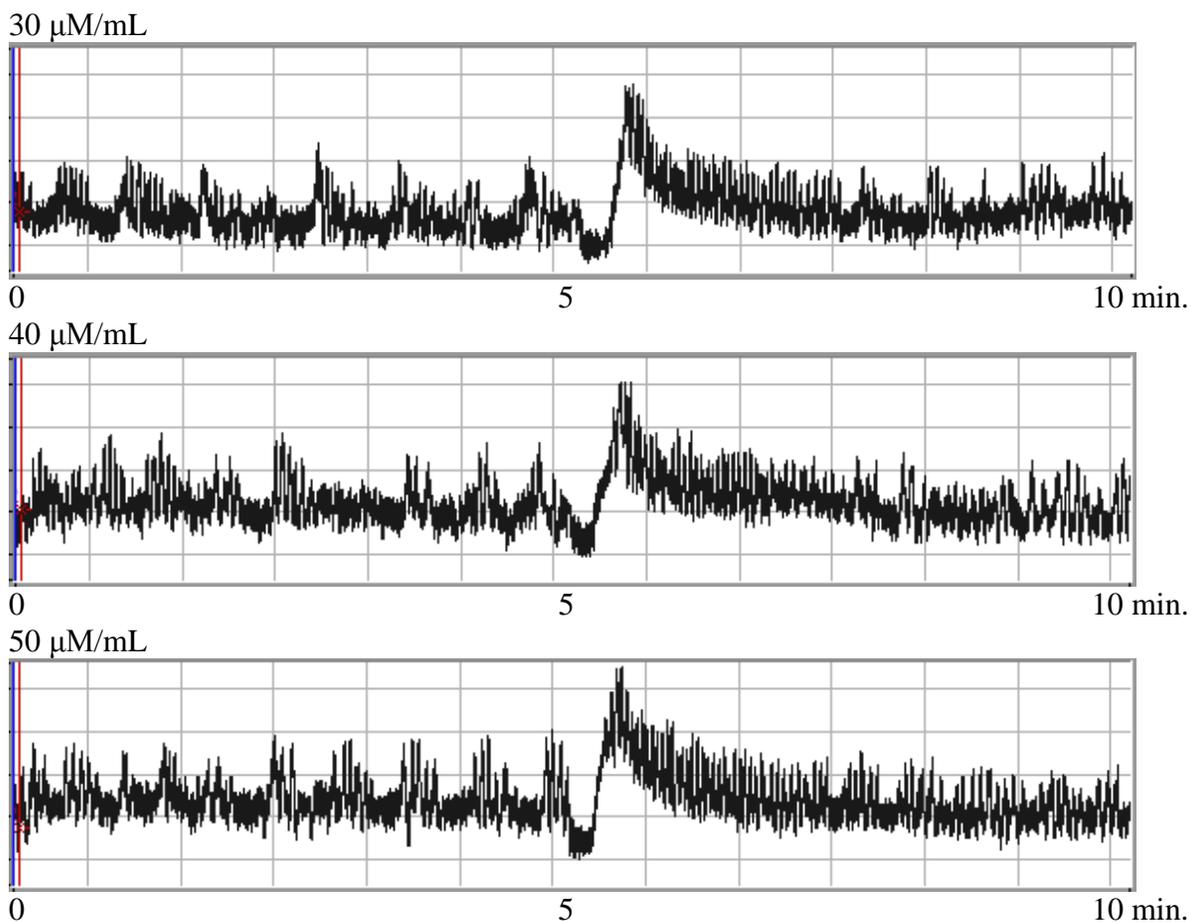
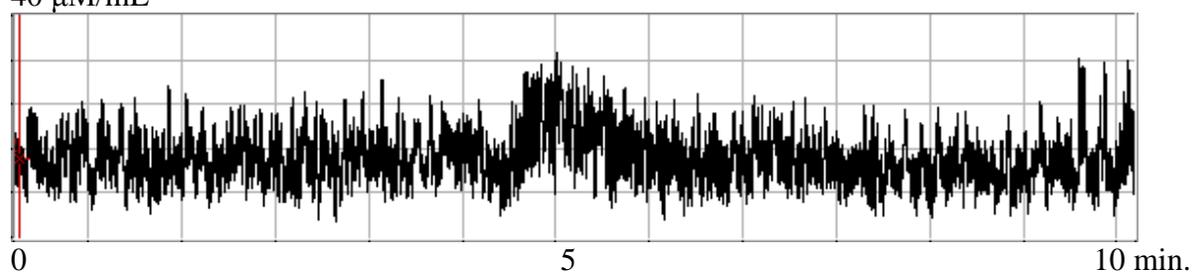
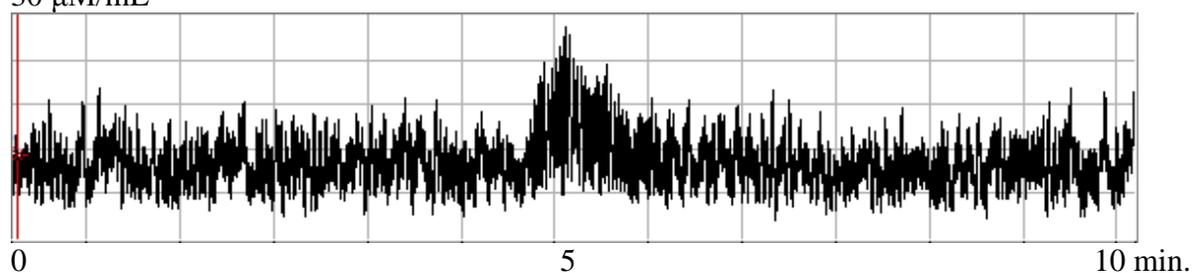
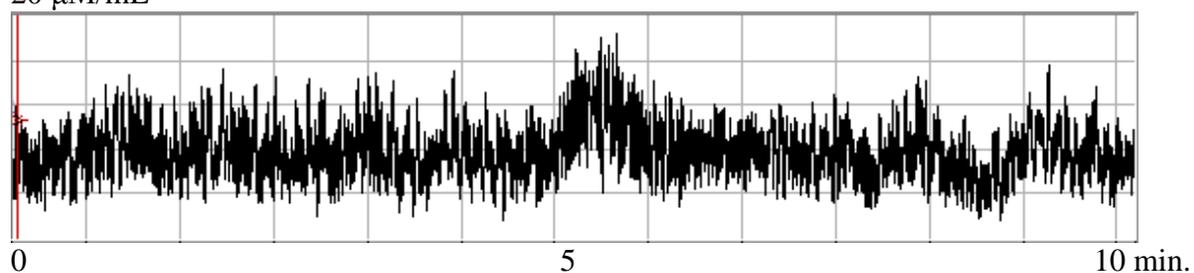
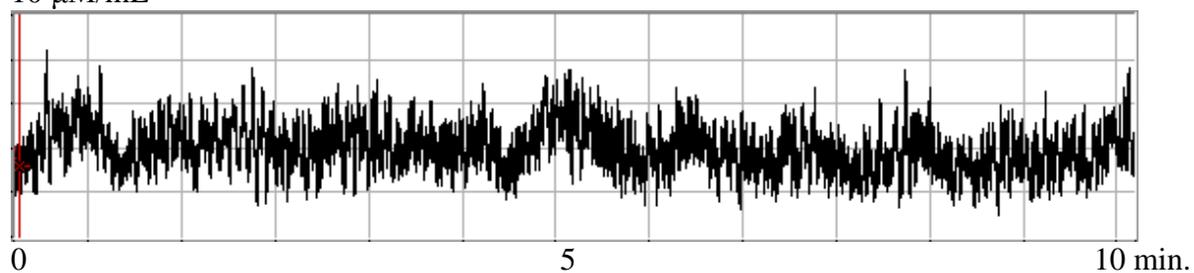
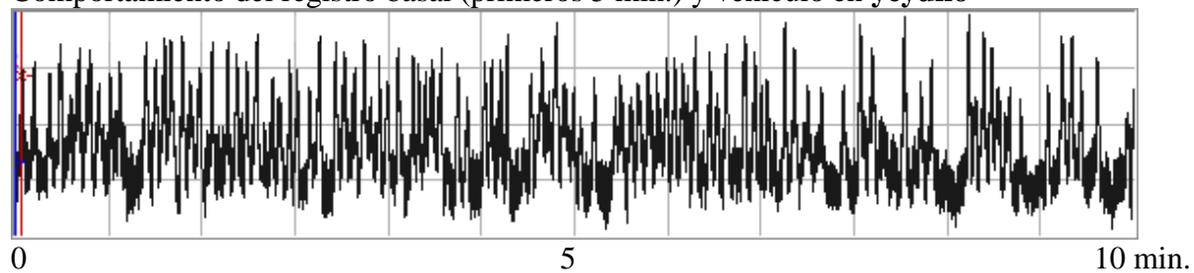


Figura 30. Registros digitales de actividad de **duodeno** con GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

La FREC de eventos contráctiles espontáneos del tejido, ocurridos durante el registro en la porción correspondiente al tejido de duodeno, yeyuno e íleo, cuando se adicionó GABA al tejido a las concentraciones ya indicadas, el resultado observado es que desde el inicio, se presenta un incremento de la actividad con respecto a la basal, medida a través de. Por lo que se atribuye este efecto, como consecuencia directa y dependiente de la concentración de GABA aplicada (Tabla No. 6 y Gráfico No. 8).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **yeyuno**

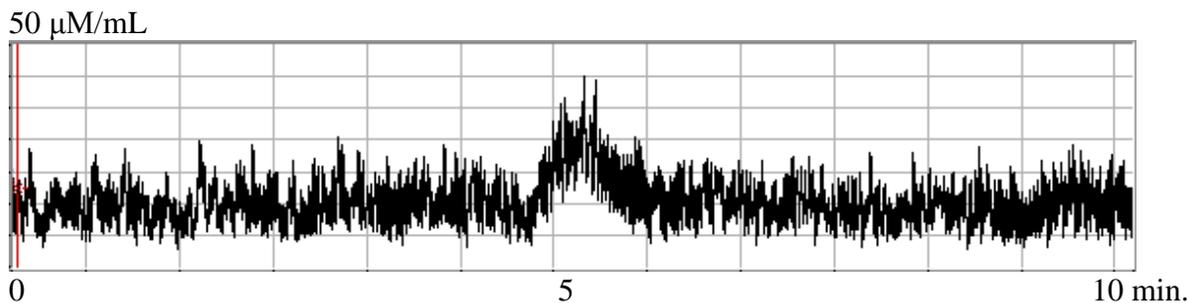
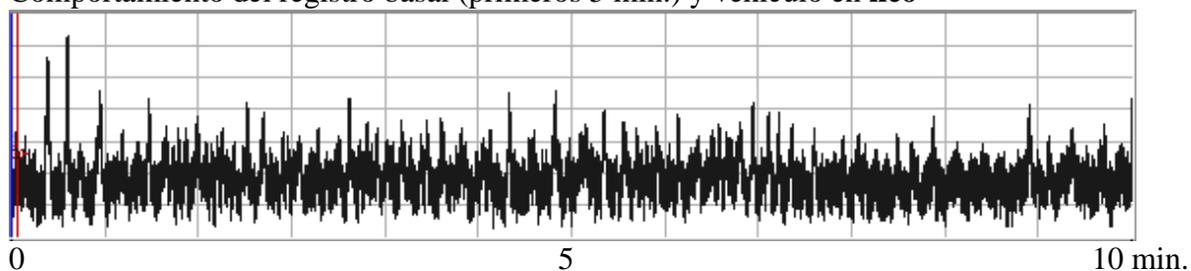


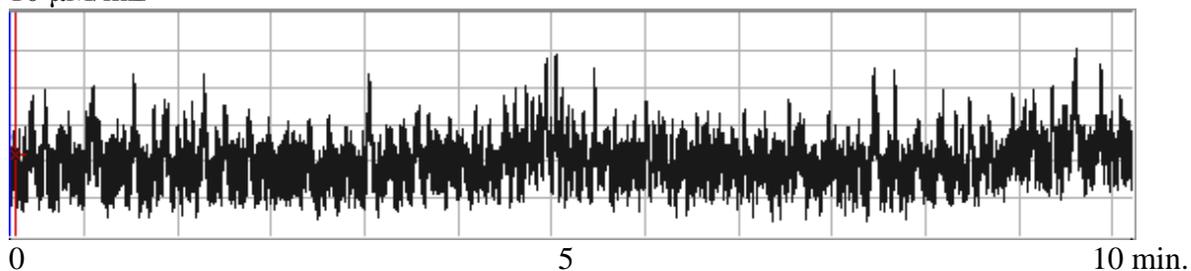
Figura 31. Registros digitales de actividad de **yeyuno** con GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

La AMP de las espigas, cuando se adiciona GABA a las concentraciones indicadas, se observó un incremento, comparado contra la basal registrada, en las porciones de tejido correspondientes al duodeno y el íleo. Únicamente en el yeyuno observamos que se presentó una disminución de la AMP con respecto a la basal, de la contracción espontánea del tejido, por lo que del mismo modo este es un efecto directo y dependiente de la concentración de GABA aplicada (Tabla No.7 y Gráfico No.8).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **íleo**



10 $\mu\text{M}/\text{mL}$



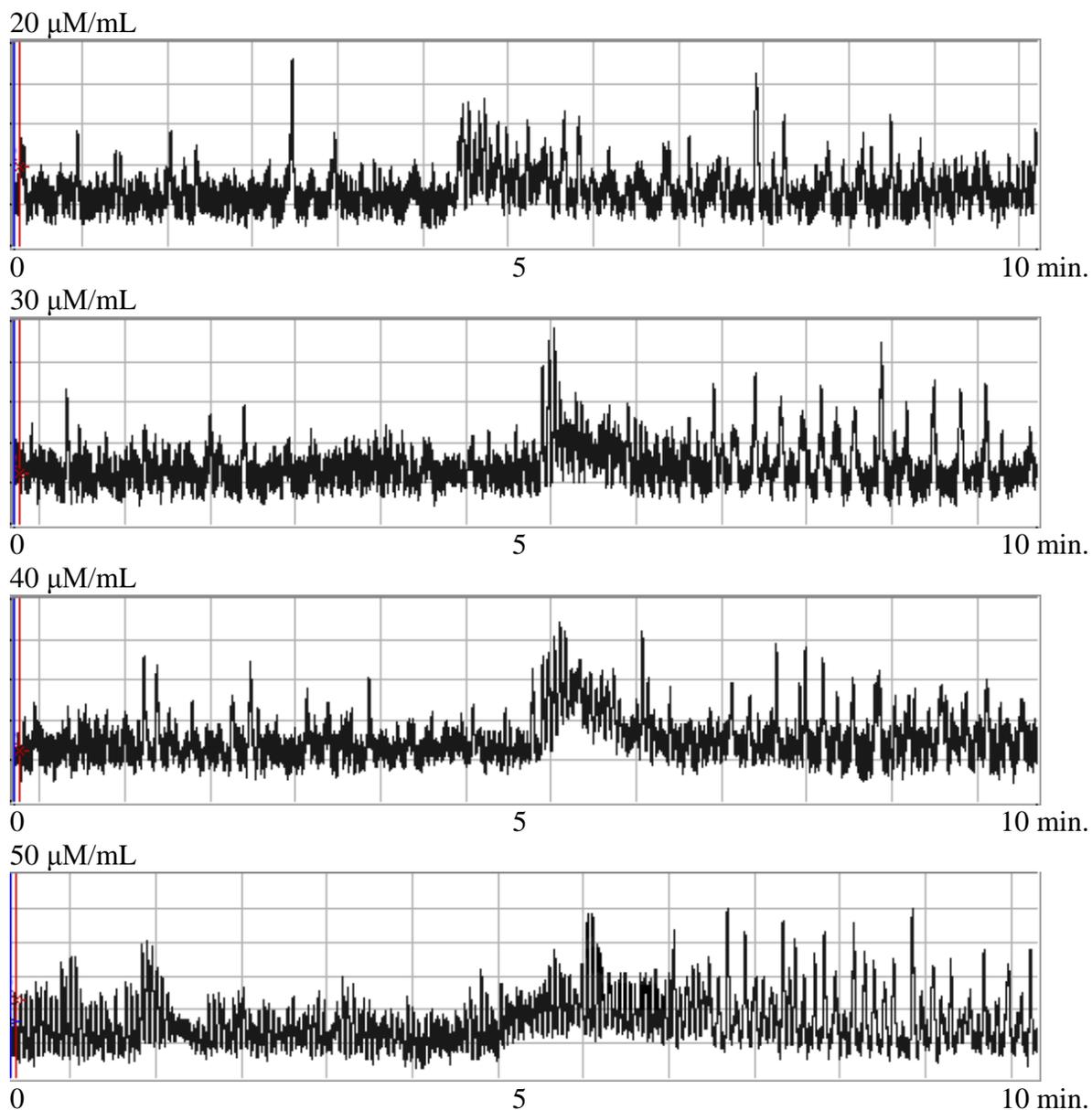


Figura 32. Registros digitales de actividad de **ileo** con GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	363.845	100.00	419.303	100.00	421.510	100.00
vehículo	99.88	361.401	99.83	417.368	99.84	419.010	99.91
10	100.09	363.140	99.81	416.522	99.34	390.480	92.64
20	100.04	412.960	113.50	443.947	105.88	416.910	98.91
30	100.04	427.790	117.57	455.000	108.51	536.550	127.29
40	99.94	459.680	126.34	513.484	122.46	582.610	138.22
50	99.97	510.990	140.44	524.177	125.01	646.950	153.48

Tabla 5. Porcentajes promedio de ABC para duodeno, yeyuno e íleo con GABA.

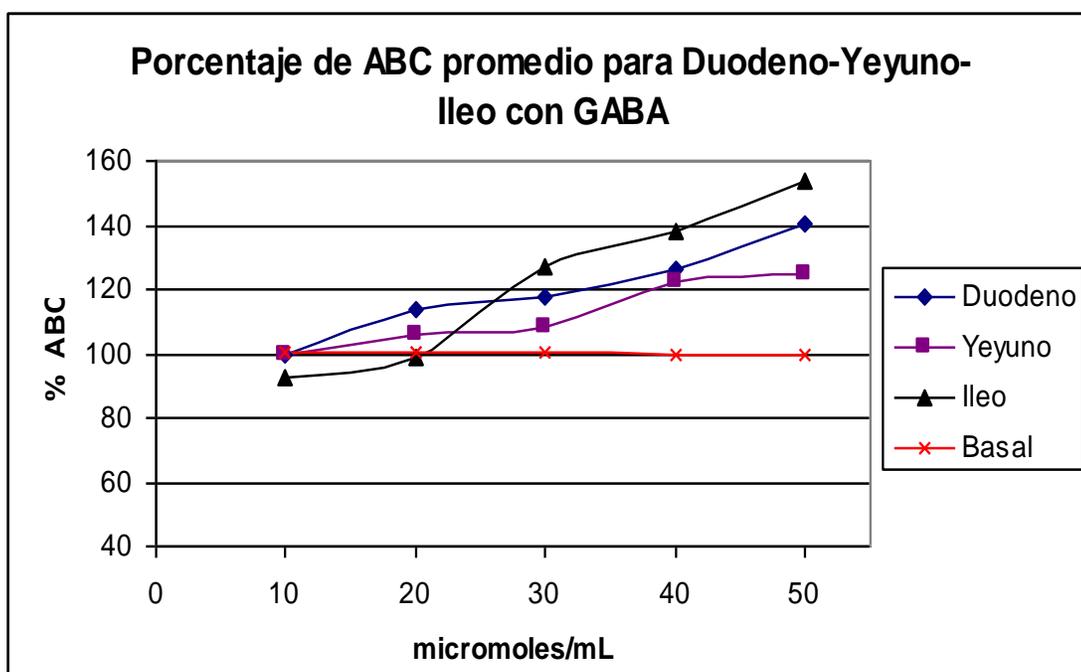


Grafico 8. Porcentajes promedio de ABC a diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de FREC/seg.							
GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M/mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.111	100.00	0.261	100.00	0.1563	100.00
vehículo	100.02	0.110	99.11	0.263	100.64	0.1551	99.23
10	100.00	0.169	151.68	0.280	107.35	0.1621	103.73
20	99.35	0.173	155.42	0.331	127.00	0.1854	118.66
30	100.06	0.172	154.28	0.344	131.80	0.1804	115.47
40	100.01	0.186	167.11	0.351	134.50	0.1801	115.25
50	100.02	0.172	154.67	0.370	141.85	0.1738	111.20

Tabla 6. Porcentajes promedio de FREC/seg. de duodeno, yeyuno e íleo con GABA.

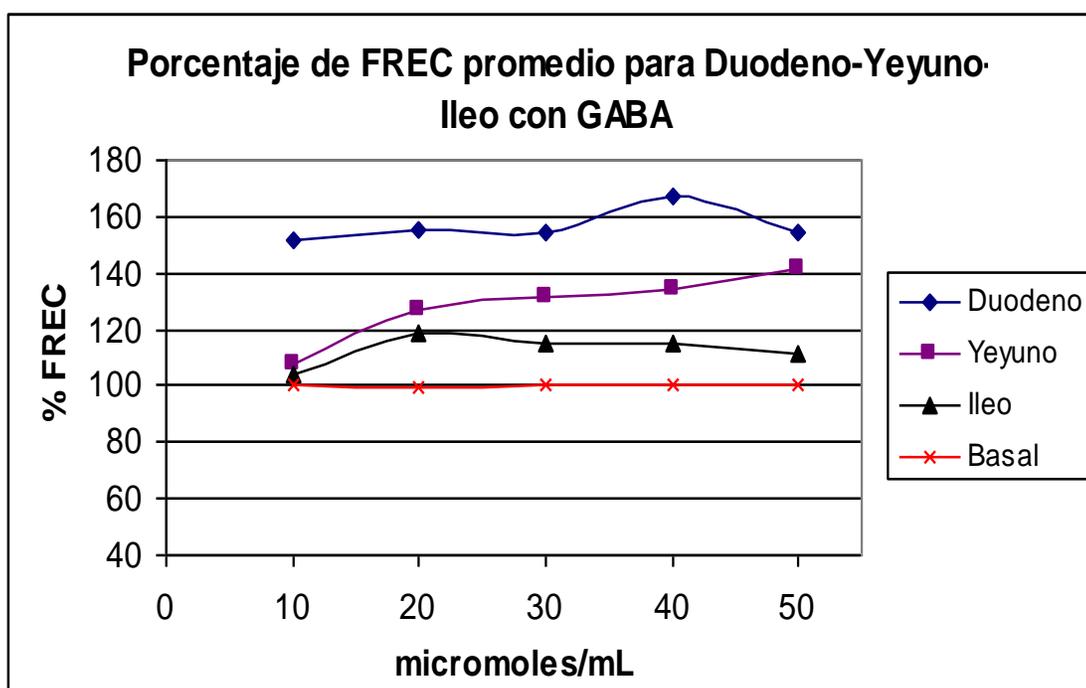


Gráfico 9. Porcentajes de frecuencia de actividad a diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de AMP							
GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	4.723	100.00	5.124	100.00	5.340	100.00
vehículo	100.10	4.702	99.56	5.065	98.85	5.340	100.00
10	100.00	4.612	97.65	4.600	89.77	5.500	103.00
20	100.05	5.145	108.94	4.690	91.53	5.040	94.38
30	100.00	4.964	105.10	4.600	89.77	5.450	102.06
40	100.00	4.868	103.07	5.250	102.46	5.910	110.67
50	99.95	4.919	104.15	5.000	97.58	5.960	111.61

Tabla 7. Porcentaje promedio de la AMP de duodeno, yeyuno e íleo con GABA.

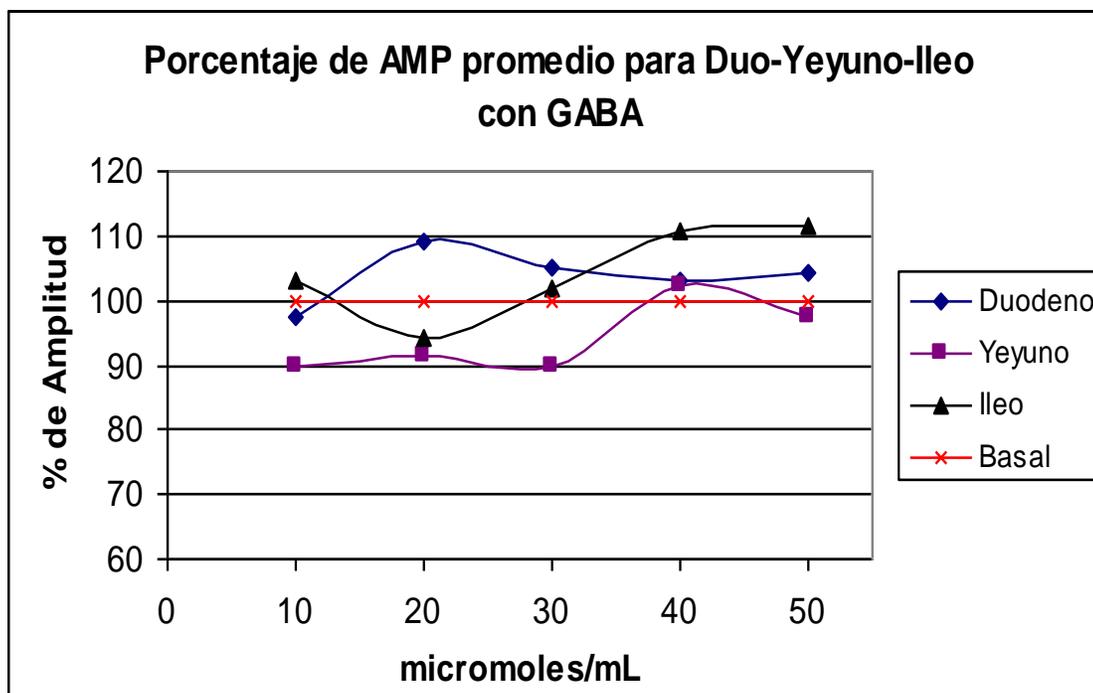


Gráfico 10. Promedio de porcentajes de la AMP a diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

La adición de GABA en diferentes concentraciones provocó un ligero decremento inicial en la actividad del íleo y posteriormente un aumento gradual de la actividad muscular en el tejido duodenal, en el yeyuno, observamos solamente un incremento gradual de la respuesta. El efecto producido por el GABA sobre la respuesta del tejido en duodeno, yeyuno e íleo consistió en el incremento del ABC hasta casi el 50 % (Tabla No.2). A partir de los datos de ABC se obtuvo una curva dosis-respuesta gradual, graficando el logaritmo de la concentración vs. porcentaje de relajación. Con este grafico se calculo la concentración de GABA a la que se alcanza el 50% (CE50) de la actividad muscular espontánea del tejido. Para el duodeno se obtiene un valor de CE50=1000.00 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (Grafico No.10). Para el yeyuno su valor es de CE=2691.53 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (Grafico No.11). Y para el íleo el valor encontrado es CI=537.03 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (Grafico No.12). La tendencia de estas curvas sugiere la existencia de una relación lineal entre la concentración del GABA y el incremento de la contracción muscular, indicando un efecto inhibitor y excitador del GABA de forma gradual y dependiente de la concentración.

