



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

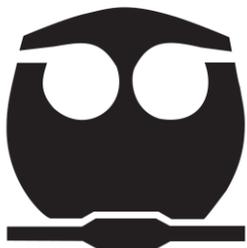
“DETERMINACIÓN DEL EFECTO MIOCONTRÁCTIL O
MIORELAJANTE DE UN NEUROPEPTIDO OBTENIDO DEL
PULPO ROJO MEXICANO EN ESTUDIO *IN VITRO* (ÍLEON DE
RATA)”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

JANETH LEDEZMA NUÑEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PROFESORES

PRESIDENTE: M.V.Z ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ

VOCAL: QFB. MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO

SECRETARIO: DR. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

1er. SUPLENTE: DRA. VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

2° SUPLENTE: DRA. RUTH BUSTAMANTE GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

BIOTERIO 5° PISO, EDIFICIO "A", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. RUTH BUSTAMANTE GARCÍA

SUSTENTANTE:

JANETH LEDEZMA NUÑEZ

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con No. TA200314, titulado “Aislamiento de neuropéptidos presentes en la saliva del pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*) y su evaluación como posible fármaco en el mal del Alzheimer”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
índice de figuras	i
índice de tablas	ii
Abreviaturas	iii
1	Resumen 1
2	Generalidades 2
2.1	Neuropéptido (NP) 2
2.1.1	Concepto de neuropéptido 2
2.1.2	Características estructurales y acción 3
2.1.3	Biosíntesis 3
2.1.4	Familias de neuropéptidos 7
2.1.5	Sinapsis peptidérgica: Liberación, receptores y degradación 7
2.1.5.1	Degradación de neuropéptidos: Peptidasas 11
2.1.6	Neuropéptidos: Oportunidad para el descubrimiento de fármacos 11
2.2	Moluscos como modelo en el estudio de los neuropéptidos 12
2.2.1	Cefalópodos 13
2.2.1.1	Importancia del Pulpo maya o rojo (<i>Octopus maya</i>) 13
2.2.1.1.1	Aspectos Biológicos 14
2.2.1.1.2	Taxonomía 15
2.2.1.1.3	El pulpo rojo como modelo de investigación y fuente de un nuevo agente terapéutico 15
2.3	Modelo <i>in vitro</i> para la evaluación del efecto del NP y la concentración efectiva 50 (CE ₅₀) 16
2.3.1	Estudio <i>in vitro</i> en íleon aislado 17
2.3.2	Intestino delgado de rata 17
2.3.2.1	Músculo liso 19
2.3.2.2	Principios generales de la motilidad gastrointestinal 20
2.3.2.2.1	Actividad eléctrica del músculo liso gastrointestinal 20
2.3.2.2.2	Cambios de voltaje del potencial de membrana en reposo 22
2.3.2.2.3	Excitación del músculo liso visceral por distensión muscular 23
2.3.2.2.4	Base física de la contracción del músculo liso 23
2.3.2.2.5	Base química de la contracción del músculo liso 24
2.3.2.2.6	Contracción tónica 25
2.3.2.2.7	Tipos funcionales de movimientos en el tubo digestivo 26
2.3.2.2.7.1	Movimientos propulsivos: Peristaltismo 26
2.3.2.2.7.2	Movimientos de mezcla y segmentación 27
2.3.2.2.8	Control hormonal de la motilidad gastrointestinal 28
2.3.2.2.9	Control nervioso de la función gastrointestinal 29
2.3.2.2.9.1	Sistema Nervioso Entérico (SNE) 29
2.3.2.2.9.2	Sistema Nervioso Autónomo (SNA) 30
2.3.2.2.9.3	Vías reflejas digestivas 31
2.3.2.2.9.4	Neurotransmisores y neuropéptidos presentes en el SNE 31
2.3.2.2.9.4.1	Acetilcolina (ACh) 32
2.3.2.2.9.4.2	Serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) 34
2.3.2.2.9.4.3	Adenosin Trifosfato (ATP) 35
2.3.2.2.9.4.4	Catecolaminas: Noradrenalina (NA) y Dopamina (DA) 36
2.3.2.2.9.4.5	Histamina 37
2.3.2.2.9.4.6	Glutamato (GLU) 38
2.3.2.2.9.4.7	Ácido γ -Aminobutírico (GABA) 39
2.3.2.2.9.4.8	Óxido Nítrico (NO) 41
2.3.2.2.9.4.9	Canabinoides (CBS) 41
2.3.2.2.9.4.10	Sustancia P (SP) 42
2.3.2.2.9.4.11	Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) 42
2.3.2.2.9.4.12	Somatostatina (SST) 42
2.3.2.2.9.4.13	Neuropéptido Y (NPY) 43

2.3.2.2.9.4.14	Péptidos Opioides	44
2.4	Farmacometría: Curva Dosis Respuesta	45
2.4.1	Curva Dosis Respuesta Gradual	45
2.4.2	Curva Dosis Respuesta Cuantal	46
3	Justificación	50
4	Objetivos	52
4.1	Objetivos generales	52
4.2	Objetivos particulares	52
5	Hipótesis	53
6	Material y métodos	54
6.1	Esquema general de trabajo	54
6.2	Material	55
6.2.1	Instrumentos, equipo y material	55
6.2.2	Reactivos químicos	55
6.2.3	Material biológico	56
6.2.3.1	Neuropéptido	56
6.2.3.2	Animales de experimentación	56
6.3	Métodos	56
6.3.1	Estudio piloto (<i>in vivo</i>)	56
6.3.2	Estudio <i>in vitro</i>	59
6.3.2.1	Preparación de soluciones de Ach, NP total, fracciones M6 y M7 del NP y solución fisiológica de Tyrode	59
6.3.2.2	Preparación del equipo, cámara de órganos aislados y evaluación farmacológica de las diferentes soluciones de Ach, NP total y fracciones del NP	59
7	Resultados	65
7.1	Estudio piloto (<i>in vivo</i>)	65
7.1.1	Determinación del efecto del NP total y la DE ₅₀ asociada	65
7.2	Estudio <i>in vitro</i>	70
7.2.1	Determinación del efecto del NP total y sus fracciones, la CE ₅₀ y la C _{max} asociadas	70
8	Discusión	82
9	Conclusiones	87
10	Referencias	88
11	Anexos	91
11.1	Anexo 1	91
11.2	Anexo 2	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos celulares de síntesis y liberación de los neuropéptidos	4
Figura 2. Síntesis de un Neuropéptido	5
Figura 3. Dibujo esquemático de una sinapsis	8
Figura 4. Mecanismos de inactivación extracelular de los neuropéptidos	10
Figura 5. La sustancia P y su antagonista MK-869	12
Figura 6. Distribución endémica de la población del pulpo <i>O. maya</i>	13
Figura 7. Fotografía de un espécimen de pulpo rojo <i>O. maya</i> y su monumento en isla Arenas, Campeche	14
Figura 8. Las cuatro capas que componen el intestino delgado de rata	18
Figura 9. Fibras musculares lisas unitarias (viscerales)	19
Figura 10. Potenciales de membrana del músculo liso intestinal	21
Figura 11. Estructura física del músculo liso	24
Figura 12. Fibra muscular lisa relajada y contraída	25
Figura 13. Movimiento de peristaltismo del intestino delgado	27
Figura 14. Movimientos de segmentación del intestino delgado	28
Figura 15. Organización del SNE y como se relaciona con el SNA y SNC	30
Figura 16. Receptores de la Ach	33
Figura 17. El principal papel de los receptores de serotonina en el tracto GI	35
Figura 18. Receptor de histamina H ₁	38
Figura 19. Representación esquemática del receptor GABA _A y sus subunidades	40
Figura 20. Curvas dosis respuesta gradual	46
Figura 21. Gráficas cuánticas de dosis efecto	47
Figura 22. Transformación de una curva sigmoidea dosis respuesta cuantal en una recta	49
Figura 23. Diagrama general de trabajo	54
Figura 24. Diagrama del procedimiento seguido para realización del estudio <i>in vivo</i> (piloto)	58
Figura 25. Equipo de prueba para el modelo de íleon aislado de rata	61
Figura 26. Ejemplo de los registros gráficos típicos proporcionados por el fisiógrafo y los componentes para obtener el porcentaje de contracción	62
Figura 27. Longitud y velocidad de onda	63
Figura 28. Diagrama del procedimiento seguido para la realización del estudio <i>in vitro</i>	64
Figura 29. Curva dosis respuesta cuantal para el efecto de sedación del NP total de <i>O. maya</i> en ratones	66
Figura 30. Latencia de sedación del NP total de <i>O. maya</i> en ratones	67
Figura 31. Curva dosis respuesta cuantal para el efecto de contracción del NP total de <i>O. maya</i> en ratones	68
Figura 32. Latencia de contracción del NP total de <i>O. maya</i> en ratones	69
Figura 33. Gráfico del porcentaje de contracción en íleon de Rata tras la administración de SSI	70
Figura 34. Efecto de la SSI sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	71
Figura 35. Curva dosis respuesta gradual control de Ach	72
Figura 36. Efecto de la Ach sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	73
Figura 37. Curva dosis respuesta gradual para el efecto del NP total de <i>O. maya</i> sobre íleon de rata	74
Figura 38. Efecto del NP total de <i>O. maya</i> sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	75
Figura 39. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de la fracción M6 del NP de <i>O. maya</i> sobre íleon de rata	76
Figura 40. Efecto de la fracción M6 del NP de <i>O. maya</i> sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	77
Figura 41. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de la fracción M7 del NP de <i>O. maya</i> sobre íleon de rata	78
Figura 42. Efecto de la fracción M7 del NP de <i>O. maya</i> sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	79
Figura 43. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de SSI, Ach, NP total, M6 y M7 sobre íleon de rata.	80
Figura 44. Comparación del efecto de SSI, Ach, NP total, M6 y M7 sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Neurotransmisores y neuropéptidos en el SNE, receptores y efectos en el músculo liso del intestino	32
Tabla 2. Lista de instrumentos, equipo y material	55
Tabla 3. Lista de reactivos químicos	55
Tabla 4. Distribución de los ratones en grupos y su correspondiente dosis administrada de solución de NP	57
Tabla 5. Distribución de las ratas en grupos y la correspondiente sustancias agregadas	60
Tabla 6. Resultados obtenidos del experimento piloto (<i>in vivo</i>)	65
Tabla 7. Tabla de conversión de porcentajes en unidades de probabilidad (Probits)	91
Tabla 8. Componentes y cantidades para la elaboración de la solución Tyrode	96

ABREVIATURAS

α_1 y α_2	Receptores adrenérgicos alfa tipo 1 y 2 respectivamente
α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}	Receptores adrenérgicos alfa tipo 1 subtipo A, B y D respectivamente
α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}	Receptores adrenérgicos alfa tipo 2 subtipo A, B y C respectivamente
β_1 , β_2 y β_3	Receptores adrenérgicos beta tipo 1, 2 y 3 respectivamente
α -MSH	Hormonas estimulantes de melanocitos (del inglés, Melanocyte-Stimulating Hormones)
5-HT	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
5-HT ₁ , 5-HT ₂ , 5-HT ₃ , 5-HT ₄ , 5-HT ₅ , 5-HT ₆ y 5-HT ₇	Receptores de Serotonina tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente
%	Por ciento
-	Menos
±	Más menos
°C	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
ACTH	Hormona Adrenocorticotrófica (del inglés, Adrenocorticotropic Hormone)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario o copia
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionico (del inglés, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
Arg	Arginina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de Adenosina (del inglés, Adenosine Triphosphate)
Ca ²⁺	Ion Calcio
CBS	Canabinoides
CB ₁ y CB ₂	Receptores de Canabinoides tipo 1 y 2 respectivamente
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCK	Colecistocinina (del inglés, Cholecystokinin)
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
cm	Centímetros
D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ y D ₅	Receptores de Dopamina tipo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DE ₅₀	Dosis Efectiva 50
DE ₉₉	Dosis Efectiva 99
DL ₁	Dosis Letal 1
DL ₅₀	Dosis Letal 50
E _{máx}	Eficacia Máxima
DT ₅₀	Dosis Tóxica 50
EC	Células Enterocromoafines
EE.UU.	Estados Unidos de América (del inglés, United States of America)
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos (del inglés, Food and Drug Administration)
fEPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios rápidos (del inglés, Fast Excitatory Postsynaptic Potentials)
g	Gramo
GABA	Ácido γ - Aminobutírico (del inglés, Gamma Amino Butyric Acid)
GABA _A , GABA _B y GABA _C	Receptores de GABA tipo A, B y C respectivamente
GAD	Glutamato Descarboxilasa (del inglés, Glutamate Descarboxylase)
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
GI	Gastrointestinal

G _i	Proteína G inhibidora
GIP	Péptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa (del inglés, Gastric Inhibitory Polypeptide)
Glu	Glutamato
GluR ₁ , GluR ₂ , GluR ₃ y GluR ₄	Receptores AMPA tipo 1, 2, 3 y 4 respectivamente
GluR ₅ , GluR ₆ , GluR ₇ , K _{A1} y K _{A2}	Receptores Kainato GluR tipo 5, 6, 7 y K tipo A subtipos 1 y 2 respectivamente
GMPc	Guanosin Monofosfato Cíclico
G _o	Proteína G que inhibe los canales de calcio
G _q o G _{q/11} o G ₁₁	Proteína G que activa la fosfolipasa C
G _s	Proteína G estimuladora
H ₁ , H ₂ y H ₃	Receptores de Histamina tipo 1, 2 y 3 respectivamente
H	Horas
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP	Intraperitoneal
IT	Índice Terapéutico
K ⁺	Ion potasio
Kg	Kilogramos
LC-MS	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso (del inglés, Large Dense Core Vesicles)
Lys	Lisina
µm	Micrómetros
µg	Microgramos
M ₂ y M ₃	Receptor muscarínico M tipo 2 y 3
M	Metros
mAChR	Receptores muscarínicos
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (del inglés, Mucosa Associated Lymphoid Tissue)
MAPK o MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (del inglés, Mitogen Activated Protein Kinases)
MCH	Hormona concentradora de melanina (del inglés, melanin concentrating hormone)
MI	Motilidad intestinal
min	Minutos
mL	Mililitros
MLI	Músculo Liso Intestinal
mg	Miligramos
mGlu ₁ , mGlu ₂ , mGlu ₃ , mGlu ₄ , mGlu ₅ , mGlu ₆ , mGlu ₇ y mGlu ₈	Receptores metabotrópicos de Glutamato tipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
MS	Margen de Seguridad
Na ⁺	Ion sodio
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptores Nicotínicos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NK ₁ y NK ₂	Receptores de la Sustancia P tipo 1 y 2 respectivamente
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR ₁ o NR ₁	Familia NMDA tipo 1
NMDAR ₂	Familia NMDA tipo 2
NMDAR _{2A} (NR _{2A}) y NMDAR _{2B} (NR _{2B})	Familia NMDA tipo 2 subtipo A y B respectivamente
NO	Óxido Nítrico (del inglés, Nitric Oxide)
NOM	Norma Oficial Mexicana
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa (del inglés, Nitric Oxide Synthases)
NP	Neuropéptido
NP _s	Neuropéptidos
NPY	Neuropéptido Y
<i>O. maya</i>	<i>Octopus maya</i>
<i>O. vulgaris</i>	<i>Octopus vulgaris</i>
P ₁ P ₂	Fosfatidil Inositol 4,5 bifosfato
P _{2X} y P _{2Y}	Receptores purinérgicos o de ATP tipo 2 subtipo X y tipo 2 subtipo Y

	respectivamente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)
pH	Potencial de Hidrogeno
PHM-27	Péptido Histidina Metionina-27
PKA	Proteína cinasa A
POMC	Proiomelanocortina
PROBIT	Unidades de Probabilidad (del inglés, Probability Unit)
RER	Reticulo Endoplásmico Rugoso
s	Segundos
sEPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios lentos (del inglés slow Excitatory Postsynaptic Potentials)
sGC	Guanilato Ciclasa Soluble (del inglés, soluble Guanylyl Cyclase)
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
SP	Sustancia P
SST	Somatostatina
SSI	Solución salina isotónica
SST-14	Somatostatina formada por 14 aminoácidos
SST-28	Somatostatina formada por 28 aminoácidos
SST ₁ , SST ₂ , SST ₃ , SST ₄ y SST ₅	Receptores de Somatostatina tipo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente
SSV	Vesículas sinápticas pequeñas (del inglés, Small Sinaptic Vesicles)
TK	Tirosina cinasa (del inglés, Tyrosine Kinase)
TSH	Hormona liberadora de Tirotopina (del inglés, Thyroid Stimulating Hormone)
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo (del inglés, Vasoactive Intestinal Peptide)
vs	Versus
Y ₁ , Y ₂ y Y ₄	Receptores de Neuropeptido Y tipos 1, 2 y 4 respectivamente

Capítulo 1. Resumen

La farmacología se ha ocupado tradicionalmente del estudio de moléculas de bajo peso molecular y de naturaleza no peptídica. Sin embargo, desde los años setenta, se ha implantado la idea de que, como moléculas de señalización, el estudio de los péptidos es al menos tan importante como aquellas. Mientras que el descubrimiento de nuevos mediadores de bajo peso molecular prácticamente se ha agotado, el de mediadores peptídicos (en concreto, los neuropéptidos) continúa creciendo a gran velocidad. Así se han constituido como 'blancos' terapéuticos atractivos para el desarrollo de nuevos medicamentos, provocando un enorme interés en la industria farmacéutica en las últimas décadas. El elevado número de Neuropéptidos existentes hace suponer que las funciones en las que intervienen son muy diversas (nocicepción, analgesia, ingesta de alimentos, regulación agua/sodio, regulación del sistema inmune, regulación de la reproducción y del comportamiento sexual, control cardiovascular, respiratorio, auditivo y visual; regulación de la glucosa, etc.). En *O. maya* (llamado también pulpo rojo), a partir de su saliva se han extraído moléculas bioactivas de la parte neurotóxica con efecto paralizante y del cual se ha podido fraccionar y obtener un neuropéptido (en proceso de secuenciación). En el presente trabajo se probó el efecto de dicho neuropéptido y de sus fracciones M6 y M7 sobre mamífero; obteniéndose que el neuropéptido total provocó un efecto bifásico dosis dependiente en estudio *in vivo* en ratones CD1 con una DE_{50} de 0.736 mg/Kg (efecto de sedación) y DE_{50} de 0.747 mg/Kg (efecto de contracción) mientras que en estudio *in vitro* en íleon de rata Wistar se obtuvo una CE_{50} de 2.33 μ g/mL y C_{max} 16.07 μ g/mL. Para la fracción M6 se presentó un efecto contráctil sobre el íleon de rata con una CE_{50} de 1.71 μ g/mL y C_{max} 63.81 μ g/mL. En el caso de la fracción M7 esta presentó un efecto bifásico sobre el íleon de rata con una CE_{50} de 2.03 μ g/mL y C_{max} 30.20 μ g/mL. Concluyendo que tanto el neuropéptido total como las fracciones M6 y M7 tienen efectos sobre musculo liso que son dependientes de la dosis.

Capítulo 2. Generalidades

2.1 Neuropéptido (NP)

A principios de 1970 se utilizó el término "neuropéptido" por primera vez por David de Wied para péptidos relacionados con las hormonas peptídicas, pero con actividad biológica no endocrina en el cerebro (Burbach, 2010 y Merighi, 2011).

Los neuropéptidos (NP_s) se producen en todo el reino animal. En mamíferos estos son codificados por más de 70 genes en sus genomas y están ampliamente distribuidos en su sistema nervioso central (Hokfelt, 2000; Burbach, 2010; Duque, 2009 y Meringhi, 2011).

Los NP_s participan en varias funciones como son: nocicepción y analgesia, ingesta de alimentos, regulación agua/sodio, regulación del sistema inmune, regulación de la reproducción y del comportamiento sexual, regulación del desarrollo, termorregulación, control cardiovascular, respiratorio, auditivo y visual, respuesta al estrés, aprendizaje, memoria, conducta, control del sueño, regulación de la glucosa, ansiedad, inflamación, regulación gastrointestinal, regulación del páncreas y de los riñones, control neuroendocrino, controlan la liberación de neurotransmisores clásicos, ejercen una acción antimicrobiana, ejercen acciones neurotróficas, actúan como neuroprotectores y ejercen una acción mitogénica sobre las células tumorales (López-García, 2002 y Duque, 2009).

2.1.1 Concepto de neuropéptido

Un NP es una pequeña sustancia proteínica producido por las neuronas, liberada en una manera regulada y que actúa sobre sustratos neurales, por ejemplo, neuronas, células gliales, o células diana no neuronales, por ejemplo, una glándula o músculo (Burbach, 2010).

2.1.2 Características estructurales y su acción

Los NP_s son moléculas formadas por cadenas cortas de aminoácidos (generalmente menos de 100). Además son sustancias neuroactivas que pueden actuar como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas. Así, la liberación de un determinado NP al espacio extracelular a partir de una neurona peptidérgica, implica que el NP puede ejercer:

- 1) Una acción neurotransmisora (se une a receptores localizados en el componente postsináptico próximo); es la denominada sinapsis química.
- 2) Una acción paracrina (neuromoduladora). El NP se une a sus receptores localizados en el componente postsináptico situado algo alejado del lugar en donde se liberó.
- 3) Una acción autocrina (neuromoduladora). El NP se une a los autorreceptores localizados en el componente presináptico.
- 4) Una acción fisiológica muy alejada del lugar en donde se liberó (neurohormona) (López-García, 2002 y Duque, 2009).

2.1.3 Biosíntesis

La síntesis de los NP_s (Figura 1), tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso (RER) del cuerpo neuronal, donde se forma un gran precursor, el pre-propéptido, que es el producto inicial del gen específico del NP. El pre-propéptido incluye una secuencia señal hidrofóbica (de 15 a 30 aa) en el extremo amino terminal para facilitar la translocación a través de la membrana del RER durante su síntesis (Flores, 2008 y López-García, 2002).

La secuencia de aminoácidos «pre» o «señal» (15-30 aa) es separada de la proteína incluso antes que se termine de sintetizar toda la molécula, merced a una metaloendopeptidasa de las cisternas del RER, formándose así el propéptido. Ésta es posteriormente vehiculada hacia el aparato de Golgi, donde se va acumulando en gránulos secretores; a lo largo de este proceso de transporte y almacenamiento granular, el propropéptido sufre modificaciones estructurales

(glucosilación, formación de puentes S-S y fosforilación) mediante enzimas específicas y sucesivos procesos de proteólisis que darán origen a los NP_s (Flores, 2008).

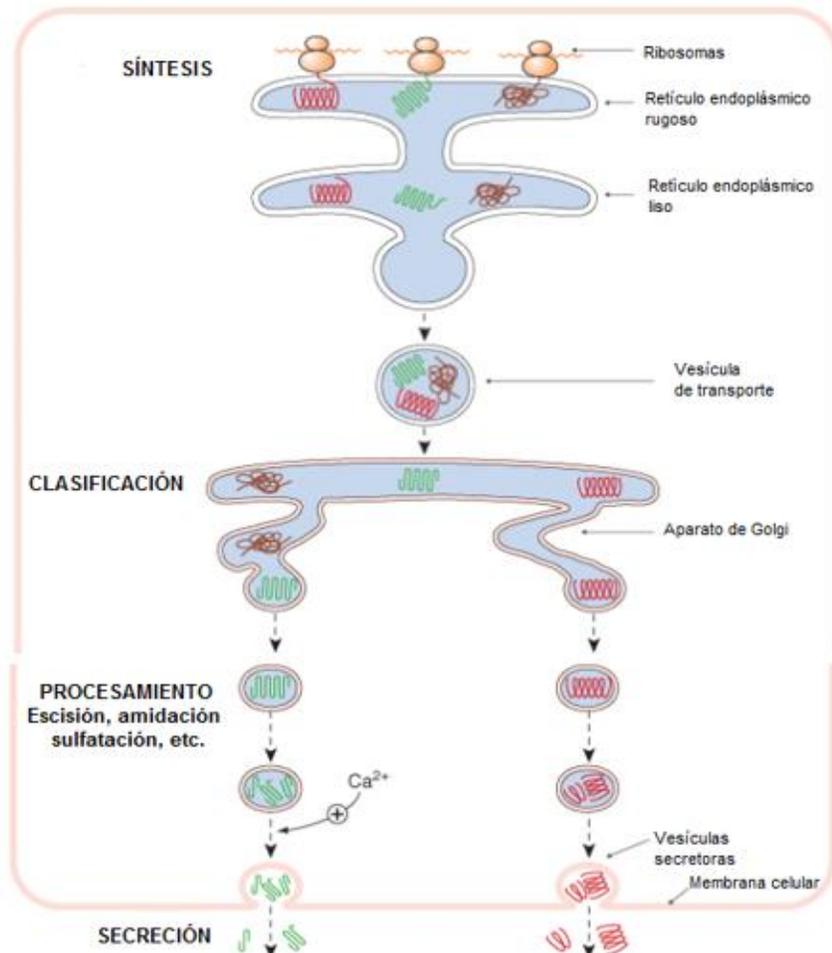


Figura 1. Mecanismos celulares de síntesis y liberación de los Neuropeptidos (NP_s). Los NP_s sintetizados por los ribosomas se enroscan a través de la membrana del Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), desde donde son enviados al aparato de Golgi mediante vesículas transportadoras. Allí se empaquetan en vesículas secretoras. El procesamiento (escisión, glucosilación, amidación, sulfatación etc.) tiene lugar en las vesículas de transporte y secretoras, y los productos son liberados de la célula por exocitosis (Rang, 2012).

Prácticamente todas las proproteínas poseen pares de aminoácidos básicos que flanquean las secuencias de NP_s que han de ser separadas (Figura 2). Los pares de residuos básicos más comunes son las secuencias Lys-Arg, Arg-Lys, Arg-Arg y Lys-Lys; estas parejas son divididas inicialmente por endopeptidasas y luego

actúan carboxipeptidasas que retiran los residuos básicos del lado C-terminal del péptido. A menudo los NP_s ya formados sufren transformaciones subsiguientes en las terminaciones N y C: amidación del C-terminal (en α-MSH, TRH, sustancia P y colecistocinina), acetilación del N-terminal (β-endorfina y α-MSH), ciclización del radical glutámico (TRH, gastrina y bombesina) o puede sulfatarse la tirosina (CCK) (Flores, 2008).

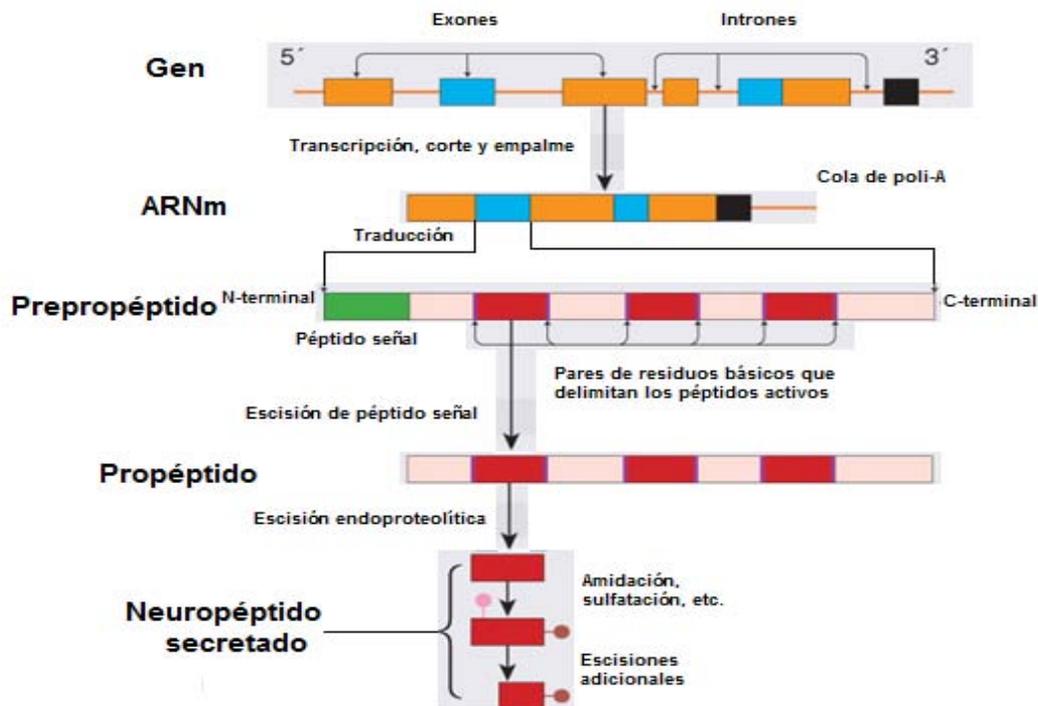


Figura 2. Síntesis de un Neuropéptido (NP). Las regiones codificadoras del gen (exones) se transcriben, cortan y empalman para dar lugar al Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm), segmentos del cual (azul) son traducidos para producir prepropéptidos. La escisión de la señal N-terminal da lugar al propéptido, a partir de la cual las endopeptidasas escinden fragmentos peptídicos. Estos pueden ser activos como tales o experimentar un procesamiento postraduccional (amidación, etc.) (Rang, 2012).

La actividad y la especificidad de las endopeptidasas y carboxipeptidasas son factores importantes porque de ellas dependen la rapidez, la cantidad y la naturaleza de la división de NP_s. Algunas son específicas de toda una familia de NP_s, mientras que otras muestran relativa inespecificidad. Así, por ejemplo, la carboxipeptidasa B procesa numerosos NP_s y hormonas, mientras que la

carboxipeptidasa E parece específica de la síntesis de encefalina (encefalina-convertasa), (Flores, 2008).

Existen propéptidos cuyo procesamiento origina varios NP_s activos. Esto significa que, en función de la presencia y la actividad de las enzimas procesadoras, una neurona puede dirigir la formación de NP_s en una dirección o en otra o modificar la cantidad formada de un determinado NP (Flores, 2008).

Las propéptidos se pueden agrupar en tres tipos diferentes, en función de los péptidos que generan:

- El primer tipo estaría constituido por aquellos propéptidos con duplicaciones de una secuencia idéntica. Entre ellos cabe destacar el precursor de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que contiene cinco copias de la hormona.
- El segundo grupo de propéptidos engloba aquellas que contienen secuencias relacionadas, como es el caso del péptido preprointestinal –que codifica para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y para el péptido histidina metionina-27 (PHM-27)–, la POMC –que codifica para la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y varias hormonas estimulantes de melanocitos y endorfinas–, la preprohipocreatina – precursora de los NP hipotalámicos descritos recientemente –la hipocreatina 1 y 2 –también denominadas orexina A y B–.
- Existe un tercer tipo de propéptidos que generan péptidos con funciones biológicas diferentes. Entre ellas se pueden citar la protacina A, de la que deriva la sustancia P (SP), y la neurocinina A. Sin embargo, la neurocinina B está codificada por un gen diferente, por lo que se demuestra que los NP_s de una familia específica pueden derivar de precursores diferentes (López-García, 2002).

Los propéptidos, por lo tanto, pueden dar lugar a una amplia variedad de NP_s necesarios para mediar distintas funciones fisiológicas. Sin embargo, éste no es el único mecanismo para crear diversidad en la producción de NP_s bioactivos. Todos los pasos que median la expresión de un gen codificante para un propéptido puede estar involucrado en la generación de diversidad, incluso la expresión de un

gen para un propéptido puede estar regulada diferencialmente en distintos tejidos. Las neuronas con el mismo gen codifican un propéptido que puede liberar distintos NP_s dependiendo de los diversos modos de procesar el precursor propéptido (López-García, 2002).

2.1.4 Familias de neuropéptidos

En un sentido amplio, los NP_s han sido agrupados en familias en base a diferentes criterios, tales como su localización anatómica, función biológica, la homología de secuencia y la derivación de un precursor común (Meringhi, 2002).

Naturalmente, cada variante significa un péptido diferente con propiedades fisiológicas y farmacológicas distintas, pero que indica la existencia de una homología transmitida desde el origen génico (Flores, 2008).

En ocasiones, los miembros de una familia neuropeptídica son expresión de genes diferentes con secuencias homólogas de bases, lo que hace suponer que estos genes derivan o son producto evolutivo de un gen ancestral común (Flores, 2008).

Otras veces, un mismo gen origina varios NP_s; en ocasiones, estos péptidos tienen secuencias homólogas, pero en otras no (Flores, 2008).

Las sinapsis peptidérgicas generalmente responden al mismo esquema que la sinapsis de los neurotransmisores clásicos (López-García, 2002). A continuación hablaremos sobre cómo se da esta.

2.1.5 Sinapsis peptidérgica: Liberación, receptores y degradación

En primer lugar se tiene que producir una despolarización de la terminal presináptica seguida de una apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) voltaje-dependientes que permite la entrada de este ion al interior de la neurona. Estos iones Ca^{2+} promueven la movilización de las vesículas que contienen al NP para finalmente fusionarse con la membrana plasmática. A continuación se debe producir la liberación del NP (López-García, 2002).

Los NP_s y los neurotransmisores clásicos pueden coexistir y liberarse conjuntamente. En las neuronas adultas la combinación habitual es de un neurotransmisor clásico y uno o más péptidos derivados de una clase de propéptido (Figura 3). Un ejemplo es la coliberación y cotransmisión de glutamato y dinorfina en el hipocampo, donde el glutamato actúa como neurotransmisor excitatorio y la dinorfina actúa como péptido opioide inhibitorio sobre las células postsinápticas cercanas que poseen receptores para ambos mensajeros químicos. En ocasiones, la liberación conjunta de un neurotransmisor clásico y un NP supone una acción neuromoduladora de éste sobre el neurotransmisor (López-García, 2002).

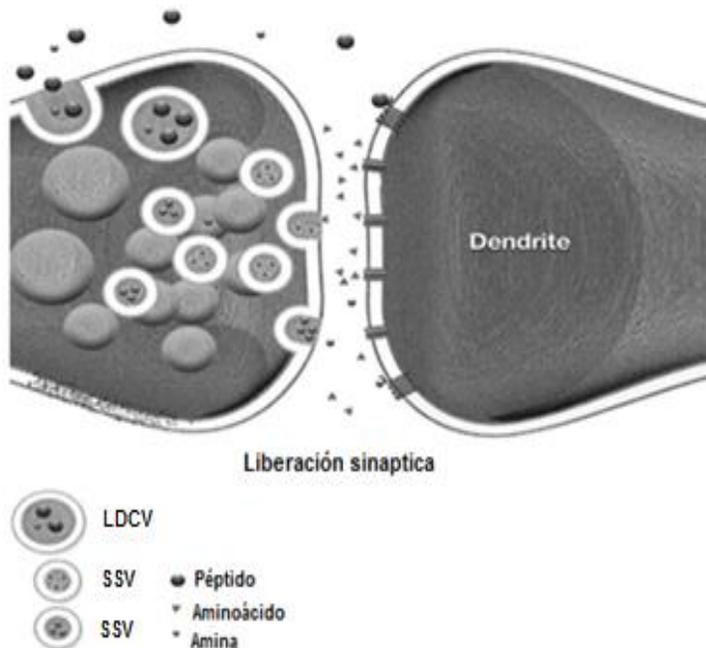


Figura 3. Dibujo esquemático de una sinapsis. Terminal nerviosa presináptica (izquierda) que alberga diferentes tipos de vesículas: vesículas sinápticas pequeñas (SSV) que almacenan neurotransmisores clásicos. Las vesículas grandes de núcleo denso (LDCV) que almacenan principalmente NP_s, pero en algunos casos, también pueden almacenar algún neurotransmisor clásico (Hokfel, 2013).

Los NP_s son insolubles en la membrana plasmática; por lo tanto, no pueden atravesarla, y deben ejercer sus efectos interactuando con receptores de la superficie celular. Esta interacción entre el NP y el receptor normalmente da lugar a un cambio en la estructura tridimensional del receptor, fenómeno que origina una cascada de eventos en la célula que se traducirá en una respuesta celular (López-García, 2002).

De hecho, más del 80% de los receptores de los NP_s son receptores acoplados a una proteína G. En general, estos receptores contienen un lugar de reconocimiento para el ligando y un lugar de reconocimiento para una proteína G particular. Están constituidos de una cadena única de 400 a 600 residuos de aminoácidos. El grupo amino terminal que contiene lugares para la glucosilación es extracelular, mientras que el grupo carboxilo terminal presenta lugares para la fosforilación por proteínas cinasas y es intracelular (López-García, 2002).

Además, estructuralmente estos receptores se caracterizan por la existencia de siete tramos de 22-28 residuos hidrófobos separados por segmentos hidrófilos. Estos segmentos transmembrales forman haces de hélices estrechamente empaquetados que atraviesan la membrana (López-García, 2002).

La unión del NP a su receptor provoca la activación de una enzima, generalmente una adenilato ciclasa (AC), que cicla nucleótidos localizados en la superficie interna de la membrana, concretamente esta enzima convierte adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Este AMPc se combina con una proteína cinasa A (PKA). La PKA consta de una subunidad reguladora y otra catalítica. La interacción del AMPc con la subunidad reguladora provoca la liberación de la unidad catalítica, que puede funcionar como una enzima fosforilante. Además de afectar a la membrana y al citoplasma adyacente, la respuesta también puede implicar al genoma de la célula a través de acciones sobre el ADN y así producir efectos a largo plazo sobre el metabolismo celular, el crecimiento y la diferenciación. Otros NP_s actúan a través de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂), que da lugar a la formación de otro grupo de segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). También existen receptores G de NP acoplados a canales. Otros receptores sobre los cuales actúan los NP_s son los ligados a receptores de tirosina cinasa (TK) o Guanilato ciclasa. Un número muy pequeño actúa sobre canales controlados por ligandos (Duque, 2009; López-García, 2002 y Rang, 2012).

Los mecanismos de eliminación de los NP_s de la hendidura sináptica son críticos para la transmisión sináptica. La persistencia del NP en el espacio sináptico tras

su liberación puede impedir nuevas comunicaciones e incluso puede provocar que la sinapsis acabe siendo refractaria, principalmente debido a la desensibilización del receptor por la exposición continuada al NP (López-García, 2002).

Se han descrito tres mecanismos por los cuales el tejido nervioso es capaz de eliminar a los NP_s: la difusión, la degradación enzimática y la recaptura o captura, tanto por la terminal presináptica como por las células gliales (Figura 4). Los NP_s, en general, se eliminan más lentamente que los neurotransmisores clásicos. Esta inactivación lenta de los NP_s contribuye a prolongar la duración de sus efectos y provoca que su metabolismo sea más parecido al de las hormonas que al de los neurotransmisores clásicos (López-García, 2002).

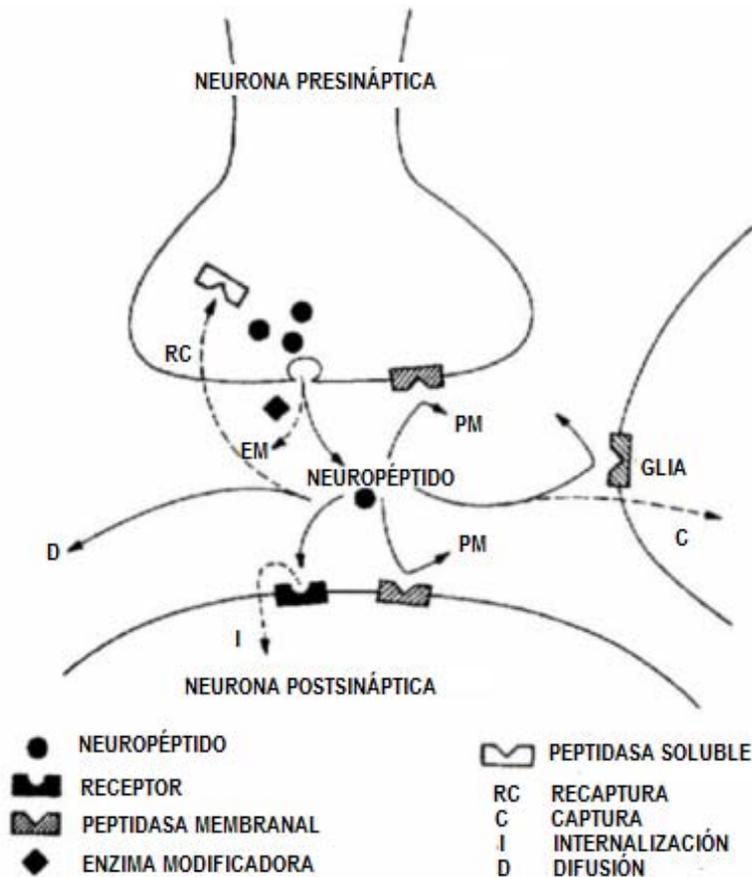


Figura 4. Mecanismos de inactivación extracelular de los NP_s: Difusión, degradación enzimática y Recaptura o captura (Méndez, 1991).

2.1.5.1 Degradación de neuropéptidos: peptidasas

En general, las enzimas proteolíticas son aquellas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos y se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Las primeras hidrolizan los enlaces próximos a los extremos N o C-terminales de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre enlaces distintos de los extremos de la cadena (López-García, 2002).

Una vez separados los NP_s del receptor al que estaban unidos, son degradados por la acción de las peptidasas. Estas están localizadas en las membranas plasmáticas de las neuronas o de la glía (su zona activa está orientada hacia el espacio extracelular), así como en el plasma sanguíneo (Duque, 2009).

2.1.6 Neuropéptidos: oportunidades para el descubrimiento de fármacos

Además de la comprensión de la fisiología y del papel funcional de los NP, las investigaciones recientes se están dirigiendo hacia la producción de fármacos que podrían tratar una amplia variedad de enfermedades (por ejemplo: ansiedad, depresión y urticaria de contacto). Así, los NP_s han provocado un enorme interés en la industria farmacéutica en las últimas décadas (López-García, 2002).

El gran número de NP_s, receptores y enzimas encargadas del metabolismo de los NP_s ofrecen muchas oportunidades para el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso (Hokfelt, 2003).

70 años después del descubrimiento de la SP y después de 30 años de la investigación dirigida y exhaustiva en los NP_s, el primer medicamento es un antagonista de la SP, denominado MK 869 (Figura 5), que ha sido probado clínicamente para el tratamiento de la depresión (Hokfelt, 2003).

El antagonista es tan eficaz como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (5-HT) y presenta menos efectos secundarios. Por otra parte, este fármaco ha sido aprobado por la FDA de EE.UU. para el tratamiento de la emesis después de la quimioterapia (Hokfelt, 2003).

La lentitud de los avances en la investigación de péptidos es en parte debido a las dificultades en la síntesis de agonistas o antagonistas selectivos y potentes que puedan atravesar la barrera hematoencefálica así como tener resistencia a la degradación catalizada por peptidasas (Hokfelt, 2003).

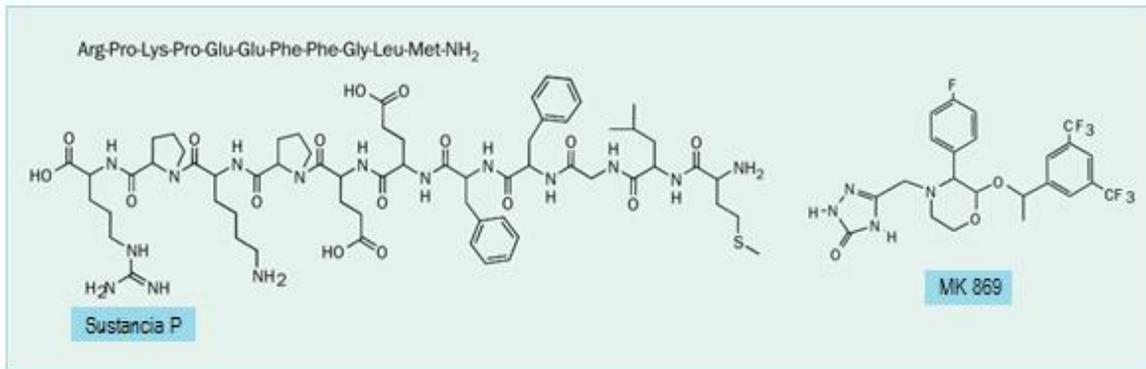


Figura 5. La Sustancia P y su antagonista MK-869 (Hokfelt, 2003).

La necesidad de entender, que hacen los NP_s y como lo hacen se ha convertido en una cuestión importante en la investigación de péptidos. Animales invertebrados, incluyendo el reino de los moluscos han servido como una rica fuente para el aislamiento de NP_s y para el ensayo de sus efectos fisiológicos (Kiss, 2011).

2.2 Moluscos como modelo en el estudio de los neuropéptidos

Los moluscos se han utilizado con éxito como modelo para el estudio molecular y el estudio de mecanismos celulares (Kiss, 2011).

Estos modelos tiene beneficios bien conocidos, como el que el sistema nervioso contiene relativamente pocas neuronas y éstas son grandes en tamaño. Estos factores ofrecen ventajas técnicas cuando se investiga la localización del NP en una neurona particular y la determinación del papel funcional (Kiss, 2011).

Son tres las principales clases de moluscos utilizados como sistemas modelo: Bivalvia, Gastropoda y Cephalopoda (Rozda, 1984).

2.2.1 Cefalópodos

Los cefalópodos (del griego *kephalo*: cabeza y *podós*: base o pie) son una clase de moluscos donde se incluyen los pulpos, se distinguen por tener un cuerpo blando con simetría bilateral y ojos bien desarrollados (SAGARPA, 2014).

La característica más representativa de los pulpos es que poseen ocho brazos. Cada brazo presenta dos filas de ventosas, su número y posición son caracteres taxonómicos importantes (SAGARPA, 2014).

2.2.1.1 Importancia del Pulpo maya o rojo (*Octopus maya*)

El llamado pulpo rojo, *Octopus maya*, es una especie que se distribuye exclusivamente en la península de Yucatán (Figura 6), donde su captura se ha convertido en una de las actividades primarias más importantes de las costas de los estados de Campeche y Yucatán. La pesca de *O. maya*, junto con la captura del pulpo patón *O. vulgaris*, genera cerca de 15 000 empleos directos y una derrama económica anual de 360 millones de pesos en toda la región, la cual se sustenta en la exportación de más de 80% del pulpo capturado, principalmente a los mercados de Europa y Japón (Juárez, 2011).

Debido a la extensa veda (16 de diciembre al 31 de julio) que limita la captura del molusco a sólo cuatro meses al año; aunado a la disminución en los volúmenes de captura, los cuales han reportado una baja hasta de un 60% en el 2005, es que actualmente se realiza el desarrollo de la tecnología de cultivo de este organismo (Serna, 2008).

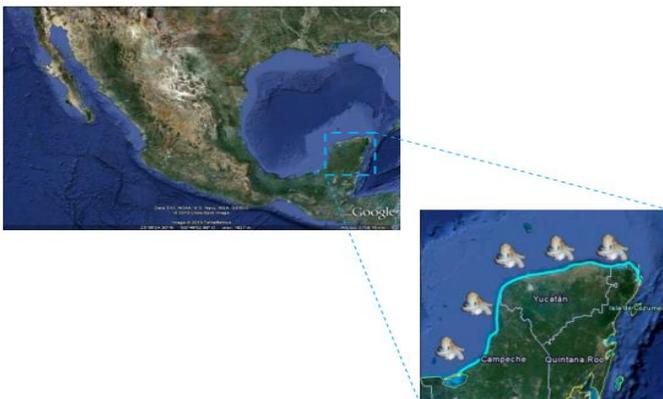


Figura 6. La población endémica del pulpo *Octopus maya* (*O. maya*) se distribuye desde Ciudad del Carmen, Campeche hasta Isla Mujeres, Quintana Roo (Espinosa, 2013).

2.2.1.1.1 Aspectos biológicos

El Pulpo rojo (Figura 7), alcanza un tamaño que va de entre 60 cm y 1 m. Posee bajo cada ojo una mancha oscura, redonda, como un enorme lunar, llamada ocelo y que le ha valido el nombre común de cuatro ojos (Morales, 2009).

La razón por la cual el pulpo rojo o maya únicamente habita los alrededores de la península de Yucatán, obedece a su forma de reproducción. Este produce entre 1500 y 2000 grandes huevos de más de 1.5 cm de longitud que la hembra conserva en su refugio y protege celosamente de los depredadores durante dos meses de incubación. También los limpia de partículas que se depositen sobre ellos y los airea sin cesar arrojándoles chorros de agua fresca (Morales, 2009).

Finalmente, las crías nacen, sin pasar por la fase larvaria, plenamente desarrolladas, ya con la apariencia de un adulto y capaces de moverse ágilmente, atrapar a sus presas, cambiar de coloración y hasta arrojar tinta. Durante esos dos meses, la madre no come en absoluto y, cumplida su misión, muere (Morales, 2009).

En tales condiciones, los huevos no se dispersan ampliamente, por ello el pulpo maya sólo existe en esta pequeña región del mundo (Morales, 2009).

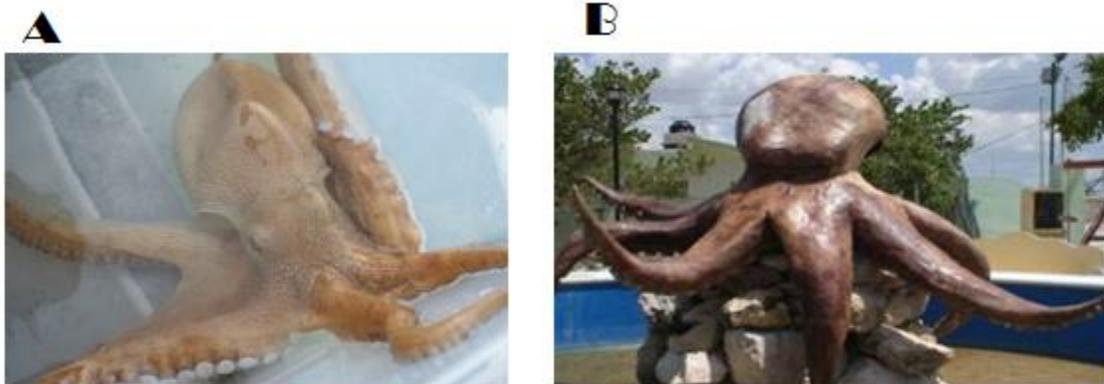


Figura 7. A) Fotografía de un espécimen de pulpo rojo *O. maya* (Espinosa, 2013). B) Monumento al pulpo rojo *O. maya* en Isla Arenas, Campeche, cerca de los límites con Yucatán (Morales, 2009).

2.2.1.1.2 Taxonomía

La ubicación taxonómica del pulpo maya o rojo es:

Reino: *Animalia*

Phylum: *Mollusca*

Clase: *Cephalopoda*

Subclase: *Coleoidea*

Superorden: *Octobrachia*

Orden: *Octopoda*

Suborden: *Incirrina*

Familia: *Octopodidae*

Subfamilia: *Octopodinae*

Género: *Octopus*

Especie: *O. maya* (SAGARPA, 2014)

2.2.1.1.3 El pulpo rojo como modelo de investigación y fuente de un nuevo agente terapéutico.

El pulpo rojo ha sido sugerido como modelo para estudiar diversas respuestas, como es el caso de la respuesta inmune por su capacidad para infectarse por organismos patógenos; en estudios de comunicación conductual en la que se utilizan el color de su cuerpo y la posición de los tentáculos para indicar su actitud hacia su presa u otros pulpos, donde su postura y color son comparables a las expresiones faciales y el lenguaje corporal de monos y humanos, en estudios de aprendizaje en el que los resultados obtenidos en pulpos han sido comparables a estudios similares en ratas y en estudios de neurobiología, electrofisiología neuronal, neuroquímica y neurosecreción (Wilson, 2014).

Así mismo, en su saliva se han encontrado diversas moléculas como los son enzimas, neurotransmisores y moléculas de naturaleza proteica (Pech, 2014). Entre estas últimas cabe destacar la presencia de un NP el cual podría servir para el desarrollo de un nuevo agente terapéutico y que es objeto de estudio de este trabajo.

Para conocer el potencial que tiene el NP como nuevo agente terapéutico es necesario la realización de pruebas farmacológicas. Una prueba farmacológica se aplica en un sistema biológico para conocer el efecto que le provoca la interacción con una sustancia (en este caso el NP) y puede ser mediante algún modelo *in vivo* o *in vitro*. En las pruebas *in vivo* se utilizan animales intactos mientras que en las pruebas *in vitro* se utilizan preparaciones aisladas de órganos o tejidos. Las especies comúnmente utilizadas en ambos estudios son ratones y ratas (Izquierdo, 2004).

2.3 Modelo *in vitro* para la evaluación del efecto del NP y la concentración Efectiva 50 (CE₅₀)

El estudio de la motilidad del tracto gastrointestinal (GI) mediante técnicas *in vitro* puede ser útil en la determinación de:

- 1) El potencial terapéutico de los nuevos fármacos en trastornos de la motilidad.
- 2) Las alteraciones en la motilidad secundarias a los estímulos fisiológicos o farmacológicos.
- 3) El efecto de la condición patológica sobre la motilidad GI (Peddireddy, 2011).

Generalmente en los experimentos farmacológicos se utiliza el intestino delgado ya que es largo y delgado, y puede ser cortado en piezas más pequeñas. Este en mamíferos está constituido de tres partes: duodeno, yeyuno e íleon, cuyas porciones muestran pequeñas variaciones de especie a especie (Peddireddy, 2011).

2.3.1 Estudio *in vitro* en íleon aislado

El modelo de íleon aislado, es una prueba farmacológica *in vitro* que fue descrita inicialmente en 1904 por Magnus, es utilizada para evaluar la actividad antiespasmódica de los extractos de plantas y fármacos (Gaginella, 1996 y Gallardo, 2005).

Los segmentos aislados de intestino de cualquier especie animal menor, mantienen la función de contracción y relajación incluso durante horas a temperatura ambiente, a condición de mantenerlos inmersos en una solución adecuada (Gallardo, 2005).

Para evaluar la actividad antiespasmódica, el íleon aislado es adecuado en un baño de órganos en solución fisiológica y condiciones adecuadas de pH, temperatura y oxigenación, al poner en contacto el tejido suspendido con los compuestos activos, se produce contracción o relajación, dependiendo de su naturaleza química. El segmento de intestino al contraerse o relajarse modifica la tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión. La señal eléctrica puede ser amplificada y registrada para cuantificar los cambios en la tensión (Gallardo, 2005).

Las principales ventajas de este modelo son:

- Las contracciones son relativamente simples y rápidas de registrar.
- Se requieren pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en el íleon.
- Relativa facilidad para llevar a cabo la prueba (Cano, 2013 e Izquierdo, 2004).

La prueba *in vitro* en este trabajo se realizó utilizando intestino delgado de rata (específicamente el íleon).

2.3.2 Intestino delgado de rata

El intestino delgado en rata es un tubo largo que mide aproximadamente 90 cm. Se extiende desde la válvula pilórica del estómago a la válvula ileocecal del intestino grueso y se divide en tres segmentos:

- Doudeno: el segmento craneal del intestino delgado. Se extiende desde la válvula pilórica a su unión con el yeyuno.
- Yeyuno: el segmento medio del intestino delgado. Es el mayor en longitud, pero no fácilmente distinguible de los otros dos segmentos.
- Íleon: el segmento de caudal. Se extiende desde su unión con el yeyuno a la válvula ileocecal, en el que el intestino grueso se origina (Wingerd, 1988).

La pared del intestino de rata está compuesto por cuatro capas (Figura 8), la parte más externa del intestino se conoce como serosa. Bajo la serosa se encuentran la muscular compuesta por dos capas de músculo liso: en la primera las células musculares están orientadas longitudinalmente, mientras que en la segunda están orientadas de forma circular. Posteriormente se encuentra la submucosa y la mucosa (Krinke, 2000).

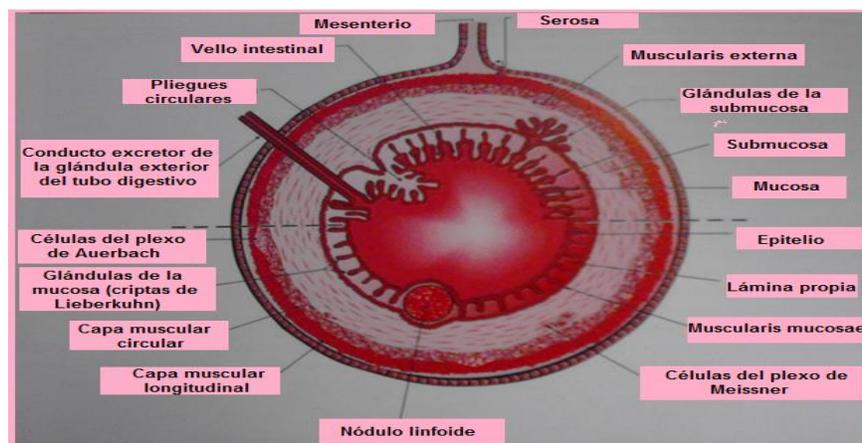


Figura 8. Las cuatro capas del intestino delgado de Rata. De la profundidad a la superficie, son la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa (Krinke, 2000).

Debido a que la muscular se encarga de la motilidad intestinal (MI) gracias a la composición de las dos capas que la conforman, que es músculo liso y a como se orientan estas últimas, procederemos a explicar cómo es que se genera la motilidad de manera normal así como esta se puede alterar por ciertos factores (fundamento de nuestro modelo *in vitro*); para esto hay que hablar sobre músculo liso así como de los principios generales de la MI.

2.3.2.1 Músculo Liso

En general el músculo liso puede dividirse en músculo liso unitario (o visceral) y músculo liso multiunitario (Ganong, 2010). Dentro de estos al que nos enfocaremos es al músculo liso unitario que es el tipo de músculo que conforma el intestino delgado.

Los músculos lisos de las vísceras (Figura 9) se hallan en estructuras tubulares que forman parte de las paredes de pequeñas arterias y venas, y de órganos huecos, como estómago, intestino, útero y vejiga. Las fibras se conectan entre sí mediante uniones en la hendidura, que forman una red a través de la cual pueden propagarse los potenciales de acción. Cuando un neurotransmisor, una hormona o una señal química estimulan una fibra, el potencial de acción muscular se transmite a las fibras vecinas, que entonces se contraen simultáneamente, como una sola unidad. Estos se caracterizan por su movilidad espontánea y por su sensibilidad al estiramiento (Tortora, 2013 y Jiménez 2003).

Existen tres características fisiológicas generales de los músculos lisos:

- Son capaces de contraerse lenta y sostenidamente con un gasto energético mínimo.
- Su innervación motora es exclusivamente autonómica
- Todos presentan cierto grado de tono, es decir, de tensión de reposo basal (Jiménez, 2003).

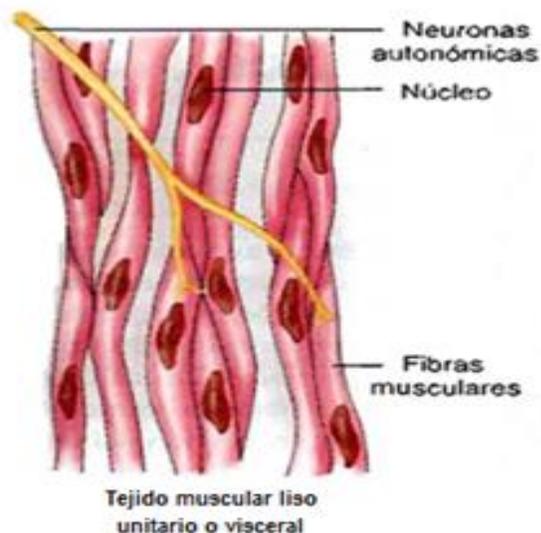


Figura 9. Fibras musculares lisas unitarias (viscerales). Se conectan entre sí a través de uniones en hendidura y se contraen como una unidad (Tortora, 2013).

2.3.2.2 Principios generales de la motilidad intestinal

Las fibras del músculo liso del intestino delgado se disponen en haces, formados por hasta 1000 fibras paralelas. Como ya se había mencionado antes, en la capa muscular longitudinal, los haces se extienden en sentido longitudinal por el tubo digestivo, mientras que en la capa muscular circular lo rodean (Guyton and Hill, 2006).

En cada haz, las fibras musculares están conectadas eléctricamente unas a otras mediante un gran número de uniones intercelulares en hendidura que permiten el paso de iones de unas células a otras con escasa resistencia. Por tanto, las señales eléctricas que inician las contracciones musculares pueden viajar con rapidez de una fibra a otra dentro de cada haz (Guyton and Hill, 2006).

Cada haz de fibras musculares lisas se encuentra separado por tejido conjuntivo laxo, pero los haces se fusionan entre ellos en muchos puntos, de modo que, en realidad cada capa muscular representa una trama ramificada de haces de músculo liso. Así pues, cada capa muscular actúa como un sincitio y cuando aparece en algún punto de la masa muscular un potencial de acción, este se transmite por ella en todas direcciones. La distancia recorrida depende de la excitabilidad del músculo; a veces, se detiene después de sólo unos milímetros y otras, atraviesa varios centímetros o incluso toda la longitud y anchura del intestino delgado (Guyton and Hill, 2006).

Además existen unas pocas conexiones entre las capas musculares longitudinal y circular, por lo que la excitación de una de ellas suele estimular también la otra (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2.1 Actividad eléctrica del músculo liso intestinal

El músculo liso intestinal (MLI) se excita por la actividad eléctrica intrínseca lenta y casi continua que recorre las membranas de las fibras musculares. Esta actividad posee dos tipos básicos de ondas eléctricas: ondas lentas y potenciales en espiga (Figura 10).