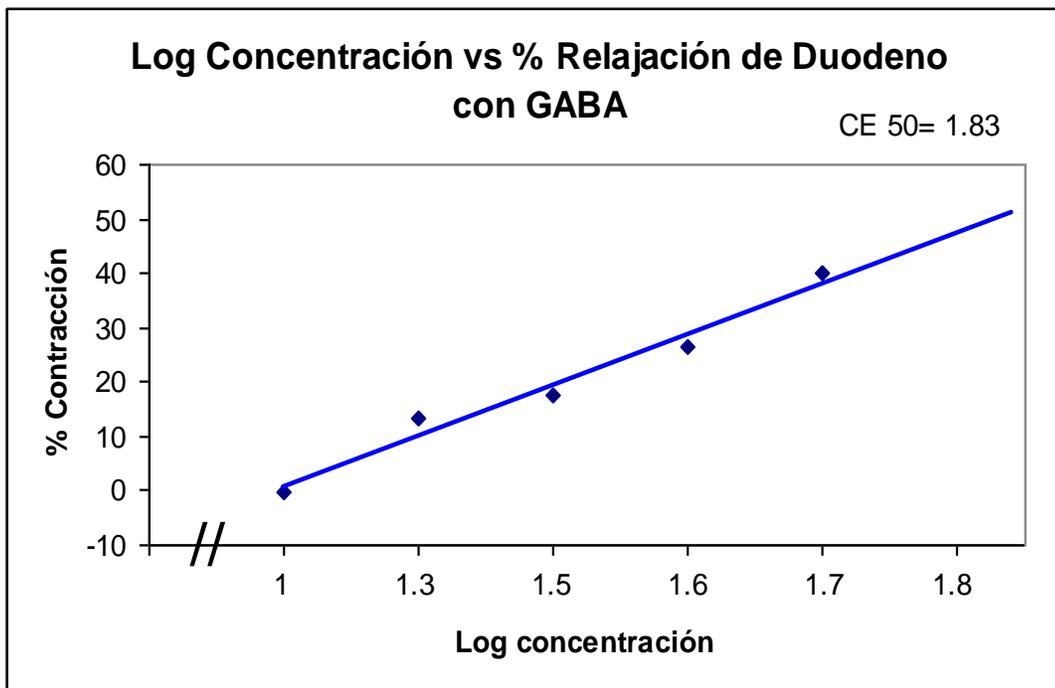


Gráfico 11. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2= 0.9187$

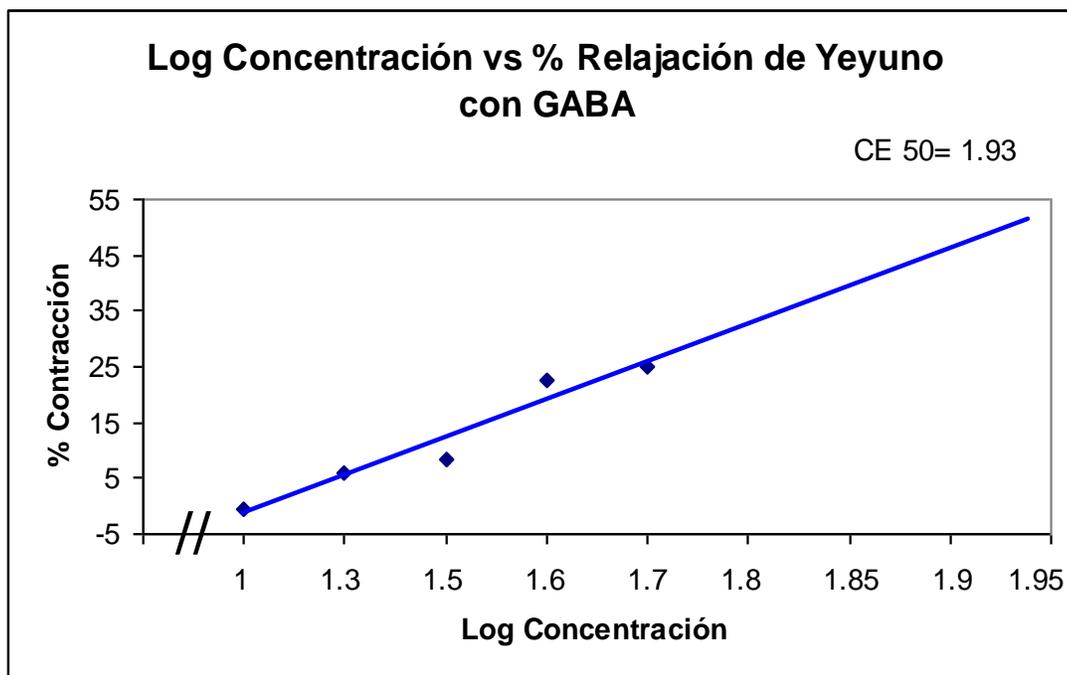


Gráfico 12. Curva dosis-respuesta gradual de yeyuno con diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2= 0.8712$

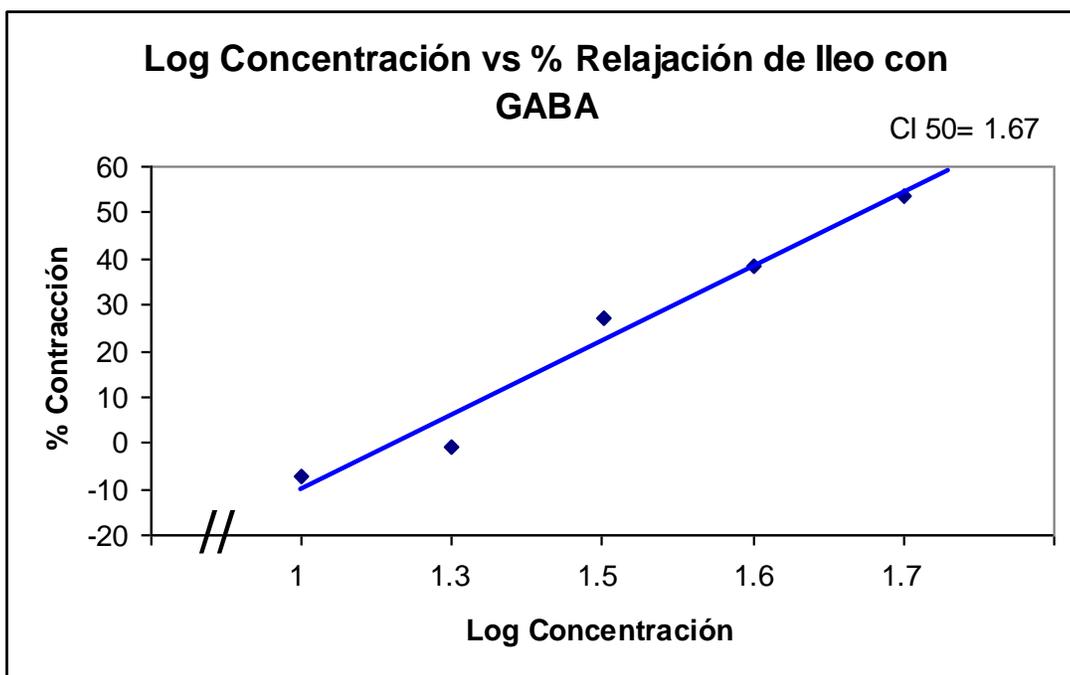


Gráfico 13. Curva dosis-respuesta gradual de íleo con diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.9015$

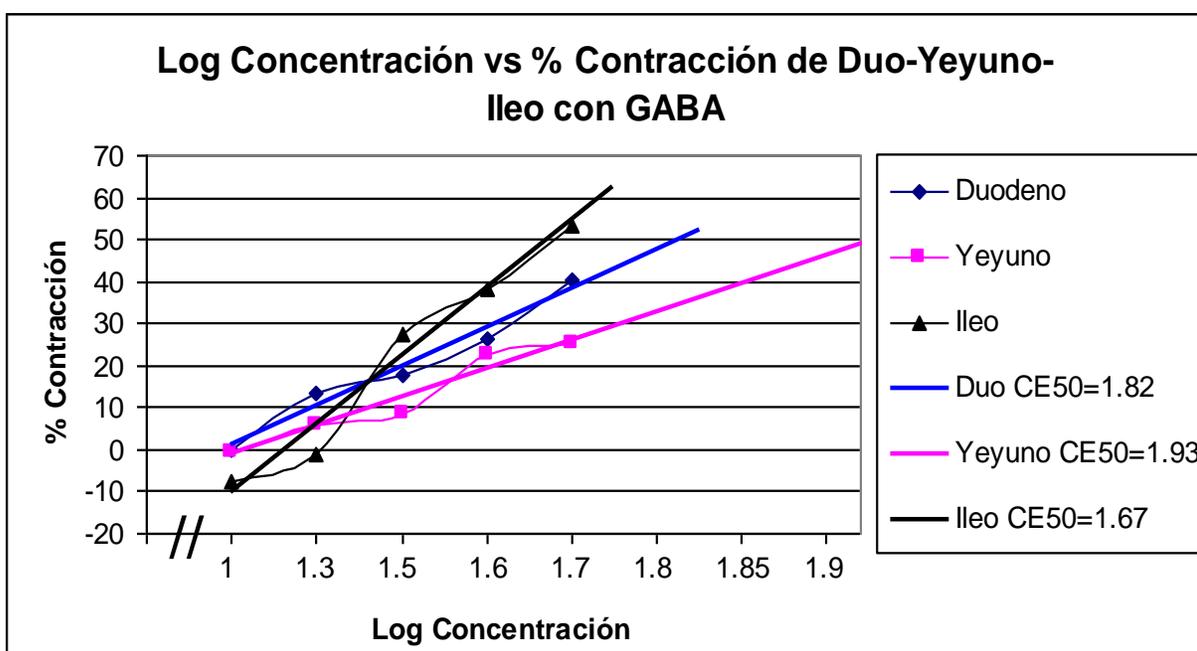


Gráfico 14. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración.

6.3. EXPERIMENTO 3

EFFECTO DE FLU, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al periodo de estabilidad de 30 min. el tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzó una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejidos se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView como se detalla en el capítulo (10.4). La escala de calibración es de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.33).

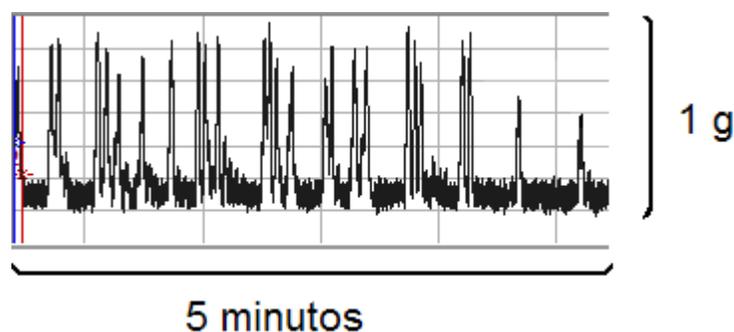
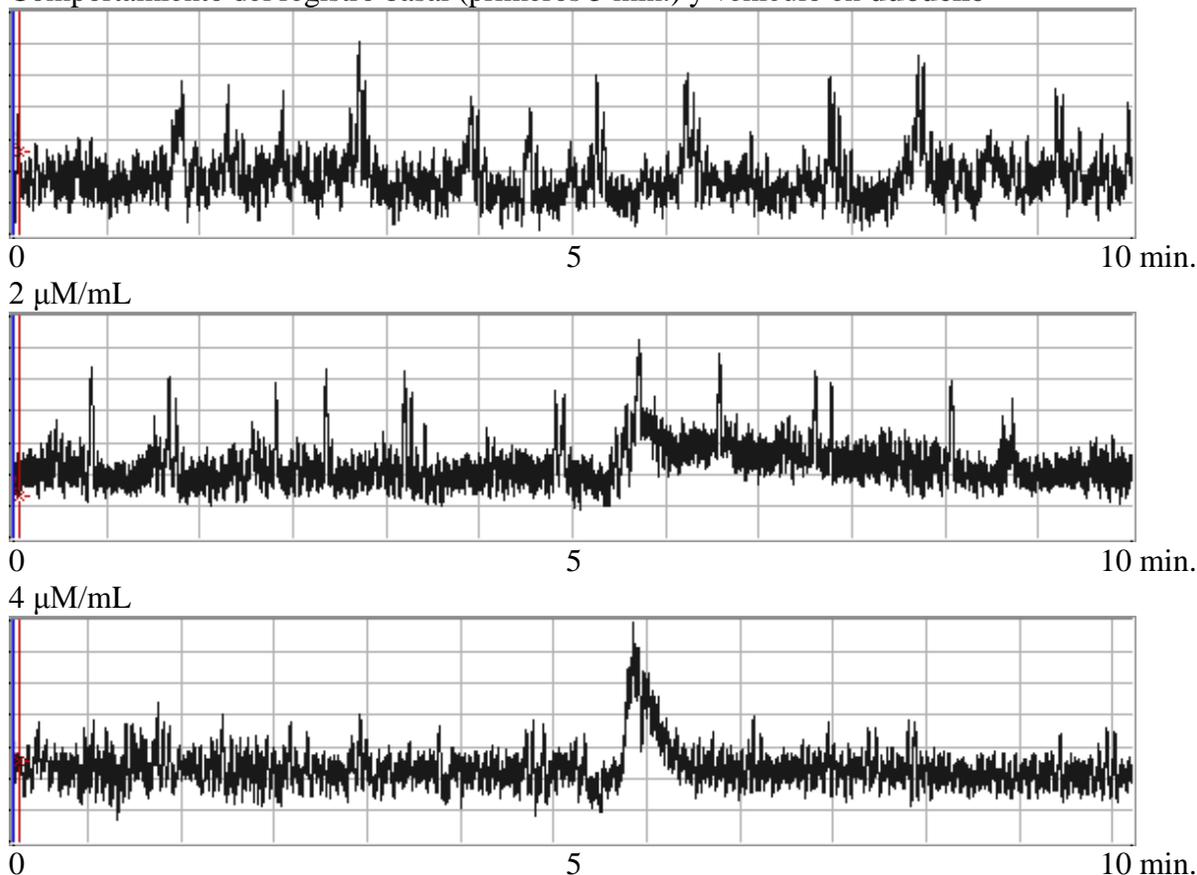


Figura No.33 Se muestra el registro digital proporcionado por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

Los parámetros utilizados para el análisis de los resultados obtenidos son: Área Bajo la Curva (ABC), la Frecuencia (FREC) y la Amplitud de espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó FLU a las concentraciones de 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

El **ABC** (Tabla No.8 y Gráfico No.13), al adicionar el FLU, a las concentraciones indicadas, se observó una disminución de la actividad espontánea del tejido al inicio de la respuesta, seguida por un posterior incremento de forma gradual de la actividad con respecto a la basal, medida a través de las porciones correspondientes al duodeno, el yeyuno y el íleo. Lo cual indica que estos efectos, son consecuencia directa y de forma dependiente de la concentración de FLU aplicada. El registro digital para el duodeno con FLU puede ser apreciado en la (Figura No.32), el de yeyuno en la (Figura No. 33) y el de íleo en la (Figura No.34).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **duodeno**



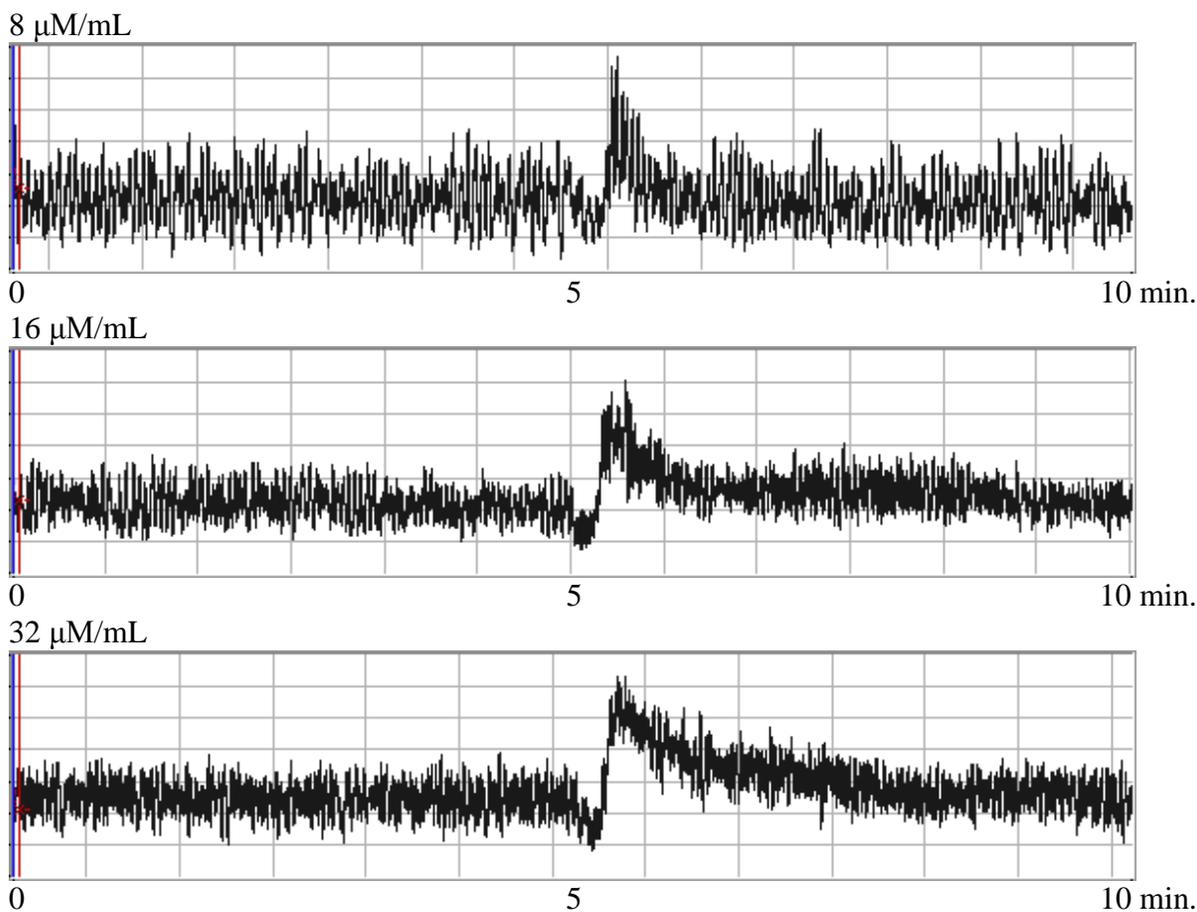
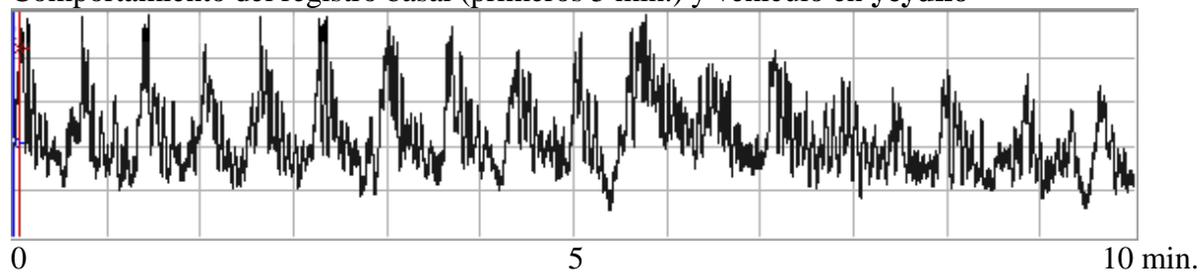
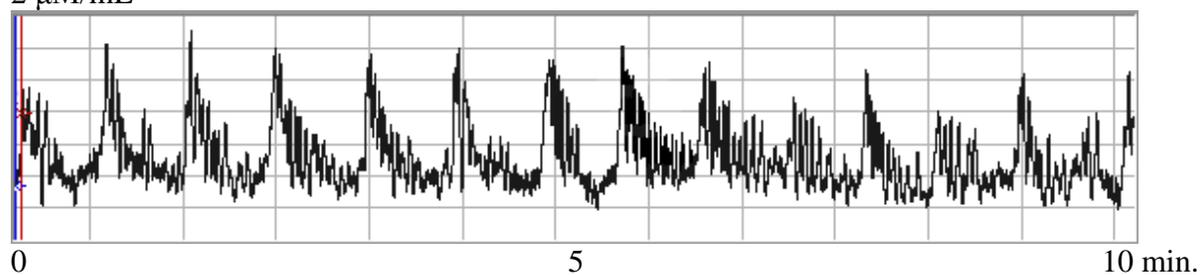
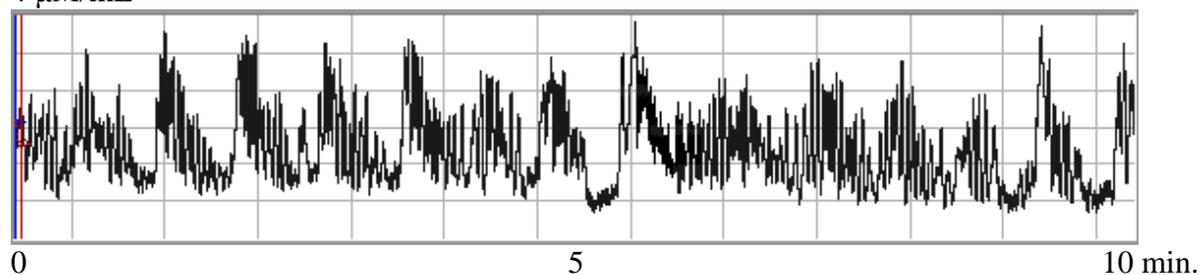
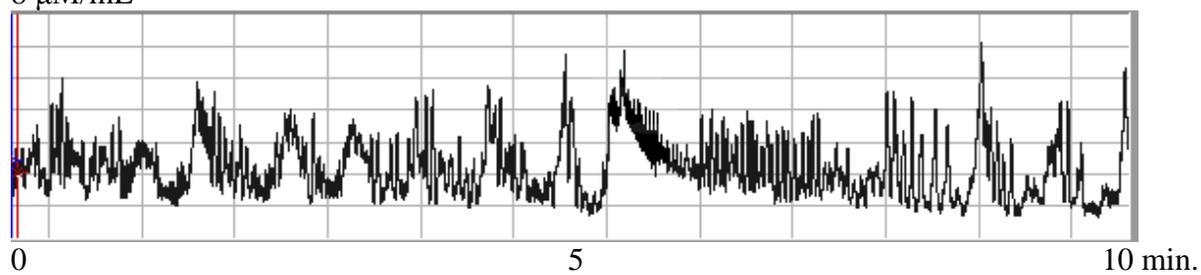
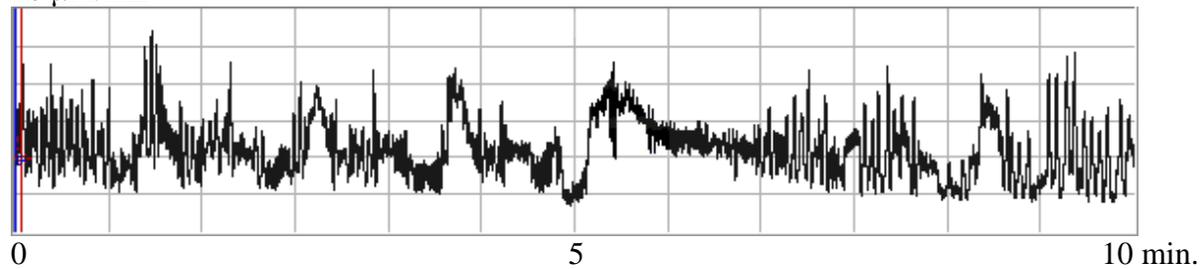


Figura 34. Registros digitales de actividad de **duodeno** con FLU. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

La FREC de eventos contráctiles espontáneos del tejido ocurrido durante el registro, cuando adicionamos FLU a las concentraciones indicadas, se observó al inicio un incremento de la actividad con respecto a la basal, seguida por una posterior disminución de forma gradual, en las porciones correspondientes al duodeno, yeyuno e íleo. Únicamente en el yeyuno este decremento es inferior al registro basal. Por lo que se atribuye este efecto como consecuencia directa y de forma dependiente de la concentración de FLU que fue aplicada (Tabla No.9 y Gráfico No.14).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **yeyuno**2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 

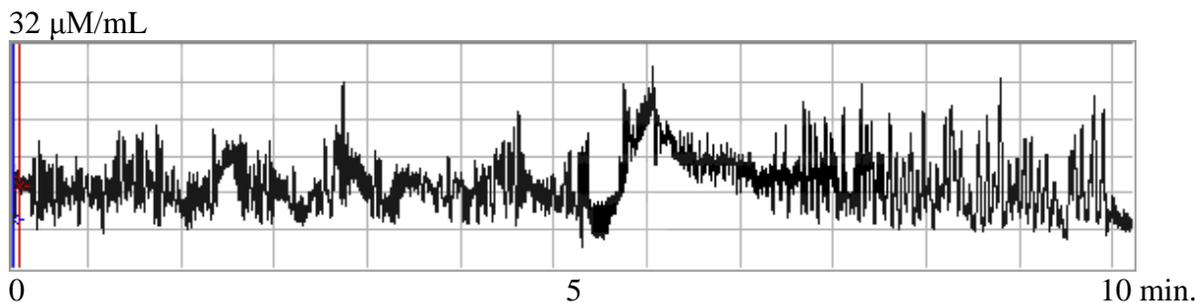
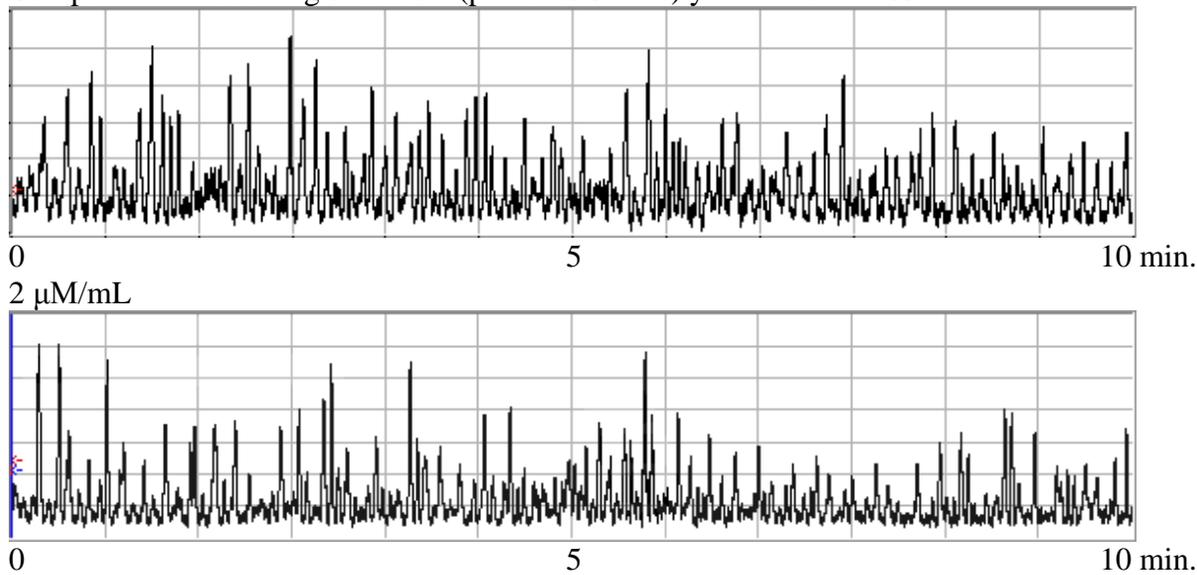


Figura 35. Registros digitales de actividad de **yeyuno** con FLU. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

A través del parámetro de la AMP, cuando se adiciona FLU a las concentraciones indicadas, se observó al inicio una disminución de la amplitud de las espigas, seguida de un posterior incremento de forma gradual medido comparado contra la basal registrada, en las porciones de tejido correspondientes al duodeno, yeyuno e íleo. Lo que indica que este efecto, es consecuencia directa y dependiente de la concentración de FLU aplicada (Tabla No.10 y Gráfico No.15).

Comportamiento del registro basal (primeros 5 min.) y vehículo en **íleo**



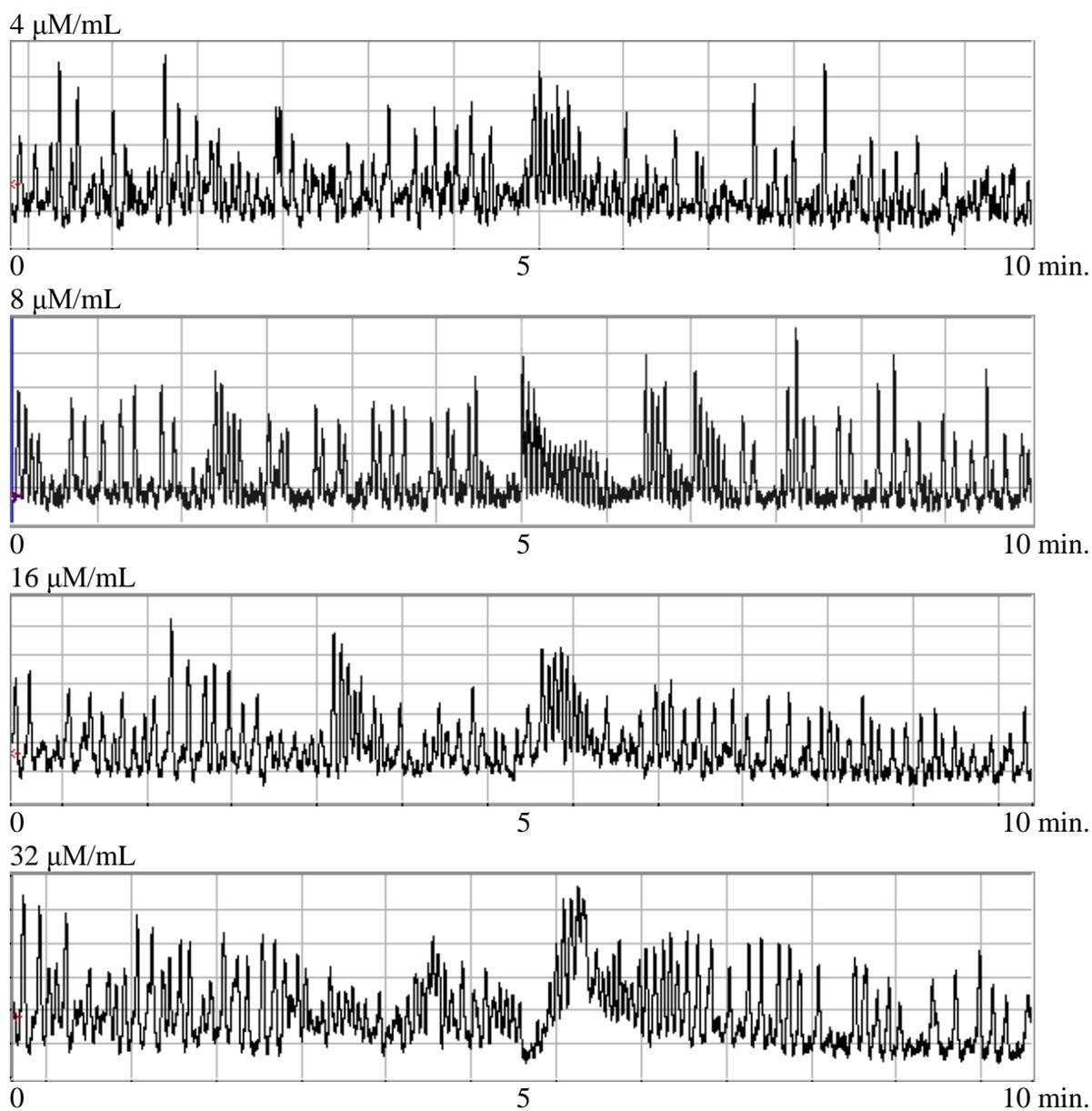


Figura 36. Registros digitales de actividad de íleo con FLU. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
FLU	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	769.858	100.00	591.690	100.00	591.438	100.00
vehículo	100.00	762.883	99.09	590.238	99.75	587.285	99.30
2	99.87	663.753	86.22	501.538	84.76	392.613	66.38
4	99.94	895.728	116.35	549.063	92.80	497.275	84.08
8	100.03	923.245	119.92	549.958	92.95	507.392	85.79
16	100.04	1043.148	135.50	640.758	108.29	586.723	99.20
32	100.02	1116.18	144.99	739.105	124.91	759.243	128.37

Tabla 8. Porcentaje promedio de ABC de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

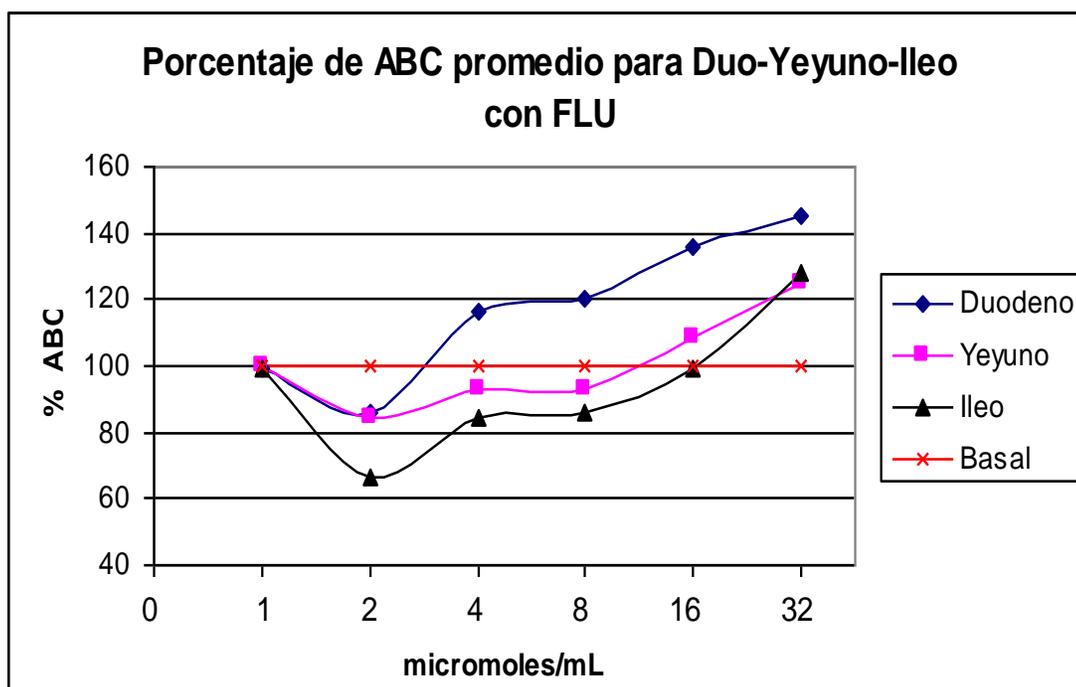


Gráfico 15. Promedio de porcentajes de ABC de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

Porcentaje promedio de FREC/seg.							
FLU	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M/mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.216	100.00	0.209	100.00	0.197	100.00
vehículo	99.93	0.213	98.76	0.208	99.20	0.195	99.15
2	100.01	0.216	99.92	0.233	111.55	0.251	127.54
4	100.00	0.239	110.73	0.224	107.17	0.234	119.07
8	100.10	0.238	109.95	0.208	99.60	0.221	112.29
16	100.12	0.232	107.25	0.195	93.23	0.221	112.29
32	100.09	0.249	115.43	0.202	96.41	0.218	110.59

Tabla 9. Porcentaje promedio de FREC de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

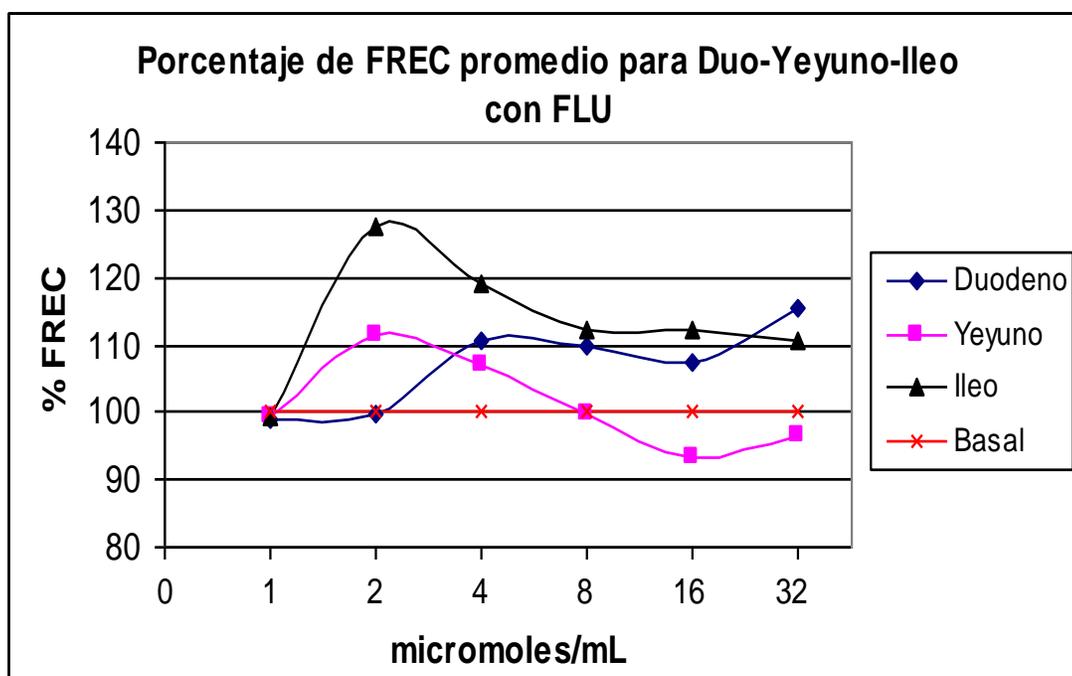


Gráfico 16. Promedio de porcentajes de FREC de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

Porcentaje promedio de Amplitud de espigas.							
FLU	% Basal	<i>Duodeno</i>		<i>Yeyuno</i>		<i>Ileo</i>	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	7.205	100.00	6.540	100.00	5.540	100.00
vehículo	100.00	7.065	98.06	6.473	98.98	5.383	97.17
2	100.01	6.415	89.04	6.738	103.03	5.558	100.32
4	100.00	7.055	97.92	6.038	92.32	5.538	99.96
8	99.58	6.893	95.67	6.840	104.59	5.858	105.74
16	99.94	7.358	102.12	6.735	102.98	5.723	103.30
32	100.00	7.630	105.90	7.265	111.09	6.525	117.78

Tabla 10. Porcentaje promedio de amplitud de espigas de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

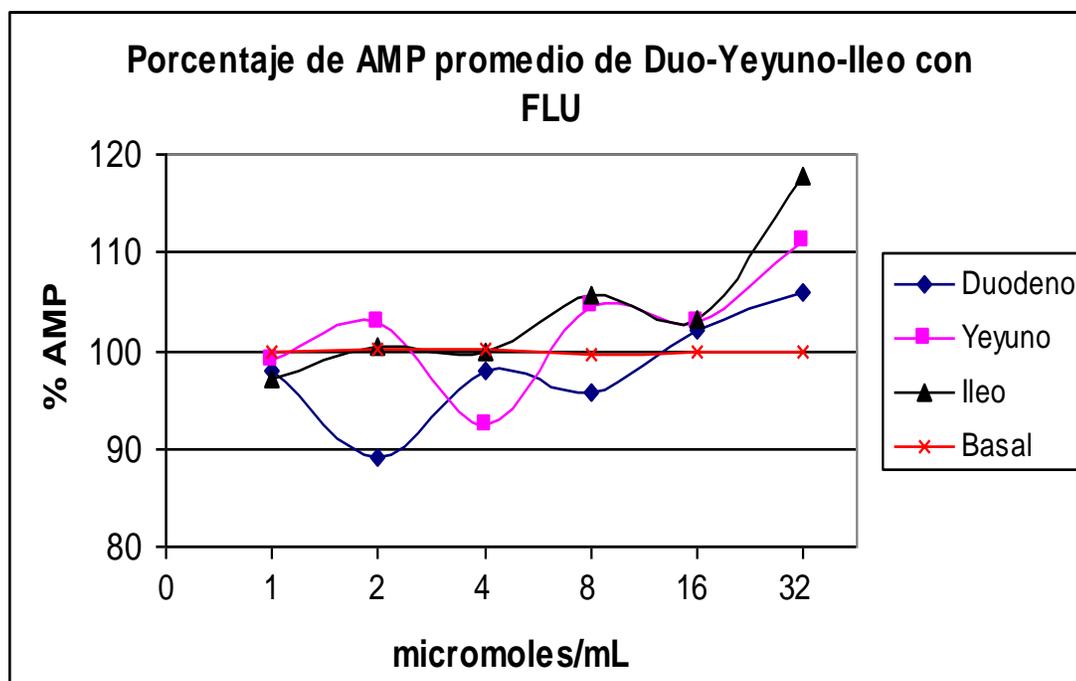


Gráfico 17. Promedio de porcentajes de amplitud de espigas de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU.

La adición de **FLU** en diferentes concentraciones provocó un decremento inicial y posteriormente un incremento de forma gradual de la actividad del músculo liso en la porción correspondiente al duodeno, yeyuno e íleo. El efecto producido por el FLU sobre la respuesta del tejido, consistió en el incremento del ABC, alrededor del 30% (Tabla No.8). A partir de los datos de ABC, se obtuvo la curva dosis-respuesta gradual, graficando el logaritmo de la concentración vs. porcentaje de contracción. Con este gráfico se calculó la concentración de FLU a la que se tiene el 50% (CE 50) de la actividad muscular espontánea del tejido. Para el duodeno se obtiene $CE = 354.81 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No.16). Para el yeyuno la $CE_{50} = 2818.38 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No. 17) y para el íleo la $CE_{50} = 1380 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No. 18). La tendencia de estas curvas sugiere la existencia de una relación lineal entre la concentración de FLU y el aumento de la contracción muscular, indicando un efecto inhibitor y excitador del FLU de forma gradual y dependiente de la concentración.

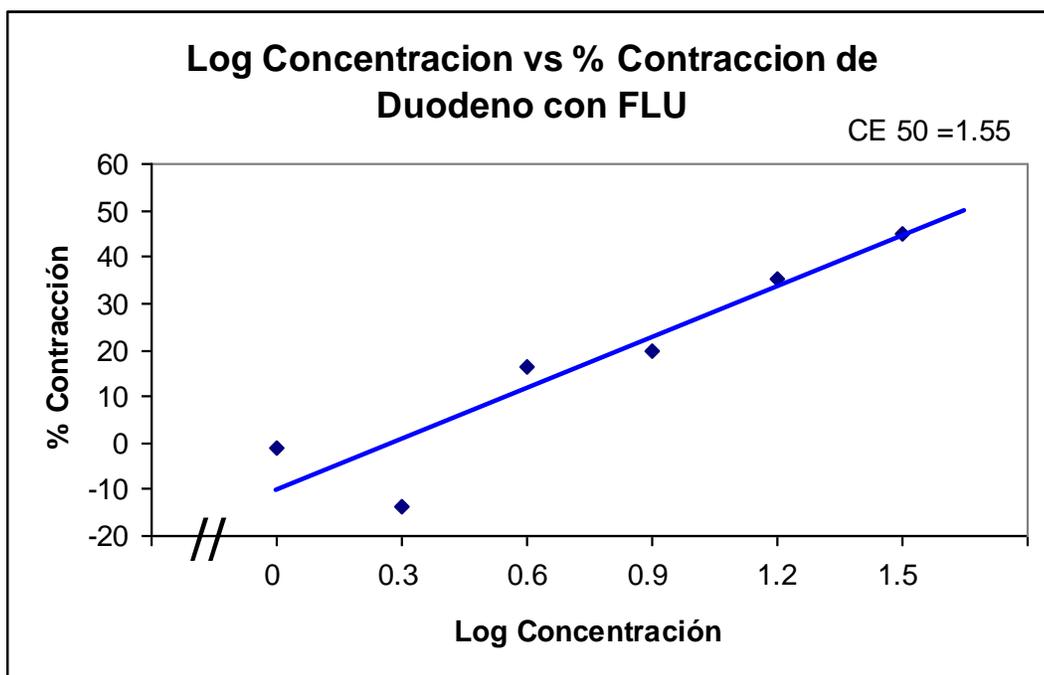


Gráfico 18. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con diferentes concentraciones de FLU. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.8626$

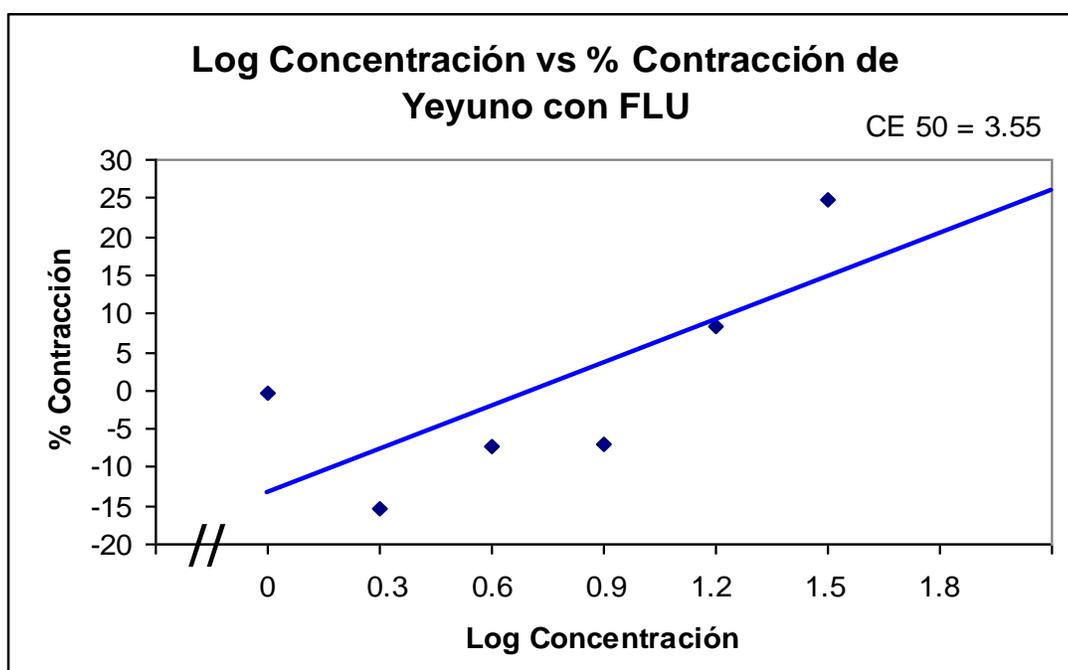


Gráfico 19. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con diferentes concentraciones de FLU. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.5403$

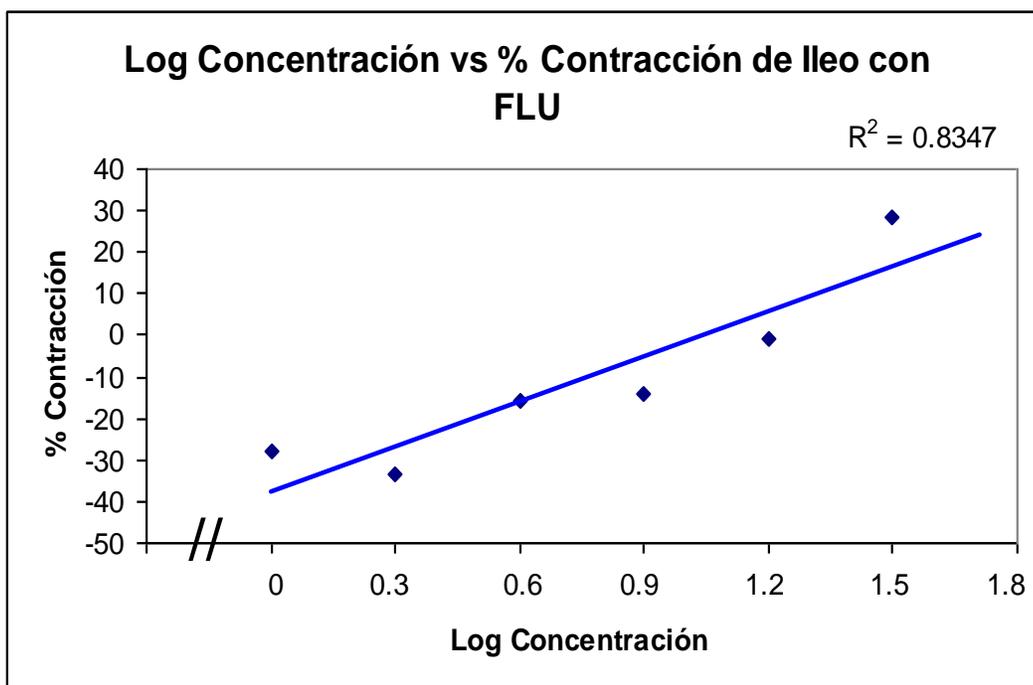


Gráfico 20. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con diferentes concentraciones de FLU. Se muestra el valor de la CI50 en Log de concentración. $R^2 = 0.8978$

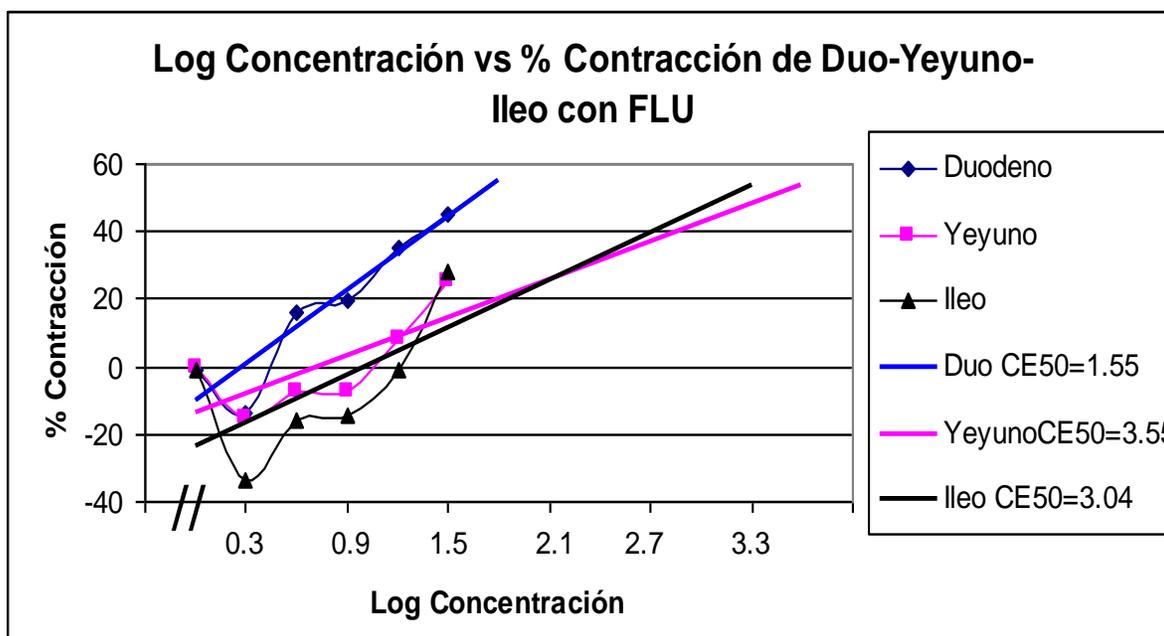


Gráfico 21. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con diferentes concentraciones de FLU. Se muestra el valor de la CE50 en Log de concentración.

6.4. EXPERIMENTO 4

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE MEL Y GABA, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al período de estabilidad de 30 min. el tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzó una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejido se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView como se detalla en el capítulo (10.4). La escala de calibración es de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.37).

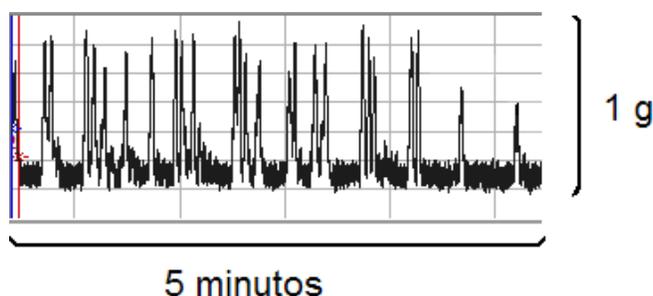
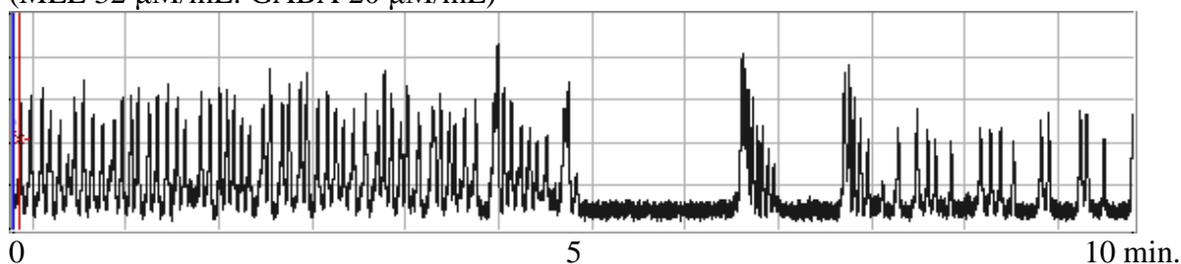
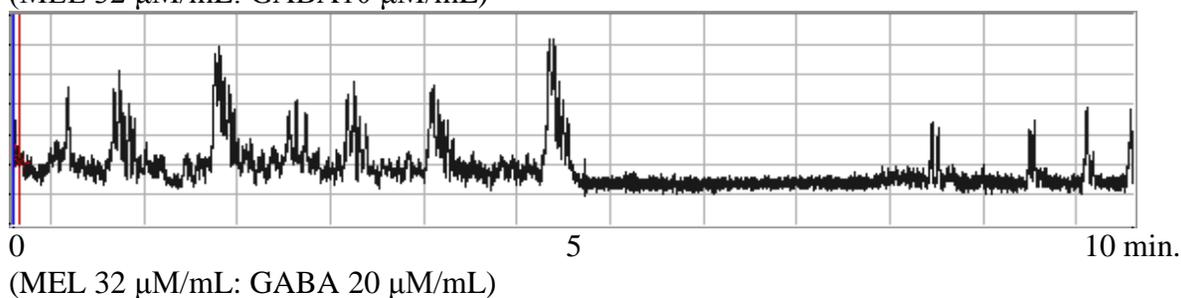
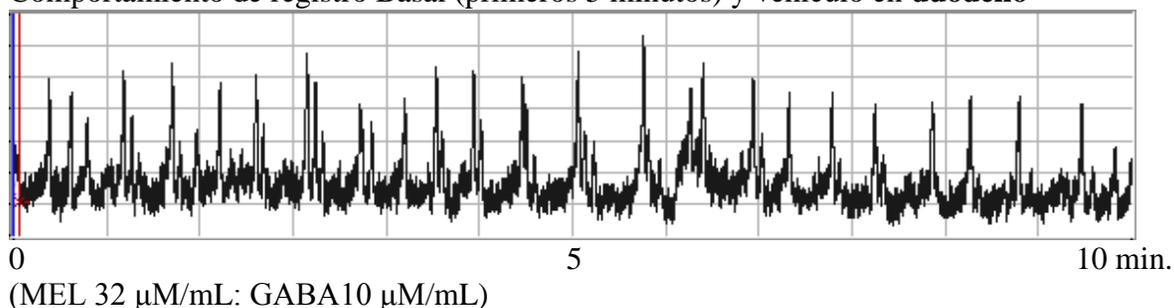


Figura 37. Muestra el registro digital registrado por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

Los parámetros utilizados para el análisis de los resultados obtenidos son: Área Bajo la Curva (ABC), la Frecuencia (FREC) y la Amplitud de espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó MEL a una concentración de 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$, simultáneamente con concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, $\mu\text{M}/\text{mL}$ de GABA, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

Al adicionar la MEL simultáneamente con el GABA, a las concentraciones indicadas se observa que a concentraciones bajas para el GABA, el efecto relajante de la MEL predomina, por lo que hay un decremento de la actividad, seguida por un leve incremento de forma gradual, medida a través del parámetro de ABC. Aún a la máxima concentración de GABA utilizada, observamos que el efecto inhibitor de la MEL no es totalmente contrarrestado y permanece el decremento de actividad muscular con respecto a la actividad basal registrada. Este comportamiento se observa en la porción correspondiente al duodeno, en el yeyuno de forma más intensa, y en el íleo (Tabla No.11 y Gráfico No.19). El registro digital para el duodeno con MEL/GABA puede ser apreciado en la (Figura No.35), el de yeyuno en la (Figura No. 36) y el de íleo en la (Figura No.37).

Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **duodeno**



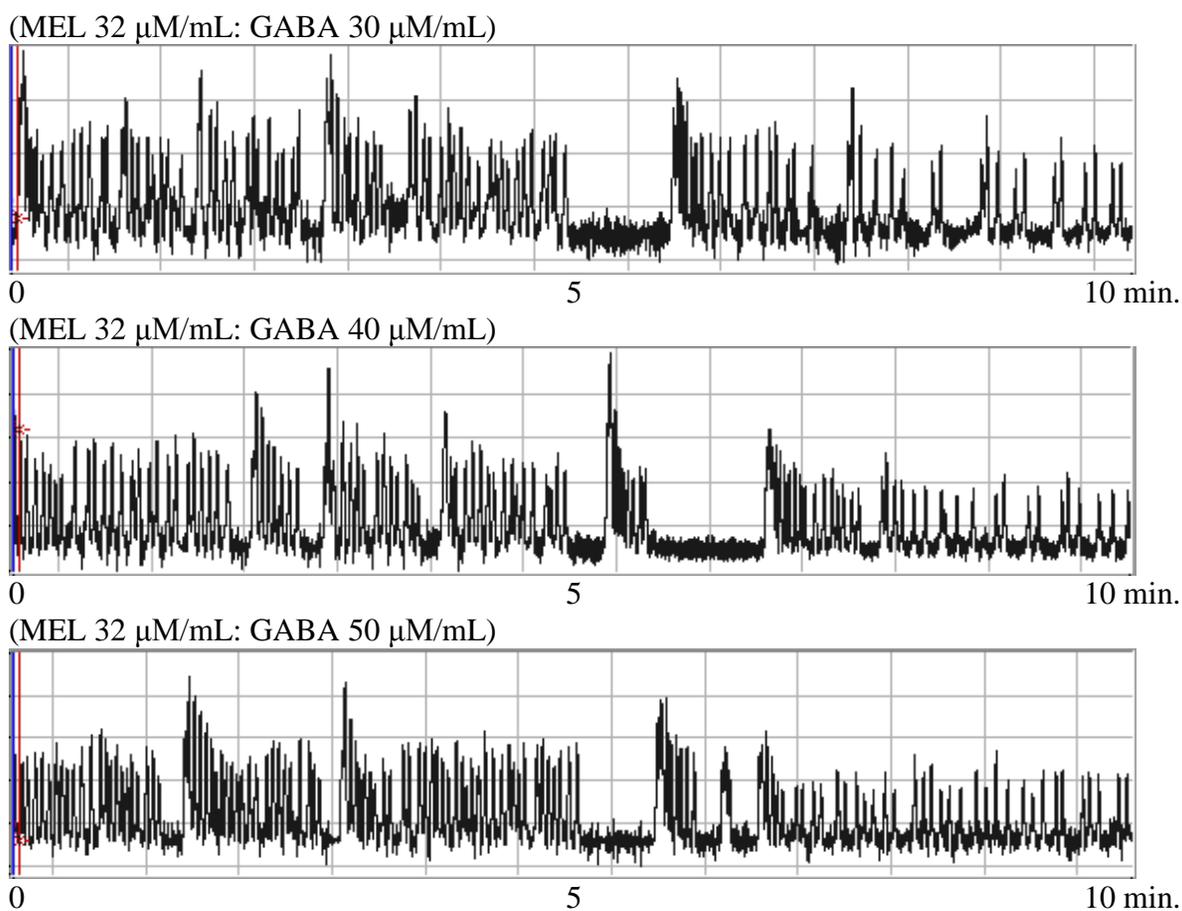
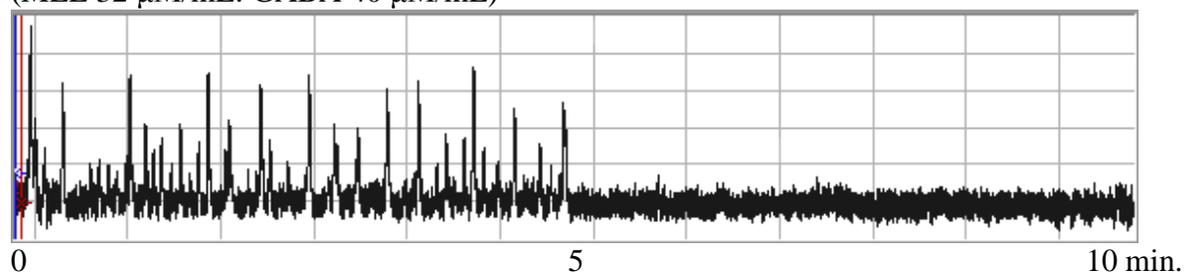
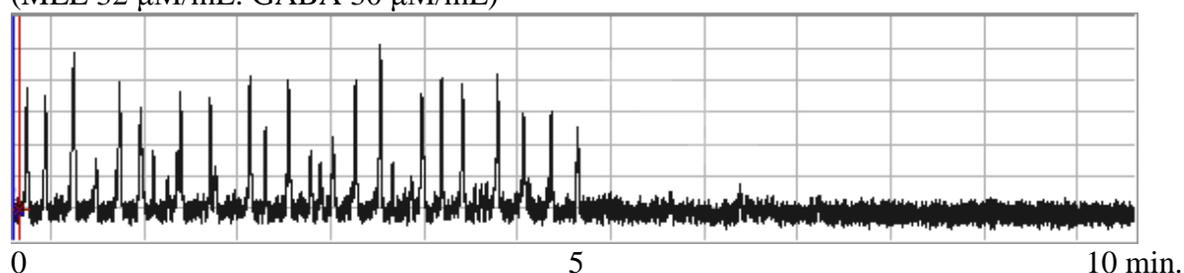
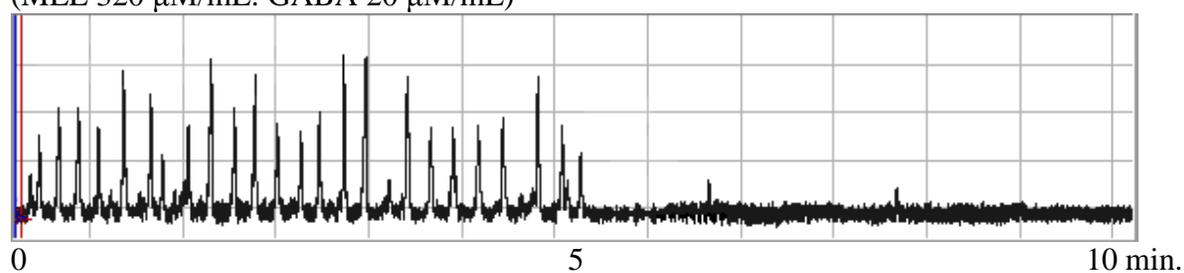
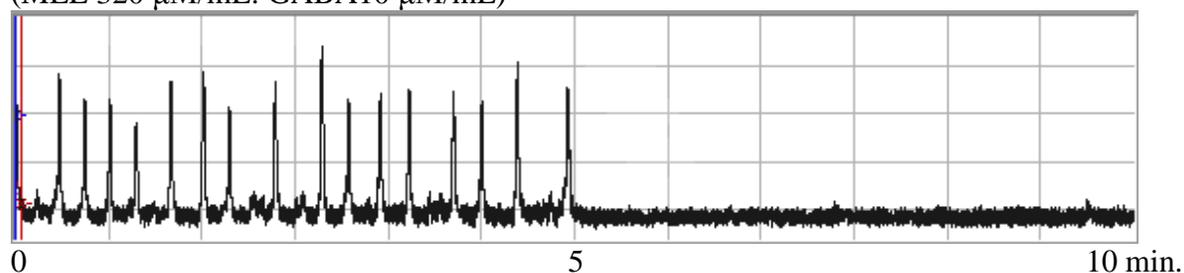
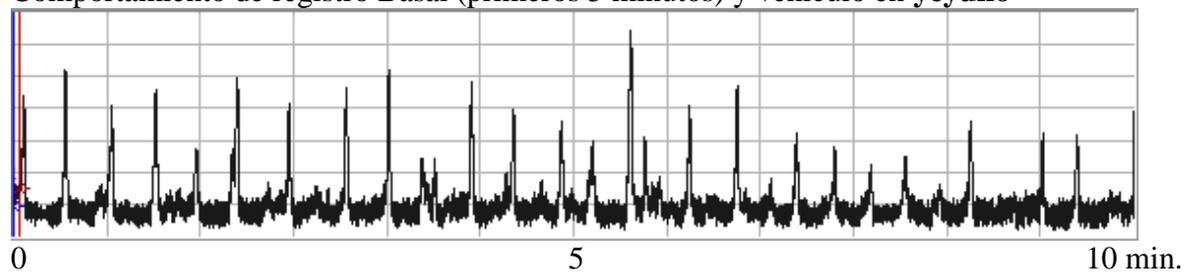


Figura 38. Registros de actividad de yeyuno con MEL y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Al adicionar simultáneamente la MEL y el GABA a las concentraciones indicadas se observa un decremento desde el inicio de la frecuencia de los eventos contráctiles espontáneos del tejido (FREC/seg.) con respecto al comportamiento basal del tejido. Este comportamiento lo observamos en la porción correspondiente al duodeno en donde a la máxima concentración de GABA utilizada parece revertir el efecto de la MEL. Sin embargo en la porción correspondiente al yeyuno y el íleo se presenta de forma mas intensa la disminución de la frecuencia de los eventos contráctiles no siendo contrarrestado el efecto inhibitor de la MEL a las concentraciones indicadas (Tabla No. 12 y Gráfico No. 20).

Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **yeyuno**

(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

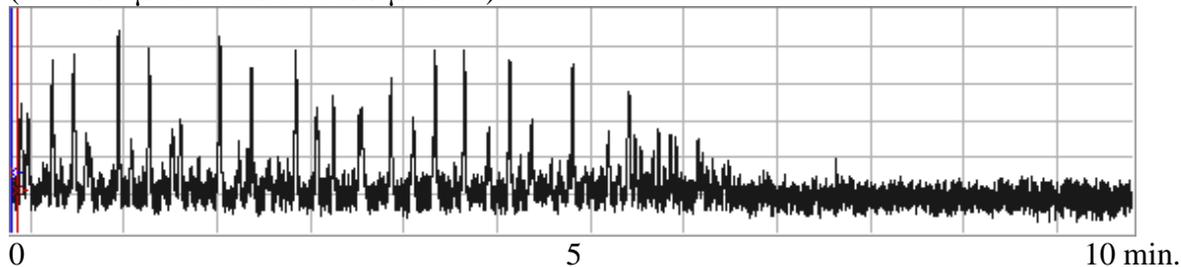
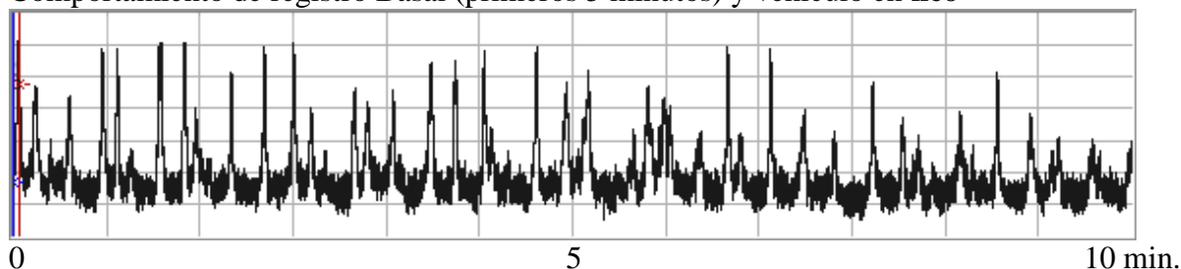


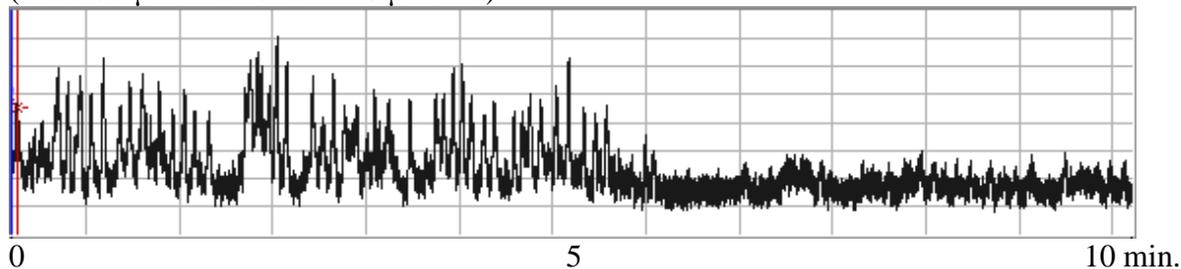
Figura 39. Registros de actividad de yeyuno con MEL y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Cuando se aplica la MEL y el GABA a las concentraciones indicadas, se presenta una disminución de la amplitud de las espigas registradas, medida a través del parámetro de (AMP) se observa que a concentraciones bajas para el GABA, el efecto relajante de la MEL predomina, por lo que hay un decremento de la actividad muscular. Aún a la máxima concentración de GABA utilizada, observamos que el efecto inhibitor de la MEL no es totalmente contrarrestado y permanece el decremento de la amplitud de las espigas respecto a la actividad basal registrada. Este comportamiento se presenta en la porción de tejido correspondiente al duodeno, yeyuno e íleo de forma muy similar (Tabla No.13 y Gráfico No.21).

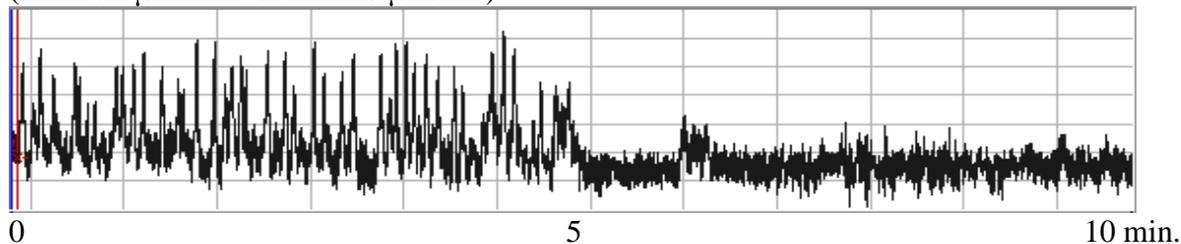
Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **íleo**



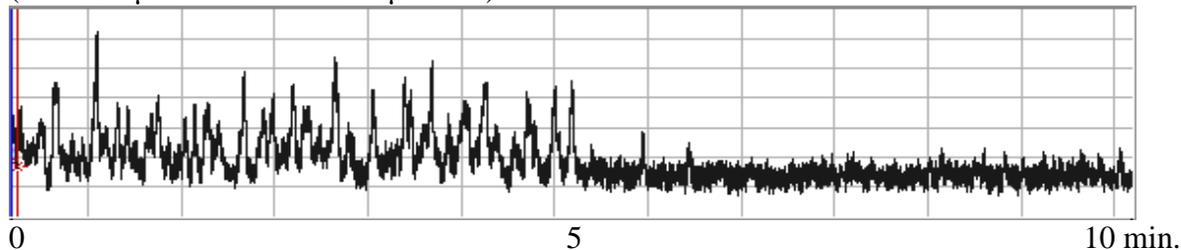
(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



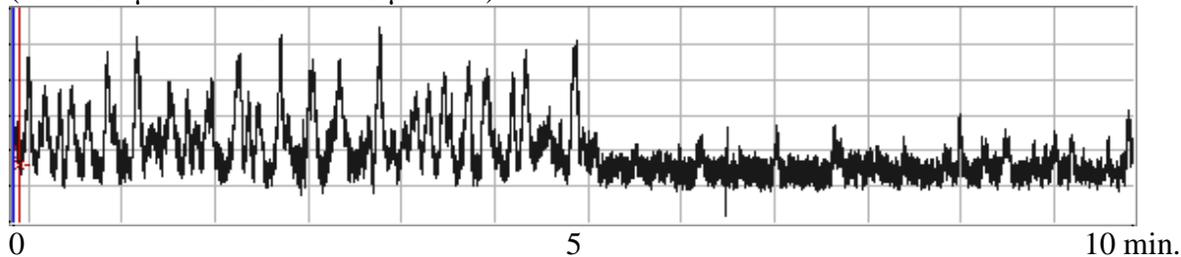
(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 20 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 40 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

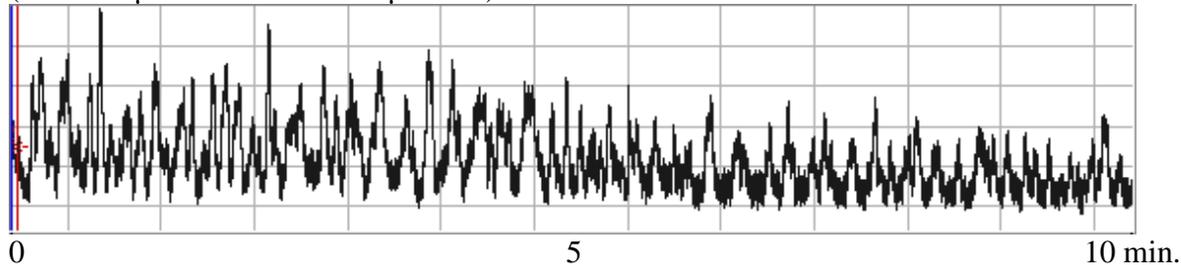


Figura 40. Registro de actividad de íleo con MEL y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
MEL/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	528.542	100.00	423.323	100.00	595.220	100.00
vehiculo	100.03	526.253	99.57	423.538	100.05	597.981	100.46
32/10	100.13	201.916	38.20	133.887	31.63	198.876	33.41
32/20	100.08	315.432	59.68	187.947	44.40	316.296	53.14
32/30	100.02	345.012	65.28	183.112	43.26	322.737	54.22
32/40	99.90	355.165	67.20	228.104	53.88	332.737	55.90
32/50	99.97	440.665	83.37	244.204	57.69	389.674	65.47

Tabla 11. Porcentajes promedio de ABC para duodeno, yeyuno e íleo con MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

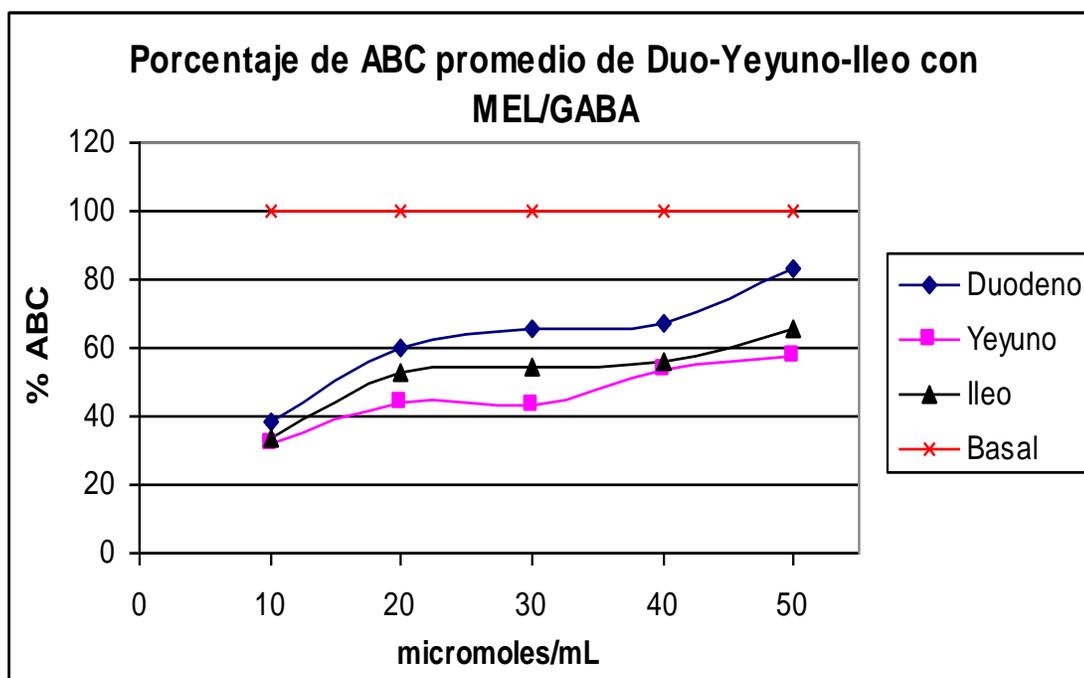


Gráfico 22. Porcentajes promedio de ABC con 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de MEL y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de FREC/seg.							
MEL/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.1146	100.00	0.093	100.00	0.143	100.00
vehículo	100.04	0.1146	100.00	0.093	100.00	0.143	99.84
32/10	99.98	0.0563	49.09	0.025	27.23	0.039	27.33
32/20	99.99	0.0804	70.18	0.051	54.46	0.014	9.50
32/30	100.00	0.0925	80.73	0.058	62.50	0.018	12.30
32/40	100.04	0.1104	96.36	0.059	62.95	0.015	10.09
32/50	100.04	0.1175	102.55	0.070	75.00	0.016	11.23

Tabla 12. Porcentajes promedio de FREC para duodeno, yeyuno e íleo con MEL $32\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

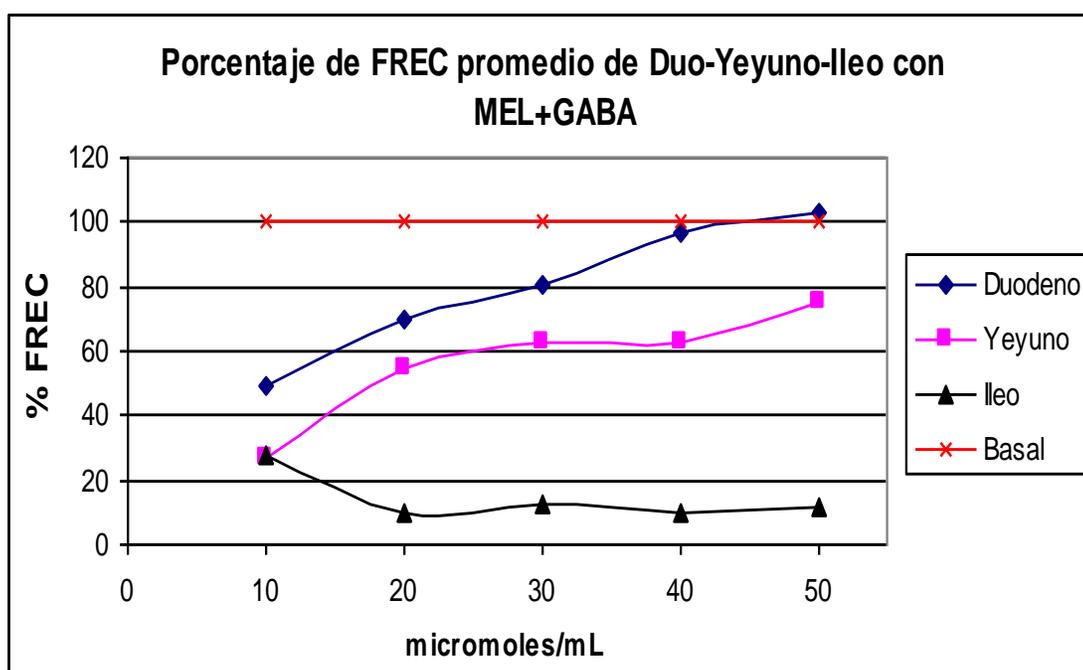


Gráfico 23. Porcentajes promedio de FREC a $32\mu\text{M}/\text{mL}$ de MEL y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de AMP.							
MEL/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	5.643	100.00	4.973	100.00	6.327	100.00
vehículo	100.18	5.690	100.83	4.960	99.74	6.348	100.33
32/10	100.10	4.188	74.22	3.672	73.84	4.087	64.60
32/20	100.12	4.541	80.47	3.836	77.14	5.288	83.58
32/30	99.95	4.538	80.42	4.182	84.09	4.337	68.55
32/40	100.04	4.255	75.40	4.407	88.62	4.830	76.34
32/50	100.00	4.757	84.30	4.752	95.56	4.962	78.43

Tabla 13. Porcentajes promedio de AMP para duodeno, yeyuno e íleo con MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

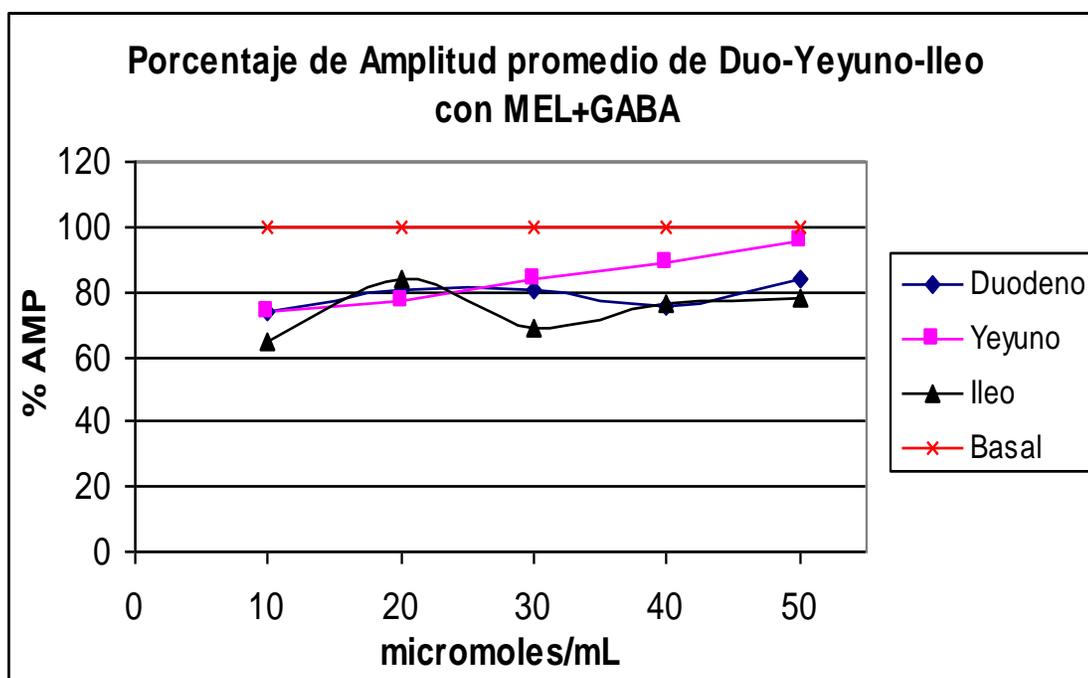


Gráfico 24. Porcentajes promedio de AMP a 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de MEL y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

La adición de MEL y de GABA en diferentes concentraciones de forma simultánea provocó una disminución de la respuesta, inducida por parte de la MEL como se había observado en su comportamiento durante el experimento 6.1. Al adicionar simultáneamente el GABA mostró una relación directa con cada una de las diferentes concentraciones, aunque no revertió totalmente el efecto de la MEL a las concentraciones utilizadas. En el caso de la ABC, el resultado fue la inhibición de la respuesta de los tres tejidos provocada por la MEL, del mismo modo la FREC/seg. y la amplitud mostraron una disminución de sus valores con respecto a al registro basal y cuya inhibición, fue revertida por el GABA a las concentraciones utilizadas pero no totalmente. Al calcular la concentración efectiva 50% de GABA a la cual revierte el efecto de MEL, para el duodeno el valor obtenido fue $CE_{50}=154.88 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.22), para el yeyuno de $CE_{50}=331.13 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.23) y para el íleo de $CE_{50}=229.09 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.24).

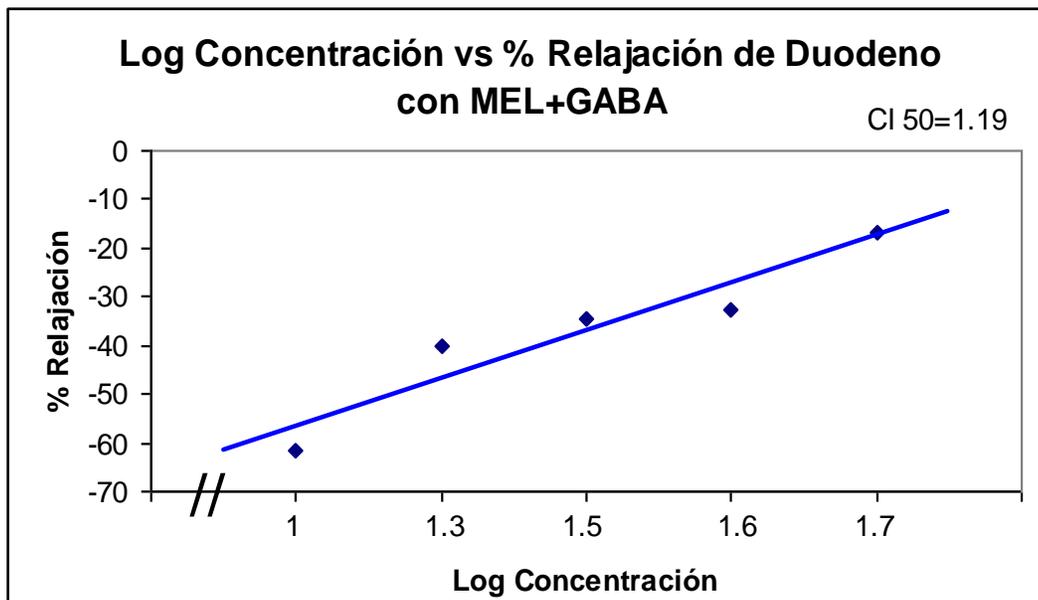


Gráfico 25. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con MEL 32µM/mL y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2 = 0.9324$

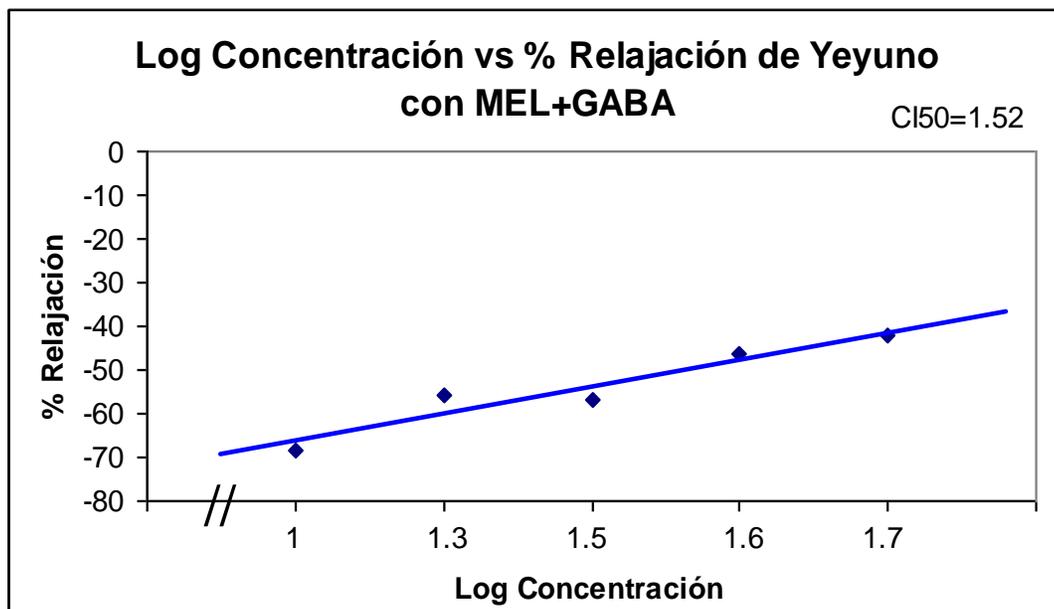


Gráfico 26. Curva dosis-respuesta gradual de yeyuno con MEL 32µM/mL y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2 = 0.9166$

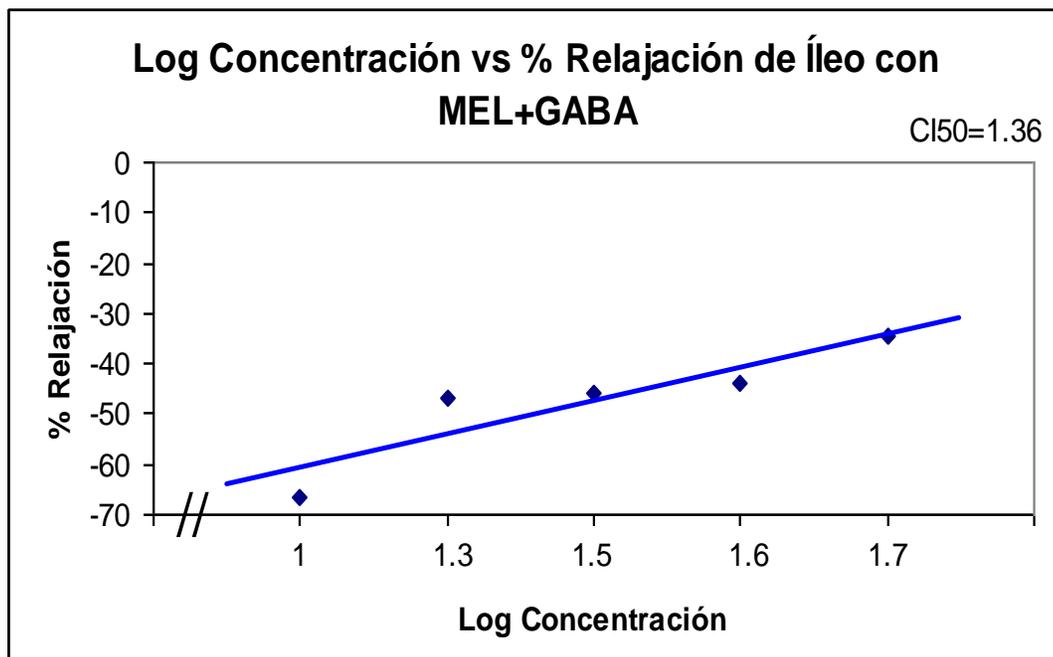


Gráfico 27. Curva dosis-respuesta gradual de íleo con MEL 32 μ M/mL y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2=0.8172$

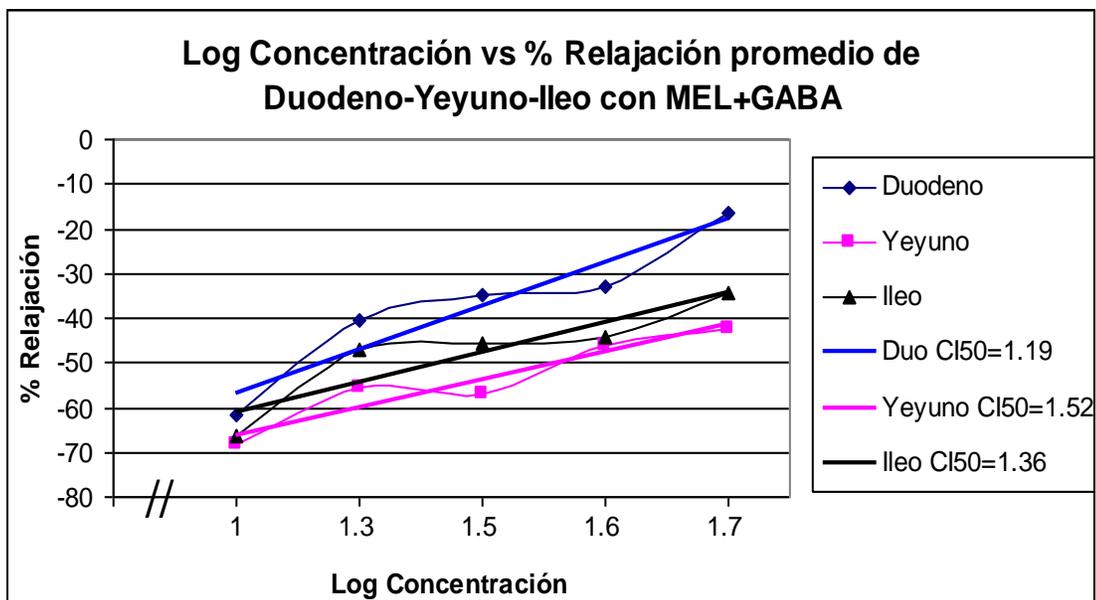


Gráfico 28. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con MEL 32 μ M y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración.

6.5. EXPERIMENTO 5

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE FLU Y GABA, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al período de estabilidad de 30 min. del tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzó una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejido se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView como se detalla en el capítulo (10.4). La escala de calibración fue de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.41).

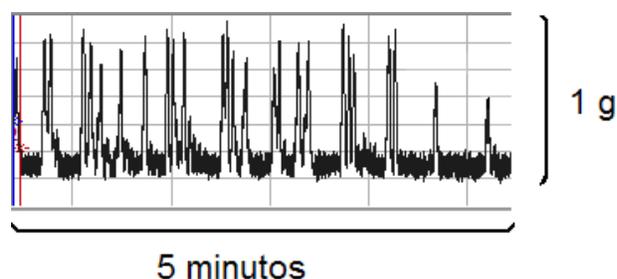
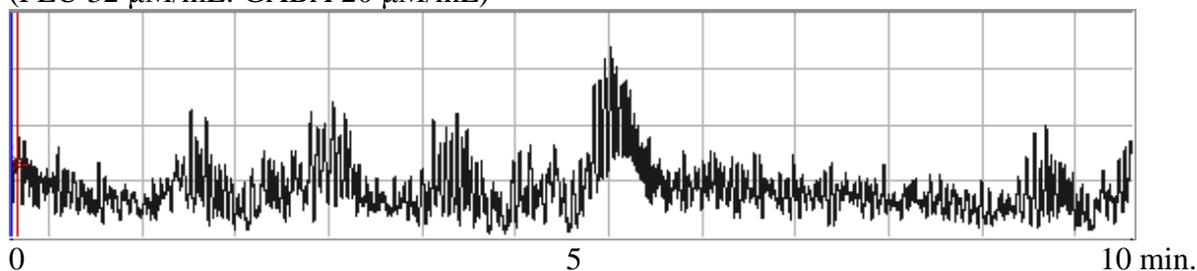
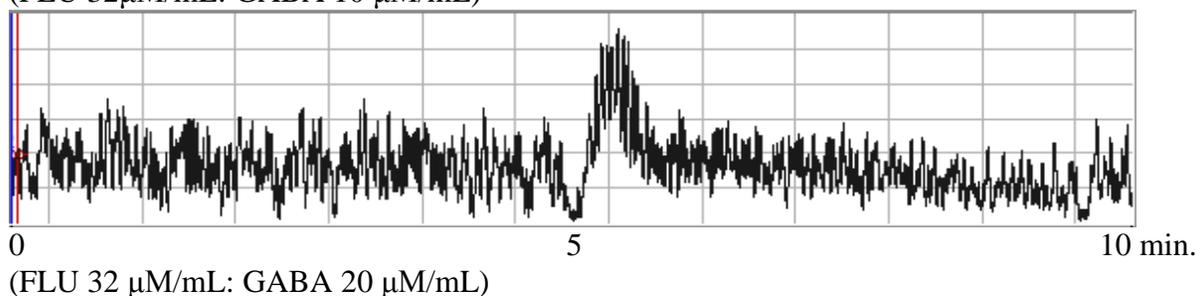
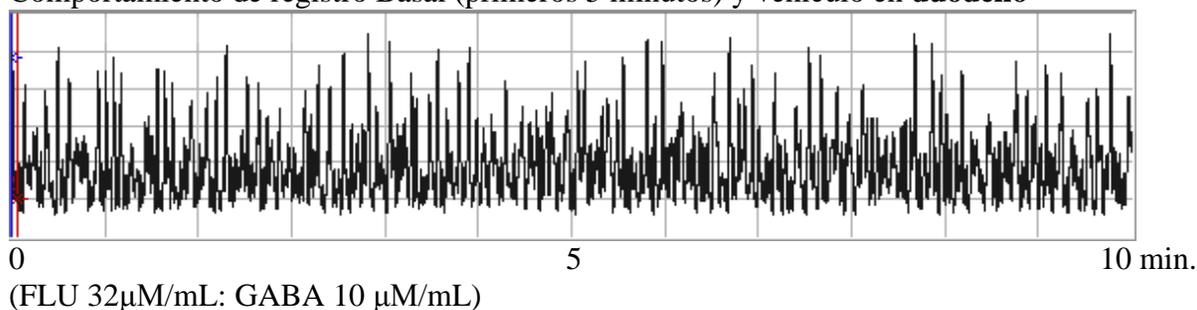


Figura 41. Muestra el registro digital obtenido por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

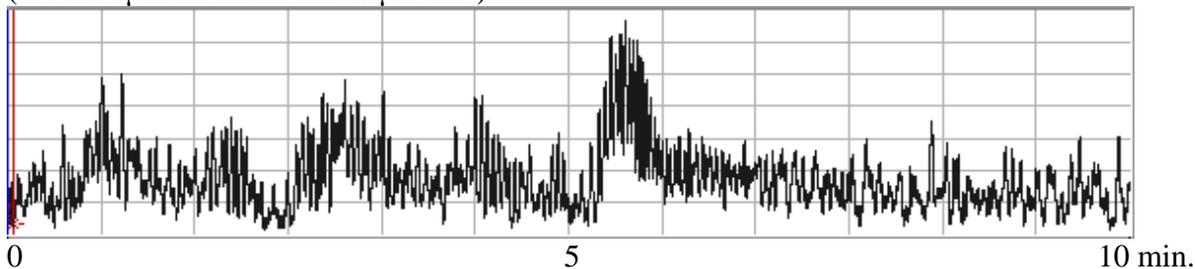
Los parámetros utilizados para el análisis de los resultados obtenidos son: Área Bajo la Curva (ABC), la Frecuencia (FREC) y la Amplitud de espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó FLU a una concentración de 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$, simultáneamente con concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, $\mu\text{M}/\text{mL}$ de GABA, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

Al adicionar el FLU simultáneamente con el GABA, a las concentraciones indicadas se observa que a concentraciones bajas para el GABA, el efecto predominante es la disminución de la actividad muscular inducida probablemente por el FLU, por lo que hay un decremento de la actividad, seguida por un posterior incremento de forma gradual, con respecto a la actividad basal registrada, la medición se realizó a través del parámetro de ABC, este comportamiento se observa en la porción de tejido correspondiente al yeyuno y en el íleo. Sin embargo el duodeno se observa un comportamiento opuesto, con un aumento en la actividad del tejido a bajas concentraciones de GABA y una disminución posterior (Tabla No.14 y Gráfico No.25). El registro digital para la actividad en duodeno con FLU/GABA puede ser apreciado en la (Figura No.38), el de yeyuno en la (Figura No. 39) y el de íleo en la (Figura No.40).