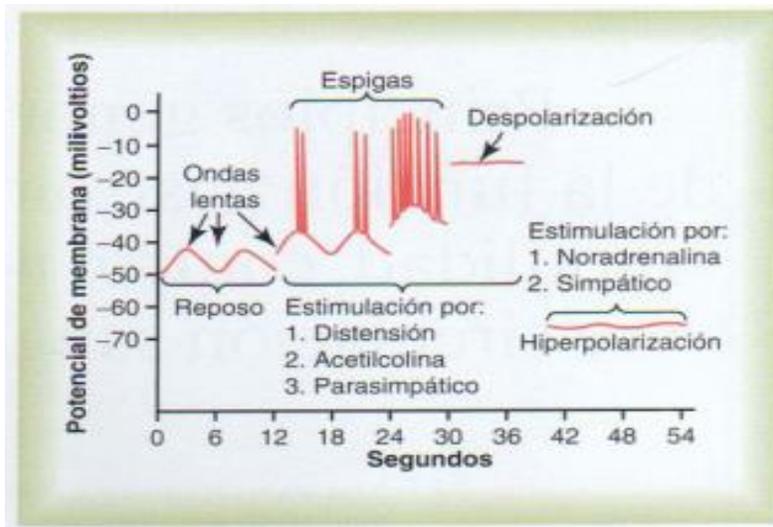


Figura 10. Potenciales de membrana del músculo liso intestinal. Obsérvense las ondas lentas, los potenciales en espiga, la despolarización total y la hiperpolarización que se producen en diferentes condiciones fisiológicas del intestino (Guyton and Hill, 2006).

Ondas lentas. Casi todas las contracciones intestinales son rítmicas y este ritmo está determinado fundamentalmente por la frecuencia de estas ondas del potencial de membrana del músculo liso. Las cuales no son potenciales de acción, sino que constituyen cambios lentos y ondulatorios del potencial de membrana en reposo. No se conoce con exactitud el origen de estas ondas, pero parece que podrían deberse a interacciones complejas entre las células musculares lisas y unas células especializadas, llamadas células intersticiales de Cajal, que se cree actúan como marcapasos eléctricos para las fibras musculares lisas. Estas últimas células forman una red y se encuentran entremezcladas con las capas del músculo liso, con cuyas células establecen contactos parecidos a una sinapsis. Las células intersticiales de Cajal sufren cambios cíclicos de su potencial de membrana debido a unos canales iónicos peculiares que se abren de manera periódica y producen corrientes hacia el interior (marcapasos) que podrían generar la actividad de ondas lentas (Guyton and Hill, 2006).

En general, estas ondas no inducen por sí mismas contracciones musculares (porque solo propician la entrada de iones sodio a las fibras musculares). Su función principal consiste en controlar la aparición de potenciales intermitentes en espiga que, a su vez, producen la contracción muscular (Guyton and Hill, 2006).

Potenciales en espiga. Verdaderos potenciales de acción. Se generan automáticamente cuando el potencial en reposo de la membrana del MLI alcanza

un valor más positivo que -40 milivoltios (el potencial normal en reposo de la membrana de la fibras de MLI varia de -50 a -60 milivoltios) cuanto más asciende el potencial de onda lenta por encima de ese valor, mayor será la frecuencia de los potenciales en espiga, que suele oscilar entre 1 y 10 espigas por segundo (Guyton and Hill, 2006).

Los potenciales de acción en el MLI se deben a la entrada en la célula de iones calcio junto con un menor número de iones sodio por lo que reciben el nombre de canales calcio-sodio. La apertura y cierre de estos canales suceden de manera lenta lo que justifica la larga duración de los potenciales de acción. Además el movimiento de grandes cantidades de iones calcio hacia el interior de las fibras musculares durante el potencial de acción desempeña un papel especial en la producción de las contracciones de las fibras del musculo intestinal (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2 Cambios de voltaje del potencial de membrana en reposo

Además de las ondas lentas y de los potenciales en espiga, el voltaje basal del potencial de membrana en reposo del músculo liso puede cambiar. En condiciones normales, el potencial de membrana en reposo tiene un valor medio de unos -56 milivoltios, pero son muchos los factores que pueden modificarlo. Cuando el potencial se hace menos negativo (despolarización de la membrana), la fibra muscular se excita con más facilidad; cuando el potencial se vuelve más negativo (hiperpolarización de la membrana), la fibra se hace menos excitable (Guyton and Hill, 2006).

Los factores que despolarizan la membrana, es decir, los que la hacen más excitable son: 1) la distensión del músculo; 2) la estimulación con acetilcolina (Ach); 3) la estimulación por los nervios parasimpáticos que secretan Ach en sus terminaciones, y 4) la estimulación por distintas hormonas intestinales específicas (Guyton and Hill, 2006).

Son factores importantes que aumentan la negatividad del potencial de membrana y que, por lo tanto, la hiperpolarizan reduciendo la excitabilidad de la fibra

muscular: 1) el efecto de la noradrenalina (NA) o de la adrenalina sobre la membrana de la fibra y 2) la estimulación de los nervios simpáticos que secretan principalmente NA en sus terminaciones (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2.3 Excitación del músculo liso visceral por distensión muscular

Cuando el músculo liso visceral (unitario) es distendido lo suficiente, habitualmente se generan potenciales de acción espontáneos, que se deben a una combinación de: 1) los potenciales de onda lenta normales y 2) la disminución de la negatividad global del potencial de membrana que produce la propia distensión. Esta respuesta a la distensión permite que la pared del intestino, cuando se distiende excesivamente, se contraiga automática y rítmicamente (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2.4 Bases físicas de la contracción del músculo liso

El músculo liso muestra grandes filamentos de actina unidos a denominados cuerpos densos (Figura 11). Algunos de estos cuerpos están unidos a la membrana celular. Otros están dispersos en el interior de la célula. Algunos de los cuerpos densos de la membrana de células adyacentes están unidos entre sí por puentes proteicos intercelulares. La fuerza de contracción se transmite de unas células a otras principalmente a través de estos enlaces (Guyton and Hill, 2006).

Interpuestos entre los filamentos de actina de la fibra muscular están los filamentos de miosina (Figura 11). Estos filamentos tienen un diámetro superior al doble que los filamentos de actina (Guyton and Hill, 2006).

La mayor parte de los filamentos de miosina tienen lo que se denomina puentes cruzados “lateropolares”, dispuestos de tal manera que los puentes de un lado basculan en una dirección y los del otro lado basculan en la dirección opuesta. Esto permite que la miosina tire de un filamento de actina en una dirección en un lado a la vez que simultáneamente tira de otro filamento de actina en la dirección opuesta en el otro lado (Guyton and Hill, 2006).

La utilidad de esta organización es que permite que las células musculares lisas se contraigan hasta el 80% de su longitud (Guyton and Hill, 2006).

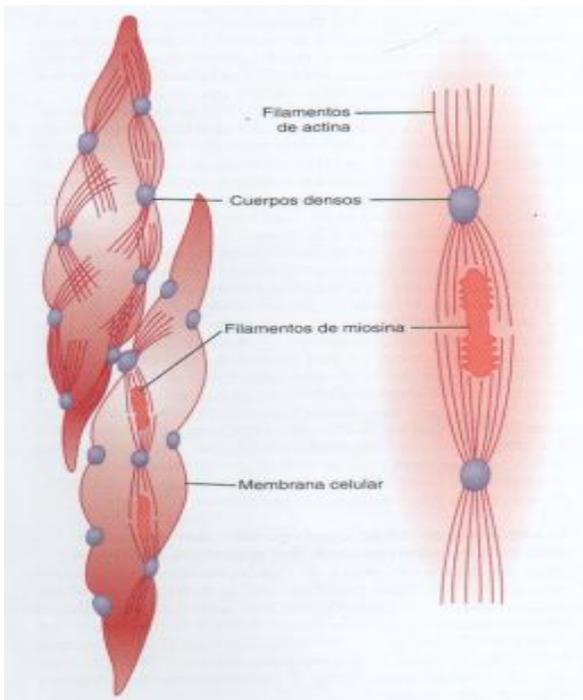


Figura 11. Estructura física del músculo liso. La fibra de la parte superior izquierda muestra los filamentos de actina que irradian desde los cuerpos densos. La fibra de la parte inferior izquierda y el diagrama del lado derecho muestran la relación de los filamentos de miosina con los filamentos de actina (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2.5 Base química de la contracción del músculo liso

La contracción del músculo liso (Figura 12), sucede tras la entrada de iones calcio en las fibras musculares. Los iones calcio, a través del mecanismo de control de la calmodulina, activan los filamentos de miosina de la fibra y generan fuerzas de atracción entre éstos y los filamentos de actina, de este modo inducen la contracción del músculo (Guyton and Hill, 2006).

A continuación se describe la secuencia de los fenómenos de la contracción y relajación del musculo liso:

Etapas en la contracción (Figura 12):

1. Los iones calcio se unen a la calmodulina
2. La combinación de calmodulina-calcio se unen a la miosina cinasa (enzima fosforiladora) y la activa
3. Una de las cadenas ligeras de cada una de las cabezas de miosina (cabeza reguladora) se fosforila en respuesta a esta miosina cinasa
4. Cuando la cadena reguladora está fosforilada la cabeza tiene la capacidad de unirse repetitivamente al filamento de actina y de avanzar

5. Se produce de la contracción muscular (Guyton and Hill, 2006)

Etapas en la relajación (Figura 12):

1. Disminución de iones calcio por debajo de un nivel crítico
2. Termina la unión de calmodulina-calcio
3. La enzima miosina fosfatasa escinde el fosfato de la cadena ligera reguladora
4. No se produce el ciclo de unión-separación de la cabeza de miosina con el filamento de actina
5. Finaliza la contracción dando paso a la relajación (Guyton and Hill, 2006)

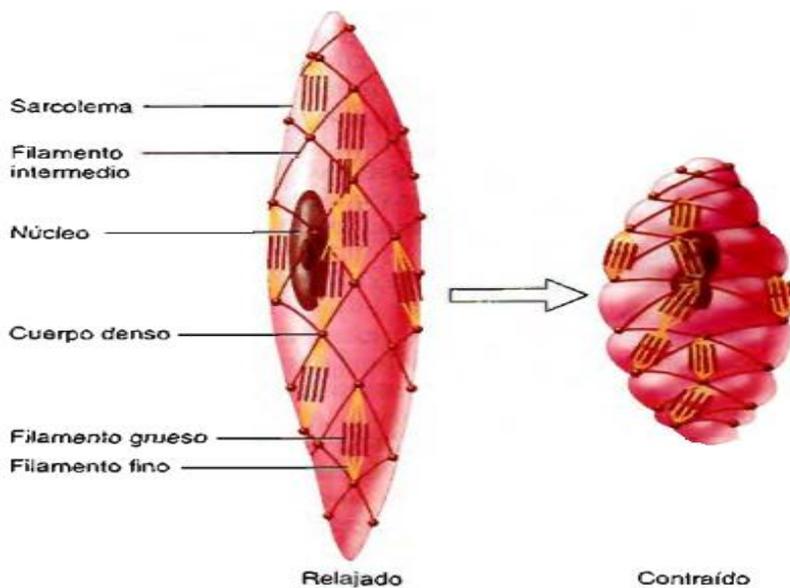


Figura 12. Fibra muscular lisa relajada (fibra del lado izquierdo) y contraída (fibra del lado derecho). Miosina (filamento grueso) y actina (filamento delgado), (Tortora, 2013).

2.3.2.2.6 Contracción tónica

La contracción tónica es continua, no asociada al ritmo eléctrico básico de las ondas lentas y a menudo persiste varios minutos o incluso varias horas. Su intensidad suele aumentar o disminuir, pero la contracción se mantiene (Guyton and Hill, 2006).

Esta contracción obedece en ocasiones a potenciales en espiga repetidos y continuos, de forma que cuanto mayor sea la frecuencia, mayor será el grado de contracción. En otros casos, la contracción tónica se debe a la acción de

hormonas o de otros factores que inducen la despolarización parcial y continua de la membrana del músculo liso sin generar potenciales de acción. Una tercera causa de contracción tónica es la entrada continua de iones calcio dentro de la célula a través de vías asociada a cambios de potencial de membrana. Estos mecanismos aún no se conocen con detalle (Guyton and Hill, 2006).

2.3.2.2.7 Tipos funcionales de movimientos en el tubo digestivo

El tubo digestivo tiene dos tipos de movimientos: 1) movimientos de propulsión, que producen el desplazamiento de los alimentos a lo largo del mismo a una velocidad adecuada para su digestión y absorción y 2) movimientos de mezcla y segmentación, que mantienen el contenido intestinal permanentemente mezclado (Guyton and Hall, 2006 y Ganong, 2010).

2.3.2.2.7.1 Movimientos propulsivos: Peristaltismo

El movimiento básico propulsivo del tubo digestivo es el peristaltismo (Figura 13). Alrededor del intestino se crea un anillo de contracción que se desplaza hacia delante, de forma analoga a cuando se colocan los dedos alrededor de un fino tubo distendido, se contraen los dedos y se deslizan a lo largo del mismo. Cualquier material situado delante del anillo de contracción se desplazará hacia adelante (Guyton and Hall, 2006).

El peristaltismo es una propiedad inherente a muchas estructuras tubulares con musculo liso sincitial: la estimulación de cualquier punto del intestino produce la aparición de un anillo de contracción en el músculo circular intestinal que, a continuación, se propaga a lo largo del tubo digestivo (Guyton and Hall, 2006).

El estímulo habitual del peristaltismo es la distensión del tubo digestivo. Así, cuando una gran cantidad de alimento se concentra en algún punto del tubo digestivo, la distensión de las paredes en este nivel estimula el SNE para que contraiga la pared GI situada 2 o 3 cm por encima de esa zona, haciendo que se forme un anillo de contracción que inicia el movimiento peristáltico. Otro estímulo desencadenante del peristaltismo es la irritación química o física del revestimiento

epitelial del intestino. Asimismo, las señales nerviosas parasimpáticas intensas que llegan al tubo digestivo inducen un fuerte peristaltismo en el mismo (Guyton and Hall, 2006).

En el intestino delgado, la actividad peristáltica puede aumentar o disminuir por los impulsos nerviosos autónomos que llegan a éste, pero su presentación es independiente de la inervación extrínseca. Además de las señales nerviosas que afectan el peristaltismo del intestino delgado, existen otros factores como los hormonales, neurotransmisores y NP_s que también influyen sobre él, como ya se mencionó en apartados anteriores (Guyton and Hall, 2006 y Ganong, 2010).

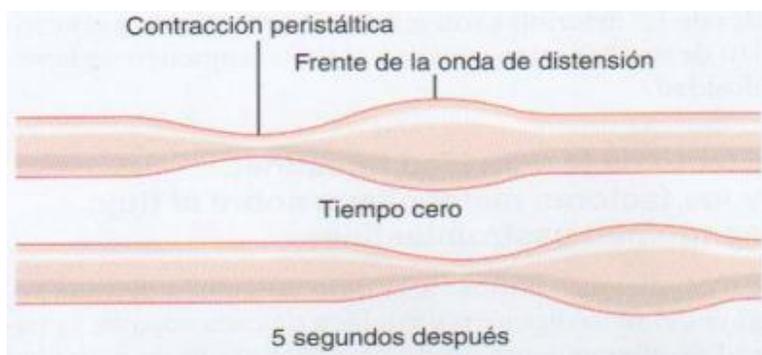


Figura 13. Movimiento de peristaltismo del intestino delgado (Guyton and Hall, 2006).

2.3.2.2.7.2 Movimientos de mezcla y segmentación

Cuando el quimo penetra en una porción del intestino delgado, la distensión de la pared intestinal induce contracciones concéntricas localizadas espaciadas a intervalos a lo largo del intestino. Las contracciones generan una “segmentación” del intestino delgado (Figura 14), de forma que el intestino queda dividido en segmentos que adoptan el aspecto de una ristra de salchichas. Cuando un grupo de contracciones de segmentación se relaja, se inicia un nuevo conjunto, pero en este caso las contracciones suceden, sobre todo, en zonas nuevas no afectadas por las contracciones previas. Por tanto, las contracciones de segmentación suelen fragmentar el quimo, facilitando la mezcla progresiva del alimento con las secreciones del intestino delgado (Guyton and Hall, 2006).

Al igual que la actividad peristáltica los movimiento de mezcla y segmentación pueden ser modificados por los impulsos nerviosos autónomos que llegan a éste, pero su presentación es independientes de la inervación extrínseca (Ganong, 2010).

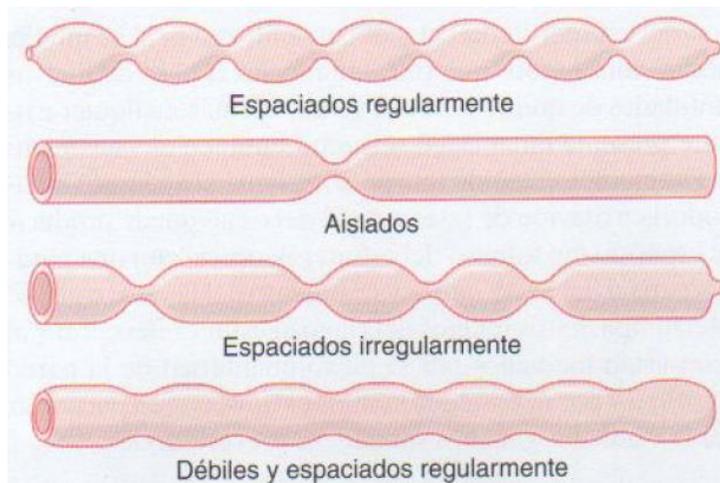


Figura 14. Movimientos de segmentación del intestino delgado (Guyton and Hall, 2006).

Las principales funciones fisiológicas del tracto intestinal incluyen motilidad, secreción, digestión, absorción y metabolismo. Estas funciones son reguladas por hormonas intestinales (la secretina y motilina), el SNE, el SNA y mensajeros químicos (VIP, SST, por mencionar algunos), (Krinke, 2000). A continuación hablaremos más sobre cómo se dan estas regulaciones para la motilidad intestinal.

2.3.2.2.8 Control hormonal de la motilidad intestinal

Son dos hormonas que tienen efecto sobre la motilidad del intestino delgado: la secretina y la motilina (Guyton and Hall, 2006).

La secretina fue la primera hormona intestinal descubierta. Procede de células de la mucosa del duodeno y se libera como respuesta al jugo gástrico ácido que alcanza el duodeno procedente del estómago a través del píloro. Posee un leve efecto sobre la motilidad del tubo digestivo (Guyton and Hall, 2006).

La motilina se secreta en la primera parte del duodeno durante el ayuno y su única función conocida es el aumento de la motilidad intestinal. La motilina se libera de

forma cíclica y estimula las ondas de la motilidad intestinal llamadas complejos mioeléctricos interdigestivos, que recorren el intestino delgado cada 90 minutos durante los periodos de ayuno. La ingestión de los alimentos inhiben la secreción de motilina a través de mecanismos aun no bien conocidos (Guyton and Hall, 2006).

2.3.2.2.9 Control nervioso de la función intestinal

El tracto intestinal está regulado por una red nerviosa intrínseca de nervios conocida como sistema nervioso entérico (SNE), y por una red extrínseca que forma parte del sistema nervioso autónomo (SNA), (Tortora, 2013).

Las fibras nerviosas y los ganglios del SNE se encuentran en dos plexos: el plexo mientérico (de Auerbach) que se encuentra entre las capas de la muscular y el plexo submucoso (de Meissner) que se encuentra dentro del tejido conectivo de la submucosa (Krinke, 2000).

2.3.2.2.9.1 Sistema nervioso entérico

Es un conjunto grande y muy organizado de neuronas que se encuentran en las paredes del intestino, aproximadamente 100 millones de neuronas. Este participa en actividades motoras y secretorias del intestino (Goodman and Gilman, 2012 y Katzung 2013).

El SNE (Figura 15), consiste de motoneuronas, neuronas sensitivas e interneuronas que se organizan principalmente en los plexos nerviosos (Goodman and Gilman, 2012 y Katzung 2013).

Dichas redes neuronales reciben fibras preganglionares del sistema parasimpático y de axones simpáticos posganglionares; también reciben estímulos sensitivos provenientes del interior de la pared del intestino (Goodman and Gilman, 2012 y Katzung 2013).

Las fibras de los cuerpos neuronales de dichos plexos discurren en sentidos anterógrado, retrógrado y circular hasta el MLI, para de esta forma controlar la

motilidad y a las células secretorias en la mucosa (Goodman and Gilman, 2012 y Katzung 2013).

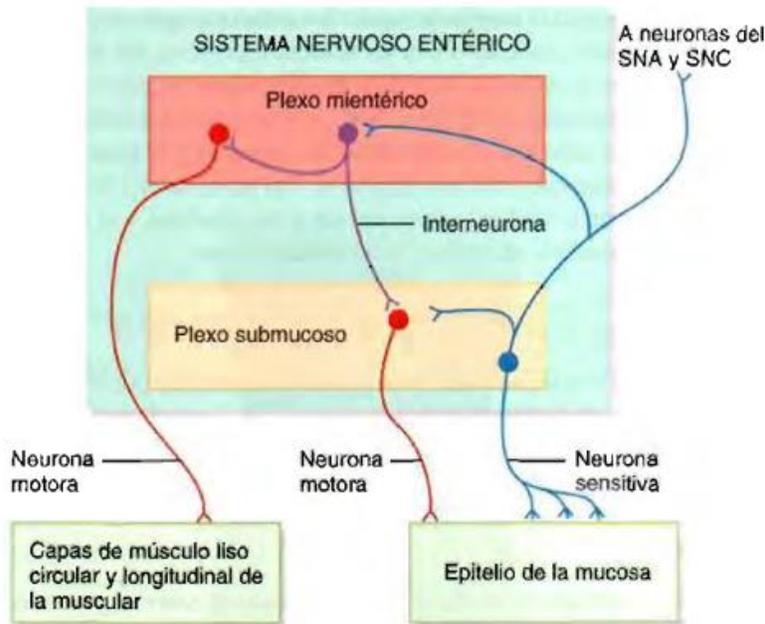


Figura 15. Organización del Sistema Nervioso Entérico (SNE) y como se relaciona con el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y SNC (Sistema Nervioso Central), (Tortora, 2013).

2.3.2.2.9.2 Sistema Nervioso Autónomo

El SNE actúa en forma semiautónoma y utiliza estímulos del SNA para modular la actividad del intestino y devolver estímulos sensitivos al SNC (Figura 15), (Goodman and Gilman, 2012 y Katzung, 2013).

El SNA modula la contracción y relajación del músculo liso a través de sus componentes simpático y parasimpático (Goodman and Gilman, 2012).

El neurotransmisor de todas las fibras autonómicas preganglionares, de la mayor parte de las fibras parasimpáticas posganglionares y de unas cuantas fibras simpáticas posganglionares es la Ach. Este a través de sus receptores M₂ y M₃ provoca la contracción y la secreción del MLI (Goodman and Gilman, 2012).

Las fibras adrenérgicas comprenden la mayor parte de las fibras simpáticas posganglionares; en ellas el principal neurotransmisor es la NA. Este a través de

sus receptores α_1 , α_2 y β_2 provoca la relajación y la disminución de la secreción del MLI (Goodman and Gilman, 2012).

2.3.2.2.9.3 Vías reflejas digestivas

Muchas neuronas del SNE son componentes de las vías reflejas que regulan la secreción y la MI, en respuesta a estímulos presentes en su luz (Tortora, 2013).

Los componentes iniciales de la vía refleja digestiva típica son receptores sensitivos (como los quimiorreceptores y los mecanorreceptores), asociados con las neuronas sensitivas del SNE (Tortora, 2013).

Los axones de estas neuronas sensitivas pueden hacer sinapsis con otras neuronas localizadas en el SNE, SNC o SNA y transmitir información a esas regiones acerca de la naturaleza del contenido y el grado de distensión (estiramiento) del tubo digestivo (Tortora, 2013).

Las neuronas del SNE, SNC o SNA activan o inhiben posteriormente las glándulas del MLI, la secreción y motilidad de éste (Tortora, 2013).

2.3.2.2.9.4 Neurotransmisores y neuropéptidos presentes en el SNE

Desde el punto de vista farmacológico, el SNE es más complejo que los sistemas simpático y parasimpático, ya que en el mismo intervienen neurotransmisores y NP_s (Rang, 2012).

Tabla 1. Neurotransmisores y NP_s en el SNE, receptores y efectos en el músculo liso del intestino.

Sustancia	Receptor	Efecto en el músculo liso del intestino.
Neurotransmisores		
Acetilcolina (ACh)	Nicotínico nAChR Muscarínicos M ₂ y M ₃	Contracción
Serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT)	5-HT _{2A} 5-HT ₄ , y 5-HT ₇	Contracción Relajación
ATP	P _{2Y} P _{2X}	Relajación Contracción
Noradrenalina (NA)	α ₁ , α ₂ y β ₂	Relajación
Dopamina (DA)	D ₁ y D ₂	Relajación
Histamina	H ₁ y H ₂	Contracción
Glutamato (Glu)	NMDA (NR ₁ , NR _{2A} y NR _{2B}) AMPA (GluR ₁₋₄) Kainato (GluR ₅₋₇) Metabotrópicos (mGlu ₁₋₈)	Contracción
Ácido γ-Aminobutírico (GABA)	GABA _A y GABA _B	Contracción Relajación
Óxido Nítrico (NO)	Sgc	Relajación
Canabinoides (CBS)	CB ₁	Relajación
Neuropéptidos		
Sustancia P (SP)	NK ₁	Contracción
Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP)	VPAC ₁ y VPAC ₂	Relajación
Somatostatina (SST)	SSTR ₂	Relajación
Neuropéptido Y (NPY)	Y ₁ , Y ₂ , Y ₄	Relajación
Péptidos opioides	Mu, kappa y delta	Relajación

A continuación se presenta información relevante con relación a los neurotransmisores y NP_s mencionados en la tabla anterior.

2.3.2.2.9.4.1 Acetilcolina (ACh)

Hay dos tipos de receptores que median la transmisión colinérgica en el SNE. La ACh se une a los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR), (Figura 16). Los nAChR son canales iónicos activados por ligando, mientras que mAChR son receptores acoplados a proteína G. Por lo tanto la unión de ACh genera potenciales postsinápticos variables dependiendo del receptor presente en la membrana celular, los receptores nicotínicos median una rápida transmisión excitatoria generando fEPSPs (potenciales postsinápticos excitatorios rápidos) y mAChR median una lenta transmisión excitatoria generando sEPSPs (potenciales postsinápticos excitatorios lentos). Ambas clases de receptores están presentes en las células efectoras (receptores postsinápticos) o en terminales nerviosas (receptores presinápticos) donde actúan como autorreceptores regulando la liberación de ACh a partir de terminales nerviosas (Harrington, 2010).

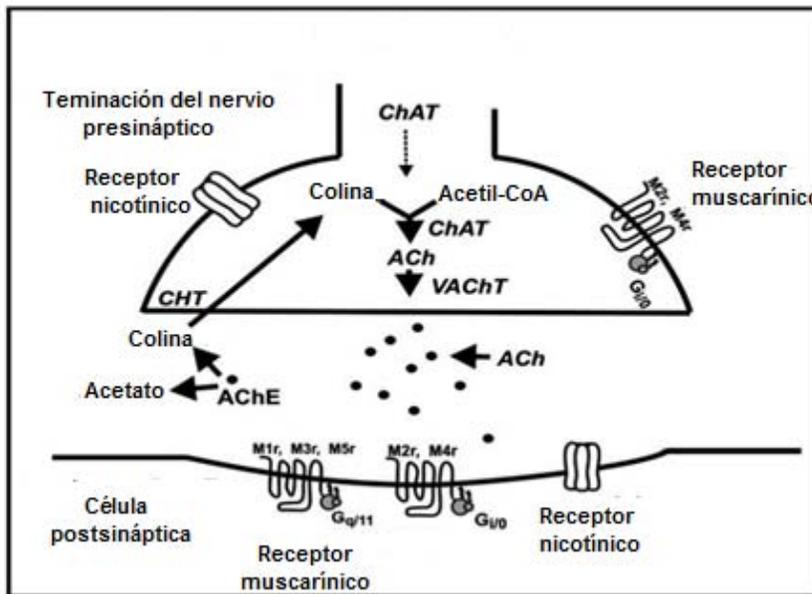


Figura 16. Receptores de Acetilcolina (ACh). Los receptores nicotínicos (nAChR) son conductos iónicos activados por ligando, mientras que los receptores muscarínicos (mAChR) están acoplados a proteína G (Harrington, 2010).

Como ya se había mencionado antes, los receptores nicotínicos son conductos iónicos controlados por ligando cuya activación siempre causa un incremento rápido (milisegundos) en la permeabilidad celular a Na^+ y Ca^{2+} , despolarización y excitación (Goodman and Gilman, 2012).

Se han clonado los ADNc para 17 tipos de subunidades nAChR para varias especies. Éstas consisten de subunidades α (α_1 a α_{10}) que componen los principales sitios para la unión de ligandos, subunidades β (β_{1-4}), gama, delta y épsilon. Estos pueden ser heteropentámeros u homopentámeros cuyas propiedades de especificidad están determinadas por el tipo de subunidades que forman el receptor. Estudios han demostrado que están localizados en las neuronas que están en vías ascendentes y circunferenciales en el plexo mientérico (Galligan, 2012; Goodman and Gilman, 2012 y Wood, 2012).

Los receptores muscarínicos están principalmente localizados en la membrana celular del músculo liso. La activación de los receptores M_2 (70-80%) y M_3 (20-30%) median la contracción del musculo liso produciendo dos efectos principales que son la inhibición de la AC (vía G_i/G_o) y la activación de la fosfolipasa C (vía G_q/G_{11}) respectivamente (Figura 16), (Harrington, 2010).

2.3.2.2.9.4.2 Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT)

La 5-HT se encuentra en el tracto GI y el SNC, y puede funcionar tanto como un neurotransmisor y como hormona local en el intestino. Alrededor del 95% de la 5-HT del cuerpo se encuentra en el tracto GI, (aproximadamente 10 mg); 90% se encuentra en las células enterocromafines (células EC) y el 5% en las neuronas serotoninérgicas del plexo mientérico. El resto del 5% de la 5-HT se encuentra en el cerebro. Toda la 5-HT en la sangre se deriva del tracto GI (Sikander, 2009).

La 5-HT inicia respuestas tan diversas como náuseas, vómitos, secreción intestinal, modula el peristaltismo y juega un papel en la fisiología del intestino como un neurotransmisor entérico (Sikander, 2009).

La sorprendente gama de efectos de la 5-HT es en gran parte debido a la presencia de múltiples subtipos de receptores presentes en las neuronas entéricas, las células EC, el MLI, posiblemente enterocitos y tejido inmune. Siete tipos o familias y múltiples subtipos de receptores de 5-HT han sido identificados, y se han denominado como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Sikander, 2009).