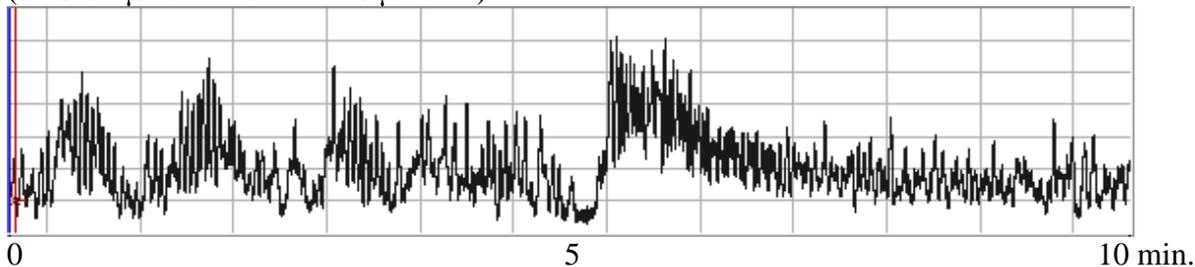
Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **duodeno**



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 40 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

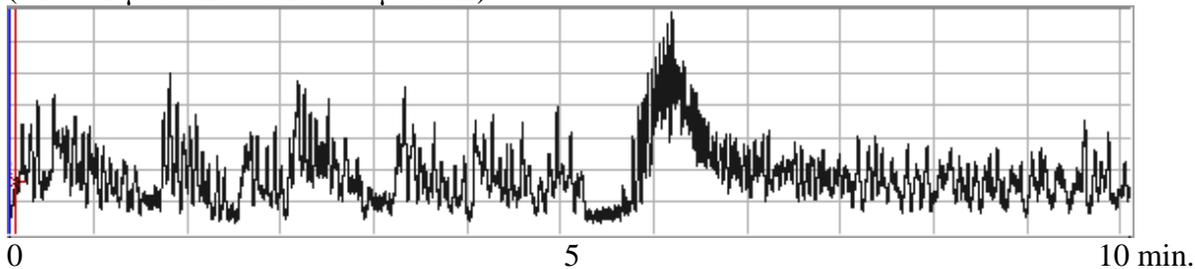
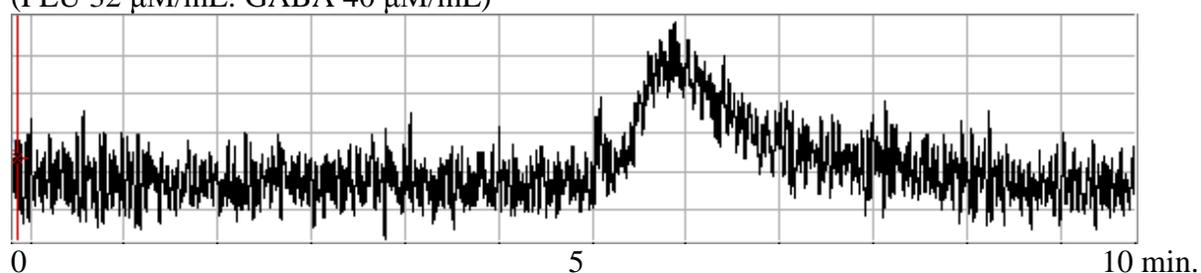
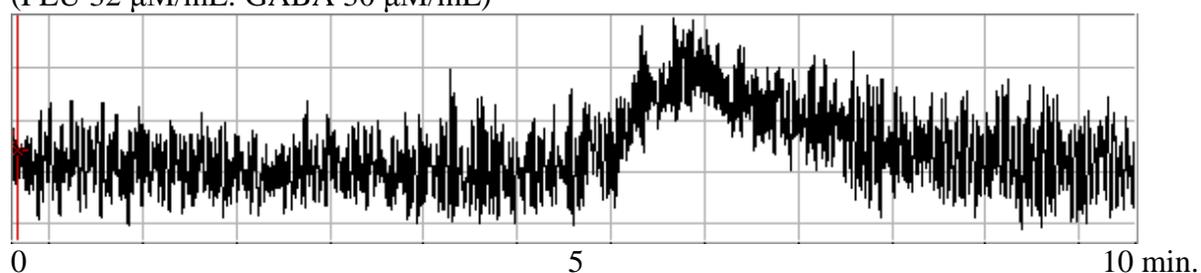
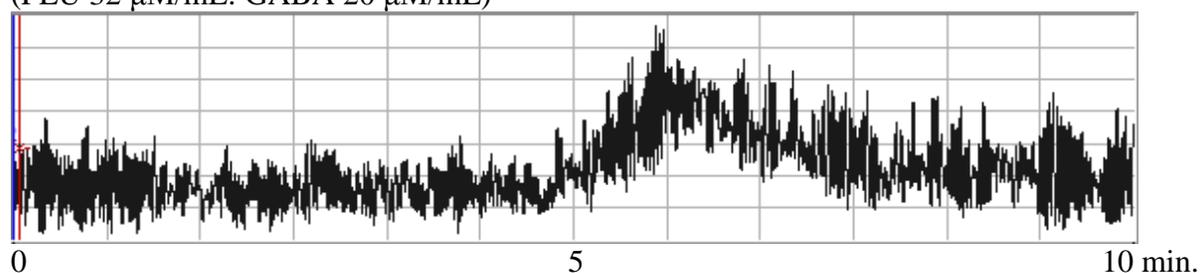
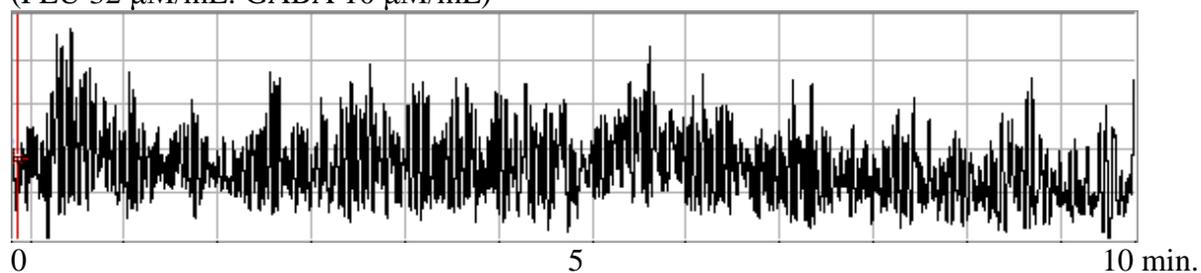
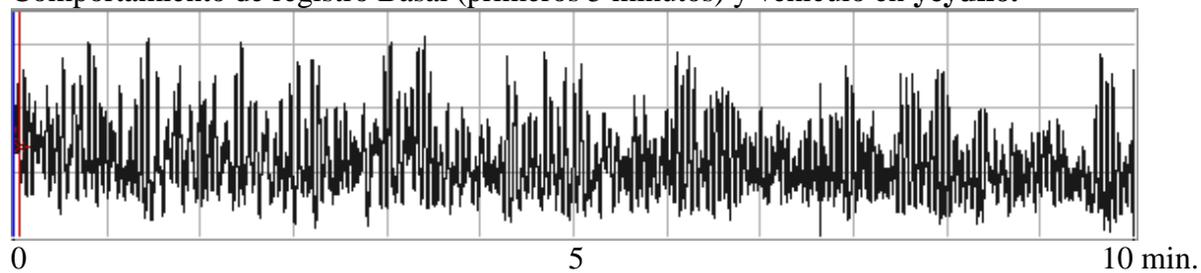


Figura 42. Registros de actividad de duodeno con FLU y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Al adicionar simultáneamente el FLU y el GABA a las concentraciones indicadas se observa un decremento desde el inicio del registro de la frecuencia de los eventos contráctiles espontáneos del tejido (FREC) con respecto al comportamiento basal del tejido. Este comportamiento lo observamos en las porciones correspondientes al duodeno, el yeyuno y el íleo, en donde aún a la máxima concentración de GABA utilizada parece no modificar el comportamiento presentado desde el inicio del registro. Sin embargo en la porción correspondiente al duodeno presenta con una mayor intensidad la disminución de la frecuencia de los eventos contráctiles (Tabla No. 15 y Gráfico No. 26).

Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **yeyuno**.



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

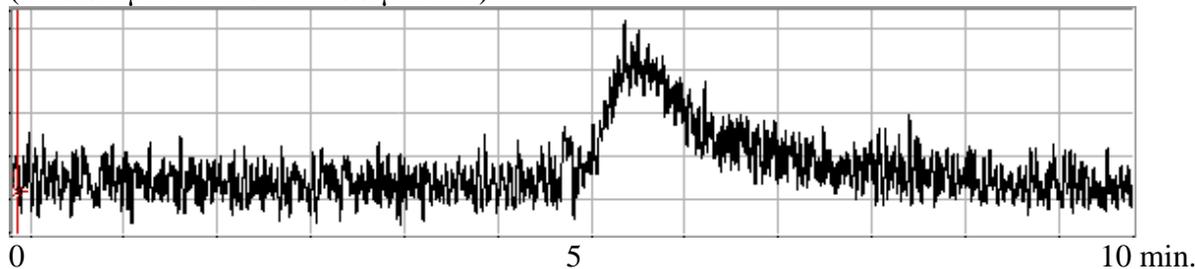
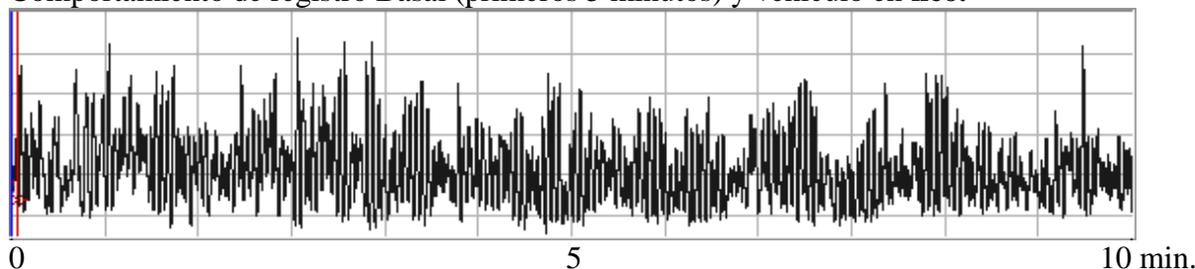


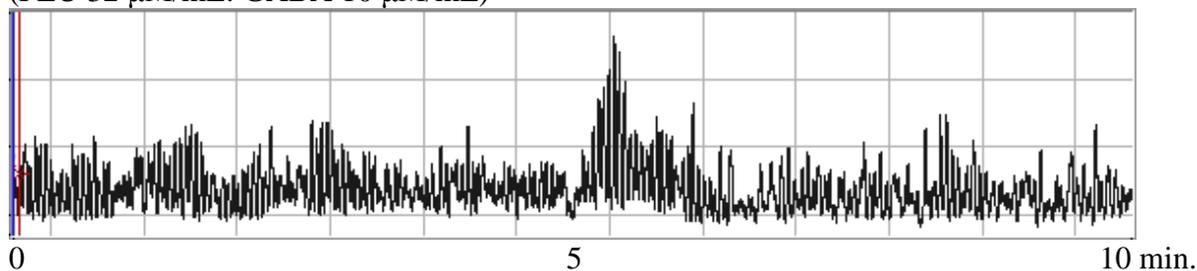
Figura 43. Registros de actividad de yeyuno con FLU y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Cuando se aplica la MEL y el GABA a las concentraciones indicadas, se presenta un incremento de la amplitud de las espigas registradas, medidas a través del parámetro de la AMP con respecto al registro basal, se observa que a concentraciones bajas para el GABA, el efecto predominante es el incremento gradual de este parámetro, por lo que hay un incremento de la actividad muscular. Aún a la máxima concentración de GABA utilizada, observamos que el efecto. Este comportamiento se presenta en la porción de tejido correspondiente al yeyuno e íleo de forma muy similar, sin embargo en el duodeno observamos un comportamiento opuesto, ya que la AMP se disminuye al aumentar la concentración de GABA de la misma forma que sucede con el ABC (Tabla No.16 y Gráfico No.27).

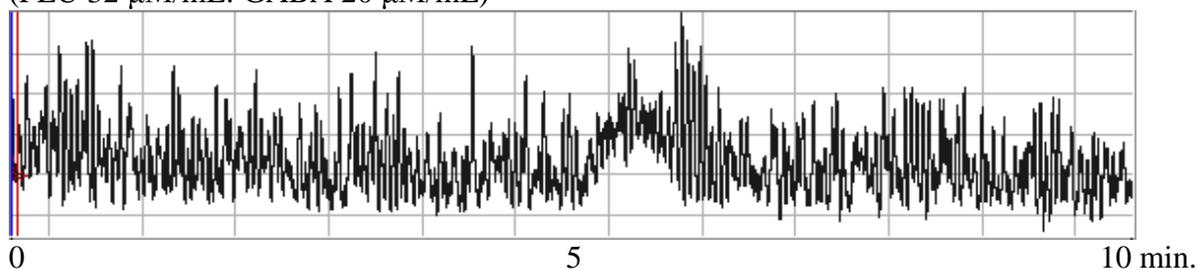
Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en íleo.



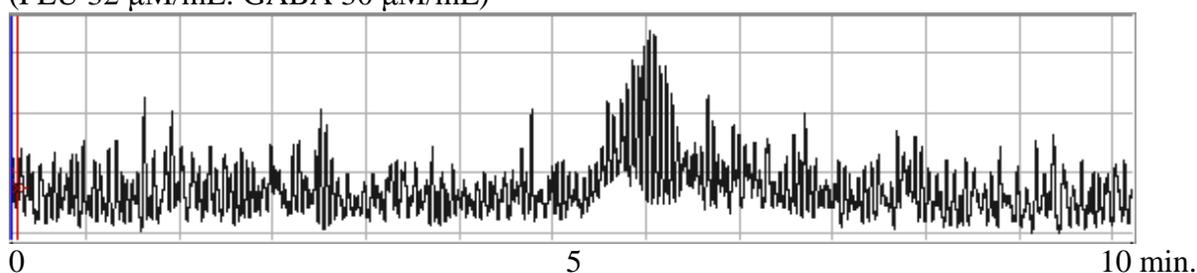
(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



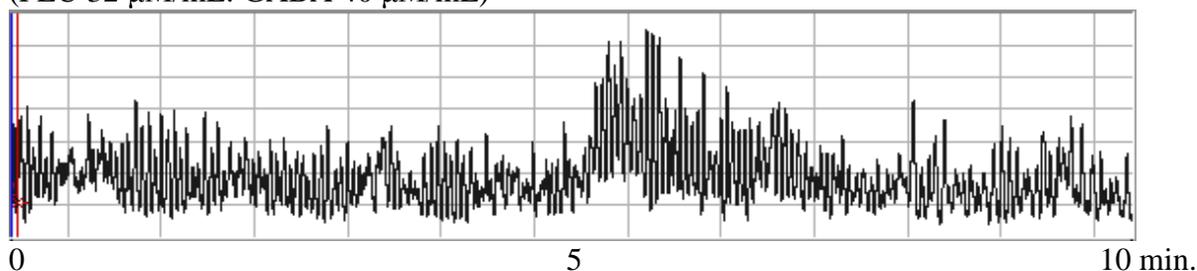
(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 20 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 40 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: GABA 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

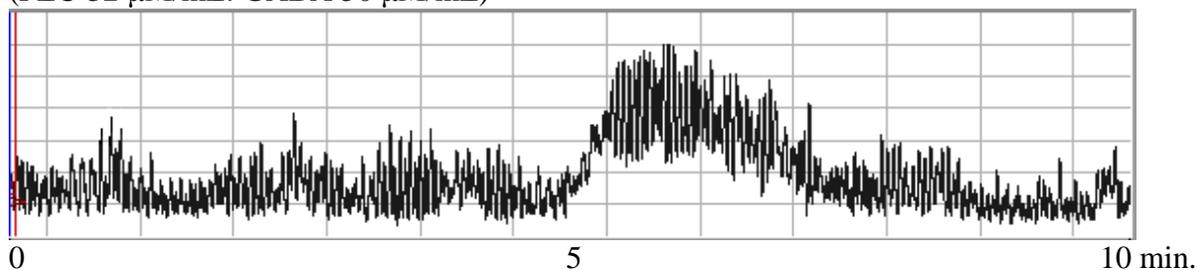


Figura 44. Registro de actividad de íleo con FLU y GABA. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
FLU/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	872.410	100.00	648.283	100.00	577.968	100.00
vehículo	100.11	874.480	100.24	649.138	100.13	576.818	99.80
32/10	100.10	1288.178	147.66	556.568	85.85	481.723	83.35
32/20	100.10	1058.928	121.38	629.980	97.18	611.18	105.75
32/30	100.07	926.625	106.21	782.998	120.78	758.283	131.20
32/40	100.12	892.163	102.26	910.393	140.43	706.188	122.18
32/50	100.08	948.658	108.74	873.268	134.70	821.310	142.10

Tabla 14. Porcentajes promedio de ABC para duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

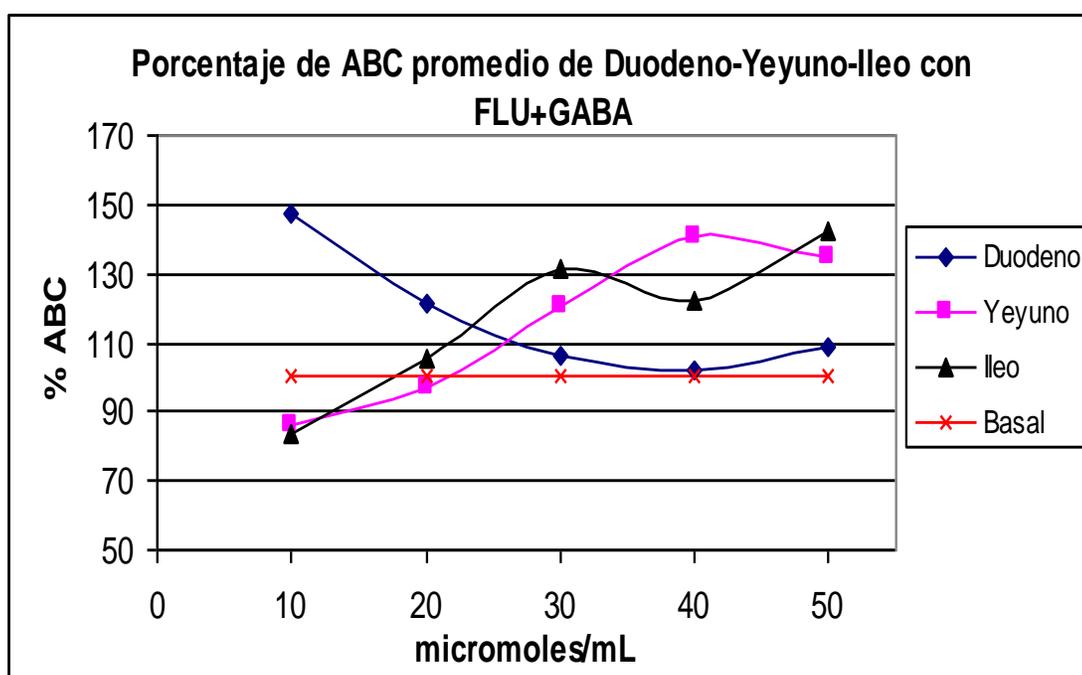


Gráfico 29. Porcentajes promedio de ABC a 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de FLU y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de FREC/seg.							
FLU/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.329	100.00	0.411	100.00	0.326	100.00
vehículo	99.93	0.329	99.97	0.415	101.01	0.325	99.74
32/10	99.99	0.240	72.91	0.384	93.51	0.274	84.14
32/20	100.02	0.245	74.43	0.383	93.31	0.292	89.51
32/30	100.11	0.248	75.44	0.399	97.16	0.273	83.89
32/40	100.09	0.258	78.48	0.397	96.55	0.277	84.91
32/50	100.13	0.273	82.78	0.369	89.86	0.269	82.61

Tabla 15. Porcentajes promedio de FREC/seg. para duodeno, yeyuno e íleo con FLU $32\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

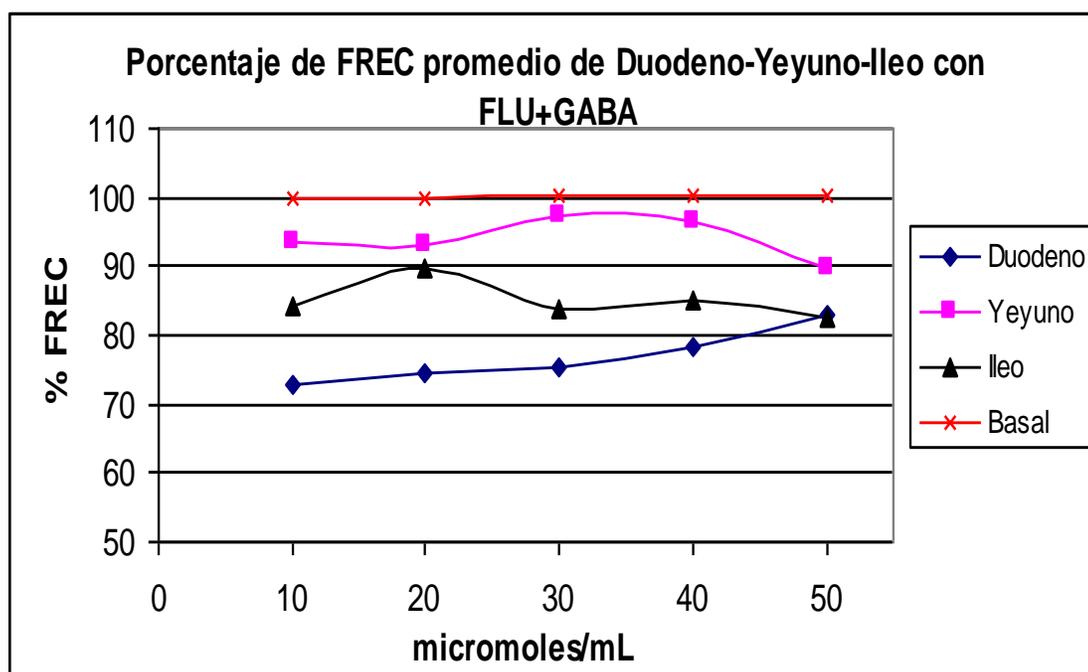


Gráfico 30. Porcentajes promedio de FREC a $32\mu\text{M}/\text{mL}$ de FLU y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de AMP							
FLU/GABA	% Basal	Duodeno		Yeyuno		Íleo	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	8.205	100.00	6.378	100.00	6.103	100.00
vehículo	100.12	8.233	100.34	6.343	99.45	6.069	99.44
32/10	100.14	8.318	101.38	6.408	100.47	5.570	91.27
32/20	100.04	7.158	87.24	7.043	110.43	6.233	102.13
32/30	100.12	6.935	84.52	7.018	110.03	6.733	110.32
32/40	100.00	6.885	83.91	7.838	122.89	6.830	111.91
32/50	100.12	6.658	81.15	6.703	105.10	7.085	116.09

Tabla 16. Porcentajes promedio de AMP para duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de GABA.

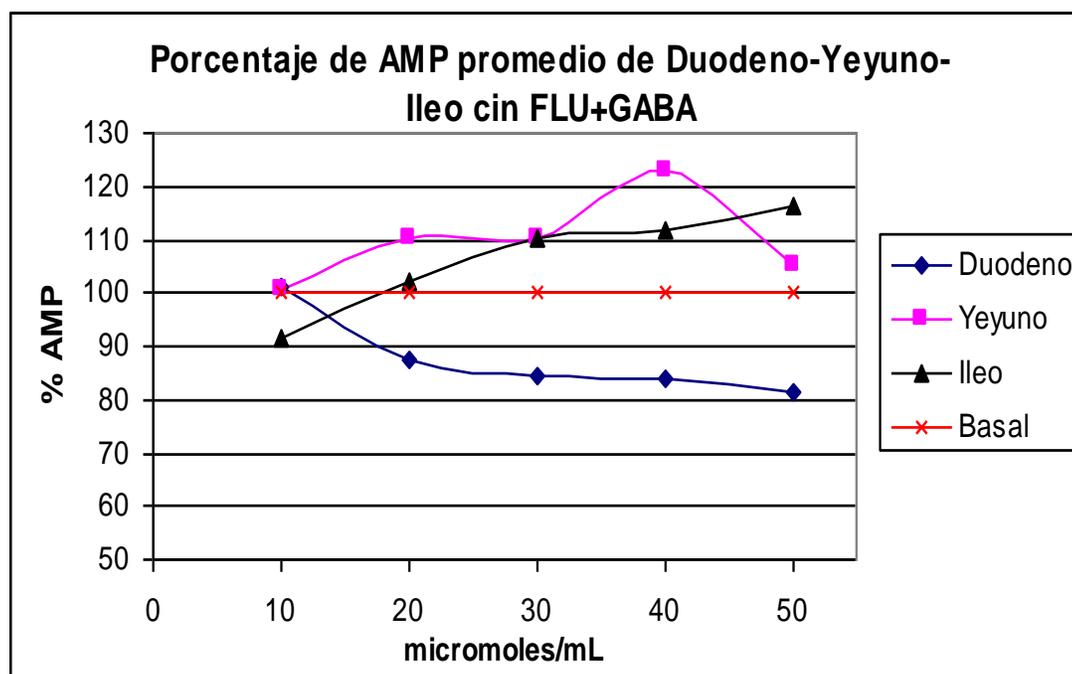


Gráfico 31. Porcentajes promedio de AMP a 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de FLU y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

La adición de FLU y de GABA en diferentes concentraciones de forma simultánea provocó un incremento de la respuesta, que probablemente se justifica por el comportamiento observado con el GABA y el FLU en los experimentos realizados con estos por separado. Sin embargo el duodeno, presentó un comportamiento opuesto. Al adicionar simultáneamente el GABA mostró una relación directa con cada una de las diferentes concentraciones. En el caso de la ABC, el resultado fue el aumento de la respuesta en el yeyuno y el íleo y una disminución en el duodeno, la FREC mostró un decremento de sus valores con respecto al registro basal y el parámetro de la AMP tuvo un comportamiento similar al presentado por el ABC. Al calcular la concentración efectiva 50 de GABA a la cual revierte el efecto de FLU, para el duodeno el valor obtenido fue $CI_{50}=3090.29 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No.28), para el yeyuno de $CE_{50}=691.83 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No.29) y para el íleo de $CE_{50}=676.08 \mu\text{M}/\text{mL}$ (Gráfico No.30).