Los receptores de 5-HT que se sabe que afectan las funciones motoras viscerales son los que pertenecen a los subtipos 5-HT₁, 2, 3, 4 y 7 (Figura 17). Receptores neuronales 5-HT pueden inhibir o potenciar la liberación del transmisor incluyendo los subtipos 5-HT_{1A} (inhibitorio), 5-HT₃, y 5-HT₄ (ambos excitatorios). Los receptores de musculo liso 5-HT pueden contraer o relajar células efectoras y pertenecen a los subtipos 5-HT_{2A} (media la contracción), 5-HT₄, y 5-HT₇ (ambos median la relajación), (Sikander, 2009).

En la contracción la 5-HT estimula a las neuronas colinérgicas con la liberación de Ach mientras que en la relajación estimula a las neuronas inhibitoras nitrérgicas para liberar NO (Sikander, 2009).

El receptor 5-HT₃ es el único canal catiónico de unión a ligando. Este receptor parece ser el principal receptor de 5-HT responsable de la respuesta de

despolarización rápida en las neuronas mientéricas, dando lugar a un aumento de la liberación de Ach de neuronas colinérgicas (Sikander, 2009).

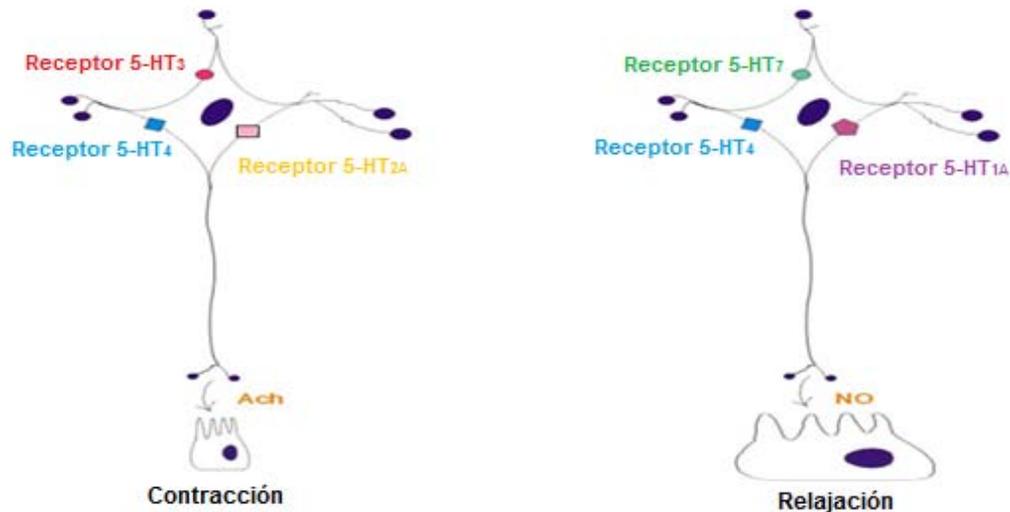


Figura 17. El principal papel de los receptores de Serotonina (5-HT) en el tracto gastrointestinal (GI). La Ach es liberada cuando la 5-HT estimula los receptores 5-HT₄, 5-HT₃ y 5-HT_{2A} en las neuronas colinérgicas entéricas y como resultado se presenta la contracción del músculo liso (Figura lado izquierdo). La 5-HT también estimula los receptores entéricos 5-HT_{1A}, 5-HT₄ y 5-HT₇ en las neuronas nitrérgicas que liberan Óxido Nítrico (NO), este provoca la relajación del músculo liso (Figura lado derecho), (Sikander, 2009).

2.3.2.2.9.4.3 Trifosfato de adenosina (ATP)

La evidencia actual indica que el sistema purinérgico juega un papel importante en la regulación de las funciones motoras intestinales a través de diferentes subtipos de receptores purinérgicos. En particular, los receptores P_{2Y} parecen mediar acciones principalmente relajantes (median la liberación de NO/ATP), mientras que los receptores P_{2X} son propensos a conducir respuestas principalmente excitatorios (median la liberación de Ach), (Antonioli, 2013).

Subtipos de receptores P_{2X} y P_{2Y} se han identificado en el plexo mientérico, el plexo submucoso, neuronas motoras, sensoriales y las interneuronas implicados en la neurotransmisión sináptica, la neuromodulación y actividades reflejas incluyendo las vías excitatorios ascendente y las inhibitorias descendentes (Gourine, 2009).

Los receptores P_{2X} están asociados a canales iónicos triméricos (homo u heteromérico), forman poros no selectivos a Ca^{2+} , K^+ y Na^+ provocando respuestas inmediatas y rápidas (10 ms). Los receptores P_{2Y} son metabotropos y están asociados a la proteína G_q , por lo que su activación estimula la fosfolipasa C, la producción de IP_3 y la movilización de Ca^{2+} (Flores, 2008).

2.3.2.2.9.4.4 Catecolaminas: Noradrenalina (NA) y Dopamina (DA)

Se han identificado tres tipos de receptores para NA los cuales son: α_1 y α_2 que se subdividen en tres subfamilias: α_1 (que consisten en tres subtipos: $1A$, $1B$, y $1D$), α_2 (que consiste en tres subtipos $2A$, $2B$ y $2C$) y β (que consisten de los subtipos: β_1 , β_2 y β_3). Todos los receptores adrenérgicos son receptores acoplados a proteína G. Cada tipo de receptor muestra preferencia para clases particulares de proteínas G, α_1 para G_q , α_2 para G_i y β para G_s (Goodman and Gilman, 2012).

La NA regula la actividad del tracto GI a través de la activación de los receptores α_1 , α_2 y β_2 provocando la relajación del MLI (Goodman and Gilman, 2012).

La estimulación de los receptores α_1 y α_2 provocan un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular provocando una hiperpolarización y relajación por medio de la activación de los conductos de K^+ dependiente de Ca^{2+} . Mientras que la estimulación de los receptores β ocasiona la acumulación de AMPc, activación de PKA y alteración de la función de numerosas proteínas celulares como consecuencia de su fosforilación (Goodman and Gilman, 2012).

Los receptores α_2 actúan sobre la transmisión colinérgica (inhibiendo la liberación de la Ach), mientras que los receptores α_1 activan una subpoblación de neuronas del plexo mientérico (Hillsley, 1992).

El intestino también contiene a la DA, que ha sido confirmado recientemente como un neurotransmisor intrínseco del SNE (Zizzo, 2010).

Hay cinco subtipos de receptores de DA, que se pueden agrupar en dos familias: la familia D_1 que incluye los receptores D_1 y D_5 , y la familia D_2 que incluyendo los receptores D_2 , D_3 , y D_4 (Zizzo, 2010).

La función de las neuronas dopaminérgicas entéricas en la regulación de la motilidad GI no es clara y el mecanismo de acción de la DA y la ubicación de los receptores de esta, son controversiales (Zizzo, 2010).

Sin embargo, en estudios en músculo de íleon de ratón se demostró que la DA modula la actividad mecánica espontánea y las respuestas neuronales colinérgicas de este, principalmente a través de la activación del receptor D₁. La DA al unirse a los receptores D₁ activa la AC, aumenta la concentración de AMPc, y activa los canales de potasio sensibles a apamina, causando la inhibición de la actividad espontánea. Además, se describe una interacción agonística de los subtipos de receptores dopaminérgicos en la regulación contráctil intestinal, destacando el papel de aportación de los receptores D₂ en presencia de receptores bloqueados D₁ (Zizzo, 2010).

2.3.2.2.9.4.5 Histamina

El control histaminérgico de la motilidad GI es muy complejo y consta de mediación neuronal así como los efectos directos sobre la contractilidad del músculo liso. Tanto los subtipos de receptores de histamina clásicos, H₁ y H₂, y el caracterizado más recientemente H₃, están involucrados (Poli, 2001).

Los receptores de histamina H₁ se encuentran principalmente en células de músculo liso y causan la contracción con un mecanismo semejante a la de los receptores muscarínicos M₃ que consiste en un aumento de la disponibilidad de calcio. Mientras que los receptores de histamina H₂, a su vez, median contracciones neurogénicas debido a una facilitación de la transmisión excitatoria colinérgica y no colinérgica en las neuronas intramurales (Poli, 2001).

El receptor H₃ controla de una manera negativa la liberación de diferentes neurotransmisores (Ach y SP) desde las terminales nerviosas del plexo mientérico y fibras pre y posganglionares (colinérgicas, no adrenérgicas y no colinérgicas) (Poli, 2001).

De los tres receptores mencionados anteriormente el que se expresa principalmente en el tracto GI es el receptor H₁ (Figura 18). La activación de este receptor va a mediar la respuesta contráctil en íleon a través de la elevación de los niveles de IP₃, induciendo movilización del calcio intracelular (Cano, 2013).

Los receptores H₁, H₂ y H₃ son receptores acoplados a proteína G (Montes, 2005).

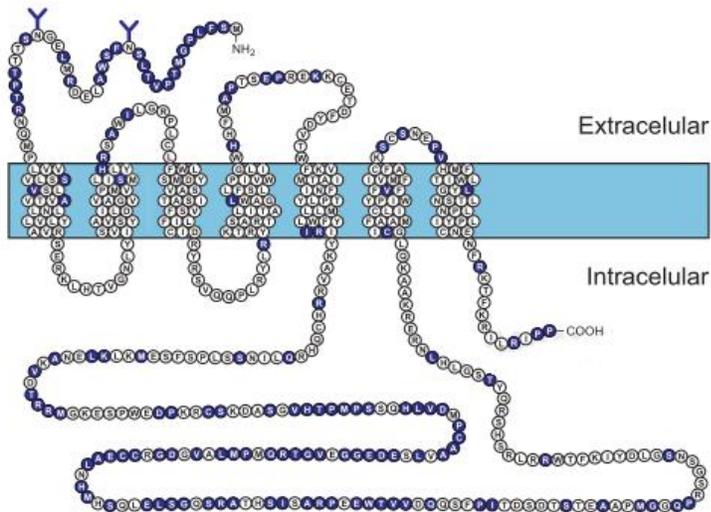


Figura 18. Receptor de Histamina H₁ (Montes, 2005).

2.3.2.2.9.4.6 Glutamato (Glu)

Los receptores sobre los cuales actúa el Glu son: ionotrópicos que incluyen los receptores NMDA, AMPA y kainato, nombre dado de acuerdo a los agonistas sintéticos selectivos originalmente utilizados para identificar los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato; AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico). Además, el Glu puede modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica mediante la activación de los miembros de una familia de receptores acoplados a proteína G denominados receptores metabotrópicos de Glu (receptores mGlu), (Kirchgessner, 2001).

Varias líneas de investigación indican un papel para el Glu en la regulación excitatoria de la motilidad intestinal (Kirchgessner, 2001).

Ganglios entéricos contienen neuronas glutamatérgicas, un transportador neuronal de Glu y receptores ionotrópicos y metabotrópicos de Glu. El Glu se ha encontrado

en un subconjunto de neuronas localizadas en los ganglios de los plexos mientérico y submucoso (Kirchgessner, 2001).

Hay dos familias de la subunidad del receptor de NMDA; la familia NMDAR₁ (NR₁) y la familia NMDAR₂ (NR_{2A} y NR_{2B}). Los tipos y subtipos del receptor NMDA (NR₁, NR_{2A} y NR_{2B}) se han encontrado en neuronas del plexo mientérico y submucoso del íleon de cobayo y de colon de rata (Kirchgessner, 2001).

Los receptores AMPA son más selectivos en su distribución y consisten en cuatro tipos, GluR₁₋₄. Las cuatro tipos de receptores AMPA se encuentran en el SNE de cobayo (Kirchgessner, 2001).

Los receptores kainato consisten en los receptores GluR₅₋₇, K_{A1} y K_{A2}. Existe alguna evidencia de que los receptores de kainato están presentes en el intestino de rata. La expresión de ARNm para el tipo de receptor kainato GluR₅ ha sido localizada en el intestino de ratas postnatales tempranas y GluR_{5/6/7} se ha visualizado en un subconjunto de cuerpos celulares y fibras nerviosas en el íleon de rata adulta (Kirchgessner, 2001).

Estudios sugieren que las neuronas entéricas expresan receptores mGlu, además de los receptores de Glu ionotrópicos. Se han clonado hasta la fecha, ocho tipos de receptores mGlu. Estos se clasifican en tres grupos principales de acuerdo con la homología de secuencia, acoplamiento a sistemas de segundo mensajero y selectividad para diversos agonistas. Receptores del grupo I (mGlu₁ y mGlu₅) activan la fosfolipasa C, mientras que los receptores del grupo II (mGlu₂ y mGlu₃) y el grupo III (mGlu₄, mGlu₆₋₈), inhiben la actividad de la AC (Kirchgessner, 2001).

2.3.2.2.9.4.7 Ácido γ -Aminobutírico (GABA)

GABA se sintetiza principalmente a partir del Glu por la glutamato descarboxilasa (GAD). Las funciones de GABA se desencadenan por su unión a sus receptores ionotrópicos GABA_A (Figura 19) y GABA_C, que son canales de cloruro activados por ligando y su receptor metabotrópico, GABA_B (regula canales de K⁺ y Ca²⁺) (Watanabe, 2002).

Desde hace varios años, la evidencia de que GABA es un neurotransmisor en el SNE se ha ido acumulando. Estos datos sugieren un papel modulador de GABA en la motilidad GI. De hecho, la enzima responsable de la síntesis de GABA se ha identificado dentro de los nervios entéricos, así como un sistema de captación de alta afinidad. En el tracto GI de roedores y humano se han identificado fibras GABAérgicas en el plexo mientérico (Bayer, 2003).

En contraste con el SNC donde GABA es inhibitorio, GABA entérico es un transmisor excitador e inhibitorio que actúa a través de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (Poulter, 1999).

La unión a sus receptores GABA_A puede llevar a la activación de las neuronas colinérgicas y neuronas no adrenérgicas no colinérgicas inhibitorias. Mientras que los efectos de la activación de los receptores GABA_B se relaciona en general, a un nivel presináptico, a una inhibición de la liberación de Ach a través del bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje (Bayer, 2003).

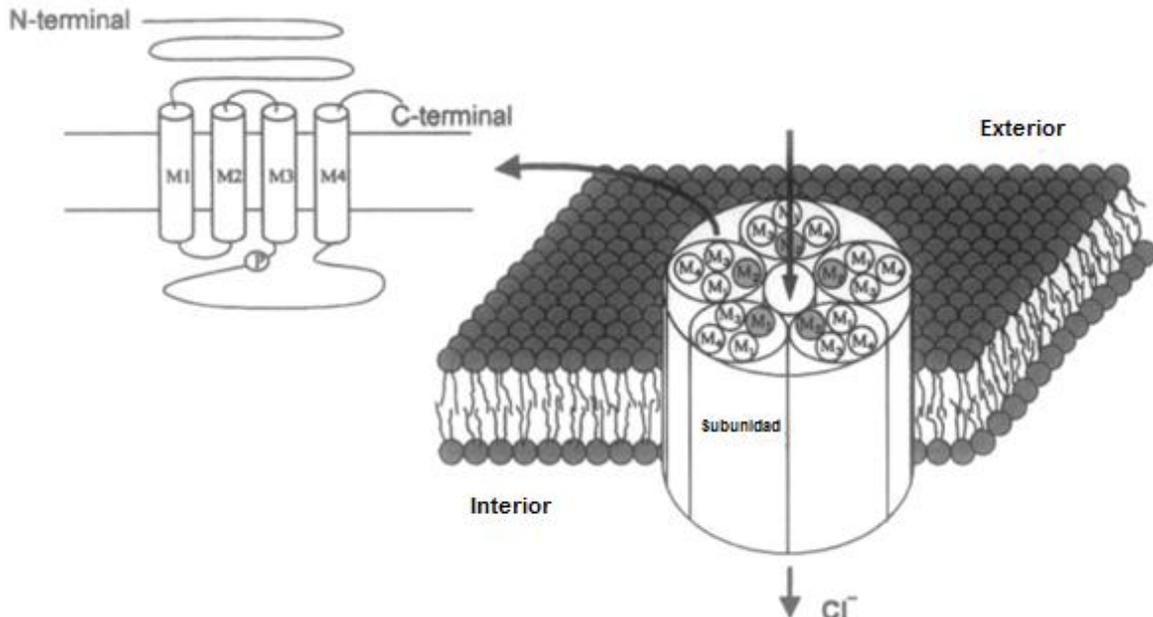


Figura 19. Representación esquemática del receptor GABA_A y sus subunidades (Watanabe, 2002).

2.3.2.2.9.4.8 Óxido Nítrico (NO)

El NO se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS). Existen tres isoformas principales de la NOS, la neuronal, la endotelial y la de macrófagos, que están codificadas por genes diferentes y tienen diferentes pesos moleculares. Tanto la NOS endotelial y neuronal son dependientes de Ca^{2+} , calmodulina y NADPH. La NOS neuronal es una proteína citoplásmica de 160 kDa que se encuentra como un homodímero (Young, 2000).

El principal receptor para el NO es la guanilato ciclasa soluble (sGC), que a diferencia de los receptores para otros neurotransmisores, está presente en el citoplasma, no en la membrana celular de la célula efectora. La activación de la sGC resulta en un aumento en la producción de GMPc que a su vez activa quinasas dependiente de GMPc; el aumento de GMPc también podría tener otros efectos, tales como acciones directas sobre los canales iónicos (Young, 2000).

Las células nerviosas que expresan NOS se encuentran en el plexo mientérico de los intestinos delgado y grueso, y las fibras nerviosas se encuentran innervando el músculo circular y longitudinal. La NOS se encuentra tanto en neuronas motoras inhibitorias como en interneuronas (Young, 2000).

La producción del NO provoca la relajación del músculo liso en el intestino la cual es mediada por la sGC (Young, 2000 y Vicent, 2010).

2.3.2.2.9.4.9 Canabinoides (CBS)

Los CBS actúan sobre receptores CB_1 y CB_2 . Estos parecen estar localizados en todas las clases funcionales de neuronas entéricas (Izzo, 2010).

En general los agonistas de los receptores CB actúan sobre los receptores CB_1 para reducir la contractilidad del músculo liso en diferentes regiones del tracto GI en animales y seres humanos. Tanto los músculos longitudinales y los circulares son generalmente sensibles a la acción inhibitoria de los agonistas del receptor CB (Izzo, 2010).

El receptor CB₁ interactúa con la proteína G_{i/o} que provoca la inhibición de la AC, bloqueo de canales de Ca²⁺ y la activación del canal rectificador de entrada a K⁺; también estimula las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y ejerce una acción ambivalente sobre el sistema del NO, ya que puede inhibir la síntesis de NO, o facilitar su liberación (Flores, 2008).

2.3.2.2.9.4.10 Sustancia P (SP)

La SP pertenece a la familia de péptidos conocido como taquicininas y fue el primer péptido de la familia identificado. Está formado por 11 aminoácidos y su receptor es el NK₁. Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en los plexos nerviosos que forman parte del SNE (Flores, 2008; Olsson, 2001 y Shuttleworth, 1995).

El receptor NK₁ está asociado a proteína G_{q/11} produciendo activación del ciclo de fosfoinosítidos y de la fosfolipasa C. La activación excitadora puede deberse a la inhibición de la conductancia al K⁺ mediada de forma primaria por una proteína G (Flores, 2008; Olsson, 2001 y Shuttleworth, 1995).

La estimulación directa del músculo liso a través de NK₁ por la SP media una acción contráctil del intestino (Flores, 2008; Olsson, 2001 y Shuttleworth, 1995).

2.3.2.2.9.4.11 Polipéptido Vasoactivo Intestinal (VIP)

El VIP es un péptido de 28 aminoácidos que se encuentra ampliamente distribuido en las neuronas motoras inhibitorias entéricas. Estas neuronas inervan directamente las células músculo liso circular. El VIP actúa sobre los receptores VPAC₁ y VPAC₂ de estas células para activar la AC a través de proteínas G_s. La generación resultante de cAMP activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) que modula canales de iones Ca²⁺, dando como resultado final que se suprima la contractilidad del músculo liso (Shi, 2007).

2.3.2.2.9.4.12 Somatostatina (SST)

La SST se encuentra en los tejidos en dos formas, como SST-14 (formada por 14 aminoácidos) y SST-28 (formada por 28 aminoácidos), y las dos son secretadas.

En el SNE se encuentra en los plexos nerviosos (mientérico y submucoso), (Chao, 2012).

Cinco tipos de receptores para este NP se han identificado SSTR₁ a SSTR₅ los cuales son receptores acoplados a proteína G. Predominantemente en el intestino se expresan SSTR₂ y SSTR₅ (Chao, 2012).

Tras la unión del ligando, las acciones inhibitoras de los receptores de la SST son mediados por uno de varios segundos mensajeros y las vías de señalización que activan. La unión a sus receptores activan las proteínas toxina-tosferina sensibles de unión a GTP de la subfamilia G_{i/o}, que a su vez inhiben la AC y disminuyen los niveles de AMPc intracelulares (Chao, 2012).

Receptores de SST también pueden activar canales de K⁺, que causan hiperpolarización reversible de la membrana, inhibiendo la afluencia de Ca²⁺ a través del cierre de canales de voltaje de Ca²⁺ y la reducción de Ca²⁺. Por último, los receptores de SST activan la proteína tirosina fosfatasas causando inhibición de MAPKs (Chao, 2012).

SST inhibe el peristaltismo en el intestino delgado a través de su receptor SSTR₂ (Chao, 2012).

2.3.2.2.9.4.13 Neuropéptido Y (NPY)

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos es el péptido más abundante del sistema nervioso de mamífero, se halla tanto a nivel central como periférico. En el intestino de los mamíferos, el NPY está presente en las neuronas mientéricas y submucosas que proporcionan una extensa inervación intrínseca a las capas del músculo liso (Flores, 2008 y Holzen, 2012).

El NPY inhibe la motilidad GI a través de los receptores Y₁, Y₂ y Y₄. Todo estos asociados a proteínas G (G_{i/o}) vinculados con la movilización de Ca²⁺ y la inhibición de la AC (Flores, 2008 y Holzen, 2012).

2.3.2.2.9.4.14 Péptidos opioides

Los opiáceos son derivados del opio, que son productos aislados de plantas de amapola que tratan eficazmente la disentería, alivian el dolor y producen euforia. Los opioides son sustancias que tienen acciones como las de los opiáceos. Los opiáceos producen sus efectos en el cuerpo mediante la unión a receptores para neurotransmisores liberados de forma endógena llamados péptidos opioides, tanto en los sistemas nerviosos central y periférico. Las encefalinas, endorfinas y dinorfinas son tres familias distintas de los péptidos opioides (Wood, 2005).

Tres tipos principales de receptores opioides mu, delta y kappa median las acciones de los opiáceos y péptidos opioides. Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores de membrana metabotrópicos acoplados a proteína G (G_i/G_o), (Holzer, 2009).

Una acción universal de los opiáceos y péptidos opioides en el SNE es la supresión de la excitabilidad neuronal (inhibición de la MI). La morfina, β -endorfinas, encefalinas o nociceptina actúan sobre receptores opioides en las neuronas para abrir canales de conductancia de potasio, lo que a su vez hiperpolariza la membrana. Esto evita la generación de los impulsos necesarios para la liberación de neurotransmisores (ACh y SP) en las sinapsis nerviosas y en las uniones neuromusculares, neuroepiteliales y neurovasculares. La supresión de la excitabilidad neuronal representa la mayor parte de las acciones de los opiáceos, opioides sintéticos y péptidos opioides endógenamente liberados sobre la motilidad GI (Wood, 2005).

Finalmente con los resultados obtenidos del estudio *in vitro* se construyeron curvas dosis respuesta para poder analizar el efecto provocado por el NP. A continuación vamos a hablar de estos gráficos.

2.4 Farmacometría: Curva Dosis Respuesta

La Farmacometría se encarga de la estimación de la concentración o de la potencia de una sustancia mediante la cuantificación de la respuesta biológica que produce (Balderas, 2009).

Sus objetivos son:

- Medición de la actividad farmacológica de sustancias nuevas o no definidas químicamente.
- Investigación de la función de los mediadores endógenos.
- Medición de la toxicidad de fármacos y efectos no deseados.
- Medición de la concentración de sustancias conocidas en el organismo (Balderas, 2009)

La intensidad y la duración de los efectos del fármaco son una función de la dosis del fármaco y la concentración del mismo en el sitio de acción (Balderas, 2009).

Cuando tales efectos son graficados contra la dosis o concentración de un fármaco producen las denominadas Curvas Dosis – Respuesta (Balderas, 2012).

2.4.1 Curva Dosis Respuesta Gradual

Este tipo de curvas describen el efecto de varias concentraciones de fármaco en un individuo integro, tejido u órgano aislado (Golán, 2012 y Balderas, 2009).

Los datos de las curvas dosis respuesta gradual (Figura 20), se representan en una gráfica del efecto farmacológico o porcentaje de respuesta (ordenadas) contra el logaritmo de la dosis (abscisas), (Katzung, 2013).

De la curva dosis respuesta gradual pueden deducirse dos parámetros importantes: potencia y eficacia (Figura 20A). La potencia (CE_{50}) de un fármaco es la concentración a la que ese fármaco provoca el 50% de su respuesta máxima. La eficacia (E_{max}) es la respuesta máxima que produce el fármaco (Golán, 2012 y Rang, 2012).

Estos parámetros son muy útiles para comparar la potencia de diferentes fármacos con efectos cualitativos similares (Figura 20B), (Rang, 2012).

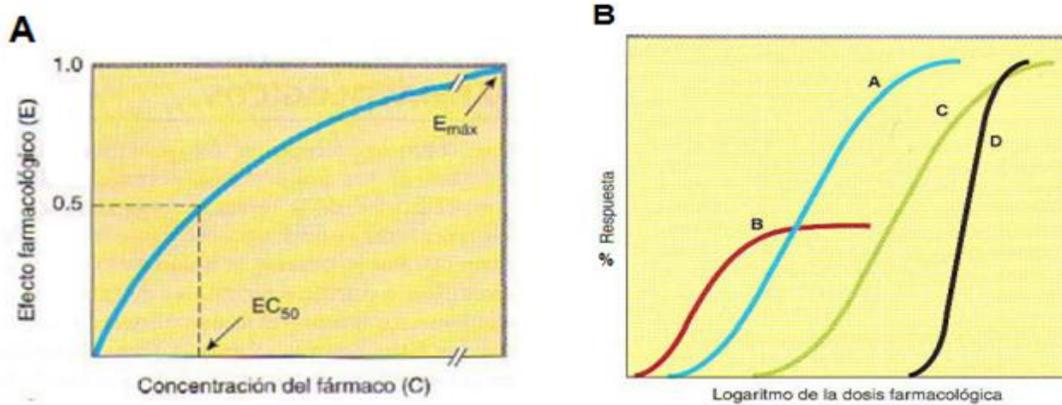


Figura 20. Curvas dosis respuesta gradual. A) Se muestran los parámetros que se pueden obtener de este tipo de curvas: Potencia (EC_{50}) y Eficacia ($E_{m\acute{a}x}$). B) Curvas graduadas de dosis-respuesta para cuatro fármacos; se ilustran las diferentes potencias farmacológicas y distintas eficacias máximas (Katzung, 2013).

2.4.2 Curva Dosis Respuesta Cuantal

Este tipo de curvas describen si un fármaco produce un efecto o no en grupos de individuos íntegros o grupos de tejidos u órganos. Por lo que pueden describir respuestas farmacológicas como sedación y contracción por ser consideradas de tipo “todo o nada”, es decir que pueden ocurrir o no, a esto se le llama respuesta cuantal (Balderas, 2012 y Villanueva, 1987).

En un organismo íntegro un fármaco es capaz de producir más de una respuesta farmacológica, con lo cual se puede construir curvas de dosis respuesta cuantales y calcular las dosis efectivas medias correspondientes. Por lo general uno de esos efectos es deseable o el terapéutico, y los demás suelen considerarse como indeseables o tóxicos. Como resultado sabremos si una sustancia es útil como agente terapéutico (Villanueva, 1987).

La dosis efectiva para la acción deseable debe ser inferior a la correspondiente a cualquiera de los efectos indeseables (Villanueva, 1987).

También puede utilizarse las curvas dosis respuesta cuantil para generar información con respecto al margen de seguridad que debe esperarse de un fármaco en particular administrado para producir un efecto específico (Katzung, 2013).

Al graficar la distribución de frecuencia de respuesta contra el logaritmo de la dosis, se obtiene una curva sigmoidea simétrica. Al sumar estas respuestas, la distribución de las frecuencias acumulativas resultantes constituye una curva cuantil de dosis efecto (o curva dosis porcentaje) de la porción o porcentaje de individuos que presentan el efecto graficado como función del logaritmo de la dosis (Figura 21), (Katzung, 2013).

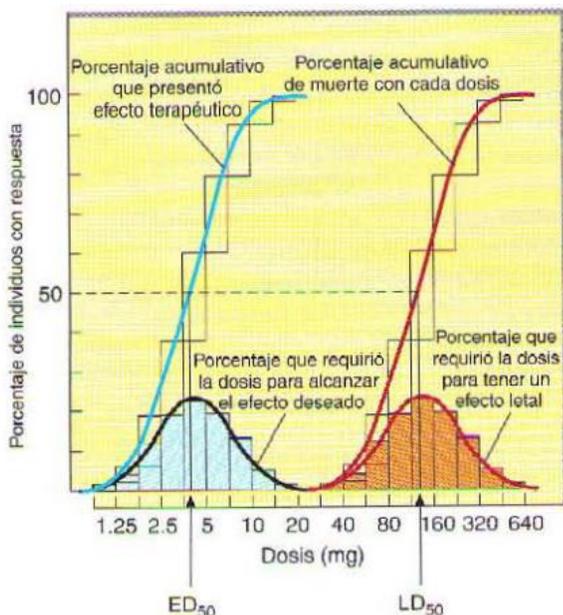


Figura 21. Gráficas cuánticas de dosis-efecto. Las barras sombreadas (y las curvas con forma de campana que las acompañan) indican la distribución por frecuencia de la dosis del fármaco requeridas para producir un efecto especificado; o sea, el porcentaje de animales que necesitaron una dosis particular para presentar el efecto. Las barras claras y las curvas coloreadas correspondientes indican la distribución por frecuencia acumulativa de las respuestas, que tienen una distribución logarítmica normal. También se muestran dos de los parámetros que podemos obtener de estos gráficos: Dosis Efectiva 50 (DE₅₀) y Dosis Letal 50 (DL₅₀), (Katzung, 2013).

Puesto que la curva dosis respuesta cuantil es en realidad una expresión de una curva de distribución normal, la escala de las ordenadas que representan el porcentaje de sujetos que responden, puede construirse con una escala probit (Ruiz, 2011).

Dentro de los métodos probabilísticos, destaca el método PROBIT ("Probability Unit"). El cual permite el estudio de los efectos adversos de un accidente siempre y cuando puedan describirse mediante funciones de probabilidad (Ruiz, 2011).

La metodología PROBIT se basa en definir una unidad de probabilidad (Y), cuya relación con la probabilidad (P) se expresa mediante la ecuación:

$$P = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \int_{-\infty}^{Y-5} \exp\left(\frac{-x^2}{2}\right) \cdot dx$$

La forma más habitual de expresar la ecuación anterior es:

$$Y = 5 + \frac{\ln(x) - \mu}{\sigma}$$

Dónde:

- Y: porcentaje de población afectada
- x: intensidad del factor causante de daño
- μ : valor medio de la distribución normal
- σ : desviación típica de la distribución normal

Esta última ecuación resulta más fácil de utilizar en la forma:

$$Y = k_1 + k_2 \cdot V$$

Es como normalmente se utiliza en análisis de vulnerabilidad, donde:

- k_1, k_2 : constantes empíricas
- V: medida de la intensidad del factor causante del daño (Ruiz, 2011)

Esta metodología es ampliamente usada porque mediante la utilización de las unidades PROBIT permite pasar de una curva de distribución normal a una línea recta (Figura 22) con parámetros fácilmente calculables como son:

- Dosis efectiva media (DE_{50}), (Figura 21): Dosis de una sustancia con la cual el 50% de los individuos presentan un efecto específico.
- Dosis tóxica media (DT_{50}): Dosis de una sustancia requerida para producir un efecto tóxico particular en el 50% de la población.
- Dosis letal media (DL_{50}), (Figura 21): Dosis de una sustancia necesaria para producir la muerte al 50% de la población.
- Índice terapéutico (IT): Señala el grado de selectividad que posee un fármaco para generar los efectos buscados en oposición a los efectos adversos, calculándose: DL_{50}/DE_{50} .
- Margen de seguridad (MS): Es la relación existente entre la dosis más baja que produce toxicidad (DL_1) y la dosis más alta que produce una respuesta terapéutica máxima (DE_{99}), se calcula: $(DL_1-DE_{99})/DE_{99}$ (Goodman and Gilman, 2012).

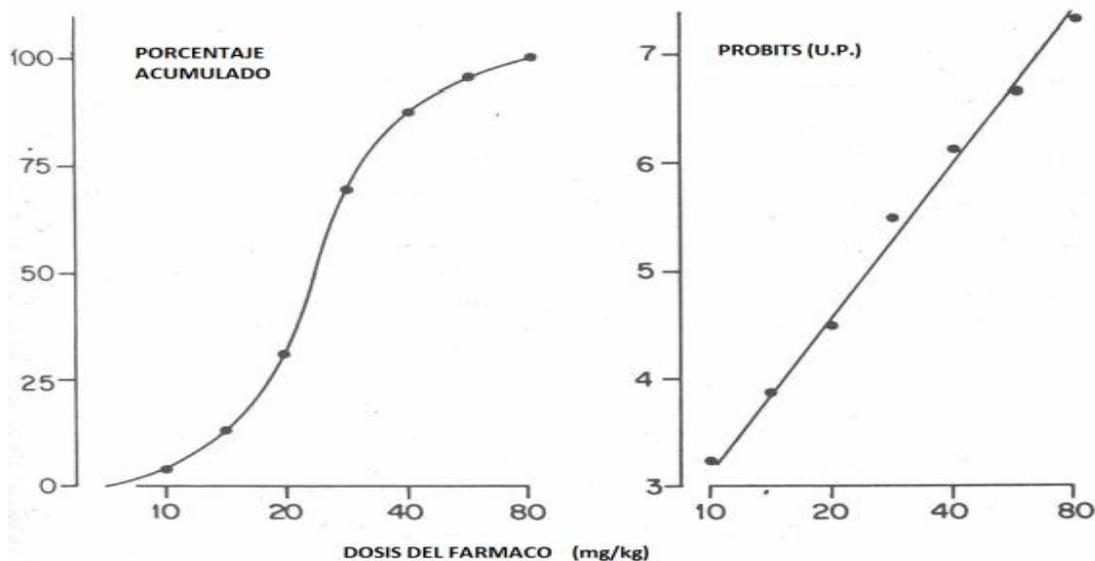


Figura 22. Transformación de curva sigmoidea dosis respuesta-cuantal (izquierda) en una recta (derecha) mediante la sustitución del porcentaje de respuestas por probit correspondiente (Ruiz, 2011).

Capítulo 3. Justificación

Durante miles de años la naturaleza ha sido una fuente inagotable de agentes terapéuticos. Un gran número de medicamentos actuales se han derivado de fuentes naturales; muchos de ellos basados en los usos de la medicina tradicional. En el que los productos naturales pueden contribuir a la búsqueda de nuevos agente terapéuticos en diferentes ámbitos: a) actuando como nuevos medicamentos que se pueden utilizar sin modificar, b) proporcionando nuevos grupos de farmacofóricos que sirven para “bloques químicos de construcción” para la síntesis de nuevos fármacos e c) indicando nuevos mecanismos farmacológicos de acción que permita completar la síntesis de nuevos análogos. Por lo que en los últimos años la búsqueda de nuevos medicamentos y estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos provenientes de organismos marinos se han incrementado considerablemente. Hoy en día la biodiversidad marina ha dado lugar a la creación de algunos fármacos a partir de productos naturales de origen marino como es el caso del Ziconotide o Prialt, analgésico 1000 veces más potente que la morfina proveniente del caracol *Conus magus*. Una de las ventajas de éste fármaco es que su forma sintética y comercial no causa adicción. De algunos cefalópodos, se han aislado moléculas salivales para su empleo como herramientas farmacológicas o medicamentos, por ejemplo la Eledoisina (undecapéptido aislado de *Eledona moschata* y *Eledone aldrovand*), ésta se ha utilizado por sus propiedades vasodilatadoras y estimulantes del músculo liso en mamíferos. Análogamente podemos citar la SE-cefalotoxina y a las octotaquiquininas aisladas de *Sepia esculenta* y de *Octopus vulgaris* respectivamente, la primera se trata de una toxina de naturaleza proteica, que posee características neurotóxicas mientras que las últimas implican neuropéptidos secretados como veneno y que actúan en organismos vertebrados.

Por lo que, en relación con el *O. maya*, a partir de la saliva de la cual se ha extraído moléculas bioactivas de la parte neurotóxica con efecto paralizante en

cefalópodos, se ha podido fraccionar y obtener un neuropéptido (en proceso de secuenciación), que es el objeto de estudio de este trabajo, el cual es de interés para determinar el efecto miocontráctil o miorelajante mediante un estudio *in vitro* (íleon de rata), ya que en estudios previos se encontró que este tipo de efectos son dosis-respuesta dependientes. Este neuropéptido podría servir para la síntesis de un fármaco que combata el dolor y espasmos o “contracciones” en estómago, intestino, vesícula biliar, etc.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto miocontráctil o miorelajante de un neuropéptido obtenido del pulpo rojo mexicano en estudio *in vitro* (ileon de rata).

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de un neuropéptido en un estudio piloto *in vivo* y obtener el parámetro farmacológico DE_{50} mediante una curva dosis - respuesta cuantál.
- Determinar el efecto del neuropéptido en un estudio *in vitro* y obtener los parámetros farmacológicos CE_{50} y E_{max} del neuropéptido, mediante una curva dosis - respuesta gradual.

Capítulo 5. Hipótesis

Dado que en la evaluación de un neuropéptido obtenido del pulpo maya o rojo en estudios piloto previos presentó un efecto bifásico dependiente de la dosis (relajante y contráctil), se espera por lo tanto que, tenga un efecto similar en función de la dosis al ser evaluado en un modelo de estudio *in vitro* en íleon de rata.

Capítulo 6. Material y Métodos

6.1 Esquema general de trabajo.

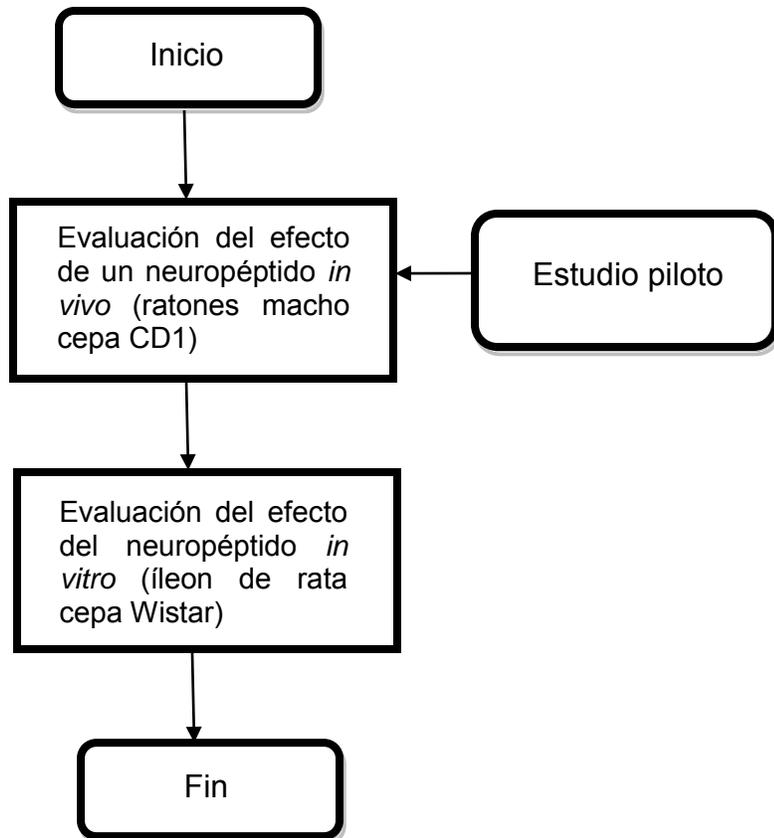


Figura 23. Diagrama general de trabajo.

6.2 Material

6.2.1 Instrumentos, equipo y material

Tabla 2. Lista de instrumentos, equipo y material.

Instrumentos, equipo y material	Marca
Aguja quirúrgica curva	N/A
Balanza analítica	Explorer Ohaus
Bomba de aire para acuario	Elite 799
Caja de Petri	Kimax
Cámara de órganos aislados	N/A
Estuche de Disección	N/A
Fisiógrafo con acoplador para miógrafo	Tipo MK-III-P de Narco Scientific Biosystems Divisions
Hilo inextensible	N/A
Marcador indeleble	Signal extra
Miógrafo de alta sensibilidad	F-60 Narco Biosystems ABS
Papel para Fisiógrafo	N/A
Pinza de tres dedos	N/A
Pipeta graduada de 10 mL	Pyrex
Resistencia	N/A
Soporte universal	N/A
Termómetro	Brannan
Vasos de precipitados de 250 y 1000 mL	Pyrex

6.2.2 Reactivos químicos

Tabla 3. Lista de Reactivos químicos.

Reactivos	Marca
Acetilcolina	N/A
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Glucosa	Química Juc
KCl	Sigma
MgSO ₄	Vesec
NaCl	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
SSI	N/A

6.2.3 Material biológico

6.2.3.1 Neuropéptido

El NP total al 2% y las fracciones M6 y M7, que corresponden al NP total y las fracciones del NP, proporcionadas por el Doctor Sergio Rodríguez Morales Académico de la Unidad de Química, Facultad de Química, UNAM; ubicada en el puerto de Sisal, Yucatán.

6.2.3.2 Animales de experimentación

Para el estudio piloto se utilizaron 7 grupos de ratones macho de la cepa CD1 con una n=6 y un peso de 25±5 g. El NP fue administrado a razón de 0.1 mL/10 g, vía IP.

Para el estudio in vitro se utilizaron 5 grupos de ratas macho cepa Wistar con una n=3 y un peso de 220±50 g. Las cuales tuvieron un ayuno de 12 h y posteriormente se realizó la eutanasia por el método físico de dislocación cervical de acuerdo al procedimiento descrito en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio).

Los animales empleados en este experimento fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Química, UNAM. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, con acceso de alimento y agua, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

6.3 Métodos

6.3.1 Estudio piloto (*in vivo*)

Para el estudio piloto se evaluó el NP total a las dosis de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 100.0 mg/Kg. Posteriormente se formaron 7 grupos de ratones con una n=6 y se procedió a pesarlos y marcarlos. Se administró el neuropéptido a cada grupo de ratones por vía IP como se muestra en la tabla 4. Finalmente, se observó cuidadosamente a los animales después de la administración de las soluciones del NP total durante 30 min y se valoró si el animal llegó a la sedación (movimientos

desordenados, disminución de la actividad motora, excitación moderada, calma y relajación) o bien presentó contracción (estiramiento de los miembros posteriores, contracción abdominal y/o presencia de diarrea).

Tabla 4. Distribución de los ratones en grupos y la correspondiente dosis administrada de solución de NP total.

Grupo	Dosis (mg/Kg)	Núm. De Ratón
1	0.25	1-6
2	0.5	7-12
3	1.0	13-18
4	2.0	19-24
5	4.0	25-30
6	8.0	31-36
7	100.0	37-42

A partir de los datos recopilados, se realizó una curva dosis respuesta cuantitativa para el efecto de sedación y otra para el efecto de contracción y se determinaron las DE_{50} correspondientes. Se construyeron los gráficos de barras correspondientes a las latencias de sedación y contracción así como se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico (ANOVA de una vía), con una $P < 0.05$ para saber si existían diferencias significativas. Tras la indicación de la ANOVA de diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el método de comparación de medias de Tukey para encontrar las latencias de los grupos que fueron estadísticamente diferentes. Este análisis se llevó a cabo empleando el programa estadístico SIGMAPLOT versión 11.0.

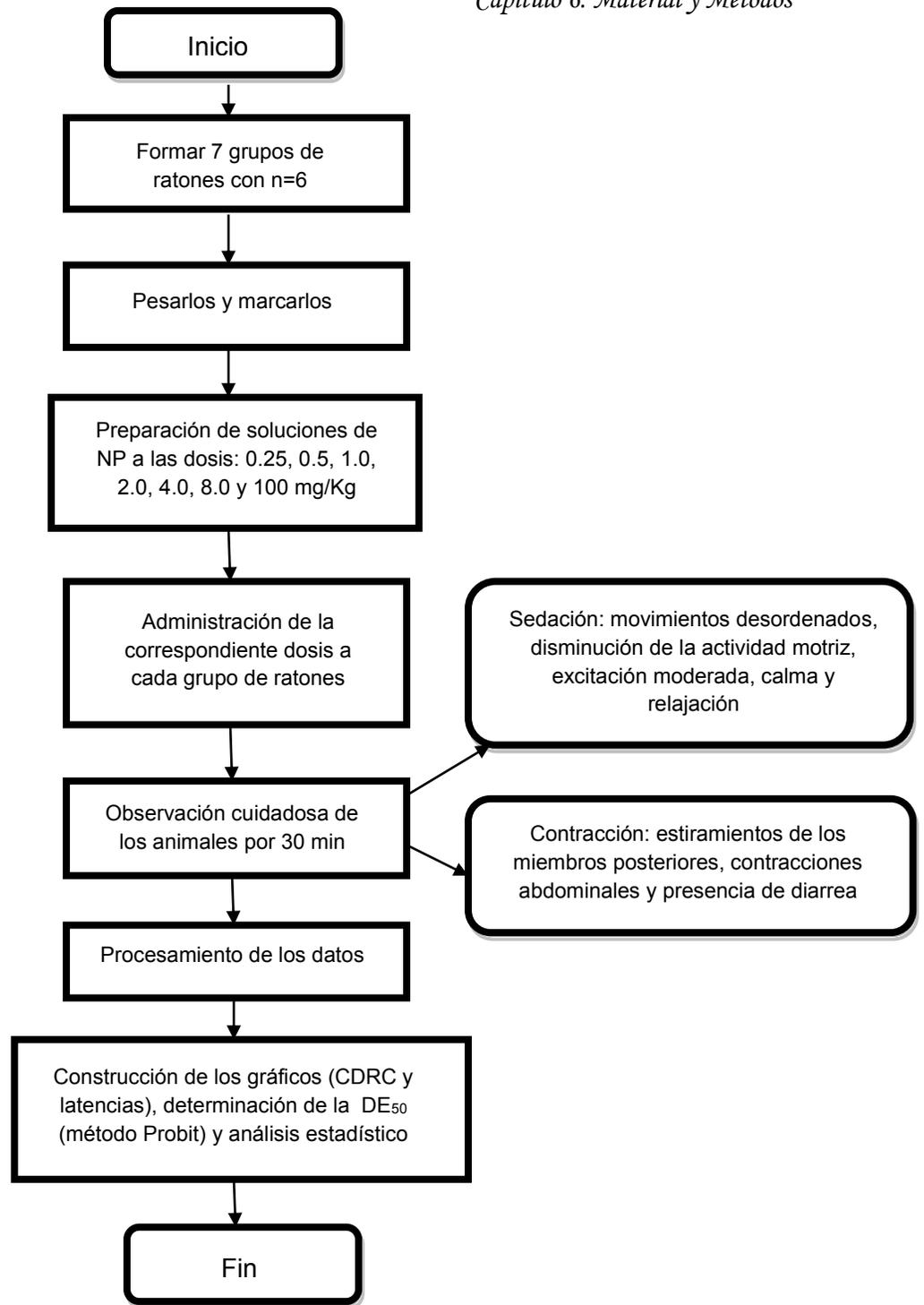


Figura 24. Diagrama del procedimiento seguido para realización del estudio *in vivo* (piloto).

6.3.2 Estudio *in vitro*

6.3.2.1 Preparación de soluciones de Ach, NP total, fracciones M6 y M7 del NP y solución fisiológica de Tyrode.

Se prepararon soluciones de Ach, de NP total y fracciones M6 y M7 del NP de concentraciones 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL utilizando agua destilada. La solución de Tyrode se preparó de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo 1.

6.3.2.2 Preparación del equipo, cámara de órganos aislados y evaluación farmacológica de las diferentes soluciones de Ach, NP total y fracciones M6 y M7 del NP.

Se preparó un dispositivo de registro gráfico, con un miógrafo isométrico sujeto a un soporte universal. En el mismo soporte se colocó la cámara para órganos aislados de manera que quedo debajo del miógrafo. Se colocó en la parte inferior de la cámara un tapón que tenía un sistema de tubos de desagüe y burbujeo (Figura 25), (Jiménez, 2003).

Se puso a calentar un vaso de precipitados lleno de solución Tyrode y un vaso con agua cuidando que la temperatura se mantuviera a 37°C. La solución se utilizó para llenar la parte interna de la cámara y así mantener el íleon viable mientras el agua se utilizó para la parte externa de la cámara y así ayudar a mantener constante la temperatura de la solución Tyrode que se encontraba en contacto con la preparación biológica (Jiménez, 2003).

Se preparó el fisiógrafo con todas sus conexiones, papel y tinta (Figura 25), (Jiménez, 2003).

La distribución de las ratas en grupos y las correspondientes sustancias agregadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Distribución de las ratas en grupos y la correspondiente sustancias agregadas.

Grupo	Num. de Rata	Sustancia agregada
1	1-3	SSI
2	4-6	Ach
3	7-9	NP total
4	10-12	M6
5	13-15	M7

Con todo listo se procedió a sacrificar a las ratas por medio de dislocación cervical. Se les abrió el abdomen mediante una incisión en la línea media abdominal para exponer las vísceras. Una vez localizado el intestino delgado, se tomó desde su primera porción cortando sus uniones píloro-duodenal e íleo-cecal, se extrajo y se colocó en una caja de Petri que contenía solución Tyrode fría y aeración dentro de la solución. Se cortó un tramo de intestino de 3 a 4 cm correspondiente al íleon de la misma porción en todas las ratas (Jiménez, 2003).

En una caja Petri con solución Tyrode fría se colocó cada segmento de íleon y se ató uno de los extremos con un hilo haciendo pasar la aguja quirúrgica curva a través de la pared, teniendo cuidado de que no quedara cerrada la luz intestinal; se dejaron los cabos del hilo lo suficientemente largos. Se realizó la misma atadura del otro extremo, de tal forma que se obtuvo un tubo abierto a través del cual pudo fluir libremente la solución Tyrode dentro y fuera del intestino (Jiménez, 2003).

Se sujetó con el hilo uno de los extremos al ganchillo del tapón inferior de la cámara de órganos aislados, se introdujo el segmento intestinal por debajo de la cámara con ayuda de unas pinzas de disección y se colocó el tapón en su lugar. Se procedió a llenar la cámara con solución de Tyrode a 37°C; se sujetó el otro extremo del intestino al ganchillo del miógrafo, cuidando que no se estirara demasiado el intestino, inmediatamente se acopló el sistema de aeración (Figura 25). La preparación se mantuvo en baño maría con lo cual se mantuvo constante la temperatura del sistema (Jiménez, 2003).

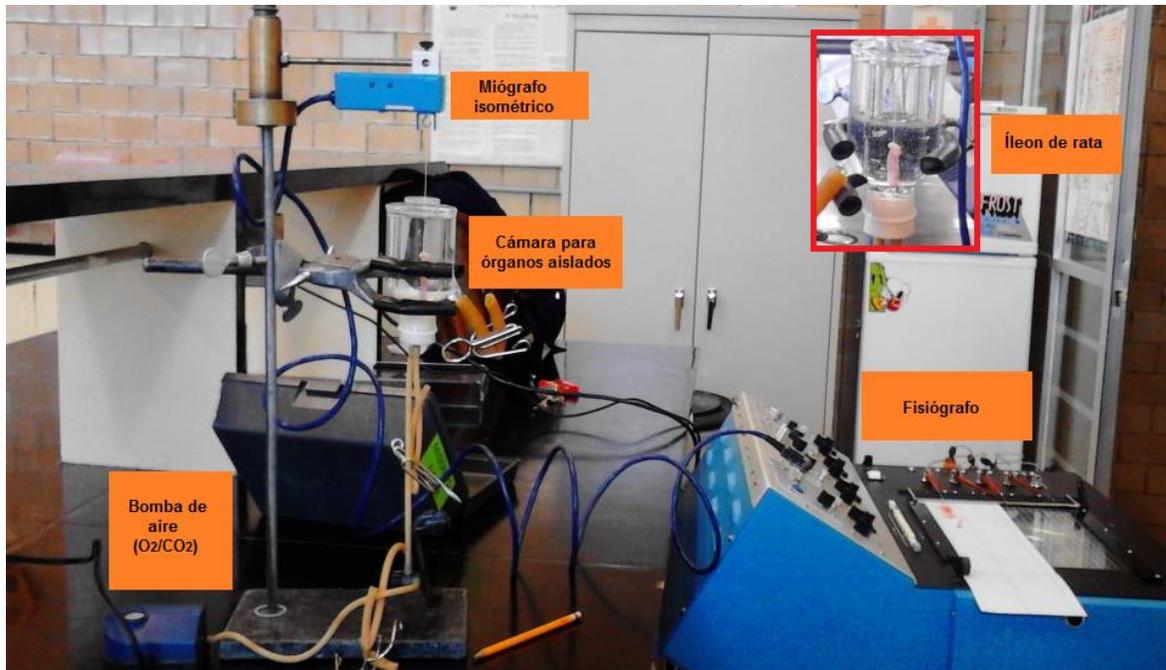


Figura 25. Equipo de prueba para el modelo de íleon aislado de rata. Fotografía del equipo y sus principales componentes. En el recuadro rojo se muestra con más claridad el montaje del íleon de rata en la cámara de órganos aislados.

Para realizar el registro, se calibro previamente el sistema de manera que la señal de 1 g generó un desplazamiento vertical de 2 cm mientras que la velocidad fue de 0.5 cm/s (Jiménez, 2003).

Con la preparación sumergida en la solución de Tyrode a 37°C y con el burbujeo de aire regulado se comenzó el registro basal de la actividad mecánica generada por el intestino delgado durante 15 min. Posteriormente se procedió a añadir al baño 1 mL de SSI lo cual se repitió 7 veces en total simulando la adición de las diferentes concentraciones de las otras sustancias utilizadas (Ach, NP total, M6 y M7). Estas adiciones fueron no acumulativas, es decir, entre la adición de cada 1 mL se realizaron dos lavados, se registró la actividad basal durante 5 min y se agregó el siguiente 1 mL, se observó la respuesta durante 5 min y se realizaron los siguientes dos lavados. Se repitió el procedimiento anterior para obtener las respuestas del intestino delgado a la adición de las soluciones de diferentes concentraciones de Ach, NP total y de sus fracciones.

En la Figura 26 se muestra como se procesaron los datos a partir de la respuesta gráfica que proporciono el equipo, para obtener el valor de porcentaje de contracción de íleon real producido por el NP total y sus fracciones (%FCRNP) mediante la siguiente ecuación:

$$\%FCRNP = (FCRNP \times 100) / FCRMVNP$$

Donde:

FCRNP: Fuerza de contracción real producida por el NP

FCRMVNP: Fuerza de contracción real de mayor valor producida por el NP

100: 100%

De la misma forma se obtuvo el porcentaje de contracción de íleon de rata real producida por la Ach.

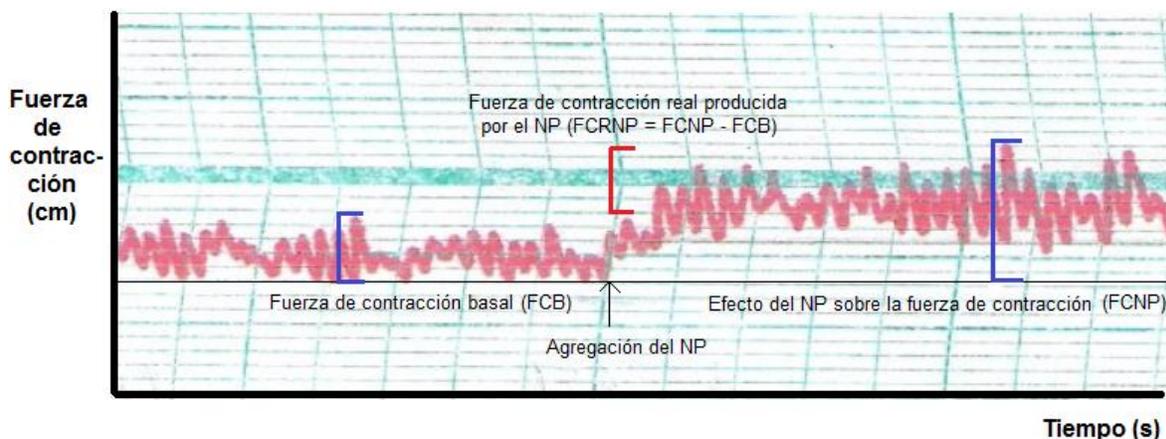


Figura 26. Ejemplo de los registros gráficos típicos proporcionados por el fisiógrafo y los componentes para obtener el porcentaje de contracción.

También se obtuvo la frecuencia producida por las diferentes concentraciones de las soluciones del NP total y de sus fracciones mediante la ecuación:

$$F = v / \lambda \text{ (http://www.uia.mx)}$$

Donde:

F = frecuencia (1/s)

v = velocidad de onda (cm/s), (Figura 27)

λ = longitud de onda (cm), (Figura 27)

Como se mencionó antes la velocidad del registro o velocidad de onda fue de 0.5 cm/s.

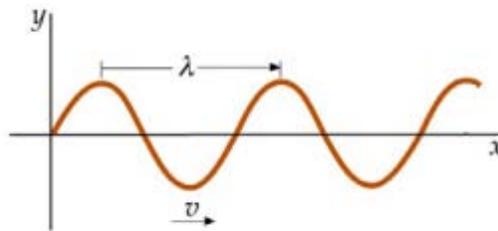


Figura 27. Longitud y velocidad de onda (<http://www.uia.mx>).

A partir de los datos obtenidos del %FCRNP se construyeron curvas dosis respuesta gradual para el NP total y sus fracciones determinándose la CE_{50} y la CE_{max} correspondientes. Mientras que con la frecuencia se construyeron gráficos de barras y se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico (ANOVA de una vía) con una $P < 0.05$ para saber si existían diferencias significativas. Tras la indicación de la ANOVA de diferencias significativas entre los tratamientos se aplicaron las correspondientes pruebas post-hoc Tukey y Duncan. Este análisis se llevó a cabo empleando el programa estadístico SIGMAPLOT versión 11.0.

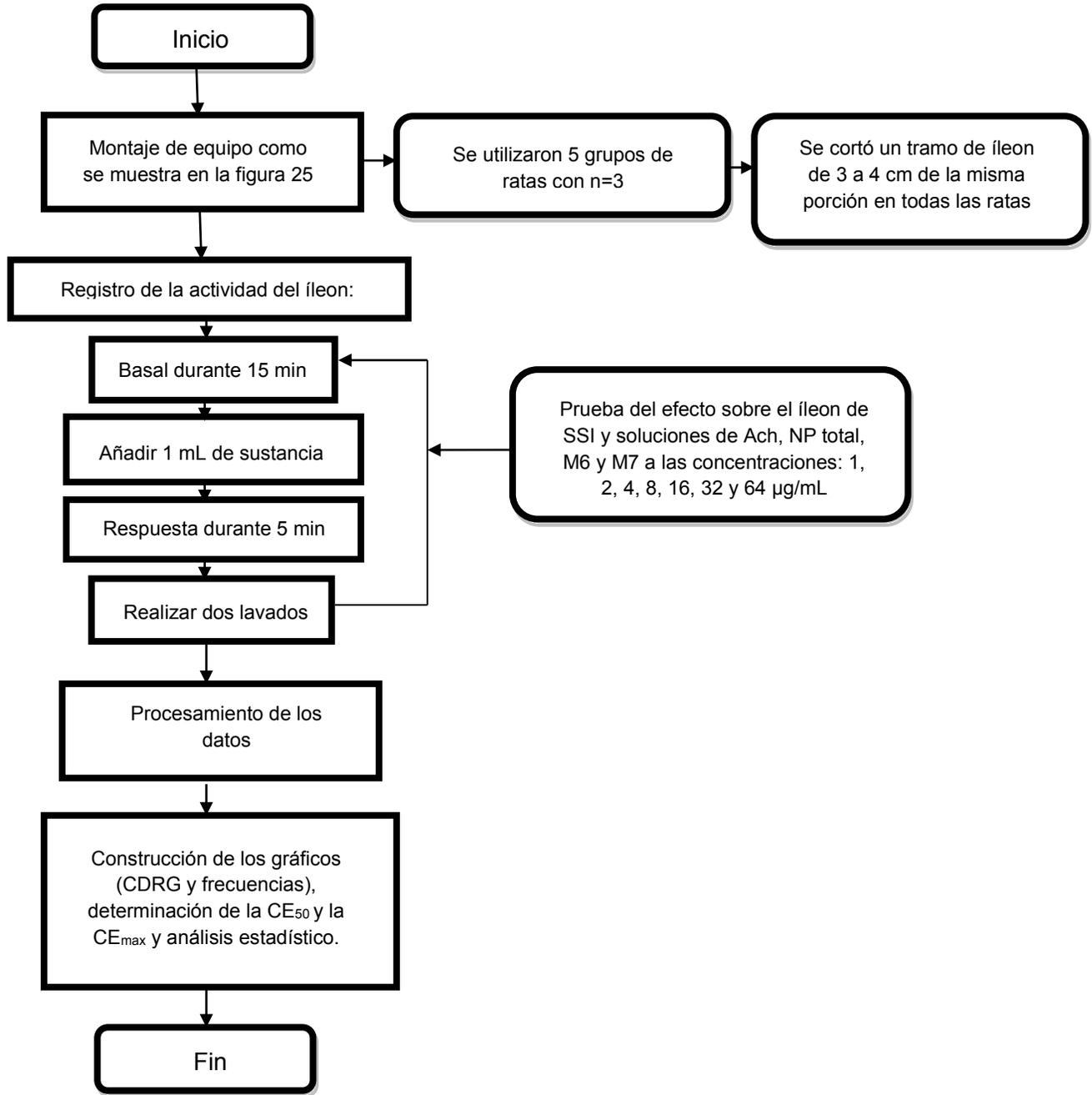


Figura 28. Diagrama del procedimiento seguido para la realización del estudio *in vitro*.