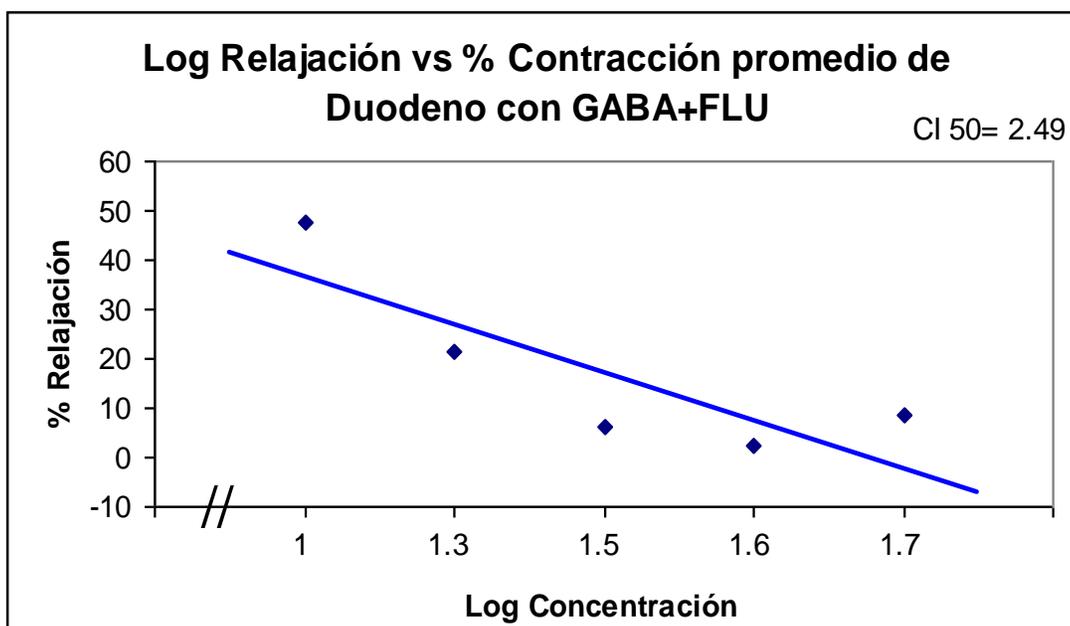


Gráfico 32. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con FLU 32 μ M y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2= 0.8704$

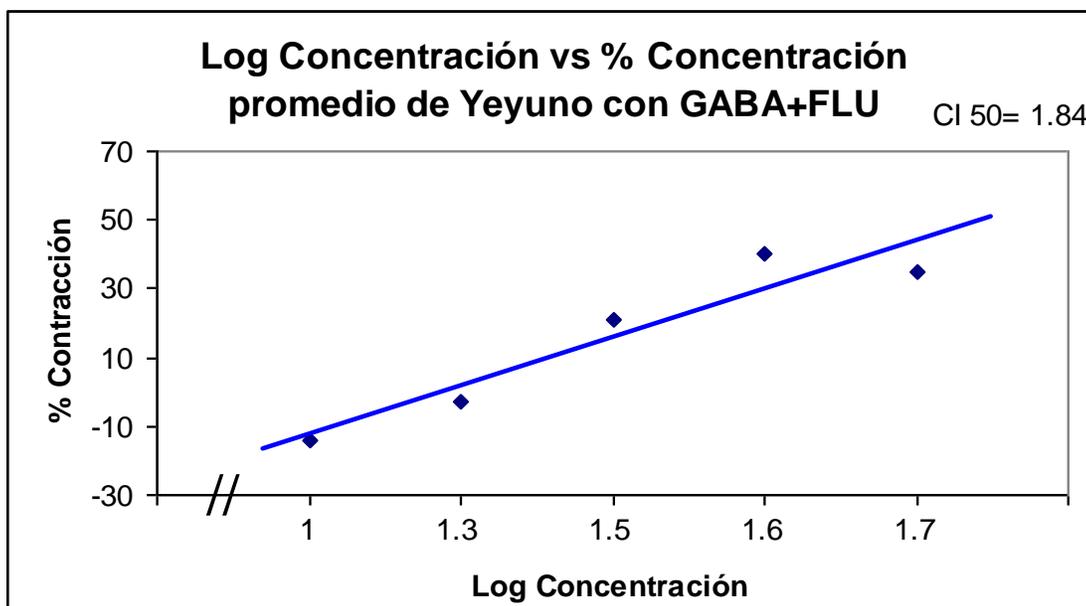


Gráfico 33. Curva dosis-respuesta gradual de yeyuno con FLU 32 μ M y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2= 0.8900$

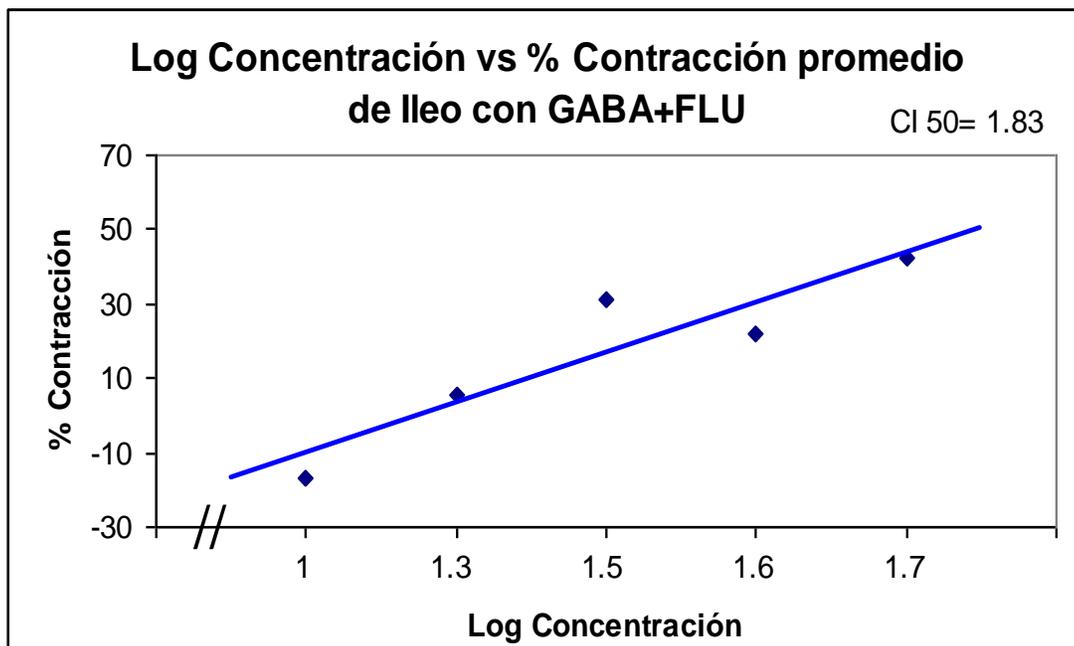


Gráfico 34. Curva dosis-respuesta gradual de íleo con FLU 32 μ M y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2=0.8475$

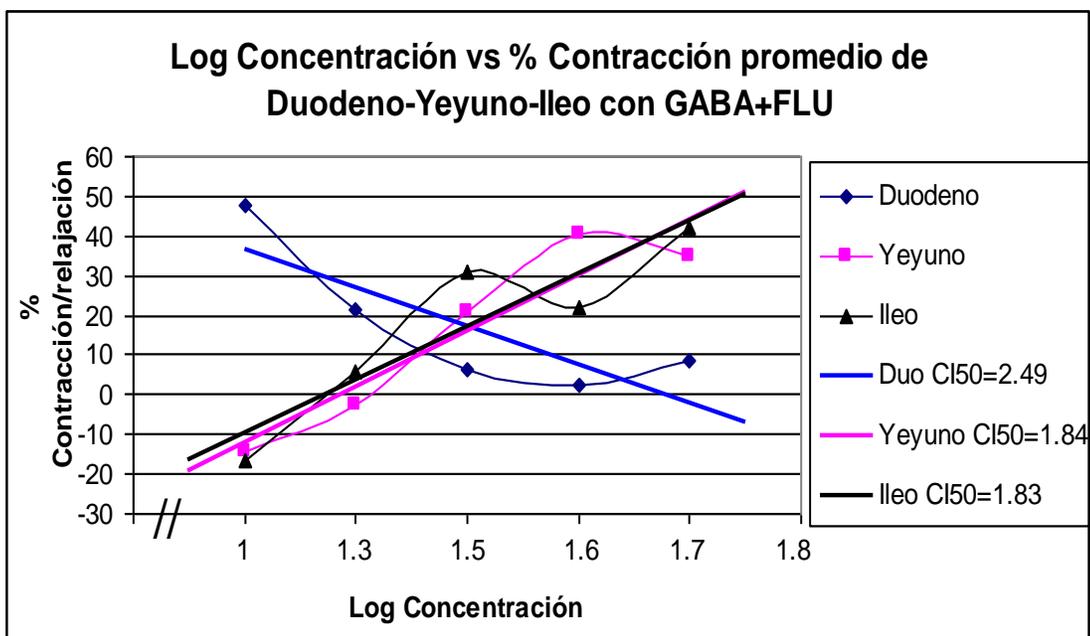


Gráfico 35. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 μ M y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración.

6.6 EXPERIMENTO 6

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE FLU Y MEL, SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE TEJIDO EN DUODENO, YEYUNO E ILEO.

Posterior al período de estabilidad de 30 min. del tejido en SMRK, el movimiento peristáltico del músculo liso, alcanzo una fase de estabilidad o basal, que se prolongó durante los siguientes 60 min. de duración del experimento.

Los registros digitales de actividad de los diferentes segmentos de tejido se obtuvieron y analizaron utilizando el software PolyView como se detalla en el capítulo (10.4). La escala de calibración fue de 1g de tensión y 5 min. de registro (Figura No.45).

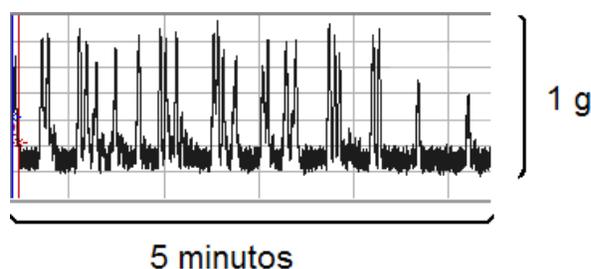
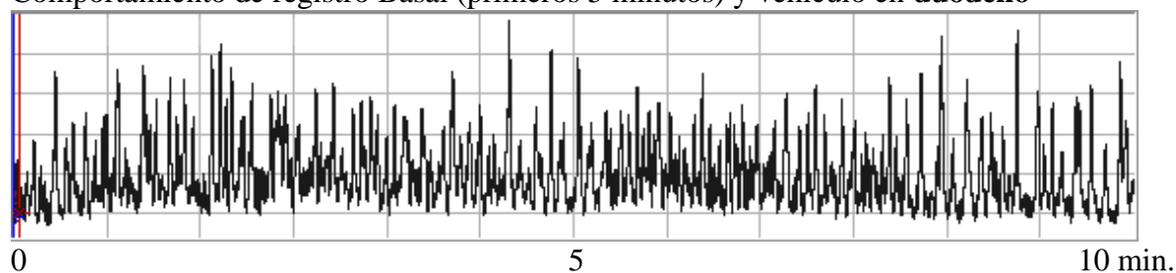


Figura 45. Muestra el registro digital obtenido por el software PolyView, con la escala correspondiente a la calibración del polígrafo, y el tiempo de registro (5).

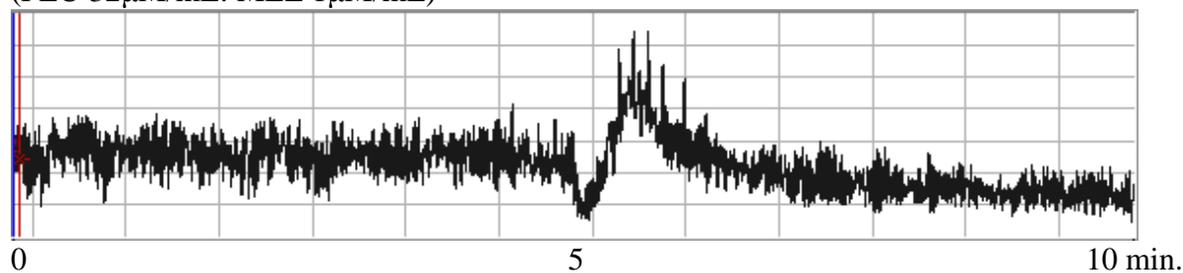
Los parámetros utilizados para el análisis de los resultados obtenidos son: Área Bajo la Curva (ABC), la Frecuencia (FREC) y la Amplitud de espigas (AMP) registradas a lo largo del experimento. Se adicionó FLU a una concentración de 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$, simultáneamente con concentraciones de 10, 20, 40, 80, 160 y 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de MEL, directamente a la cámara de estudio “In Vitro” en donde se encontraba sumergido el tejido con SMRK. Los resultados para duodeno, yeyuno e íleo, fueron ordenados y promediados en una hoja de cálculo, de acuerdo al parámetro analizado.

Al adicionar FLU y MEL simultáneamente a las concentraciones indicadas observamos que el efecto predominante es la disminución de forma gradual de la actividad muscular, con respecto a la actividad basal registrada, esta disminución de la actividad probablemente sea debida a la aplicación de mayores concentraciones de MEL, la medición fue realizada a través del parámetro de ABC, este comportamiento se observa de modo similar en las porciones de tejido correspondientes al duodeno, el yeyuno y el íleo. (Tabla No.17 y Gráfico No.31). El registro digital para la actividad en duodeno con FLU/MEL puede ser apreciado en la (Figura No.41), el de yeyuno en la (Figura No. 42) y el de íleo en la (Figura No.43).

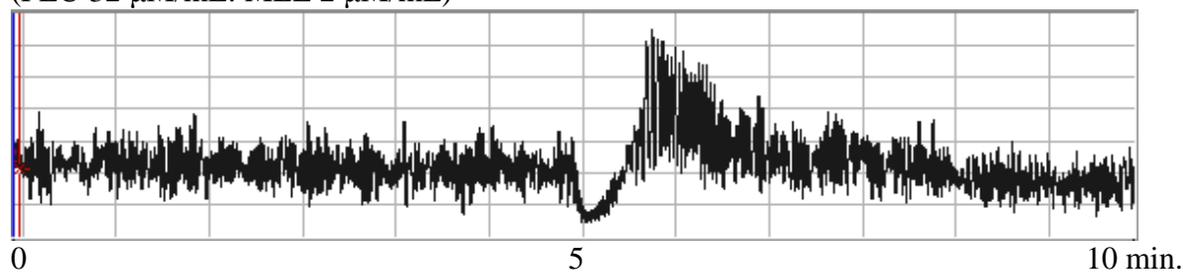
Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **duodeno**



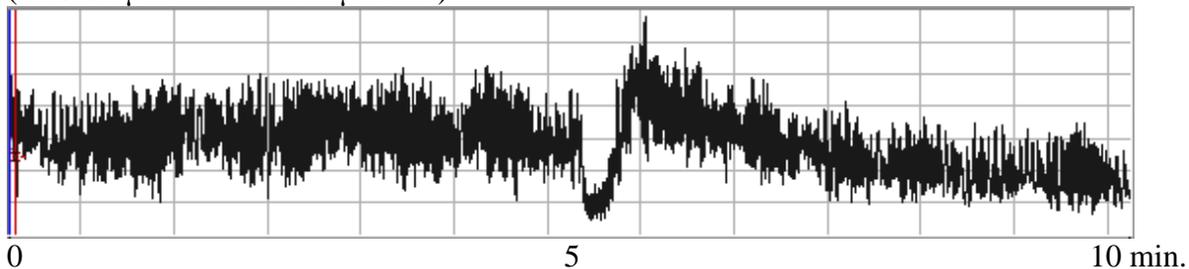
(FLU 32 μ M/mL: MEL 1 μ M/mL)



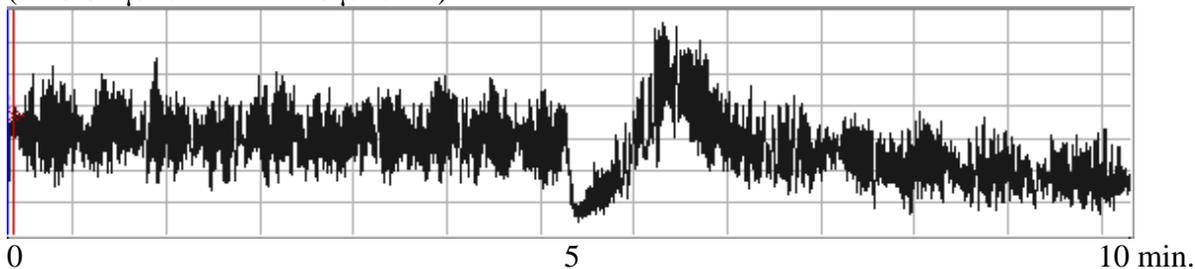
(FLU 32 μ M/mL: MEL 2 μ M/mL)



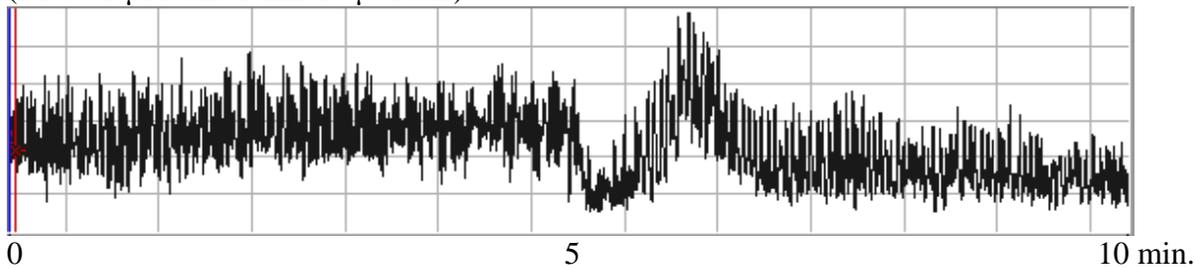
(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

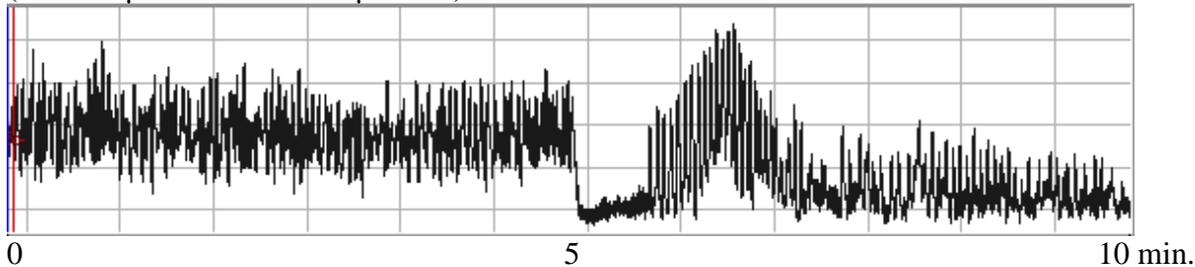
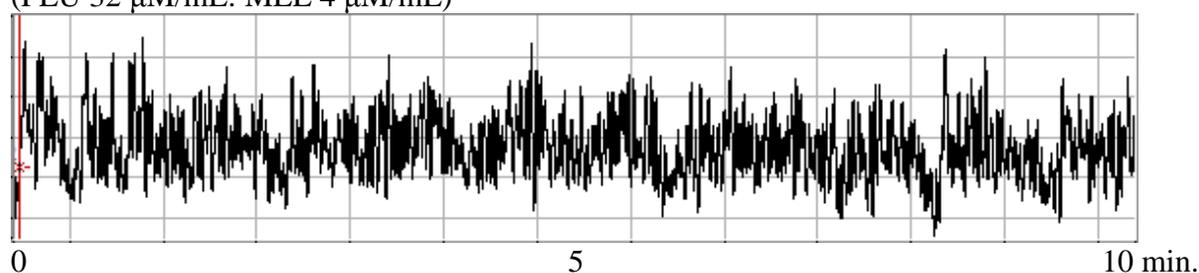
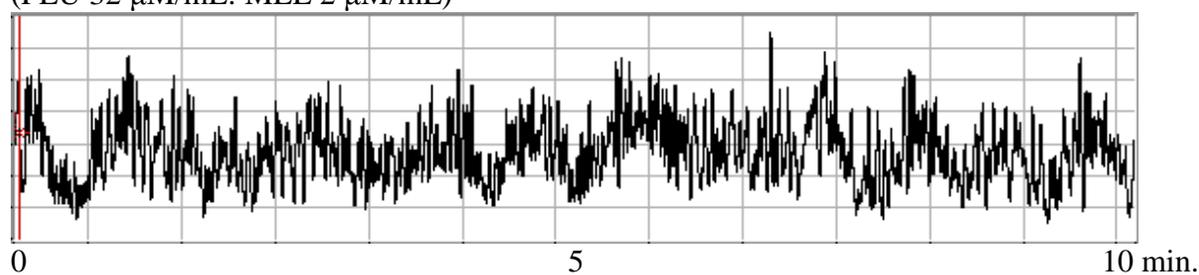
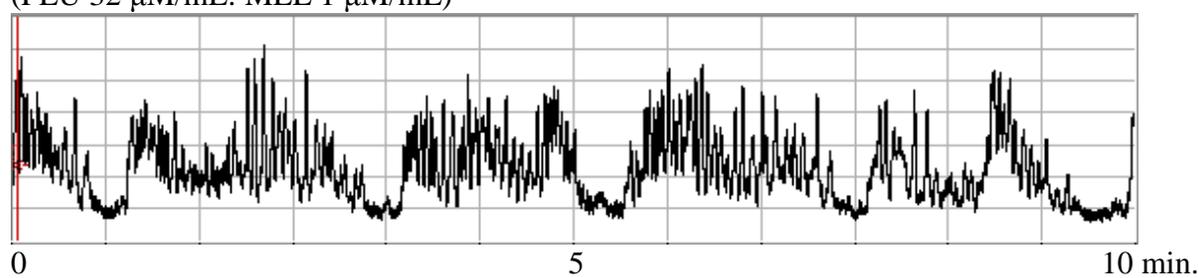
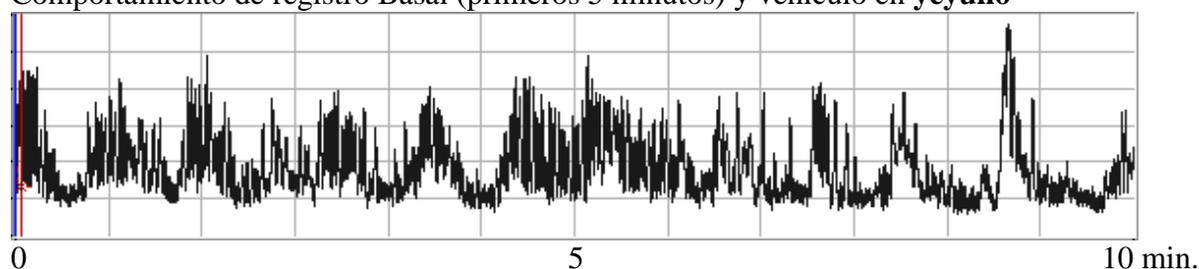


Figura 46. Registros de actividad de duodeno con FLU y MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la adición de la solución vehículo.

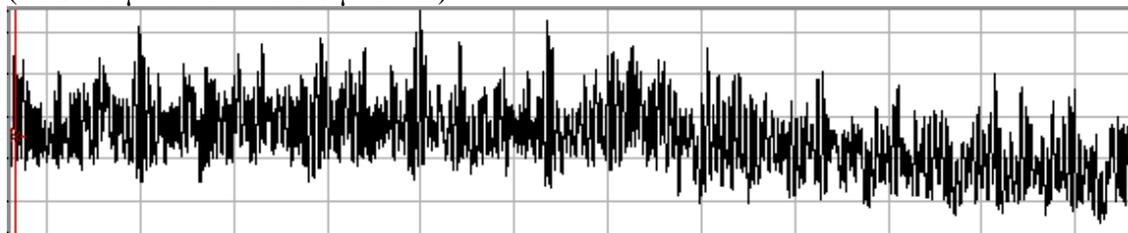
Al adicionar el FLU simultáneamente con la MEL, a las concentraciones indicadas se observa que a concentraciones bajas para la MEL, el efecto predominante es el incremento de la actividad muscular inducida probablemente por el FLU. Por lo que hay un aumento de forma gradual de la frecuencia, con respecto a la actividad basal registrada, esta medición se

realizo a través del parámetro de FREC. Este tipo de comportamiento se observa en las porciones de tejido correspondientes al yeyuno e íleo. Sin embargo en el duodeno se presenta un comportamiento opuesto, con un decremento en la actividad del tejido a bajas concentraciones de MEL y una disminución gradual posterior con respecto a la actividad basal (Tabla No.18 y Gráfico No.32).

Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en **yeyuno**

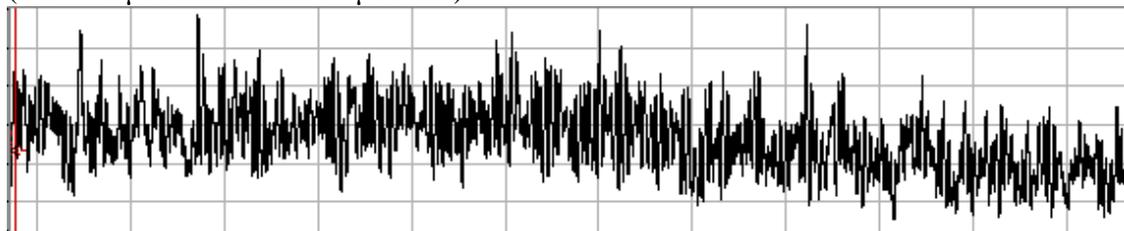


(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



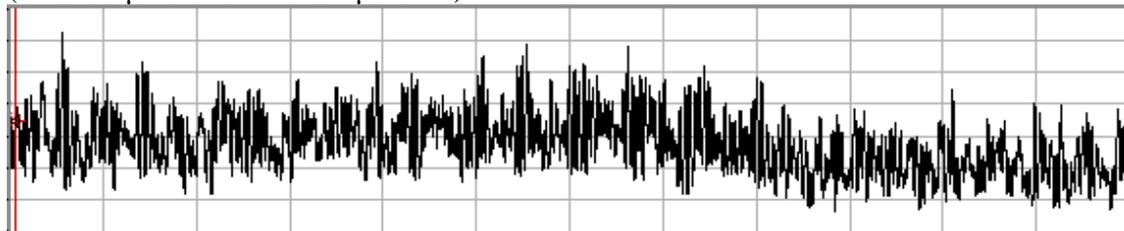
0 5 10 min.

(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



0 5 10 min.

(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

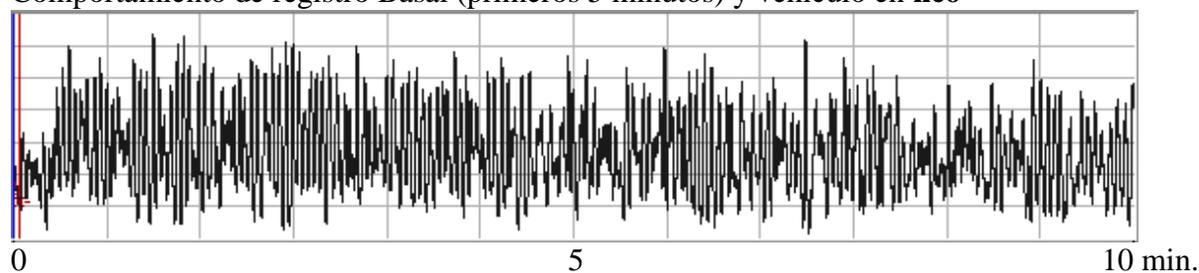


0 5 10 min.

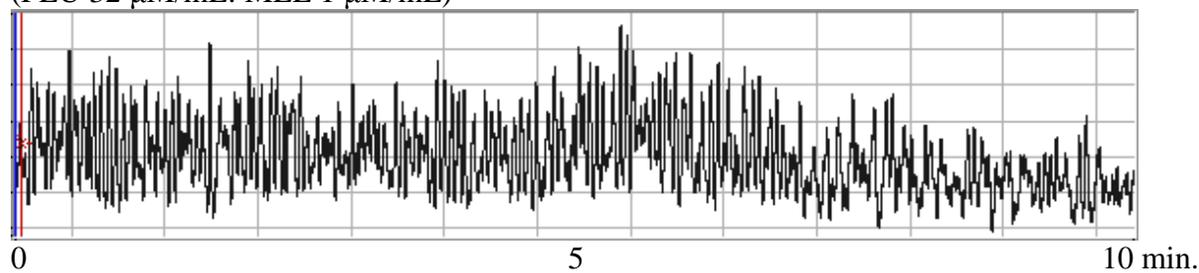
Figura 47. Registros de actividad de yeyuno con FLU y MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Cuando se adiciona simultáneamente el FLU y la MEL a las concentraciones indicadas se observa un decremento desde el inicio del registro de la amplitud de los eventos contráctiles espontáneos del tejido (AMP) con respecto al comportamiento basal del tejido. Este comportamiento lo observamos en las porciones correspondientes al duodeno, el yeyuno y el íleo, en donde a la máxima concentración de MEL utilizada parece no modificar el comportamiento presentado desde el inicio del registro. En la porción correspondiente al duodeno se presenta con una mayor intensidad la disminución de la AMP de los eventos contráctiles a la máxima concentración de MEL utilizada (Tabla No. 19 y Gráfico No. 33).

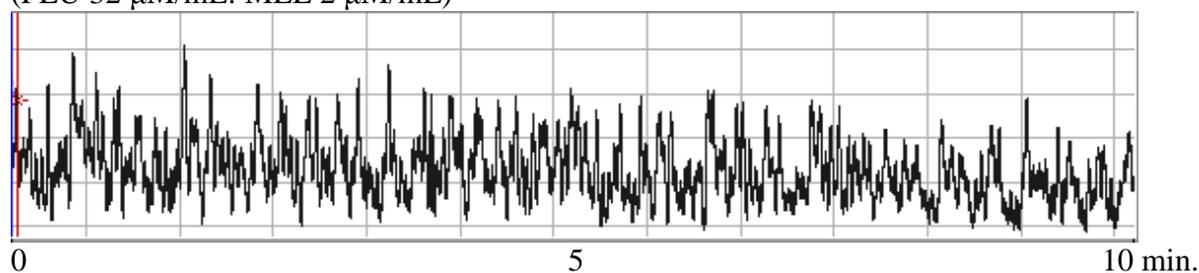
Comportamiento de registro Basal (primeros 5 minutos) y vehículo en íleo



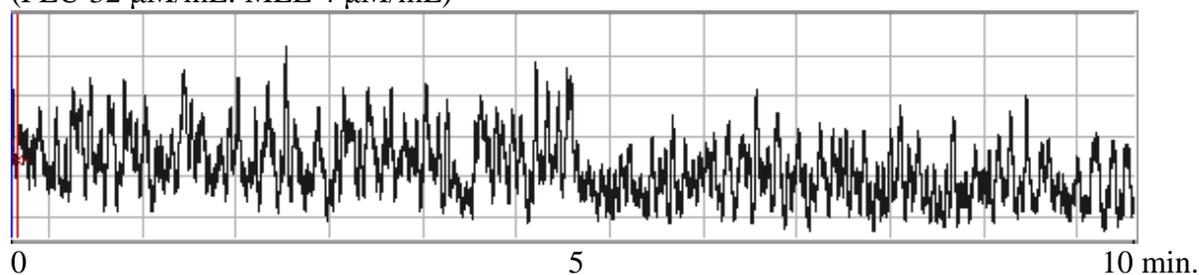
(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



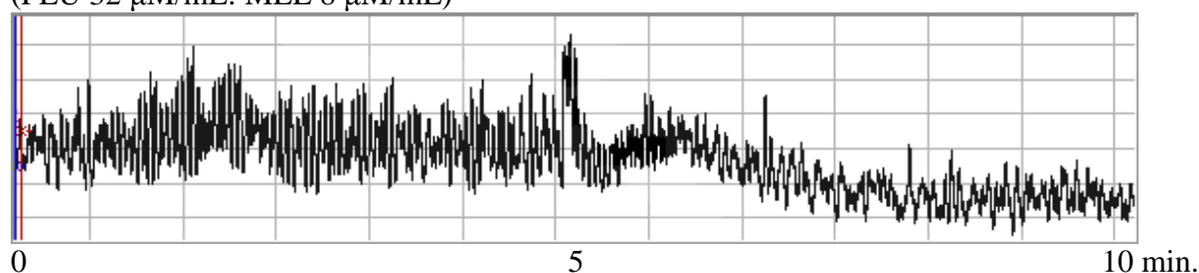
(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 8 $\mu\text{M}/\text{mL}$)



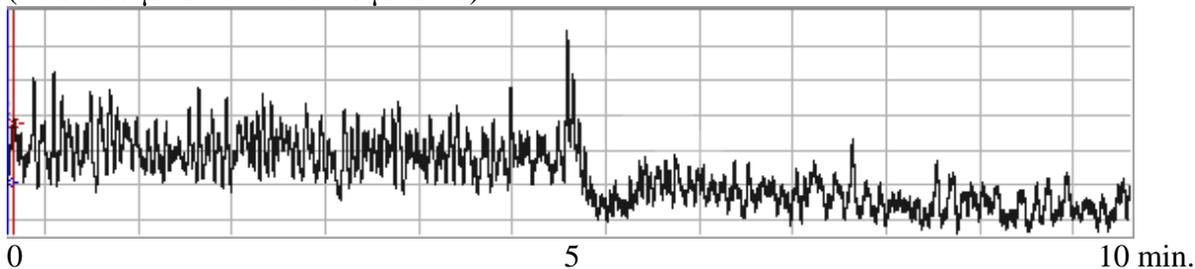
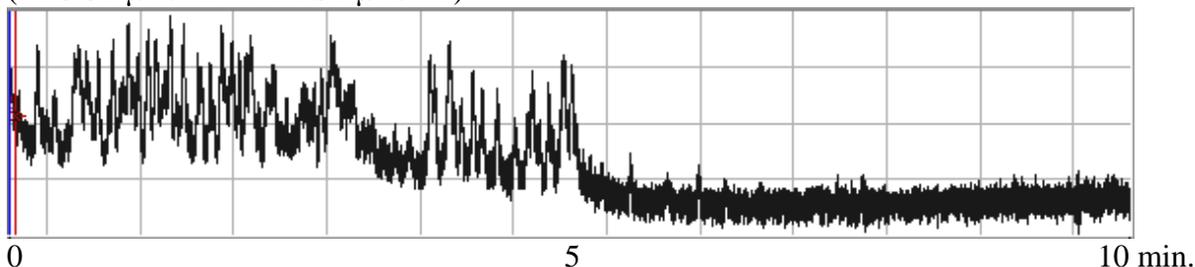
(FLU 320 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 16 $\mu\text{M}/\text{mL}$)(FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$: MEL 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$)

Figura 48. Registros de actividad de yeyuno con FLU y MEL. La escala de 0-5 min. indica el registro basal y la escala de 5-10 indica el registro postadministración. El primer registro se obtuvo con la administración de la solución vehículo.