Capítulo 7. Resultados

7.1 Estudio piloto (*in vivo*)

7.1.1 Determinación del efecto del NP total y la DE₅₀ asociada

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del experimento piloto (*in vivo*) en ratones CD1 que fueron administrados con diferentes dosis de soluciones de NP total, en donde se observa que este último provoca un efecto bifásico dosis dependiente; con respecto a la latencia de sedación esta aumenta conforme aumenta la dosis administrada alcanzando su mayor duración a la dosis 0.5 mg/Kg para después disminuir y volver a aumentar a la dosis de 4.0 mg/Kg y después mantenerse prácticamente constante. En contraste la latencia de contracción aumentó gradualmente alcanzando su mayor duración a la dosis de 1.0 mg/Kg para después a partir de la dosis siguiente 2 mg/Kg ya no presentarse, ya que hubo presencia del efecto de sedación siendo en el 100% de la población de los animales.

Tabla 6. Resultados obtenidos del experimento piloto (*in vivo*). L.S= Latencia de Sedación, L.C= Latencia de Contracción, U.P.S= Unidades Probit de Sedación y U.P.C= Unidades Probit de Contracción.

Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	Núm. De rata	Promedio de L.S (min)	% de ratas que presentaron respuesta	U.P.S	Promedio de L.C (min)	% de ratas que presentaron respuesta	U.P.C
0.25	-0.60	1-6	15	33.33	4.560	0.67	66.66	5.413
0.5	-0.30	7-12	24.66	50	5	5.5	50.0	5
1.0	0	13-18	5.13	66.66	5.413	18	33.33	4.560
2.0	0.30	19-24	0.71	100	6.751	0	0	3.249
4.0	0.60	25-30	3.08	100	6.751	0	0	3.249
8.0	0.90	31-36	2.31	100	6.751	0	0	3.249
100.0	2	37-42	4	100	6.751	0	0	3.249

En la Figura 29 se muestra la curva dosis respuesta cuantil para el efecto sedación provocado por el NP total de *O. maya* en ratones, donde se puede observar que el efecto es dependiente de la dosis administrada. A partir de la dosis de 2 mg/kg se produce sedación en el total de la población de los animales. La DE_{50} de dicho efecto fue de 0.736 mg/Kg.

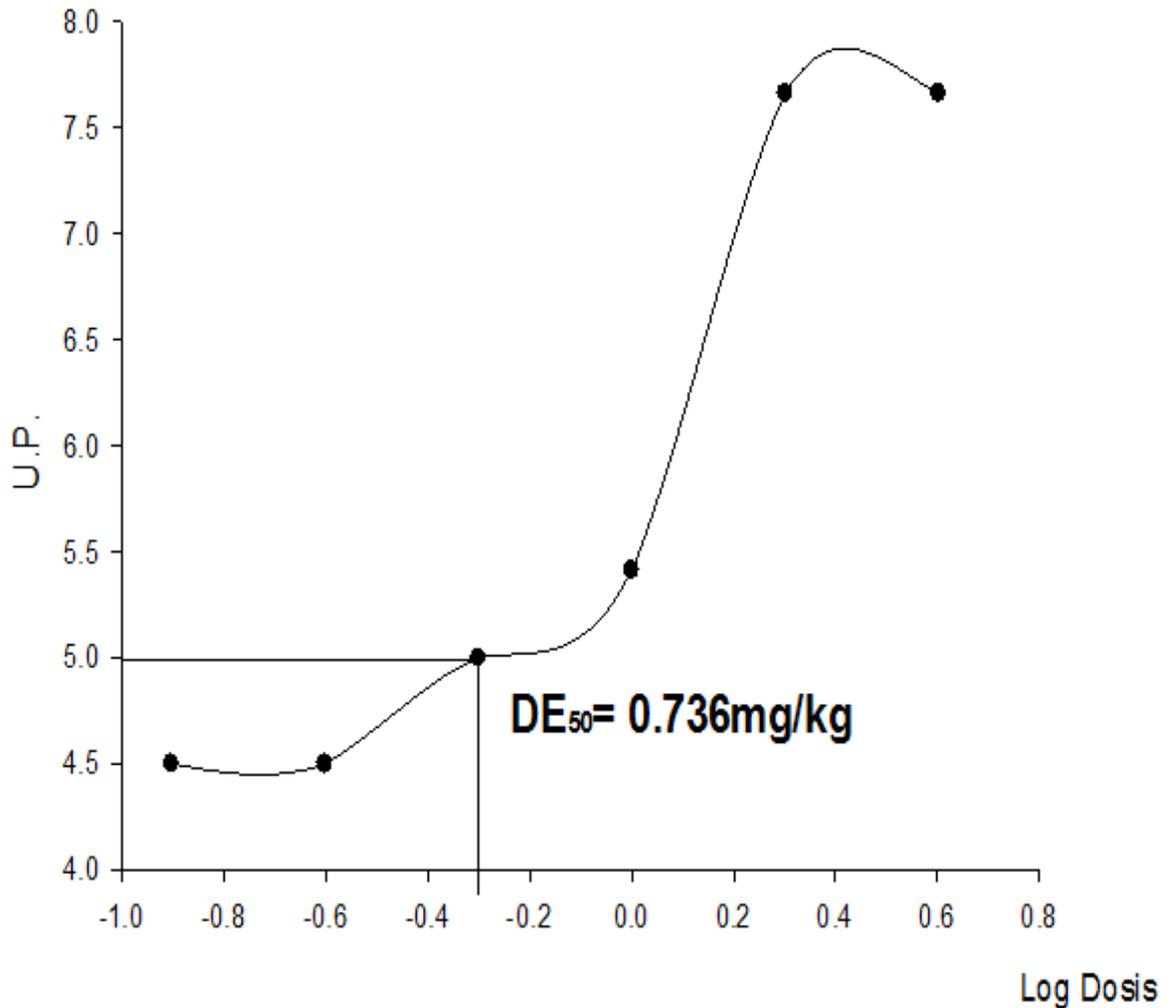


Figura 29. Curva dosis respuesta cuantil para el efecto de sedación del NP total de *O. maya* en ratones.

En la Figura 30 se muestra la latencia de sedación producida por el NP total de *O. maya* en los ratones, donde se observa un aumento significativo en el grupo de ratones administrados con la dosis 0.5 mg/Kg (ANOVA de una sola vía $H=14.350$, $g.l=6$, $p<0.05$. Prueba post-hoc Tukey). Después de la dosis anterior se muestra una disminución en el tiempo de sedación para después volver a aumentar y permanecer prácticamente constante.

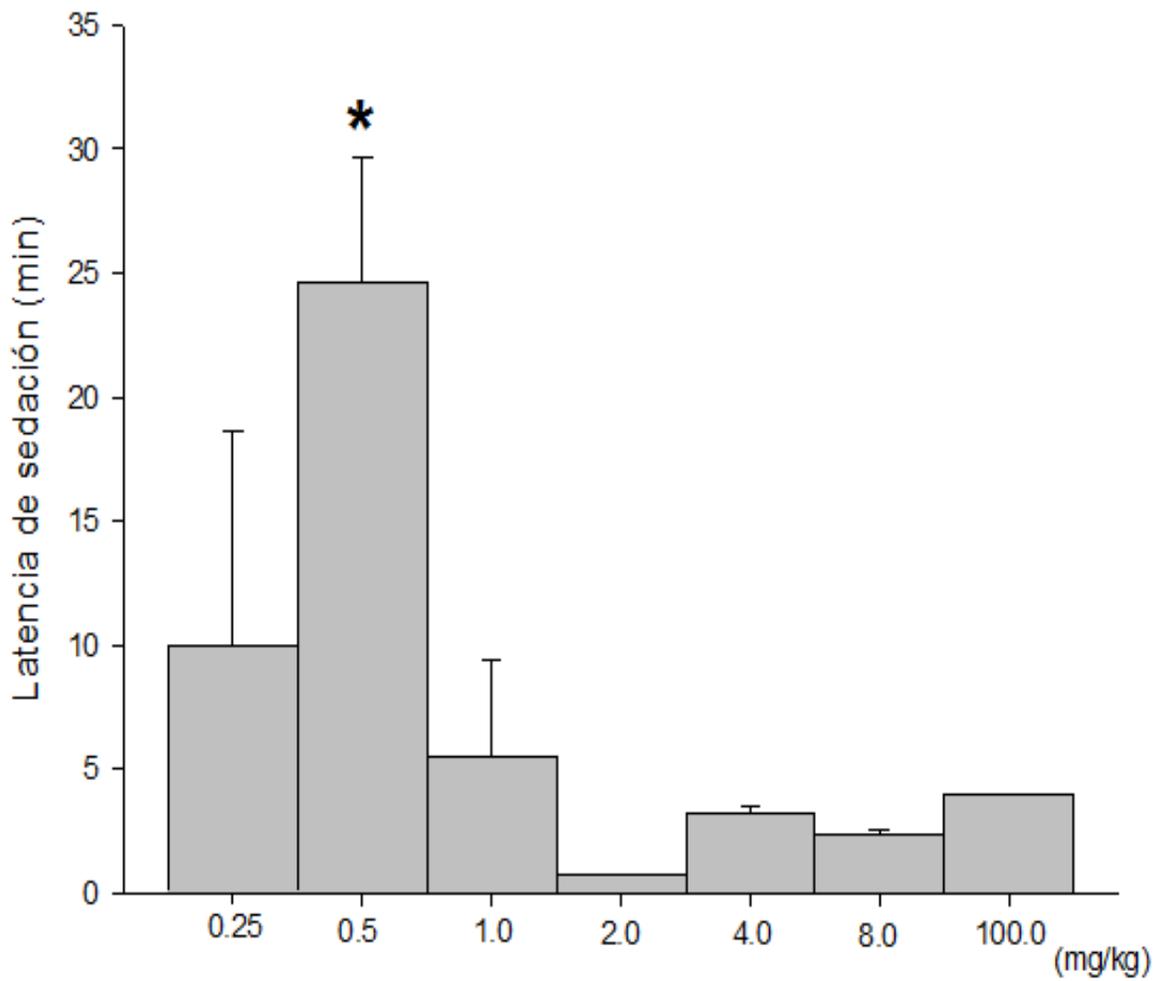


Figura 30. Latencia de sedación del NP total de *O. maya* en ratones. Cada barra representa el promedio de la latencia de sedación expresada en minutos \pm E.E. a las dosis 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 100 mg/Kg respectivamente. * $P<0.05$ vs dosis 2.0 mg/Kg.

En la Figura 31 se muestra la curva dosis respuesta cuantil para el efecto de contracción producido por el NP total de *O. maya* en ratones, donde se puede ver que dicho efecto es dependiente de la dosis administrada. La DE_{50} para dicho efecto fue de 0.747 mg/Kg.

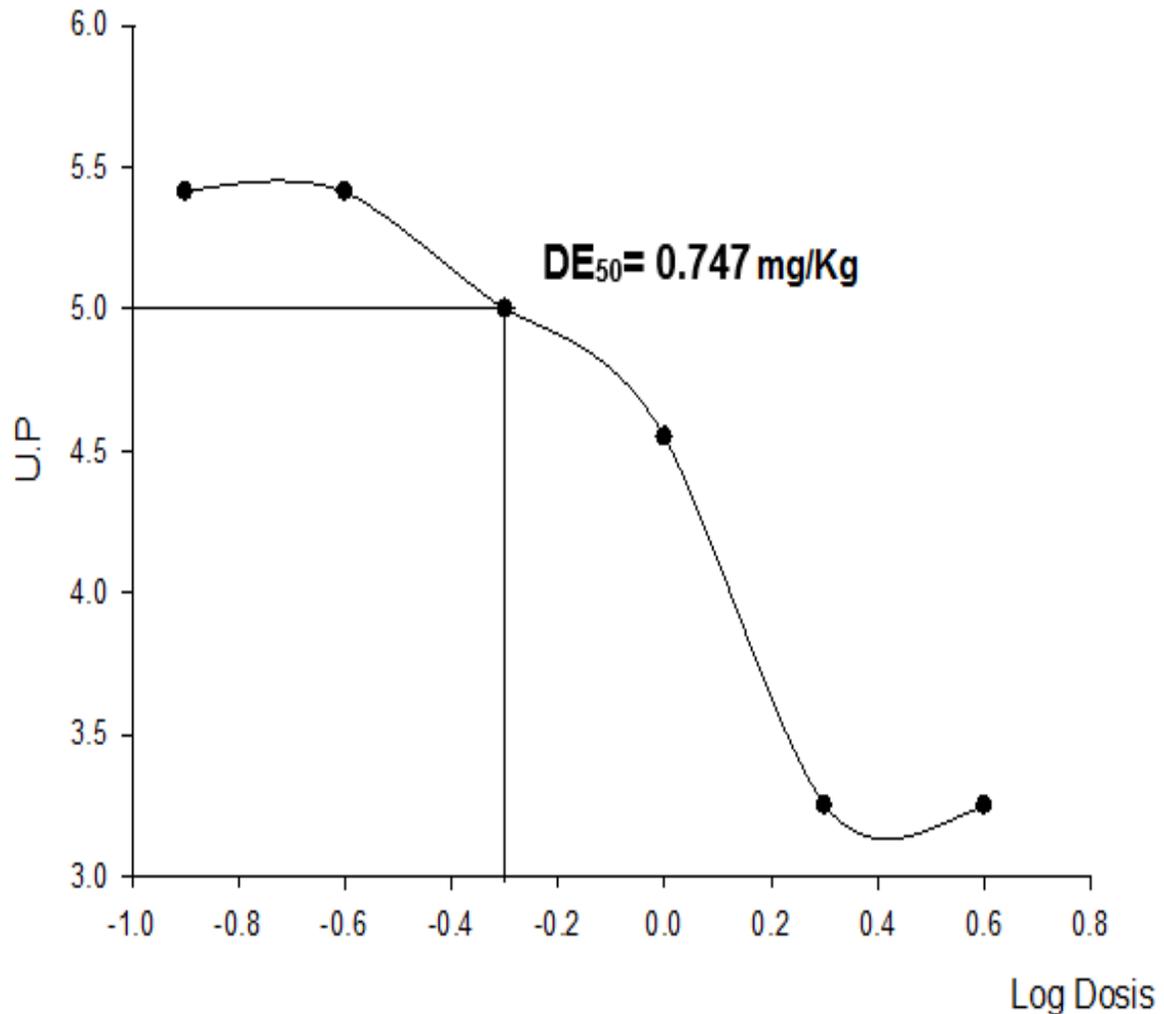


Figura 31. Curva dosis respuesta cuantil para el efecto de contracción del NP total de *O. maya* en ratones.

En la Figura 32 se muestra la latencia de contracción producida por el NP total de *O. maya* en los ratones, donde se observa que conforme aumenta la dosis aumenta la latencia de contracción (ANOVA de una sola vía, $p < 0.05$. Prueba post-hoc Tukey). A partir de la dosis 2 mg/Kg ya no se presentó efecto de contracción por lo que ya no se graficó.

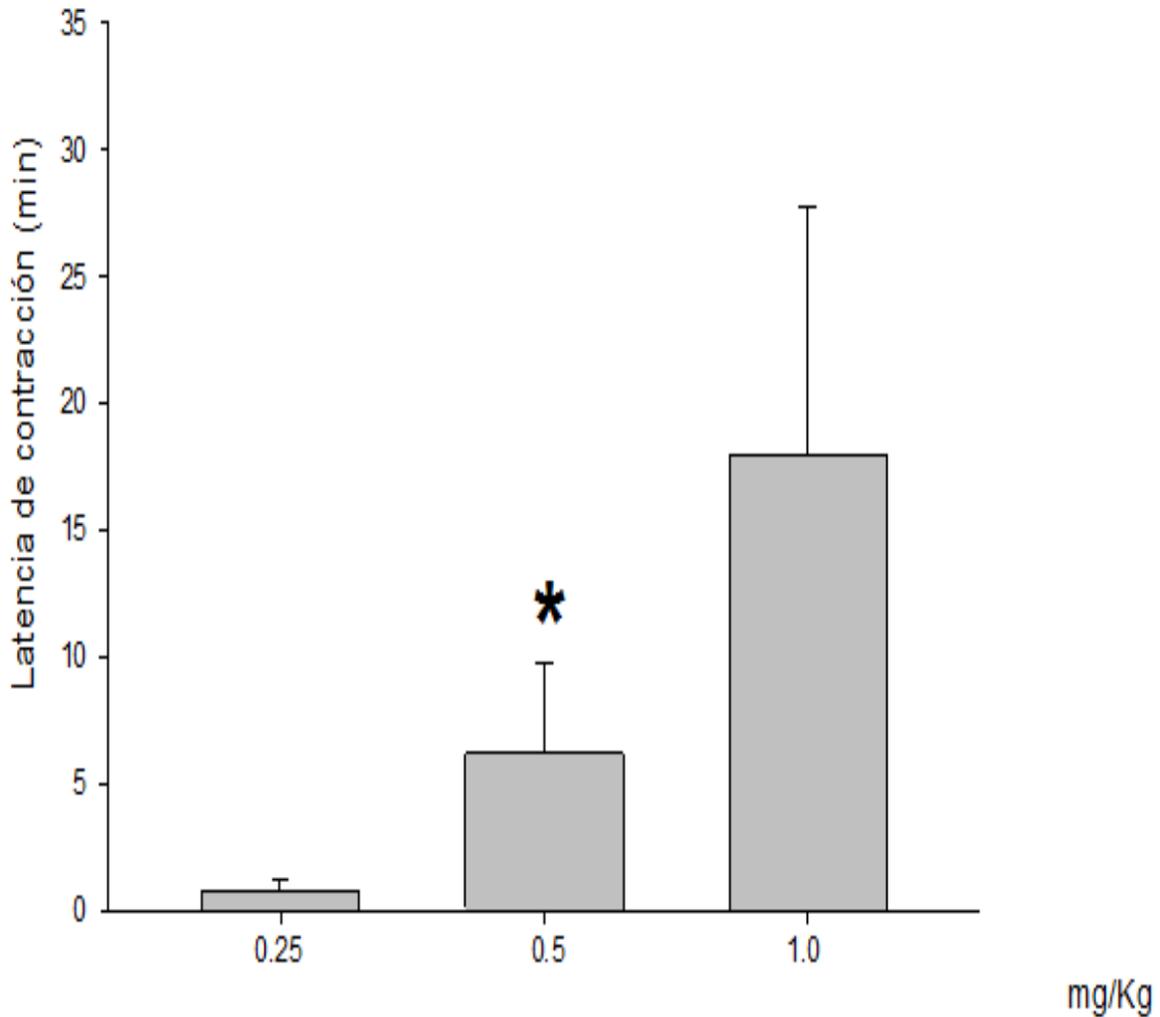


Figura 32. Latencia de contracción del NP total de *O. maya* en ratones. Cada barra representa el promedio de la latencia de sedación expresada en minutos \pm E.E. a las dosis 0.25, 0.5 y 1.0 mg/Kg respectivamente. * $P < 0.05$ vs dosis 0.5 mg/kg.

7.2 Estudio in vitro

7.2.1 Determinación del efecto del NP total y sus fracciones, la CE_{50} y la C_{max} asociadas

En la Figura 33 se muestra la curva porcentaje de concentración en íleon de rata utilizando solución salina isotónica (SSI) 0.9%, como podemos observar no existe variación significativa de la respuesta basal al adicionar esta sustancia.

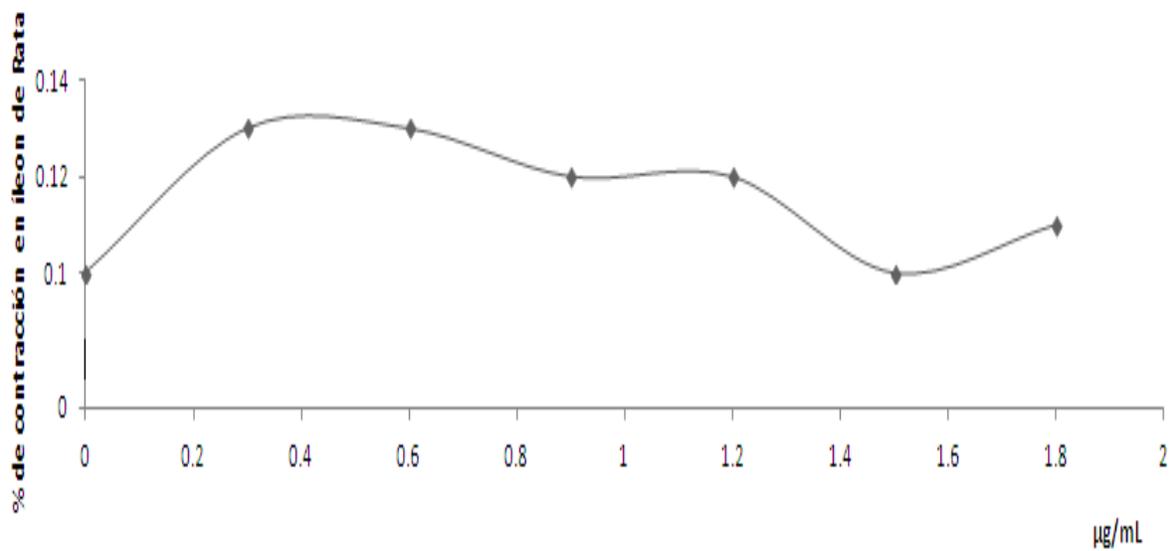


Figura 33. Gráfico del porcentaje de contracción en íleon de rata tras la administración de SSI.

En la Figura 34 se muestra el efecto que tiene la SSI sobre la frecuencia de contracción del íleon de rata; prácticamente esta se mantiene constante. No se observaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba estadística aplicada. (ANOVA de una sola vía, $H= 8.629$, $g.l=6$; $p= 0.196$, n.s.).

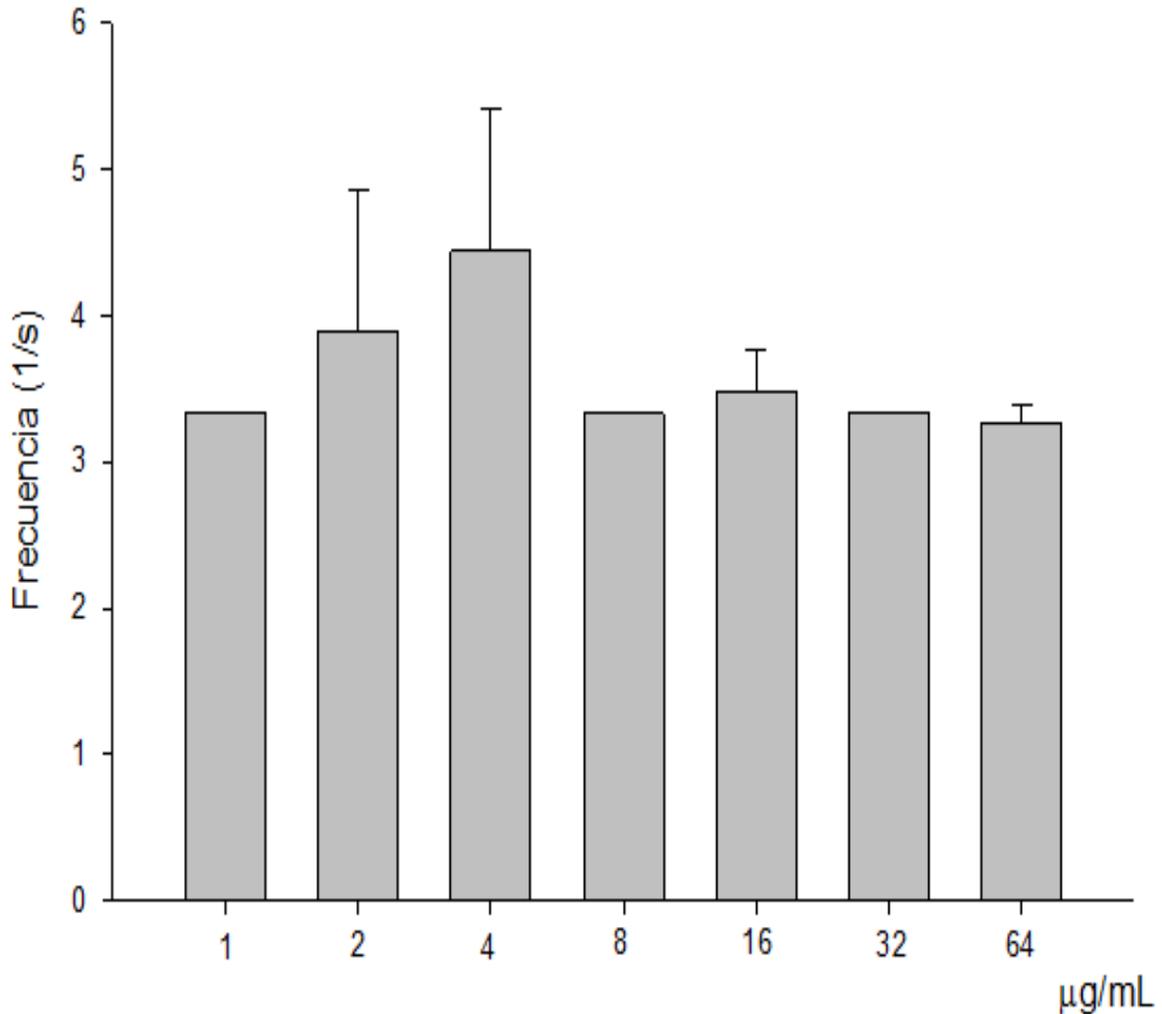


Figura 34. Efecto de la SSI sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. $P=0.196$. n.s.

En la Figura 35 se muestra la curva dosis respuesta gradual control construida con disoluciones a diferentes concentraciones de Ach. Se aprecia un aumento en la contracción dosis dependiente. La CE_{50} fue de $3.61 \mu\text{g/mL}$ y la C_{max} fue de $62.92 \mu\text{g/mL}$.

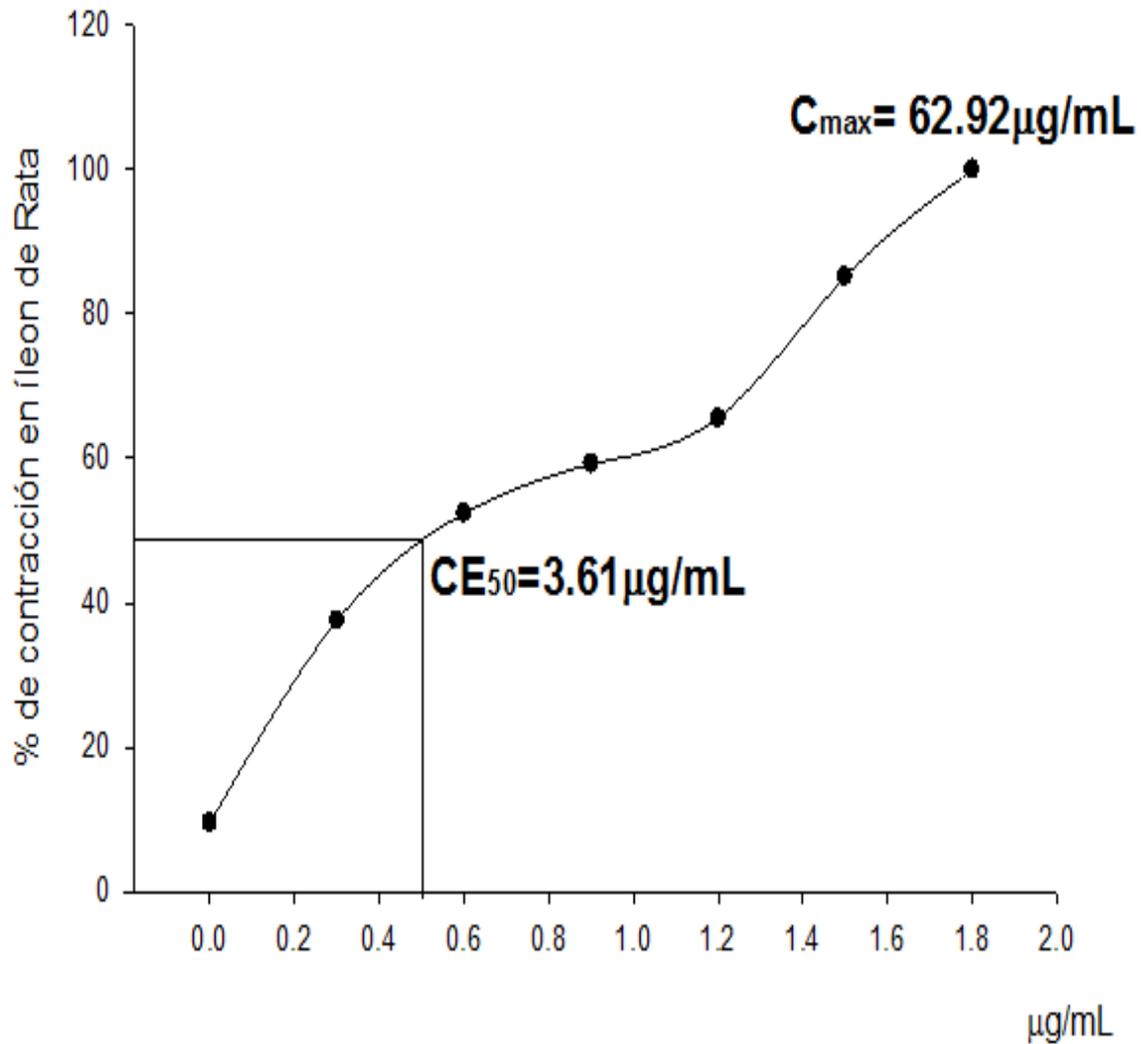


Figura 35. Curva dosis respuesta gradual control de Ach.

En la Figura 36 se muestra el efecto que tiene la Ach sobre la frecuencia de contracción del íleon de rata. Esta disminuye en función de la dosis (ANOVA de una sola vía, $H=46.633$, $g.l=6$; $p<0.001$. Prueba post-hoc Tukey).

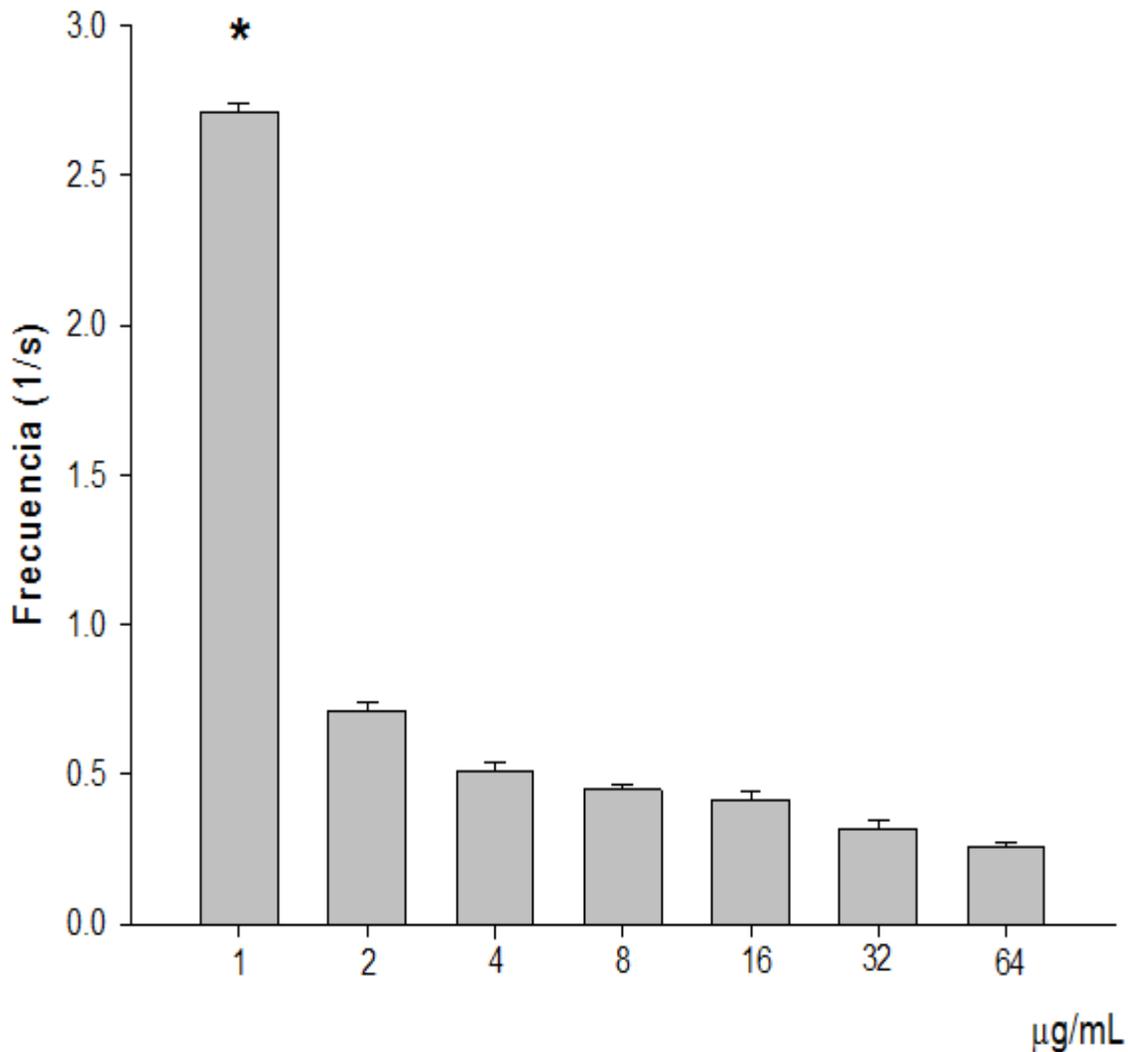


Figura 36. Efecto de la Ach sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. *Diferencias significativas de la concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ vs las concentraciones restantes a $P<0.001$.

En la Figura 37 se muestra el efecto del NP total de *O. maya* en íleon de rata, donde se observa que tiene un efecto bifásico dosis dependiente sobre dicho material biológico, este logra ejercer su mayor efecto a la dosis de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de esta dosis disminuye su efecto. La CE_{50} fue de 2.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que la C_{max} fue de 16.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

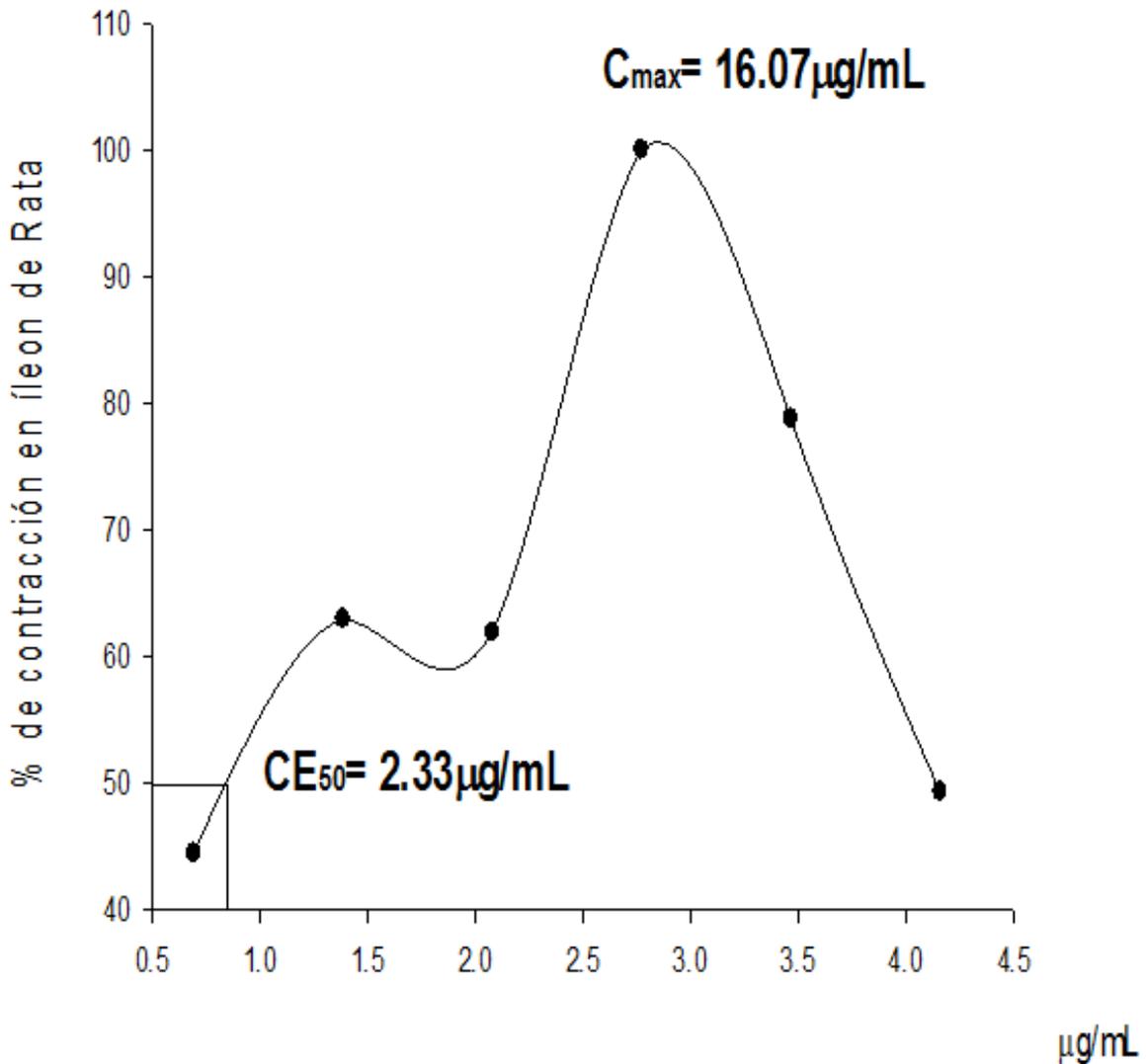


Figura 37. Curva dosis respuesta gradual para el efecto del NP total de *O. maya* sobre íleon de rata.

En la Figura 38 se muestra el efecto que tiene el NP total de *O. maya* sobre la frecuencia de contracción del íleon de rata, donde se observa un aumento en la frecuencia conforme aumenta la dosis de NP hasta la dosis 4 $\mu\text{g/mL}$ para después disminuir y volver a aumentar (ANOVA de una sola vía, $F= 7.910$, $p= 0.008$. Prueba post-hoc Duncan).

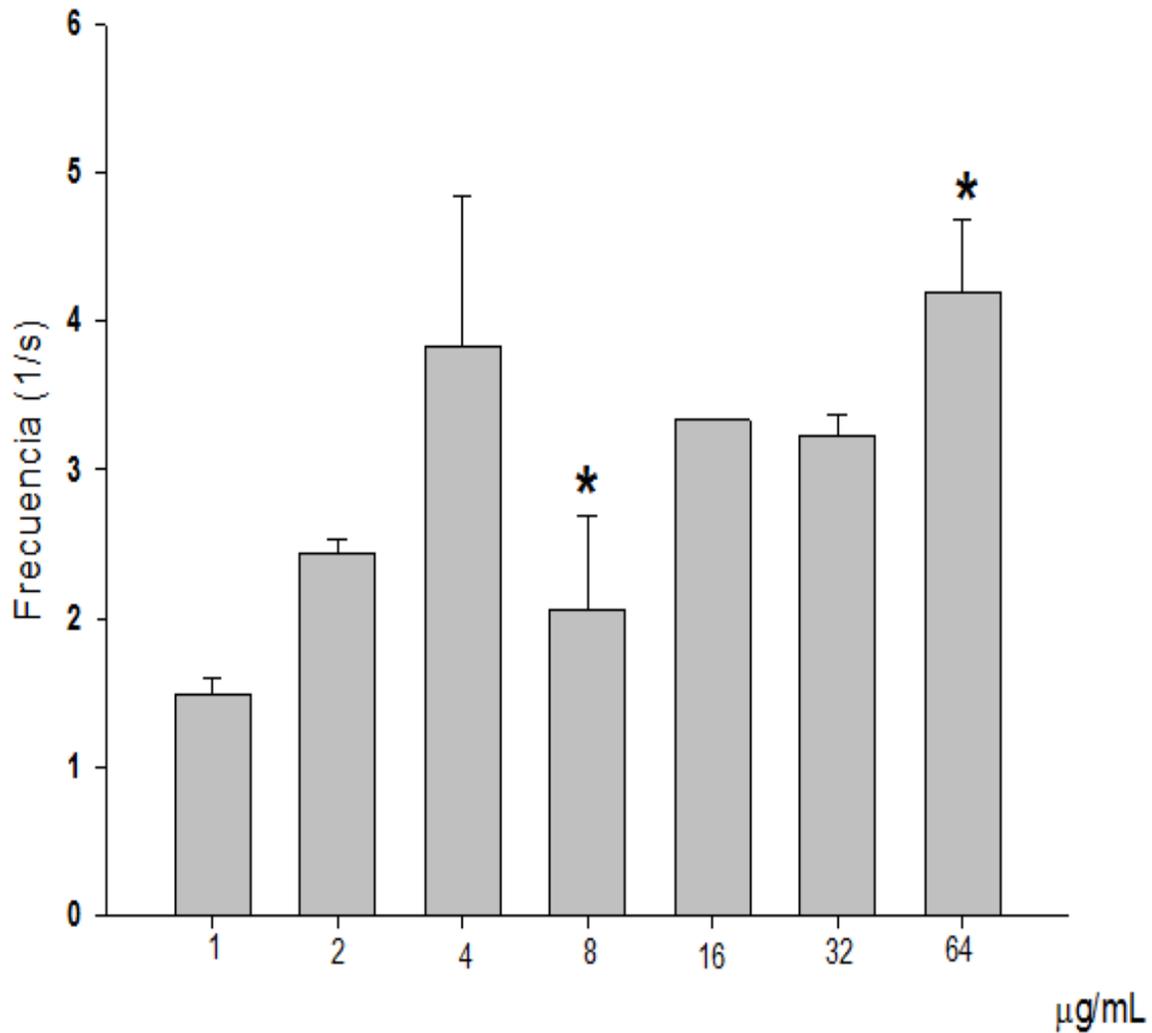


Figura 38. Efecto del NP total de *O. maya* sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. * $P < 0.05$.

En la Figura 39 se muestra la curva dosis gradual para el efecto de la fracción M6 del NP de *O. maya* en íleon de rata, donde se observa que este provoca un aumento en la contracción dosis dependiente de dicho material biológico. La CE_{50} para dicho efecto fue de $1.71 \mu\text{g/mL}$ mientras que la C_{max} fue de $63.81 \mu\text{g/mL}$.

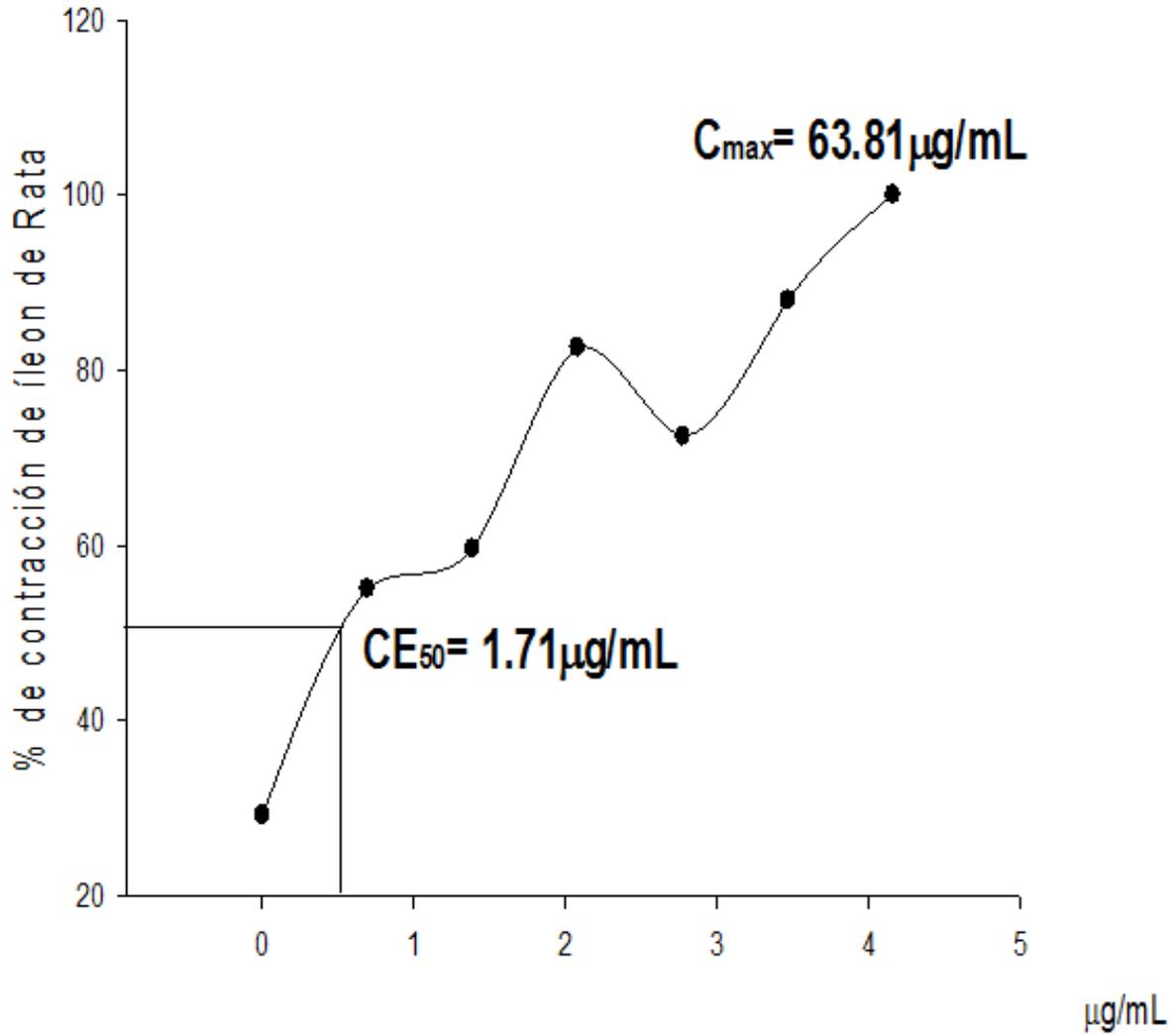


Figura 39. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de la fracción M6 de NP de *O. maya* sobre íleon de rata.

La Figura 40 muestra el efecto de la fracción M6 del NP de *O. maya* sobre íleon de rata, donde se observa que hay un aumento dosis dependiente de la frecuencia de contracción. No se observaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba estadística aplicada (ANOVA de una vía, $F= 2.913$; $p= 0.094$, n.s.).

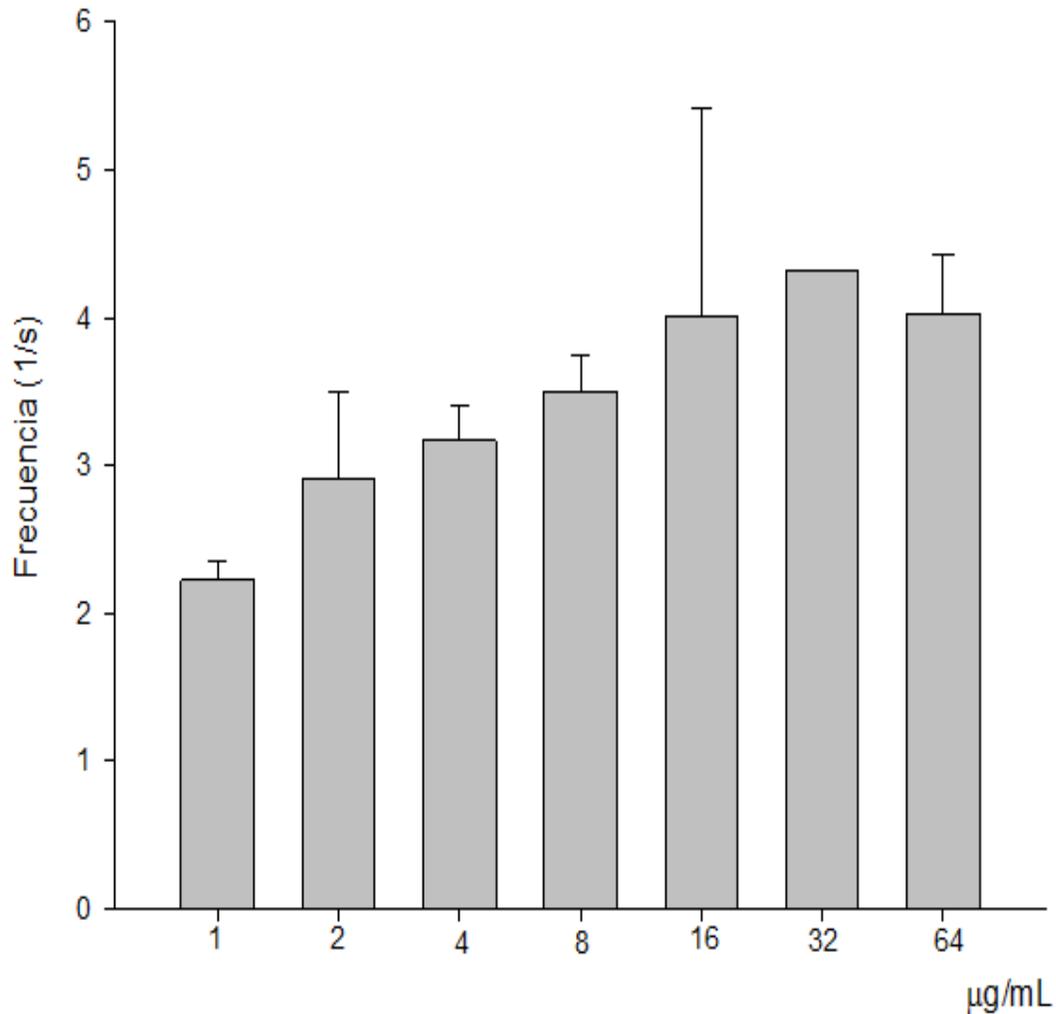


Figura 40. Efecto de la fracción M6 del NP de *O. maya* sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. $P<0.05$. n.s.

En la Figura 41 se muestra la curva dosis gradual para el efecto de la fracción M7 del NP de *O. maya* en íleon de rata, donde se observa que este tiene un efecto bifásico dosis dependiente sobre dicho material biológico. Se da un aumento en la contracción hasta la dosis 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para después disminuir. La CE_{50} para dicho efecto fue de 2.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que la C_{max} fue de 30.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

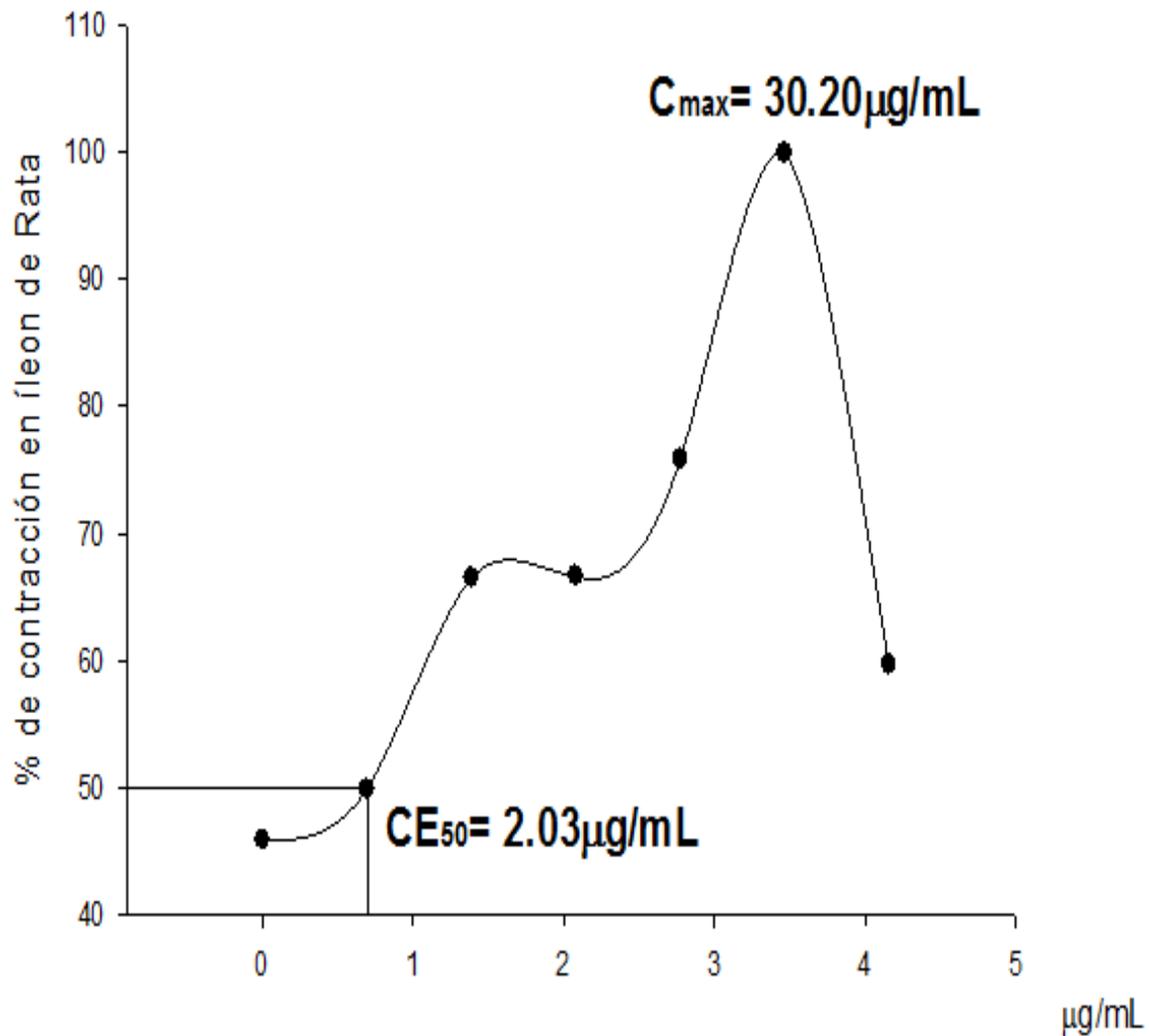


Figura 41. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de la fracción M7 del NP de *O. maya* sobre íleon de rata.

La Figura 42 muestra el efecto de la fracción M7 del NP de *O. maya* sobre íleon de rata, donde se observa que hay un aumento dosis dependiente de la frecuencia de contracción. No se observaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba estadística aplicada (ANOVA de una vía, $H= 7.644$, g.l.=6; $p<0.05$, n.s.).

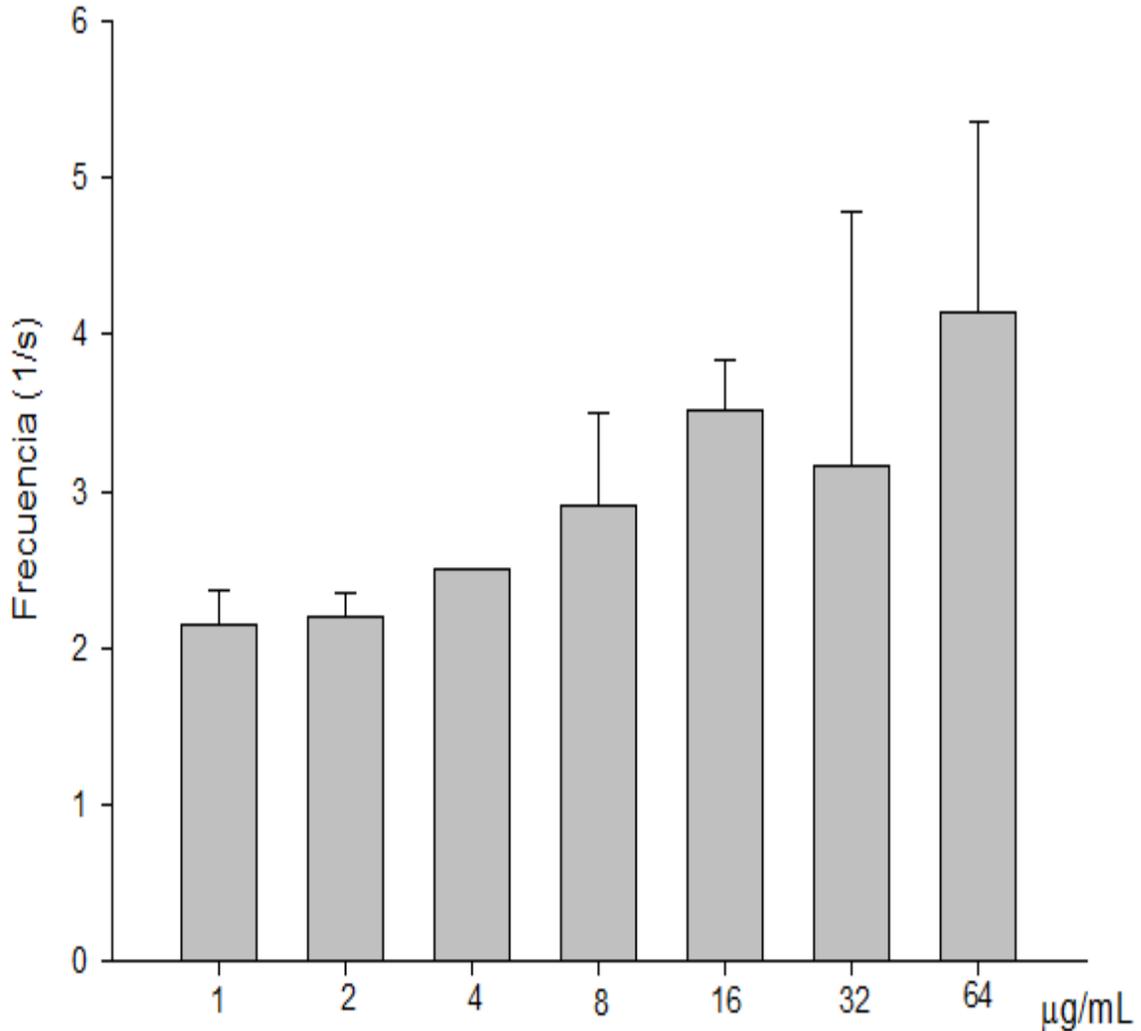


Figura 42. Efecto de la fracción M7 del NP de *O. maya* sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. $P<0.05$. n.s.

En la Figura 43 se observa que el porcentaje de contracción del íleon de rata no muestra diferencias significativas al administrar SSI y al comparar el efecto de la Ach (que es la sustancia prototipo para ser utilizado como control en este tipo de estudios) con el NP total y sus fracciones se muestra una mayor eficacia de estos últimos a las mismas concentraciones.