Porcentaje promedio de ABC							
FLU/MEL	% Basal	<i>Duodeno</i>		<i>Yeyuno</i>		<i>Íleo</i>	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100	949.950	100	717.305	100	1184.615	100
vehículo	100.12	949.080	99.91	714.520	99.61	1199.433	101.25
32/1	100.04	677.418	71.31	538.833	75.12	1039.923	87.79
32/2	100.08	850.823	89.57	888.145	123.82	808.065	68.21
32/4	100.00	739.868	77.88	709.250	98.88	873.463	73.73
32/8	99.98	659.023	69.37	562.673	78.44	622.713	52.57
32/16	99.99	564.163	59.39	498.755	69.53	350.318	29.57
32/32	100.02	345.688	36.39	388.345	54.14	98.5825	8.32

Tabla 17. Porcentajes promedio de ABC para duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de MEL.

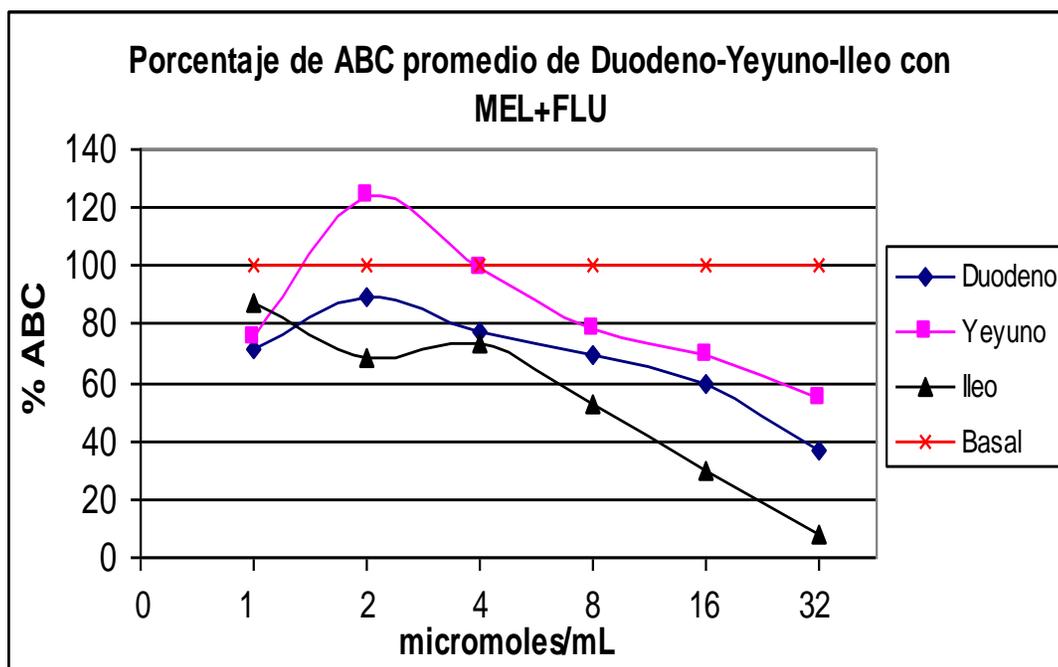


Gráfico 36. Porcentajes promedio de ABC con 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de FLU y diferentes concentraciones de GABA en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de FREC							
FLU/MEL	% Basal	<i>Duodeno</i>		<i>Yeyuno</i>		<i>Íleo</i>	
$\mu\text{M}/\text{mL}$	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	0.256	100.00	0.201	100.00	0.325	100.00
vehiculo	100.13	0.254	99.35	0.203	100.83	0.327	100.62
32/1	100.09	0.253	98.70	0.211	104.98	0.300	91.74
32/2	100.10	0.399	128.66	0.341	169.71	0.276	91.94
32/4	100.11	0.368	143.97	0.358	178.01	0.276	100.00
32/8	100.08	0.417	162.87	0.368	183.40	0.202	73.11
32/16	100.01	0.351	137.13	0.356	177.18	0.182	90.08
32/32	100.07	0.270	105.54	0.357	177.59	0.043	23.39

Tabla 18. Porcentajes promedio de FREC para duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y diferentes concentraciones de MEL.

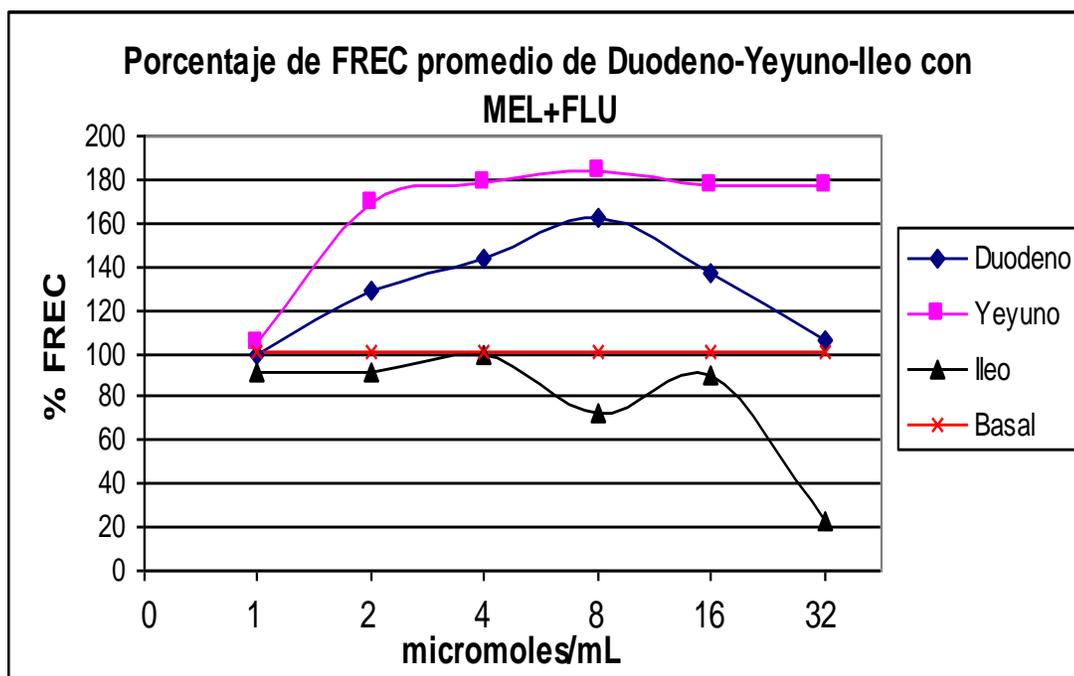


Gráfico 37. Porcentajes promedio de FREC/seg. con 32 μ M/mL de FLU y diferentes concentraciones de MEL en duodeno, yeyuno e íleo.

Porcentaje promedio de Amplitud de espigas							
FLU/MEL	% Basal	<i>Duodeno</i>		<i>Yeyuno</i>		<i>Ileo</i>	
μ M/mL	Promedio	Promedio	%	Promedio	%	Promedio	%
Basal	100.00	7.650	100.00	8.443	100.00	8.958	100.00
vehículo	100.32	7.590	99.22	8.538	101.13	8.520	95.11
32/1	99.98	7.090	92.68	6.560	77.70	8.598	95.98
32/2	100.00	7.360	96.21	8.245	97.65	8.568	95.65
32/4	99.87	6.773	88.54	7.280	86.23	8.865	98.96
32/8	99.98	7.118	93.05	6.733	79.75	8.705	97.18
32/16	100.10	5.963	77.95	6.370	75.45	7.505	83.78
32/32	100.12	5.538	72.39	6.443	76.31	5.280	58.94

Tabla 19. Porcentajes promedio de AMP para duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32 μ M/mL y diferentes concentraciones de GABA.

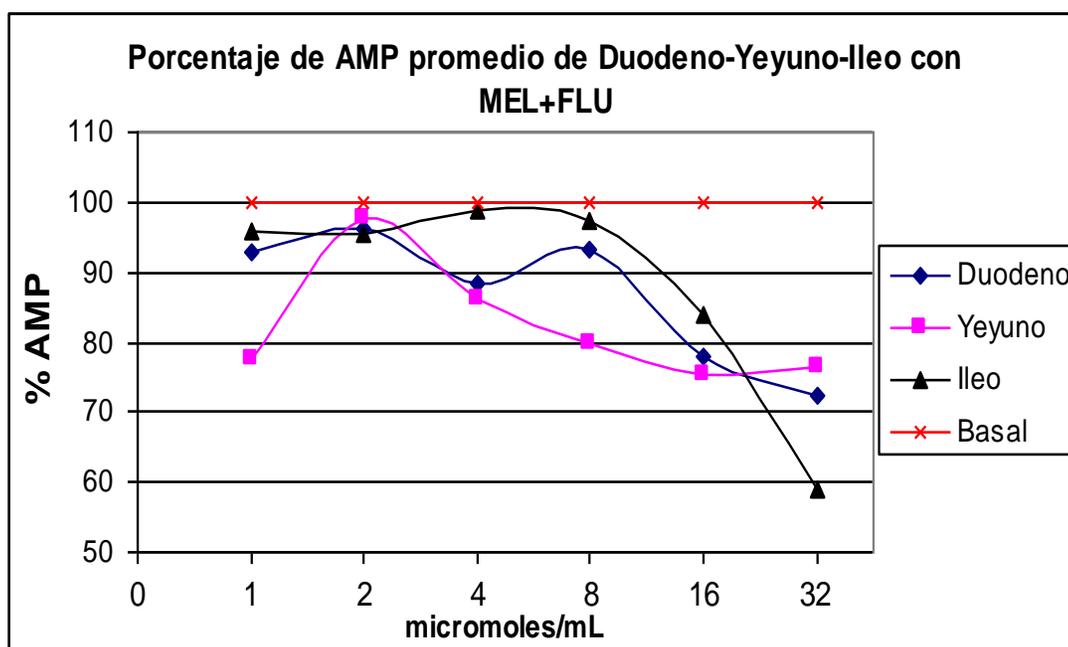


Gráfico 38. Porcentajes promedio de AMP con 32 μ M/mL de FLU y diferentes concentraciones de MEL en duodeno, yeyuno e íleo.

La adición de FLU y de MEL en diferentes concentraciones de forma simultánea provocó un decremento de la respuesta, que probablemente se justifica por el comportamiento observado con la MEL en los experimentos realizados con esta por separado. Al adicionar simultáneamente la MEL mostró una relación directa con cada una de las diferentes concentraciones. En el caso de la ABC, el resultado fue la disminución de la actividad en el duodeno, yeyuno e íleo y un aumento en la FREC excepto en el duodeno, que mostró un decremento de sus valores con respecto al registro basal. En cuanto al parámetro de la AMP se presentó un comportamiento similar al registrado en la medición del ABC. Al calcular la concentración efectiva 50 de MEL a la cual revierte el efecto de FLU, para el duodeno el valor obtenido fue $CI_{50}=263.03 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.34), para el yeyuno de $CE_{50}=1202.26 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.35) y para el íleo de $CE_{50}=66.07 \mu\text{M/mL}$ (Gráfico No.36).

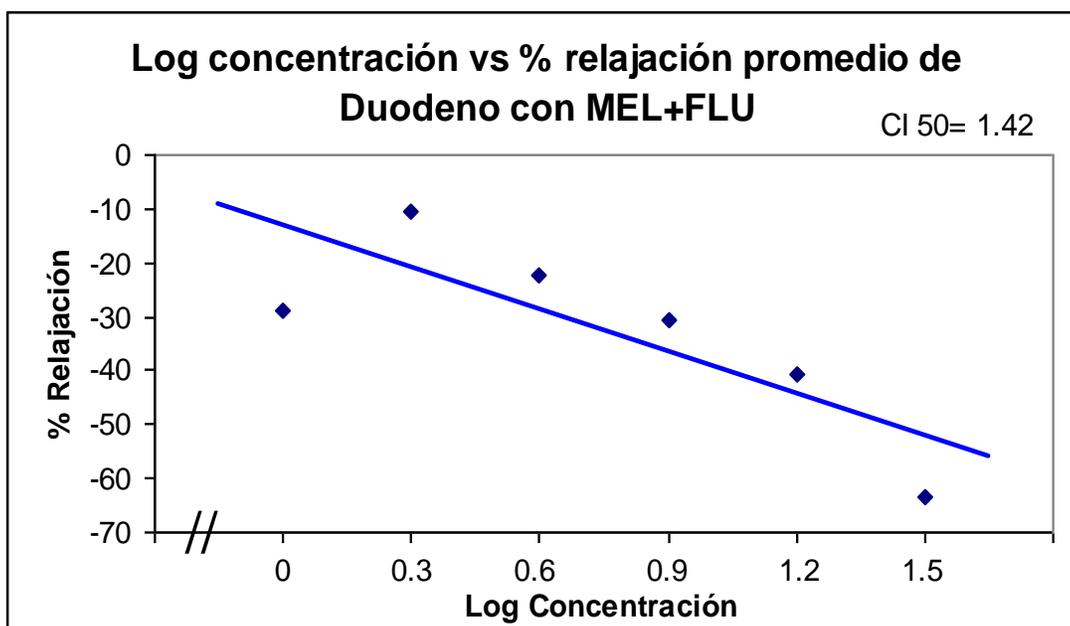


Gráfico 39. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno con FLU 32µM/mL y diferentes concentraciones de MEL. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2= 0.6498$

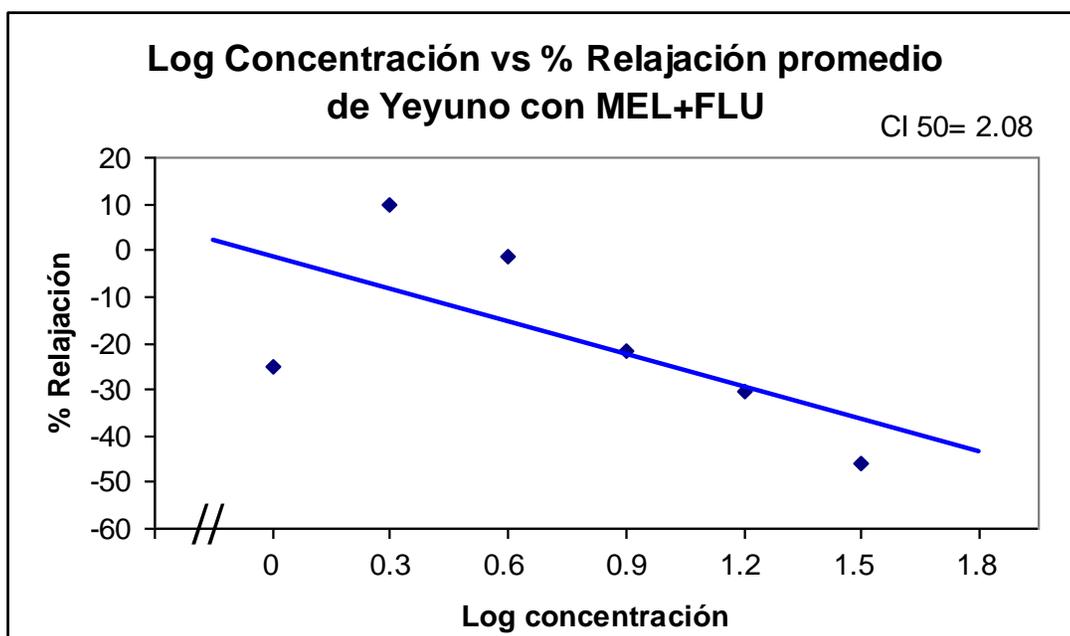


Gráfico 40. Curva dosis-respuesta gradual de yeyuno con FLU 32µM/mL y diferentes concentraciones de MEL. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2= 0.4236$

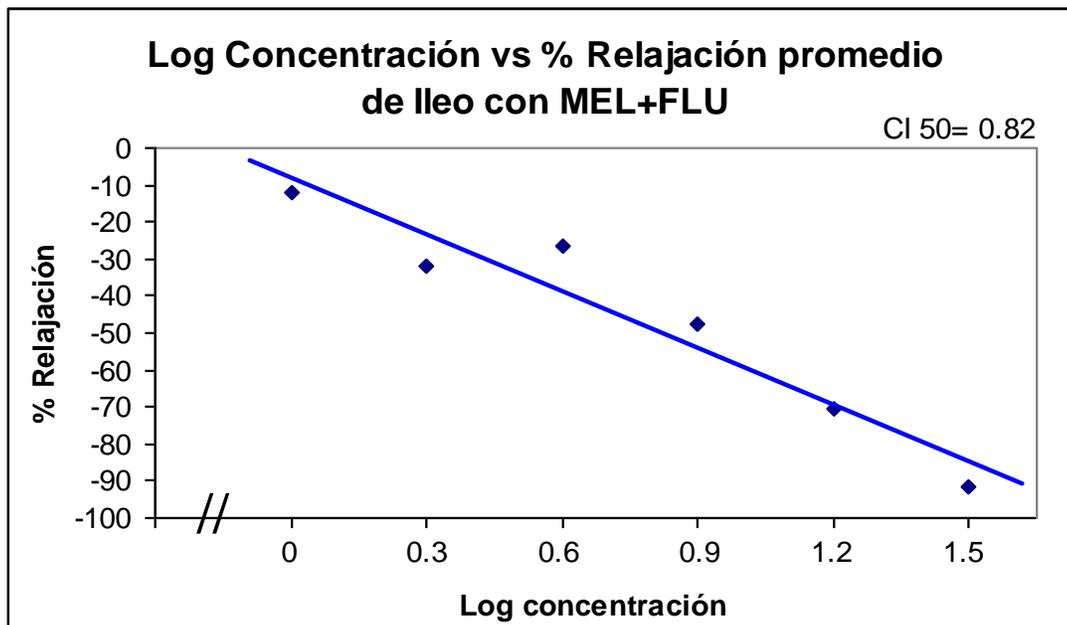


Gráfico 41. Curva dosis-respuesta gradual de íleo con FLU 32µM/mL y diferentes concentraciones de MEL. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración. $R^2= 0.9239$

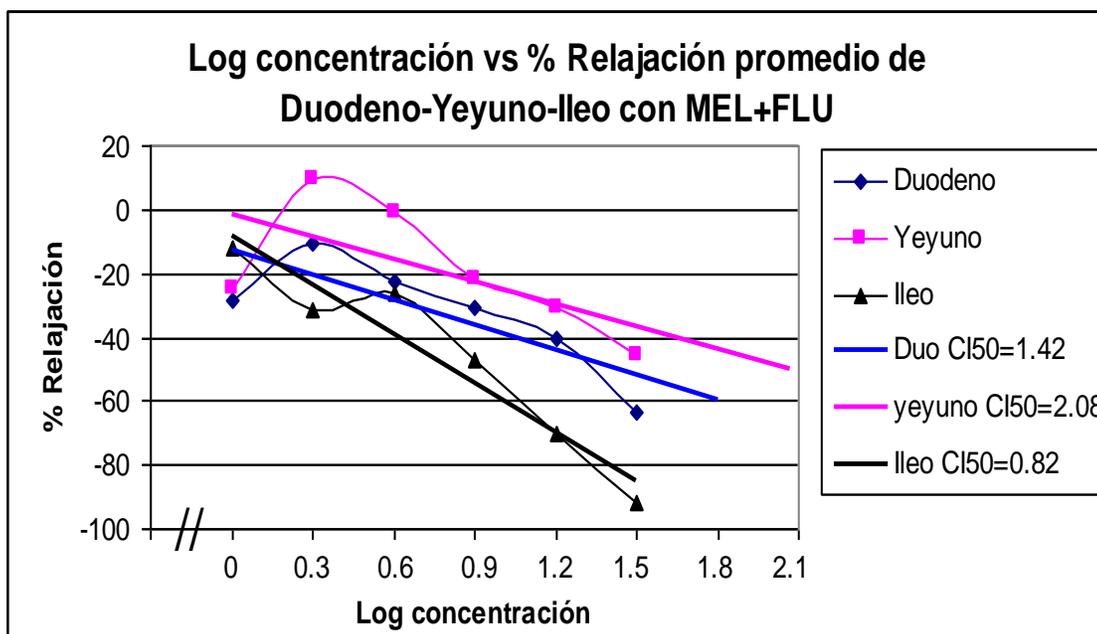


Gráfico 42. Curva dosis-respuesta gradual de duodeno, yeyuno e íleo con FLU 32µM/mL y diferentes concentraciones de GABA. Se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% en Log de la concentración.

7. DISCUSIÓN

Se conoce por estudios previos que el TGI de los vertebrados es una fuente de MEL cuya concentración puede llegar a sobrepasar los niveles sanguíneos de MEL, de 10 a 100 veces según estudios realizados por Bubenik (16). En otras investigaciones la liberación de MEL por el TGI, parece estar más relacionada con la periodicidad en la ingesta de alimento que con una secreción foto periódica (18). En estudios anteriores se muestra que en TGI la MEL fue detectada mediante pruebas inmuno-histológicas, por radio-inmunoensayo y por HPLC, en las células enterocromafines (CE) de la mucosa digestiva, además, de las enzimas que sintetizan a la MEL, la NAT y la HIOMT (16) (76).

Investigaciones previas muestran que en el TGI del roedor la MEL y la NAT exhiben una distribución por regiones, con un nivel alto en el recto y el colon y un nivel bajo en el yeyuno y el íleo. Esta distribución es similar a la observada con la 5-HT y a la densidad de CE probable fuente de la síntesis de MEL. A lo largo del intestino, la densidad de los receptores de MEL muestran un valor máximo en el yeyuno y el íleo y un mínimo en el colon (63). También, se ha especulado que al menos una porción de la MEL detectada en el TGI es de origen pineal (especialmente durante la noche) lo que ha sido confirmado por investigaciones de Messner y cols., (64). Otros estudios indican también que la mayor parte de la concentración de MEL en el día es probablemente de origen GI generada en las CE del TGI en respuesta al tránsito de alimento (18), y a su vez la MEL migra hacia capas más profundas del TGI por medio de los vasos sanguíneos en la lamina propia y la submucosa y de este modo actuar en la muscularis (9).

Lo anterior nos permite explicar los resultados obtenidos en este trabajo experimental. Los tejidos expuestos: duodeno, yeyuno e íleo; después de la aplicación de MEL a las dosis bajas de 1 a 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ resultó en un aumento de la actividad contráctil, mientras que la aplicación de concentraciones más altas de 4 a 32 $\mu\text{M}/\text{mL}$ el efecto observado fue una disminución de la actividad contráctil y por ende una relajación del músculo liso. Por lo que se puede decir que la MEL ejerce un efecto bifásico sobre el músculo liso, es decir, contrae o relaja dependiendo de la concentración. Esto concuerda con estudios llevados a cabo en animales, en donde después de una inyección i. p. de pequeñas dosis de MEL (1 a 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) se observó un incremento sustancial en la motilidad y tránsito intestinal, es decir, a bajas concentraciones tiene un efecto contráctil. En contraste este efecto fue totalmente revertido después de la inyección i. p. de dosis altas de MEL (100 a 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), ya que lo que se observó fue un retardo en el tránsito intestinal, es decir, a altas concentraciones tiene un efecto relajante (27).

En los experimentos realizados en este trabajo, este comportamiento bifásico, se observó en el parámetro correspondiente al ABC con un nivel de significancia de $P < 0.05$, en los segmentos correspondientes al duodeno y yeyuno, sin embargo, en la región correspondiente al íleo, se observó solamente un comportamiento de relajación gradual. Los resultados encontrados en el parámetro de FREC, con un nivel de significancia de $P < 0.05$ es similar a los resultados obtenidos para el ABC, es decir, a concentraciones bajas se observó un aumento en el número de eventos contráctiles por minuto; a concentraciones más elevadas se observó una disminución de estos eventos. Este resultado es contrario al reportado por Harlow y cols., (41) en cuya publicación se menciona que la MEL no tiene influencia sobre la

frecuencia de las contracciones de duodeno de rata, pero si reduce la fuerza de las contracciones. El parámetro de AMP con una significancia de $P < 0.05$ presenta de igual forma un comportamiento bifásico similar al observado en el ABC y la FREC y en donde el segmento correspondiente al íleo también presentó una menor FREC y AMP. Esta diferencia entre el íleo y los demás tejidos podría atribuirse a que hay una menor densidad de receptores a la MEL en este segmento del TGI como se mencionó anteriormente, en las porciones más proximales al colon hay una menor densidad de receptores a MEL.

Los efectos observados en este experimento también han sido obtenidos por otros investigadores como Bubenik, 1986 (citado por 63), Quastel y Rahamimoff (citado por 16), los cuales han reportado que la MEL en estudios “In Vitro” inhibe las contracciones espontáneas de duodeno de rata, por lo que tiene un efecto inhibitor sobre la actividad contráctil del músculo liso. Otros estudios también confirman que la MEL inhibe las contracciones del músculo liso en regiones tales como el estómago, el íleo y el colon. Además de el efecto de relajación presente en muchos estudios “In Vitro” la MEL parece inhibir la acción de la 5-HT (precursor de la MEL) también “In Vivo” (63) (16).

Los efectos observados probablemente se deban a los receptores a MEL, MT1 y MT2, por lo que estudios recientes indican que la acción de la MEL sobre el músculo liso es probablemente a través de estos receptores, a través de la técnica de auto-radiografía han sido detectados sitios de unión a MEL en la mucosa del TGI a nivel intracelular, también, se han detectado en fracciones nucleares, microsomales, mitocondriales y citosólicas. Además, de sitios en hipotálamo de rata, retina e intestino delgado, investigaciones sugieren que al menos algunos efectos de la MEL, son mediados a través de los receptores membranales MT1 y

MT2, hay también evidencia experimental que une a los receptores de MEL con proteínas G (75) (9). Los receptores tipo MT1 y MT2 muestran perfiles farmacológicos similares y cuya estructura consta de siete dominios transmembranales y la capacidad de transducir señales extracelulares vía la unión a proteínas G (61). También, existe la hipótesis de que la MEL parece afectar la densidad de sus propios receptores, ya que se ha observado una diferencia significativa en la expresión de los tipos de receptores en el intestino delgado durante la noche y el día. (75) (69). Otros estudios confirman que la MEL también inhibe las contracciones del músculo liso en el estómago, el íleo y el colon (16).

Con respecto al GABA siendo el mayor neurotransmisor inhibitorio en el SNC de mamíferos presenta tres clases de receptores. Los receptores ionotrópicos GABA_A que producen una rápida inhibición sináptica cuando son activados por GABA, pero también, son modulados por barbitúricos, esteroides y BZP. Este receptor es más ubicuo y desempeña un papel en una amplia variedad de funciones en el SNC (22). En contraste los receptores metabotrópicos GABA_B activan segundos mensajeros acoplados a proteínas G, y se relacionan principalmente con la apertura de canales iónicos de Ca⁺ y K⁺ (23). Con respecto a los receptores GABA_C por ejemplo no hay evidencia que los relacione en funciones motoras o en acciones con fármacos ansiolíticos o anticonvulsivos (22), sin embargo puede estar presente en el TGI como lo demuestran estudios utilizando la técnica de RT-PCR (8). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que las fibras nerviosas y cuerpos celulares contienen GABA a lo largo del TGI, con una alta densidad en particular en el plexo mientérico y dentro de la muscularis externa, con base en la localización anatómica de estas fibras intrínsecas a los ganglios mientéricos e inclusive el músculo circular, se ha sugerido que el GABA puede

funcionar como transmisor interneuronal (51). EL GABA y su enzima sintetizante, la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) también han sido localizados en algunas neuronas del intestino delgado (8).

Los resultados experimentales del presente trabajo con respecto al GABA, muestran un efecto bifásico producido por la acción del GABA sobre el músculo liso gastrointestinal. El parámetro de ABC con una significancia de $P < 0.05$ muestra que a bajas concentraciones se produce una ligera relajación pero al aumentar la concentración se presenta una contracción, este resultado se observa en los tres segmentos de tejido que fueron analizados. El parámetro correspondiente a la FREC con una significancia de $P < 0.05$ mostró un aumento en el número de eventos contráctiles por min. de forma más notable en el duodeno y el yeyuno. En cuanto al parámetro de AMP con una significancia de $P < 0.05$ el yeyuno presentó una disminución notable, con respecto a los tejidos restantes.

Estos resultados son similares a los obtenidos en los experimentos realizados por Kristev y cols., (51), donde el GABA ejerce un efecto bifásico sobre la actividad mecánica de relajación-contracción del músculo liso con pronunciadas características concentración-dependientes en preparaciones de íleo de cobayo. Durante esta reacción el efecto de contracción fue usualmente más fuerte que la parte de la relajación. Del mismo modo experimentos realizados por Bayer y cols., (8), muestran también que el GABA induce dos tipos de efectos o efecto bifásico, consistente en una relajación transitoria seguida de una contracción en preparaciones de colon de rata.

El efecto contráctil del GABA es una consecuencia de la activación de receptores específicos $GABA_A$ localizados presinápticamente en neuronas colinérgicas post-

ganglionares, la activación de estos receptores permite la liberación de Ach endógena, y el efecto de relajación producido por GABA sería mediado a través de los receptores GABA_B ya que la activación de estos últimos genera una inhibición de la liberación de Ach. A nivel del tejido intestinal, la activación de los receptores GABA_A y GABA_B permite efectos muy complejos y variables dependiendo del segmento del intestino y de la especie estudiada (8).

El FLU, una imidazobenzodiazepina, es un antagonista específico de los receptores benzodiazepínicos, y es una herramienta para la investigación del comportamiento y mecanismo farmacológico de estos receptores, y sobre los efectos producidos por fármacos que actúan sobre el complejo receptor GABA/BZP/Cl⁻ (82) (68).

Por otro lado, se conoce por estudios previos que el FLU revierte muchos de los efectos ansiolíticos, anticonvulsivos y de relajación muscular que generan las BZP (30). Estudios realizados por Escorihuela y cols., (30), reflejan una interacción significativa entre BZP y FLU, este último en dosis de 10 mg/Kg. en ratas, antagoniza (total o parcialmente) los efectos inducidos por BZP.

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo muestran que el FLU, presenta un efecto muy similar al observado con GABA, el parámetro de ABC, con una significancia de $P < 0.05$ utilizando bajas concentraciones se observa una disminución del ABC y por consiguiente de la actividad contráctil (inhibición) y en concentraciones altas un aumento en dicha actividad (contracción). En cuanto a los parámetros de FREC y la AMP con una significancia de $P < 0.05$ se observó un comportamiento similar al obtenido en el ABC, a bajas concentraciones hay una disminución y a concentraciones altas un aumento de los valores en estos parámetros. El comportamiento en los parámetros de medición que presenta el FLU es

muy similar con los valores en los parámetros de medición de GABA y se debe probablemente, a que el FLU se une de forma específica a los sitios benzodiazepínicos (30), que forman parte de los sitios de unión de GABA generando probablemente, una respuesta de características similares.

Con respecto a la interacción MEL/GABA, en el parámetro de ABC con una significancia de $P < 0.05$ se observa que el músculo se relaja totalmente, por efecto de la acción directa de la MEL, pero al aumentar la concentración de GABA el efecto relajante de la MEL es revertido, de forma dependiente a la concentración de GABA aplicada; este comportamiento se observa en los tres segmentos de tejido utilizados. El resultado experimental para el parámetro de FREC con una significancia de $P < 0.05$, se observa una disminución en el número de eventos contráctiles por min. en los segmentos de duodeno y yeyuno, pero de forma más evidente en el segmento de íleo. El parámetro correspondiente a AMP a una significancia de $P < 0.05$ presenta un comportamiento similar a los parámetros de ABC y FREC. Estos resultados sugieren un efecto antagónico del GABA sobre la MEL y que puede ser mediado a través de los receptores $GABA_A$.

Los resultados experimentales de la interacción farmacológica entre FLU/GABA, para el parámetro de ABC con una significancia de $P < 0.05$, se observó un aumento del ABC en el segmento correspondiente al duodeno y un efecto bifásico de disminución y aumento del ABC (relajación–contracción) en los segmentos de yeyuno e íleo. El parámetro de FREC con una significancia de $P < 0.05$ muestra una disminución del número de eventos contráctiles en los tres segmentos de tejido. El resultado para el parámetro de AMP a significancia de $P < 0.05$ mostró una disminución de la amplitud de espigas en el segmento de tejido correspondiente al

duodeno, sin embargo en el yeyuno e íleo se presenta el efecto bifásico observado con el GABA. Estos resultados se asemejan al comportamiento observado con el GABA, por lo cual se sugiere, que estos efectos son vía los receptores GABA_A, sin embargo la diferencia en el comportamiento observada en el segmento correspondiente al duodeno podrían sugerir que estos efectos pueden ser producidos vía otro tipo de receptores como los receptores a MEL.

Con respecto a la interacción FLU/MEL, el parámetro de ABC con una significancia de $P < 0.05$ se observó que a bajas concentraciones de MEL se presenta un aumento del ABC esto en los tres segmentos de tejido, debido al efecto de contracción observado a bajas concentraciones con MEL y al efecto contráctil del FLU, sin embargo al aumentar la concentración de MEL se observa una disminución del ABC en los tres tejidos. En el parámetro de FREQ con una significancia de $P < 0.05$ se observa un aumento en el número de eventos contráctiles en las regiones de duodeno y yeyuno, y una disminución en la región del íleo. En cuanto a la AMP con una significancia de $P < 0.05$ se observa un comportamiento similar de la amplitud de espigas, al observado en el parámetro de ABC. Estos resultados nos indican que el FLU no antagoniza totalmente los efectos producidos por la MEL, como sucedió en la interacción de MEL/GABA, por lo que receptores a MEL muy probablemente y de acuerdo a investigaciones previas, sugeriría que este efecto es vía los receptores MT1 o MT2 a MEL (68, 30).

Los resultados del presente trabajo sugieren que en determinadas regiones del TGI, la MEL podría actuar, vía sus propios receptores MT1 y MT2, de acuerdo a la densidad de estos que se sabe podrían ser modificados inclusive por la misma concentración de MEL presente. El número y tipo de los receptores responsables de los efectos observados en el TGI o en las

capas del músculo liso, probablemente sean los receptores a MEL (MT1 y/o MT2) o los de GABA vía receptores GABA_A.

Experimentos posteriores, utilizando técnicas de radio-inmunoensayo o de PCR podrían ayudar a distinguir entre los distintos subtipos de receptores presentes en el músculo liso del TGI, para tratar de distinguir de una forma precisa el tipo de receptor de GABA o de MEL involucrado en el mecanismo de acción de la MEL en la TGI.

8. CONCLUSIONES.

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

1. La MEL posee un efecto inhibitor sobre la actividad contráctil de duodeno, yeyuno e íleo, de forma dependiente de la concentración.
2. El efecto de la MEL sobre la actividad contráctil del músculo liso en duodeno, yeyuno e íleo provoca un efecto bifásico de contracción-relajación, aumento-disminución de los parámetros de medición utilizados: ABC, FREC y AMP siendo este un efecto dependiente de la concentración.
3. El GABA produce un aumento sobre la actividad contráctil de duodeno, yeyuno e íleo de forma dependiente de la concentración.
4. El efecto de GABA sobre la actividad contráctil del músculo liso en duodeno, yeyuno e íleo provoca un efecto bifásico de relajación-contracción, disminución-aumento de los parámetros de medición utilizados: ABC, FREC y AMP siendo este un efecto dependiente de la concentración.
5. El FLU posee un efecto de contracción semejante al observado con GABA, sobre la actividad de duodeno, yeyuno e íleo.
6. La interacción farmacológica entre MEL/GABA, el GABA revierte o antagoniza los efectos de la MEL.
7. En la interacción farmacológica entre FLU/GABA, se ve aumentado el efecto en la actividad contráctil del músculo liso por el GABA.

8. La interacción farmacológica entre FLU/MEL, el FLU revierte o antagoniza los efectos de la MEL de forma parcial.
9. Se comprueba la hipótesis planteada al inicio y aunque se sugiere que estos efectos se desarrollan vía los receptores a GABA en específico los receptores GABA_A, no se descarta la posibilidad de que MEL actúe también vía sus propios receptores MT1 o MT2, sugiriendo una variación en el número y localización de estos receptores por regiones y tejidos en el TGI, a su vez modulados por la misma concentración de MEL presente.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. ARENDT J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* 3:13-22. 1998.
2. ASTRO-MED Inc. GRASSS INSTRUMENT DIVISION. DC Driver Amplifier. Model 7 DA. Instruction Manual. USA. 1992.
3. ASTRO-MED Inc. GRASSS INSTRUMENT DIVISION. Lower level DC preamplifier. Model 7 P1. Instruction Manual. USA. 1990.
4. ASTRO-MED Inc. GRASSS INSTRUMENT DIVISION. Polygraph Model 7K. USA. 1994.
5. ASTRO-MED Inc. GRASSS INSTRUMENT DIVISION. PolyView. User Guide. Versión 2.1. USA. 1998.
6. AXELROD J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science.* 1184:1341-1348, 1974.
7. BARGMANN W. Neurosecretion. *Int. Rev. Cytol.* 19:183-201. 1966.
8. BAYER S. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon. *Life Sci.* 71: 911-925, 2002.
9. BENOUALI P S. Melatonin is involved in cholecystokinin-induced changes of ileal motility in rats. *J. Pineal Res.* 17: 79-85, 1994.
10. BERNARD E A y SKOLNICK P. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor function. *Pharmacol. Rev.* 1998. 50(2): 291-313. 1998.
11. BEYER C E y STEKETEE J D. Antioxidant Properties of Melatonin- An Emerging Mystery. *Biochem. Pharmacol.* 56:1265-1272. 1998.
12. BIRZNIECE V y TÜRKMEN S. GABA_A receptor changes in acute allopregnanolone tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 1-8. 2006.
13. BONNAFUS C y SCATTON B. Benzodiazepine-induced intestinal motor disturbances in rats: mediation by omega 2 (BZ2) sites on capsaicin-sensitive afferent neurons. *Brit. J. Pharmacol.* 1994. 113: 268-274. 1994.

14. BOWMAN W C y RAND M J. Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas. 2ª. Edición. Edit. Interamericana. México. 1985. pp. 39.1-39.9.
15. BOX G E. Estadística para investigadores. Editorial Reverte. México. 1999.
16. BUBENIK G A. Gastrointestinal Melatonin. Localization, Function and Clinical Relevance. Dig. Diseases and Sciences. 47: 2336-2348, 2002.
17. BUBENIK G A. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. Biol. Sig. Recep. 10: 350-366. 2001.
18. BUBENIK G A. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of the rat. Biol. Signals. 6: 40-44, 1997.
19. CABEZA J y MOTILVA V. Mechanism involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. Life Sci. 68:1405-1415. 2001.
20. CASSONE V M y WARREN W S. Melatonin, the Pineal Gland, and Circadian Rhythms. J. Biol. Rhythm. 8:S73-S81. 1993.
21. COSTA T y COTECCHIA S. Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol. Sci. 2005. 26: 618-624. 2005.
22. CRITTENDEN D L. A quantitative structure-activity relationship investigation into agonist binding at GABA_C receptors. J. Mol. Structure. 755: 81-89, 2005.
23. CRITTENDEN D L. Enantiomers of *cis*-constrained and flexible 2-substituted GABA analogues exert opposite effects at recombinant GABA_C receptors. Bioorganic & Med. Chem. 14: 447-455, 2006.
24. 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.
25. DESCARTES R. 1649, *Les passions de l'âme*, Ámsterdam. (In French). Reprinted in AT, vol. XI. English translation in CSM, vol. I.
26. DESCHAUX O y FROESTL W. Influence of a GABA_B and GABA_C receptor antagonist on sleep-waking cycle in the rat. Eur. J. Pharmacol. 2006.

27. DRAGO F. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig. Diseases and Sci.* 47(9): 1969-1974. 2002.
28. DUBOCOVICH M L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends. Pharmacol. Sci.* 1995. 16:50-56. 1995.
29. DUVOCOVICH M L y Takahasi J S. Use of 2[¹²⁵I] iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3916-3920, 1987.
30. ESCORIHUELA R M. Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol. Res.* 28(1): 53-58, 1993.
31. ESCORRIHUELA R M y FERNANDEZ-TERUEL A. Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol. Res.* 1993. 28(1): 53-59. 1993.
32. FARGEAS M J y FIORAMONTI J. Central and peripheral action of GABA_A and GABA_B agonist on small intestine motility in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1988. 150: 163-169. 1988.
33. FIGUEROA J. *Glosario Farmacológico*. 2ª. Edición Editorial UTEHA México. 2002.
34. FURNESS J B y COSTA M. *Types of Nerves in the Enteric Nervous System*. *Neuroscience*. 5: 1-30. 1980.
35. GERSHON M D. *The Enteric Nervous System: A Second Brain*. Edit. Harper Collins, New York. 1998.
36. GOLOBEK D A y PEVET P. Melatonin Effects on Behavior: Possible Mediation by the Central GABAergic System. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20(3): 403-412. 1996.
37. GOTH A. *Farmacología Médica*. 13ª. Edición. Edit. Mosby. España. 1992. pp. 6-12.
38. GUYTON A C y HALL J E. *Unidad XII. Tratado de fisiología médica*. 11ª. Edición. Edit. Elsevier. España. 2006, pp. 771-825.
39. HABER A. *Estadística General*. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. México. 1989.
40. HARDELAND R y PANDI-PERUMAL S R. Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 313-316. 2006.

41. HARLOW H J. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J. Pineal Res.* 3(3): 277-284, 1986.
42. HARNETT D L. Introducción al análisis estadístico. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. México. 1989.
43. HATTORI A y MIGITAKA H. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Molec. Biol. Intern.* 35(3): 627-634. 1995.
44. IAIN L O. Capitulo 1. GOODMAN A y GILMAN. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª Edición. Edit. Mc Graw-Hill. Colombia. 2006. pp. 1-39.
45. IRALA-REYES M R. Alzheimer y melatonina. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2006.
46. JUNG H Y y SOHN Y H. Flumazenil does not affect intracortical motor excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. *Clin. Neurophysiol.* 115: 325-329. 2004.
47. KATZUNG B G. Farmacología básica y clínica. 6ª. Edición. Edit. El Manual Moderno. México. pp. 5-7. 1996
48. KENAKIN T. Principles: Receptor theory in pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25(4): 186-192. 2004.
49. KENNAWAY D J y HUGEL H M. Melatonin binding sites: are they receptors? *Molec. Cell. Endocrinol.* 88:C1-C9. 1992.
50. KORPI E R. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* 67:113-159. 2002.
51. KRISTEV A D. Effects of GABA_B receptor antagonists on spontaneous and on GABA-induced mechanical activity of guinea-pig smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.* 431: 339-344, 2001.
52. LEE P P y PANG S F. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol. Sig.* 1993. 2: 181-193. 1993.
53. LEFKOWITZ R J. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (8): 413-422. 2004.
54. LERNER A B y Case J D. Melatonin. *Fed. Proc.*, 19: 590-593, 1960.

-
55. LERNER A B y Takahashi Y. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 80:2587-2595, 1958.
 56. LEVINE R R. *Farmacología. Acciones y reacciones medicamentosas*. Editorial Salvat. 1982 España. pp. 12-22.
 57. LEVITAN I B. Signaling protein complex associated with neuronal ion channels. *Nature Neuroscience*. 9: 305-311, 2006.
 58. LOCK B G y PANDIT K. Is Flumazenil an Effective Treatment for Hepatic Encephalopathy? *Ann. Emer. Med.* 2006. 47(3): 286-288. 2006.
 59. MACCHI M M y Bruce J N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.* 25: 177-195. 2004.
 60. MAHLE C D y TAKAKI K S. Melatonin Receptor Ligands and Their Potential Clinical Applications. *Annual Reports in Medicinal Chemistry-32*. Academic Press. Inc. Chapter 4, pp. 31-39. 1997.
 61. MAILLIET F. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT₃. *FEBS Letters* 578: 116-120, 2004.
 62. MARQUES de CANTÚ M J. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas*. Edit. Mc Graw-Hill. México. 1991.
 63. MERLE A. 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.
 64. MESSNER M. Tissue retention and subcellular distribution of continuously infused melatonin in rats under near physiological conditions. *J. Pineal Res.* 25: 251-259, 1998.
 65. MOTILVA V y CABEZA J. New Issues about Melatonin and its Effects on the Digestive System. *Curr. Pharm. Des.* 7: 909-931. 2001.
 66. NARANJO-RODRÍGUEZ E B, Osornio A O, Hernández-Avita E, Mendoza-Fernández V and Escobar A. Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxitriptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 24(1):117-29, 2000.
 67. OKA M y WADA M. Functional expression of metabotropic GABA_B receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 341: 874-881. 2006.
-

68. PERICIC D. Chronic exposure of cells expressing recombinant GABA_A receptors to benzodiazepine antagonist Flumazenil enhances the maximum number of benzodiazepine binding sites. *Life Sci.* 76: 303-317, 2004.
69. POIRE V J. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 946: 64-71. 2002.
70. REITER R J y TAN D X. Neurally-Mediated and Neurally-Independent Beneficial Actions of Melatonin in the Gastrointestinal Tract. *J. Phys. Pharmacol.* 54(4): 113-125. 2003.
71. REITER R J. Anatomy of the pineal gland of the mammals. En: *The pineal*. Reiter, R. J. Edit. Eden Press. 6: 14-40, 1981.
72. ROGER-EVANS M y SPURR P. The isolation and use of a benzodiazepine iminochloride for the efficient construction of Flumazenil. *Tetrahed. Lett.* 2003. 44: 2425-2428. 2003.
73. ROMIJN H J. Parasympathetic innervation of the rabbit pineal gland. *Brain Res.*, 55: 431-436, 1973.
74. ROMIJN H. Is the pineal gland a tranquilizing organ? *Life Sci.*, 23:2257-2274, 1978.
75. SALLINEN P. The expression of MT₁ and MT₂ melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.* 76: 1123-1134, 2005.
76. SJÖBLOM M. Central nervous α 1-adrenoceptor stimulation induces duodenal luminal release of melatonin. *J. Pineal Res.* 36: 103-107, 2004.
77. SPIEGEL M R. STEPHENS, L. J. Estadística. Edit. Mc Graw-Hill. México 2002. 3a. Edición. 2002.
78. UNAM. Un interesante Contenido Farmacológico para Sesiones Experimentales. 2ª. Edición. 2004. México.
79. VAN DE GRAAFF. *Human Anatomy*. Sixth Edition. USA, 2002.
80. VELÁZQUEZ A. *Farmacología Básica y Clínica*. 17ª. Edición. Editorial Panamericana. España. 2005. pp. 59-73.
81. VIEIRA R y MÍGUEZ J M. GABA modulates day-night variation in melatonin levels in the cerebral ganglia of the damselfly *Ischnura graellsii* and the grasshopper *Oedapoda caerulescens*. *Neurosci. Lett.* 376: 111-115. 2005.

82. WALA E P. Flumazenil, diazepam, nordiazepam and oxazepam interactions on plasma protein binding. *Pharmacol. Res.* 32(5): 299-304, 1995.
83. WALA P E y SLOAN J W. Flumazenil, Diazepam, Nordiazepam and Oxazepam Interactions on Plasma Protein Binding. *Pharmacol Res.* 1995. 32(5): 299-305. 1995.
84. WANG F y LI J. The GABA_A receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74: 573-578. 2003.

Direcciones de Internet.

- I1. www.becomehealthynow.com
- I2. www.faqs.org/health
- I3. www.arbl.cvmbs.colostate.edu
- I4. www.pathology.mc.duke.edu
- I5. www.gabitril.com/physicians/patienteducation
- I6. www.neurosci.pharm.utole
- I7. www.usyd.edu.au/anaes/lectures/benzo1996
- I8. www.chsweb.ir.k12.nj.us/psidelsky/GItractmicro
- I9. www.leeds.ac.uk/library/adopt-a-book/descartes
- I10. www.astrosurf.org/lambry/documents

10.1. MATERIAL TECNOLÓGICO.**Cámaras para estudio “In Vitro” convencionales. Marca: PYREX.**

Características: Las cámaras están fabricadas con vidrio de borosilicato transparente con una doble pared y en cuyo espacio circula agua a 37° C, en la cual se mantiene una temperatura uniforme. Dichas cámaras están interconectadas por tubos de látex a un baño de agua con recirculación y montadas a un soporte mediante pinzas de tres dedos.

Condiciones adicionales: Las cámaras fueron recubiertas con papel aluminio por el lado brillante para refractar el calor y evitar disipación de la temperatura en la cámara.

Recirculador de agua. Marca: NESLAB.

Características: Baño de agua de acero inoxidable con capacidad para diez litros, equipado con una bomba la cual permite una circulación de agua de forma uniforme. Control digital y termostato de temperatura la cual ofrece una precisión de hasta 1 décima de grado centígrado de forma constante por largos períodos de tiempo.

Condiciones adicionales: Temperatura programada en 37° C +/- 2° C.

Transductores de fuerza isométrica. Marca: GRASS Inc.

Modelo: FT03C

Componentes: Transductor y cable GRASS TAC-7

Características: Los transductores están fabricados en aluminio. Ofrecen bajo nivel de resistencia eléctrica y gran precisión debido a la tecnología de fotocelda interna que realiza la función de sensor de movimiento (4).

Condiciones adicionales: se encuentran montados de forma individual y firmemente en una base de bronce la cual cuenta con un tensor milimétrico. El cable se conecta a la entrada

del PREamplificador. La conexión cuenta con 6 pines y una tuerca de seguridad, para evitar que se desconecte accidentalmente.

Función: Convierten la tensión producida por el tejido muscular en un voltaje de forma proporcional a la tensión que se detecta.

10.2. MANEJO DEL POLÍGRAFO.

Marca: GRASS Inc.

Modelo: 7

El polígrafo, es un instrumento de registro que ha sido diseñado para registrar una gran variedad de fenómenos fisiológicos, con el se pueden efectuar estudios, con mayor precisión en una fracción de tiempo determinada. Con este equipo se pueden obtener simultáneamente registros directos en tinta de tres o más variables fisiológicas. No existe restricción en cuanto al tipo de registro a realizar, es posible realizar cualquier tipo de variables simultáneamente con la señal eléctrica que las acompaña. El principio en el cual se basa el polígrafo es el mismo que se usa para cualquier registro de información variable con respecto al tiempo (4).

Componentes del polígrafo:

En el sistema de registro se distinguen los siguientes componentes básicos que lo constituyen, cada uno posee una función especial y característica distintiva.

- 1) PRE-amplificador.
- 2) Amplificador.
- 3) Carta de registro.
- 4) Transductores.
- 5) Interfase.

Características: El polígrafo esta compuesto de tres partes principales. Consta de un panel sobre el cual están montados un preamplificador (modelo 7P1F) y un amplificador, este conjunto constituye una unidad o canal de adquisición de datos, para realizar nuestros experimento utilizamos cuatro canales, registrando la información proveniente de las cuatro cámaras para el estudio “In Vitro” convencionales, que contienen las muestras de tejido individuales. Además cuenta con una hoja de registro en la cual las plumillas trazan la información proveniente de los amplificadores. La velocidad de avance del papel también puede ser controlada (4).

Pre-amplificador.

Marca: GRASS Instrument Company.

Modelo: 7P1

Funciones: Permite preseleccionar la señal que será registrada con todas sus características

Características: Exactitud, alta ganancia, bajo ruido eléctrico, baja frecuencia, conexión DC (corriente continua) (3).

Funciones (3):

- Provee controles de balance y de calibración para los transductores indicadores de tensión para registrar: volumen, desplazamiento, tensión muscular, presión sanguínea, pulso, respiración, movimiento, etc.
- El amplificador DC permite el registro de potenciales DC, temperatura por medio de termopares, tensión de oxígeno con un electrodo de platino y muchos otros fenómenos DC.

- El amplificador permite registrar Electro Encefalogramas (EEG), electrocardiograma (ECG) y respiración, etc.

Especificaciones Técnicas (3):

Calibración: 2 mV DC manualmente generada al presionar un botón con +/- 2% de exactitud.

Selección de la impedancia de entrada: $1M\Omega$, $20K\Omega$, $2K\Omega$

Sensibilidad: Ajustable de 0.01 a 20 mV/cm. en las plumillas.

Balance de voltaje: +/- 120 mV DC, +/- 2% precisión.

Control grueso = 10mV/ cada paso

Control fino = 1 mV / cada vuelta, 10 Turnos.

Amplificador.

Marca: GRASS

Modelo: DC Driver Amplifier 7DA

Este amplificador básico se le conoce técnicamente como amplificador de acoplamiento directo. Su operación consiste en el manejo de la amplitud (sensibilidad) y posición y centrado de las plumillas inscriptotas de la carta de registro del polígrafo. Además ambos pueden ser regulados independientemente (2).

Funciones (2):

- Sensibilidad: Estándar 50 mV/ cm.
- Ajustable: desde 30 mV/ cm. a 250 mV/ cm. de deflexión de las plumillas inscriptotas.
- Calibración: Generada manualmente a 100 mV activando el botón “Driver Cal” ubicado en la fuente de poder.
- Línea basal: ajustable sobre 5 cm. en dirección ascendente y descendente.

- Salidas: Conexiones coaxiales J7 y J6A.

Código de colores de los controles:

Dorado = Sensibilidad.

Negro = calibración de línea basal.

Plateado = Filtro de frecuencia y poder.

Manejo de Amplificador.

Interruptor general.

Interruptor de encendido y apagado para el oscilógrafo (polígrafo) individual del amplificador. Este interruptor debe estar colocado en la posición de Standby para colocar al oscilógrafo en una condición de apagado temporal. En la posición de Standby el pre-amplificador y el amplificador funcionan normalmente por lo que la información de las salidas coaxiales puede ser registrada por la computadora, aunque el oscilógrafo este apagado. Cuando el interruptor se coloca en la posición “ON” el oscilógrafo comienza a registrar instantáneamente (2).

Interruptor de polaridad y botón de calibración.

Para amplificar señales del preamplificador el interruptor de polaridad debe estar en la posición USE. La posición CAL o de calibración se usa durante el proceso de calibración del amplificador para ajustar el control de la línea basal. Tanto en la posición UP CAL y DOWN CAL la salida del preamplificador es desconectada desde la entrada del amplificador.

El interruptor DRIVER CAL cuando se oprime introduce 100 mV a la entrada del amplificador cuando el interruptor de polaridad esta en la posición CAL.

Control de Sensibilidad. El control de sensibilidad alterna la sensibilidad del amplificador. La sensibilidad recomendada es de 50 mV/ cm. (100 mV = 2 cm.).

Control de la posición de la línea basal. El control de posición de línea basal, coloca a la plumilla con respecto al eje del cero mecánico. Cuando este control se gira hacia las manecillas del reloj las plumillas se mueven hacia arriba; cuando este se gira contra de las manecillas del reloj las plumillas se mueven hacia abajo. La línea basal deseada debe ser establecida con el interruptor de polaridad del amplificador en la posición de CAL (2).

Carta de registro del Polígrafo.

Compuesta por una extensa hoja milimétrica, un panel con 8 plumillas, selector de velocidad de avance de la hoja, depósitos individuales de tinta, e interruptor de encendido y avance de hoja (4).

Componentes (4).

- Panel de plumillas. Las 8 plumillas están montadas sobre un soporte, conectado directamente a los galvanómetros que están por debajo del panel. Las plumillas inscriptotas se conectan por medio de pequeñas mangueras a los depósitos de tinta.
- Selector de velocidad. Se encuentra localizado en la parte frontal del panel. Este permite seleccionar la velocidad de avance de la hoja en mm/min. o mm/seg.
- Depósitos de tinta. Se localizan sobre el panel alineados de lado derecho. Se recomienda no sobre llenar los depósitos y no dejar las plumillas sin tinta.
- Interruptor de encendido. Mediante una palanca puede seleccionar tres posiciones a) Apagado, b) Avance de la hoja de registro c) Avance de la hoja y movimiento de plumillas.

Interfase de enlace polígrafo-computadora.

Marca: GRASS

Modelo: PVA 1

Descripción: Conexión de tipo coaxial para 8 canales de entrada y 2 salidas.

La interfase enlaza la salida del amplificador con el CPU de la computadora que monitorea en tiempo real los datos, utilizando el programa PolyView (5).

10.3. PROCEDIMIENTO PARA LA CALIBRACIÓN DEL POLÍGRAFO GRASS Inc.

Modelo 7 (2, 3, 4).

- 1) Colocar el selector *Input* en la posición de *Bridge 2K*.
- 2) El selector de *Balance voltaje* debe estar en 40 MV. En este paso la línea basal debe conservarse en la posición seleccionada previamente. En caso contrario utilizar el selector de *Balance voltaje fino* hasta que la línea basal corresponda a nuestra línea original.
- 3) Colocar el selector de *Sensitivity* en 0.5 MV/ cm.
- 4) Colocar la pesa de un gramo en el ganchillo del transductor. En este momento la plumilla debe ascender 2 cm. exactamente. Por lo tanto un gramo de fuerza corresponden a 2 cm. de desplazamiento (1 g = 2 cm.)
- 5) En caso de que el margen de 2 cm. no sea completado o bien sea rebasado ajustar con el selector de *ADJ CAL*, hasta completar el margen de 2 cm.

Repetir esta operación para cada canal. Una vez realizada, la calibración esta completa y no es necesario calibrar nuevamente cada vez que se utilice el equipo (4).

10.4. MANEJO DEL SOFTWARE POLYVIEW (5).

Marca: GRASS Inc.

Modelo: Versión 2.0

Características:

Este tipo de software debido a sus características multifuncionales ofrece una gran herramienta para el experimento. Puede ser grabado el registro de datos en tiempo real en una pantalla desplegada en la computadora semejante a la hoja tradicional de registro del polígrafo, en esta pantalla puede ser seleccionada la velocidad de registro de datos, colores distintivos para cada canal. Una vez terminado el registro los datos pueden ser analizados individualmente para obtener los siguientes parámetros: Área bajo la curva (ABC), Frecuencia (FREC) y Amplitud (AMP).

Almacenamiento de datos.

Los datos pueden ser almacenados en el disco duro de la computadora o en otro dispositivo de datos periférico, teniendo así capacidad de almacenamiento ilimitada, también se pueden guardar segmentos de registros de nuevos archivos.

Características mínimas que debe reunir el hardware:

- Procesador Pentium o superior
- 16 MB RAM
- Monitor Color SVGA
- CD-ROM
- Windows Graphics acelerador
- Windows 95

Almacenamiento de datos (modo de grabación).

- 1) En la pantalla principal de inicio, seleccionar “Todos los Programas” a continuación “GRASS Instruments” y posteriormente en la ventana principal del programa, seleccionar el icono del grabador de 4 canales.
- 2) Aparecerá el cuadro de diálogo de *Select Name*, en *File Name*:
Se despliega *DATA.BIN* (este deberá ser reemplazado con el nombre del archivo que deseemos asignarle, conservando la extensión del archivo preestablecida por el software).
- 3) La ventana de *SET UP Acquisition* aparecerá enseguida, se deberá asignar el tiempo de duración del registro e ingresar valores de muestreo.
- 4) La ventana de *Channel Set Up y Calibration* aparece posteriormente. Se debe indicar los parámetros para la adquisición de datos y definir la fuente de datos, así como la presentación de cada canal.

Nota: Puede ser creada una carpeta por cada registro, dentro de la carpeta general de datos en el software PolyView.

Una vez que se ha completado el *SET UP*, el equipo de cómputo, está listo para almacenar sus datos presionando *OK*, en la ventana de *Recorder*. De este modo se ingresa al monitoreo en tiempo real.

Monitoreo de Datos.

En modo monitor:

- Se muestran las señales procedentes del polígrafo ya digitalizadas.
- Ejecuta la conversión de unidades y calibración de la escala Y.

- Aplica cualquier función extra de procesamiento de señal DSP (digital signals processing).
- Muestra las señales en la pantalla de la computadora.

LOS DATOS NO SERÁN GRABADOS NI REGISTRADOS EN LA MEMORIA DE LA COMPUTADORA, HASTA QUE SE ACTIVE EL BOTÓN DE **STORE**. EL BOTÓN CAMBIARA INTERMITENTEMENTE A AMARILLO Y SE LEERA “ALMACENANDO” (5) (4).

10.5. MATERIAL REACTIVO.

MEL. (N-acetil-5-metoxitriptamina). Laboratorio: SIGMA

Condiciones: Se debe mantener en refrigeración de 2-7C° y protegida de la luz antes y durante su uso.

GABA (ácido gama-amino butírico). Laboratorio: SIGMA

Condiciones: Se debe mantener en su empaque original en un lugar fresco y seco alejado de la luz directa.

FLU (Flumazenil). Laboratorio: SIGMA

Condiciones: Se debe mantener en refrigeración de 2-7°C y protegida de la luz antes y durante su uso.

Carbógeno. Marca: INFRA

Composición: 98% Oxígeno, 2% dióxido de carbono.