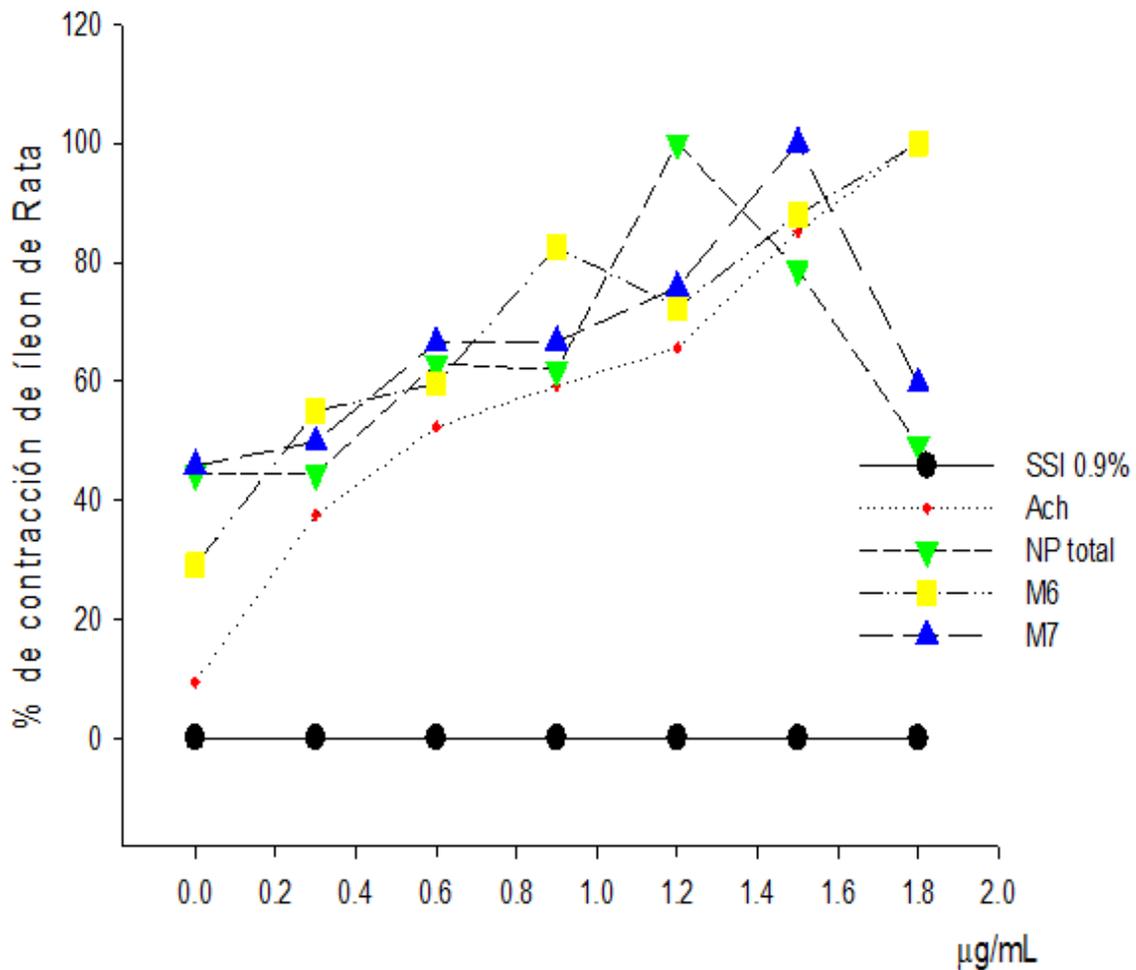


Figura 43. Curva dosis respuesta gradual para el efecto de SSI, Ach, NP total, M6 y M7 sobre íleon de rata.

La Figura 44 muestra la comparación del efecto de SSI, Ach, NP total, M6 y M7 sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. No se observaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba estadística aplicada (ANOVA de una vía, $H=3.987$, g.l.=6; $p=0.678$, n.s.).

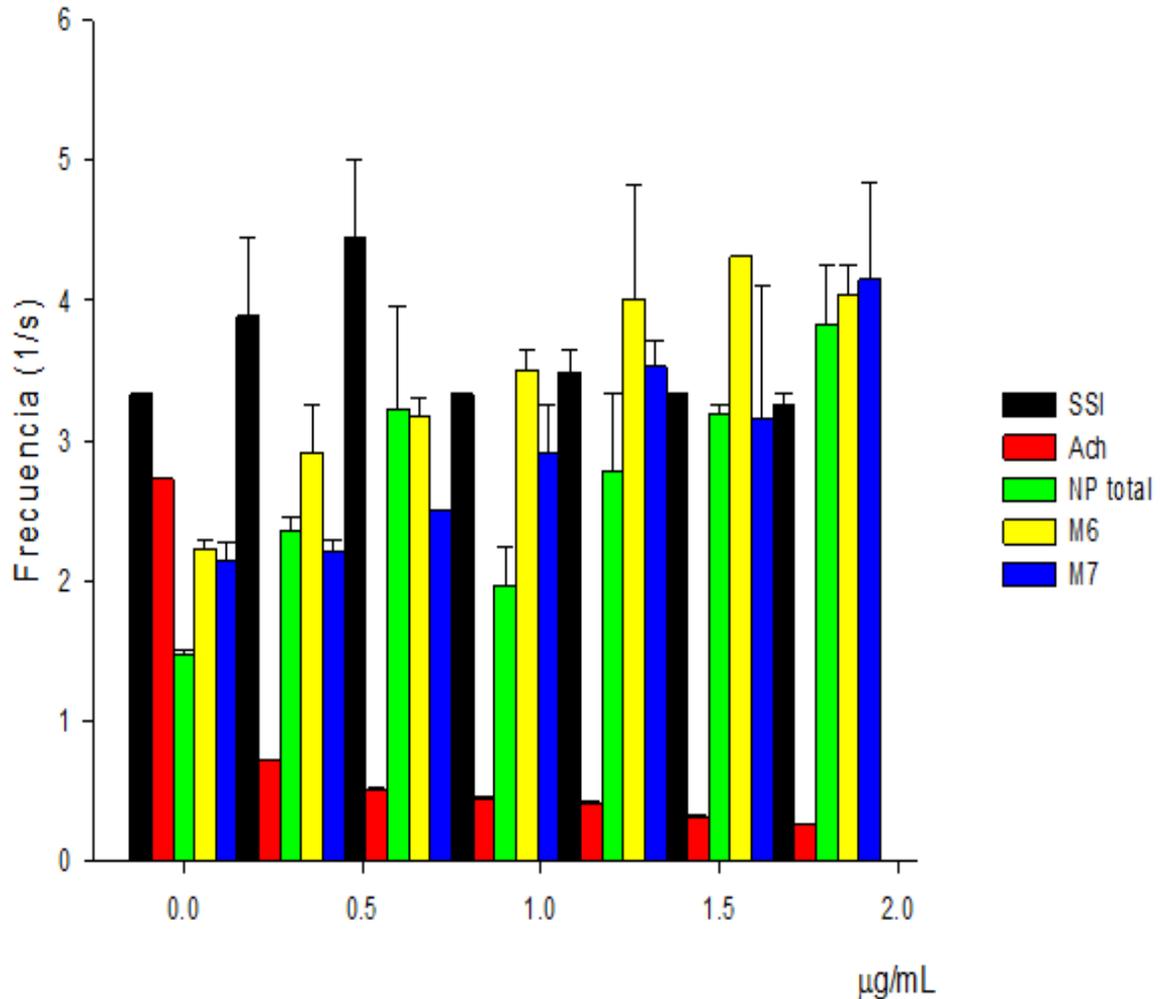


Figura 44. Comparación del efecto de SSI, Ach, NP total, M6 y M7 sobre la frecuencia de contracción en íleon de rata. Cada barra representa el promedio de la frecuencia de contracción expresada en segundos \pm E.E. a las dosis 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL respectivamente. $P=0.678$. n.s.

Capítulo 8. Discusión

Como se mencionó en la introducción y la justificación de este trabajo, el Dr. Sergio Rodríguez y su equipo se han dedicado a trabajar en el aislamiento de moléculas bioactivas de la saliva del pulpo rojo mexicano. Para lo cual lograron separar dicho fluido en tres fracciones: la metabólica o digestiva, neurotóxica y la paralizante (aislada de la parte neurotóxica), (Campos, 2013 y Pech, 2014). Esta separación se logró gracias a la utilización de diversas técnicas cromatográficas (CCF, CLAR, LC-MS y GC-MS) aunado a esto se utilizó el cangrejo fantasma (*Ocypode quadrata*) como modelo *in vivo* durante la separación y así determinar si las fracciones obtenidas presentaban efectos como: muerte (fracción digestivo o metabólica); relajación muscular, temblor y descoordinación motora (fracción neurotóxica); y/o parálisis (fracción paralizante), (Pech, 2014). De estas fracciones la que se nos proporcionó fue la paralizante la cual tiene importancia farmacológica debido a que como ya se había mencionado antes el primer fármaco marino en el mercado (Prialt, Ziconotide) se aisló de esta fracción del veneno de caracol *Conus magus* (Pech, 2014). Es por esta razón que a la separación de la parte paralizante en el pulpo rojo se hizo el análisis de su composición lo cual arrojó como resultado la presencia de aminoácidos libres, esto aunado a que en la saliva de otras especies de *Octopus* se han encontrado NP_s lo que conlleva a pensar que el efecto paralizante pueda deberse a la presencia de un NP en esta parte (Pech, 2014). Es por lo anterior que a esta parte la llamamos NP total.

En este trabajo se realizó el cernimiento o screening de efectos según la dosis en animales íntegros, realizando el estudio piloto en ratones CD1. La curva dosis respuesta cuantitativa nos reveló un efecto bifásico dosis dependiente. A dosis bajas se presentaron estiramientos de los miembros posteriores, contracción abdominal y presencia de diarrea (contracción). Esto último indicativo de que la acción del NP total tenía efecto a nivel de tubo digestivo. La latencia de contracción fue no mayor a 18 min. A dosis altas, mayores a 2 mg/kg se presentaron movimientos

desordenados, disminución de la actividad motora, excitación moderada, calma y relajación (sedación) sobre el total de la población de animales mientras que desapareció el efecto de contracción. La latencia de sedación en el 100% de la población no fue mayor a 4 min. Dicho efecto *in vivo* puede deberse a que el NP total puede estar ejerciendo su efecto a través de más de un sistema o mecanismo de acción, dependiente de la dosis a nivel de sistema nervioso central y periférico (Bustamante, 2012). Ya que como explicare más adelante esta fracción contiene el NP (probablemente una taquicinina) y serotonina así como posiblemente GABA (Campos, 2013 y Pech, 2014). En el SNC, las taquicininas modulan la liberación de neurotransmisores como Dopamina, Acetilcolina y Noradrenalina. A nivel periférico las taquicininas tienen funciones motoras y sensoriales. La principal fuente de taquicininas en el sistema nervioso periférico es una población de fibras C (nervios sensoriales), que cuando son estimuladas producen la liberación de las taquicininas las cuales inicia su respuesta funcional. En el tracto gastrointestinal, las taquicininas regulan un número de funciones fisiológicas que incluyen la motilidad. Las taquicininas actúan principalmente sobre los receptores NK₁ y/o NK₂ como potentes espasmógenos (Khawaja, 1996). En el caso de la serotonina esta regula una gran variedad de funciones sensoriales, motoras y funciones de comportamiento en el SNC donde uno de los mecanismos para esto es inhibir la liberación de diferentes neurotransmisores. En cambio a nivel de sistema nervioso periférico específicamente en el intestino este inicia respuestas tan diversas como náuseas, vómitos, secreción intestinal y el peristaltismo. En el caso del peristaltismo, la estimulación de las neuronas colinérgicas por parte de la serotonina promueve la contracción del músculo liso intestinal y la estimulación de neuronas nitrérgicas promueve la relajación (Sikander, 2009). Mientras que GABA es un neurotransmisor inhibitorio en el SNC por aumento de la conductancia al ion cloro (hiperpolarización). Su existencia en el tejido nervioso garantiza el equilibrio entre excitación e inhibición neuronal, un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora. Existen numerosas sustancias que interactúan con receptores GABAérgicos. Todas las que interfieren con su funcionamiento producen aumento de la excitabilidad cerebral hasta el punto de producir crisis

convulsivas (Cortes, 2011). En contraste GABA entérico es un transmisor excitador e inhibidor que actúa a través de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (Poulter, 1999). A través de estos receptores GABA se modula la contracción y relajación del músculo liso del intestino delgado (Bayer, 2003).

Tomando en cuenta que hubo indicios de efecto del NP total a nivel de tubo digestivo se procedió a probar los efectos de este en íleon de rata (estudio *in vitro*) lo cual nos arrojó también un efecto bifásico dosis dependiente. Donde el efecto de contracción aumenta hasta la dosis de 32 µg/mL, después de esta dosis disminuye su efecto aproximadamente en un 50%, mientras que al mismo tiempo provoca un aumento en la frecuencia de contracción que también es dosis dependiente. Este efecto *in vitro* se asoció a que el NP total podía contener otras sustancias como lo son neurotransmisores que pudieran estar causando la dualidad del efecto (como se mencionó en párrafos anteriores serotonina y GABA). Lo cual se comprobó tiempo después, este contenía trazas de serotonina lo que dio lugar a realizar un fraccionamiento más cuidadoso para eliminar los residuos de este neurotransmisor (dato proporcionado por el Dr. Sergio Rodríguez, SISAL; Yucatán). De este fraccionamiento se obtuvieron 7 fracciones de las cuales la fracción 6 y 7 (M6 y M7) mostraron ser libres de serotonina. Como se mencionó antes la serotonina pudo estar enmascarando el efecto real del NP en el estudio *in vitro* provocando el efecto bifásico. Este efecto (bifásico) sobre el músculo liso del intestino puede estar mediado por dos mecanismos: a través de su unión a los receptores 5-HT_{2A}, donde estimula a las neuronas colinérgicas con liberación de Ach para producir contracción; mientras que su unión 5-HT₄, y 5-HT₇ estimula a las neuronas inhibitoras nitrérgicas que liberan óxido nítrico produciendo relajación (Sikander, 2009).

En el caso de la fracción M6 esta muestra un efecto contráctil asociado a un aumento de la frecuencia de contracción ambas dosis dependiente. Tomando en cuenta los resultados anteriores, la naturaleza proteica obtenida de análisis previos de la parte paralizante y/o que la literatura reporta; la caracterización de dos taquicininas de la saliva de *Octopus vulgaris* y una de *Octopus kaurna* (Pech,

2014) se puede inferir que la fracción M6 es donde se encuentra el NP, el cual podría tratarse de una taquicinina. Que al igual que como el prototipo de la familia de las taquicininas, en los mamíferos la SP, median acciones contráctiles en intestino (Pech, 2014; Flores, 2008; Olsson, 2001 y Shuttleworth, 1995).

En cuanto a la fracción M7 esta sigue mostrando un efecto bifásico y un aumento en la contracción dosis dependientes. El efecto de contracción aumenta hasta la dosis de 32 µg/mL después de esta dosis disminuye su efecto aproximadamente en un 40%. Lo cual podría deberse a que esta fracción puede contener algún otro neurotransmisor que no ha sido identificado. Este podría ser GABA ya que dentro de los aminoácidos libres que se encontraron presentes en la fracción paralizante se encuentra el glutamato (Campos, 2013 y Pech, 2014), ya que GABA se sintetiza principalmente a partir del glutamato por la glutamato descarboxilasa (GAD) (Watanabe, 2002). Esta enzima responsable de la síntesis de GABA se ha identificado dentro de los nervios entéricos, así como un sistema de captación de alta afinidad. Tanto en el tracto GI de roedores y en humanos se han encontrado fibras GABAérgicas en el plexo mientérico (Bayer, 2003). El GABA entérico es un transmisor excitador e inhibidor que actúa a través de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (Poulter, 1999). La unión a sus receptores GABA_A puede llevar a la activación de las neuronas colinérgicas y neuronas no adrenérgicas no colinérgicas inhibitorias, con lo cual estimula por una parte la contracción del músculo liso intestinal y por otra parte la relajación de este. Mientras que los efectos de la activación de los receptores GABA_B se relaciona en general a una inhibición de la liberación de Ach a través del bloqueo de canales de Ca²⁺ esto produce la relajación del músculo liso intestinal (Bayer, 2003).

Por último cabe mencionar la importancia de la utilización de SSI y Ach como controles. El uso de SSI nos sirvió para corroborar que el efecto en íleon de rata (sobre la motilidad y frecuencia) causado por la Ach, NP total, M6 y M7 es debida propiamente a cada una de estas sustancias y no a fluctuaciones de la actividad basal del intestino ya que como se muestra en los gráficos correspondientes, esta última es prácticamente constante cuando se agrega SSI a la preparación. En

cuanto a la Ach, como ya se mencionó antes es la sustancia prototipo para ser utilizada como control en estudios sobre el efecto que tienen ciertas sustancias en la motilidad intestinal (Goodman and Gilman, 2012). Al comparar el efecto de la Ach con el efecto del NP total y sus fracciones se muestra una mayor eficacia de estos últimos a las mismas concentraciones. En cuanto al efecto de las sustancias sobre la frecuencia de contracción del íleon de rata, para la SSI se observa que esta permanece constante, en el caso del control Ach se observa una disminución dosis dependiente mientras que para NP total, M6 y M7 se muestra un aumento dosis dependiente.

Capítulo 9. Conclusiones

- El NP total presenta un efecto bifásico (contracción-relajación) dosis dependiente tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro*.
- La fracción M6 del NP presenta un efecto contráctil dosis dependiente en íleon de rata.
- La fracción M7 del NP presenta un efecto bifásico dosis dependiente en íleon de rata.

Las perspectivas a futuro de este trabajo es evaluar y determinar el mecanismo de acción mediante técnicas de biología molecular (inmunohistoquímicas, Western-blot, PCR, etc.) del NP, no solo a nivel de intestino delgado, sino en otros tejidos, que pudieran coadyuvar a dilucidar bien su efecto y así poder ser utilizado como preanéstesico, sedante, en terapias contra el dolor o enfermedades relacionadas con el SNC.

Capítulo 10. Referencias

1. Antonioli L., Colucci R., Pellegrini C., Giustarini G., Tuccori M., Blandizzi C., Fornai M., The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: Pharmacological modulation and potential therapeutic applications, *Pharmacology & Therapeutics* 139 (2013) 157–188.
2. Balderas J. L., *Farmacología 1*, Facultad de Química, UNAM (2009).
3. Barret K.E., Barman S.R., Boitano S., Brooks H.L., Ganong, *Fisiología Médica*, 23ª edición, Mc-Graw Hill. México (2010).
4. Bayer S., Jellali A., Crenner F., Aunis D., Fabielle A., Functional evidence for a role of GABA receptors in modulating nerve activities of circular smooth muscle from rat colon in vitro, *Life Sciences* 72 (2003) 1481–1493.
5. Burbach J.P., Neuropeptides from concept to online database www.neuropeptides.nl, *European Journal of Pharmacology* 626 (2010) 27–48.
6. Bustamante G.R., Cernimiento neurofarmacológico de dos análogos de la melatonina en ratones CD1. Tesis que para obtener el grado de doctorado. Escuela Superior de Medicina. IPN (2012).
7. Campos E.G., Estudio químico del efecto paralizante de la saliva del pulpo rojo de Yucatán (O. maya). Tesis que para obtener el título de química en alimentos. Facultad de Química. UNAM (2013).
8. Cano, L.E., Efectos antimicrobianos y antiespasmódicos del aceite esencial y sus componentes mayoritarios presentes en las hojas de Guayaba (*Psidium guajava L.*). Tesis que para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de ciencias naturales, Universidad Autónoma de Querétaro (2013).
9. Cortes R.C., Galindo F., Galicia S.S., Flores A., GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el desarrollo. *Rev. Neurology* 52 (2011) 665-675.
10. Chao C., Hellmich M.R., Gastrointestinal Peptides: Gastrin, Cholecystokinin, Somatostatin, and Ghrelin, *Physiology of the Gastrointestinal Tract 2* (2012) 115-154.
11. Duque D.E., Distribución de neuropéptidos en el tronco del encéfalo del hombre y el mono (*Saimiri sciureus*): Estudio Inmunocitoquímico. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Neurociencias. Facultad de Medicina e Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca (2009).
12. Espinosa G.Y., Estudio Químico de efecto paralizante de la saliva del pulpo rojo de Yucatán (*Octopus maya*). Tesis que para obtener el título de Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM (2013).
13. Flores J., Armijo J.A., *Farmacología Humana*, Editorial África Mediavilla-Elsevier Masson, Quinta edición, España (2008) 508-510.
14. Gaginella T.S., *Handbook of methods in gastrointestinal pharmacology*, CRC Press, E.U.A. (1996) 189-224.
15. Gallardo, L.B., Actividad antiespasmódica de extractos de plantas medicinales en preparación de ileon de cobayo. Tesis que para obtener el grado de doctor en ciencias con especialidad en biomédica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, (2005).
16. Galligan J., *Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system*. Department of Pharmacology and Toxicology 2 (2012) 623-629.
17. Golán E.D., Tashjian H.A., Armstong E.J., Armstrong A.W., *Principios de farmacología: Bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico*, Editorial Lippincott Williams and Wilkins, Tercera edición, España (2012).
18. Goodman and Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12ª edición, Mc-Graw Hill, México (2012).
19. Gourine A.V., Wood J.D., Burnstock G., Purinergic signalling in autonomic control, *Trends in Neurosciences* 32 (2009) 241-248.
20. Guyton C.G. & Hall J.E., *Fisiología Médica*, Editorial Elsevier, 11ª edición, España (2006).
21. Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R., Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 44 (2010) 173-202.
22. Hillsley K., Band S.M., Grundy D., Alpha-adrenoreceptor modulation of neutrally evoked circular muscle responses of the guinea pig stomach, *Journal of the Autonomic Nervous System*, 40 (1992) 57-62.

23. Hokfelt T., Broberger C., Xu D.Z., Sergeev V., Ubink R., Diez M., Neuropeptides an overview, *Neuropharmacology* 39 (2000) 1337-1356.
24. Hokfelt T., Bartfai T., Bloom F., Neuropeptides: Opportunities for Drug Discovery, *The Lancet Neurology* 2 (2003) 463-472.
25. Holzer P., Reichmann F., Farzi A., Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis, *Neuropeptides* 46 (2012) 261-274.
26. Holzer P., Opioid receptors in the gastrointestinal tract, *Regulatory Peptides* 155 (2009) 11-17.
27. Izquierdo, A., Extractos de plantas micropropagadas de *Aristolochia elegans Mast.* Con actividad relajante en la contracción inducida por veneno de alacrán (*Centruroides limpidus limpidus Karsch*) en íleon aislado de cobayo. Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo de productos Bióticos. Centro de desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional (2004).
28. Izzo A.A., Sharkey K.A., Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts, *Pharmacology & Therapeutics* 126 (2010) 21-38.
29. Jiménez M.L., Moreno E., Laboratorio de Fisiología: Manual de Prácticas. Departamento de Biología. Facultad de Química, UNAM (2003).
30. Juárez O.E., Rosas C. y Arena L., La posible historia del Pulpo Maya: Leída en su ADN, *Ciencias* 97 (2011) 42-44.
31. Katzung, *Farmacología Básica y Clínica*, 12ª edición, Mc-Graw Hill, México (2013).
32. Khawaja A.M., Duncan F.R., Tachykinins: receptors to effector. *Int. J.Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) 721-738
33. Kirchgessner A.L., Glutamate in the enteric nervous system, *Gastrointestinal* (2001) 591-596.
34. Kiss T., Diversity and abundance: The basic properties of neuropeptide action in molluscs, *General and Comparative Endocrinology* 172 (2011) 10-14.
35. Krinke J.G., *The handbook of experimental animal. The laboratory rat*, Academic Press, London (2000).
36. López-García M.J., Martínez-Martos J.M., Mayas M.D., Carrera M.P., Ramírez-Expósito M.J., Fisiología de los neuropéptidos, *Revista de Neurología* 35 (2002) 784-793.
37. Méndez M., Vargas M.A., Bravo J.P., Charli J.L., Inactivación de los neuropéptidos, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnológica, UNAM (1991) 123-138.
38. Meringhi A., Salio C., Ferrini F., Lossi L., Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 42 (2011) 276-287.
39. Meringhi A., Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS, *Progress in Neurobiology* 66 (2002) 161-190.
40. Montes M.J., Flores F.J., Barrón E.A., Histamina, receptores y antagonistas, *Rev. Med. Hosp. Gen. Méx.* 68 (2005) 164-169.
41. Morales J.J., El pulpo maya, nuestro pulpo, *Revista Cienciorama UNAM* (2009). Consultado online 17/04/2014: www.cienciorama.ccadet.unam.mx/articulos_extensos/183_extenso.pdf.
42. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
43. Olsson C., Holmgren S., The control of gut motility, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128 (2001) 481-503.
44. Pech P.J., Obtención de compuestos bioactivos presentes en las glándulas salivales posteriores del pulpo *O. maya*. Tesis que para obtener el grado de maestro en ciencias. Unidad de Química, Sisal. UNAM (2014).
45. Peddireddy M.K.R., *In vitro* Evaluation Techniques for Gastrointestinal Motility, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 45 (2011) 184-191.
46. Poli E., Pozzoli C., Coruzzi G., Role of histamine H3 receptors in the control of gastrointestinal motility. An overview, *Journal of Physiology - Paris* 95 (2001) 67-74.
47. Poulter M.O., Singhal R., Brown L.A., Krantis A., GABA_A receptor subunit messenger RNA expression in the enteric nervous system of the rat: Implications for functional diversity of enteric GABA_A receptors, *Neuroscience* 93 (1999) 1159-1165.
48. Rang H.P., Dale M.M., Flower R.J., Henderson G., *Farmacología*, Editorial Elsevier, Séptima edición, España (2012).
49. Rozda K.S., The pharmacology of molluscan neurons, *Progress in Neurobiology* 23 (1984) 79-150.
50. Ruiz A.D.L., Determinación de la DE₅₀, DL₅₀ y el margen de seguridad del 2,2,2-Tribromoetanol en conejos de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculi*). Tesis que para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM (2011).
51. SAGARPA 2014. ACUERDO por el que se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero de pulpo (*O. Maya* y *O. Vulgaris*) del Golfo de México y Mar Caribe. Consultado en línea (17/04/2014): <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fsagarpa.gob.mx%2Fnormateca%2FNormateca%2FACUERDO%2520por%252>

- 0el%2520que%2520se%2520da%2520a%2520conocer%2520el%2520Plan%2520de%2520Manejo%2520Pesquero%2520de%2520pulpo%2520del%2520Golfo%2520de%2520M%25C3%25A9xico%2520y%2520Mar%2520Caribe.pdf&ei=02pQU5HvGM2syASk4oK4BA&usg=AFQjCNEi5PaFCB5POWSoOZNhALTWSo4R-A&sig2=vEjXjeJgbnQm54V65suEHg.
52. Serna M., Carmona C., Growth and survival of larvae of octopus (*Octopus maya*): fed with inert diets under conditions of laboratory in Yucatán, México. *Hidrobiológica* 18 (2008) 209-214.
 53. Shi X.Z., Choudhury B.K., Pasricha P.J., y Sarna S.K., A Novel Role of VIP in Colonic Motility Function: Induction of Excitation–Transcription Coupling in Smooth Muscle Cells, *Gastroenterology* 132 (2007) 1388–1400.
 54. Sigma plot version 11.0.
 55. Sikander A., Rana S.V., Prasad K.K., Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome, *Clinical Chimica* 403 (2009) 47–55.
 56. Shuttleworth C.W.R., Keef K.D., Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission, *Regulatory Peptides* 56 (1995) 101-120.
 57. Tortora G.J., Derrickson B., Principios de anatomía y fisiología, 13ª edición, editorial Panamericana, México (2013).
 58. Universidad Iberoamericana. Ondas mecánicas. Consultado en línea (05/11/2014): www.uia.mx/campus/publicaciones/fisica/pdf/14ONDASmecanicas.pdf
 59. Universidad de Vigo. Atlas de histología vegetal y animal. Consultado en línea (12/08/2014): <http://webs.uvigo.es/mmegias/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-delgado.php?pagina=20>.
 60. Van Den Pol A.N., Neuropeptide transmission in brain circuits, *Neuron* 76 (2012) 98-115.
 61. Villanueva H., Rojas J., Principios de farmacología, primera edición, editorial Profopad (1987).
 62. Vincent S.R., Nitric oxide neurons and neurotransmission, *Progress in Neurobiology* 90 (2010) 246–255.
 63. Watanabe M., Maernura K., Kanbara K., Tamayama T., Hayasaki H., GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs, *International Review of Cyrology*, 213 (2002) 1-47.
 64. Wilson S.S., Invertebrate models for biochemical research, testing and education, *ILAR Journal* (2014) 126-152.
 65. Wingerd B.D., *Rat Disecction Manual*, The Johns Hopkins University Press, London (1988).
 66. Wood J.D., Cellular Neurophysiology of Enteric Neurons, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2 (2012) 621-669.
 67. Wood J.D., Opioids, the Enteric Nervous System, and Postoperative Ileus, *Semin Colon Rectal Surg* 16 (2005) 188-196.
 68. Young H.M., Anderson C.R., y Furness J.B., Nitric oxide in the peripheral autonomic nervous system, *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, 17 (2000) 215-265.
 69. Zizzo M.G., Mulé F., Mastropaolo M., Serio R., D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility, *Pharmacological Research* 61 (2010) 371–378.

Capítulo 11. Anexos

11.1 Anexo 1

Tabla 7. Tabla de conversión de porcentajes en unidades de probabilidad (Probits), (Ruiz, 2011).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	===	2,674	2,546	3,119	3,249	3,355	3,445	3,524	3,595	3,659
10	3,718	3,772	3,625	3,874	3,920	3,964	4,005	4,045	4,085	4,122
20	4,158	4,194	4,228	4,261	4,254	4,326	4,357	4,387	4,417	4,447
30	4,476	4,504	4,532	4,560	4,587	4,515	4,642	4,668	4,695	4,721
40	4,747	4,773	4,798	4,824	4,849	4,274	4,900	4,925	4,950	4,975
50	5,000	5,025	5,050	5,075	5,100	5,126	5,151	5,176	5,202	5,222
60	5,253	5,279	5,205	5,332	5,358	5,385	5,413	5,440	5,456	5,496
70	5,524	5,553	5,583	5,613	5,643	5,874	5,706	5,789	5,772	5,806
80	5,842	5,979	5,915	5,954	5,994	5,086	6,080	6,126	6,175	5,227
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
90	6,282	6,287	6,293	5,299	6,305	6,321	5,317	6,322	6,329	6,335
91	6,341	6,347	6,353	6,359	6,366	6,372	6,379	6,385	6,392	6,398
92	6,405	6,412	6,419	6,426	6,433	6,440	6,447	6,454	6,451	6,468
93	6,476	6,483	6,491	6,498	6,506	6,514	6,522	6,530	6,528	6,546
94	6,555	6,563	6,572	6,580	6,589	6,598	6,607	6,616	6,625	6,635
95	6,645	6,653	6,665	6,675	6,685	6,695	6,705	6,717	6,728	6,739
96	6,751	6,762	6,774	6,787	6,799	6,812	6,845	6,838	6,852	6,866
97	6,881	6,896	6,911	6,927	6,943	6,960	6,971	6,995	7,014	7,033
98	7,054	7,075	7,097	7,120	7,144	7,170	7,197	7,226	7,257	7,290
99	7,326	7,368	7,409	7,457	7,512	7,576	7,662	7,748	7,875	8,090

Para la determinación del 0% y el 100% de respuesta en unidades de probabilidad se utilizaron las siguientes formulas:

$$0\% = 0.25/n * 100$$

$$100\% = n - 0.25/n * 100 \quad (\text{Ruiz, 2011})$$

11.2 Anexo 2

Solución fisiológica de Tyrode.

La preparación de la solución fisiológica de Tyrode se realizó según lo especificado en el manual de prácticas del laboratorio de fisiología de la UNAM 2003, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes y cantidades para la elaboración de la solución Tyrode

Reactivo	Gramos
NaCl	8.0
KCl	0.2
CaCl ₂	0.2
MgSO ₄	0.15
NaHCO ₃	1.0
NaH ₂ PO ₄	0.04
Glucosa	1.0

Todos los componentes están dados en gramos por litro de solución. Para la preparación de las soluciones se disolvió completamente cada sal antes de añadir la siguiente.