

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**LA MELATONINA INHIBE EL EFECTO ESTIMULANTE DE LA
ACETILCOLINA SOBRE LAS NEURONAS SENSORIALES
PRIMARIAS DEL INTESTINO DEL RATÓN**

Tesis que presenta

EGINA CRISEIDA VILLALOBOS HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

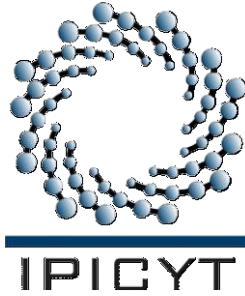
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

Dra. Marcela Miranda Morales

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo de 2012



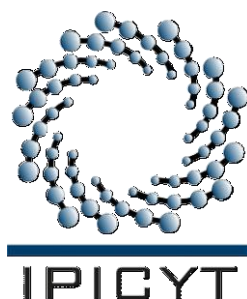
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**La melatonina inhibe el efecto estimulante de la acetilcolina sobre las neuronas sensoriales primarias del intestino de ratón**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Egina Criseida Villalobos Hernández** y aprobada el **03 de 07 de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas López
Codirector

Dra. Marcela Miranda Morales
Codirectora

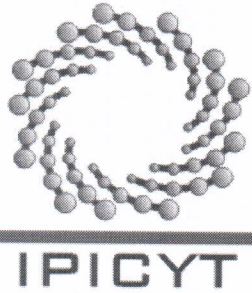
Dr. Rubén López Revilla
Asesor



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Carlos Barajas López y la Dra. Marcela Miranda Morales.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (250280) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 094 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Egina Criseida Villalobos Hernández

sobre la Tesis intitulada:

La melatonina inhibe el efecto estimulante de la acetilcolina sobre las neuronas sensoriales primarias del intestino del ratón

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Marcela Miranda Morales
Dr. Carlos Barajas López

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de julio de 2012.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres Ma. Guadalupe Hernández y Guillermo Villalobos, por su apoyo incondicional, por estar siempre pendiente de mí, por compartir mis sueños y por todo su amor.

A mis hermanos Idun, Inari y Guillermo por todas sus enseñanzas y sus consejos brindados en los momentos que más los he necesitado.

A todos mis amigos (as), porque aunque pase el tiempo siguen estando a mi lado y no han perdido la esperanza en mí.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Barajas por aceptarme en su laboratorio, por darme la oportunidad de viajar al extranjero y de esta manera obtener una experiencia única y por supuesto por todo su apoyo en mi proyecto de maestría.

A la Dra. Miranda Marcela M. por ser mi codirectora, por estar al pendiente de todo mi proyecto, tener la paciencia de enseñarme y por la amistad que me ha brindado.

Al Dr. Rubén López Revilla por ser mi asesor y por sus comentarios los cuales fueron muy útiles.

A la técnico Rosa Espinosa Luna por estar al pendiente de todo lo que necesitamos, por ayudarme en todo el área biológica, por darme tips, por su buen humor, por preocuparse y estar siempre al pendiente de nosotros, y por su amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio por hacer que este paso por la maestría sea más llevadero. A Lupita y a Cintya por escucharme en todo momento, darme consejos y brindarme su amistad. A Josué porque su buen humor que lo acompaña siempre. A Néstor por sus consejos oportunos y su apoyo cuando más lo necesite. A Raúl por la paciencia, por sus explicaciones padres, por escucharme y darme consejos. A Lili por su entusiasmo que la caracteriza.

A todos mis compañeros de generación (Karina, Gloria, Ivonne, Mariel, Lula, Israel, Gil, Ángel, Jorge, Tania, Chuy), y en especial a Lupita y a Joshua por su amistad y por su apoyo de tanto tiempo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	viii
Abreviaturas	ix
Glosario	x
Resumen	xiv
Abstract	xv
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	1
Introducción a la biología de la melatonina	1
Melatonina extrapineal	7
Melatonina en el tracto gastrointestinal	8
Efectos benéficos de la melatonina en pacientes con enfermedades intestinales	9
Objetivo	10
MÉTODOS	11
Animales.....	11
Fármacos	11
Registro de la actividad multiunitaria de un nervio mesentérico	11
Análisis de Datos.....	13
RESULTADOS	15
La ACh incrementa la actividad multiunitaria en los nervios mesentéricos de intestino delgado de ratón. 15	
El efecto de la ACh sobre la actividad multiunitaria disminuye al prevenir la contracción muscular	16
La melatonina disminuye la actividad multiunitaria inducida por ACh.....	19
La melatonina no disminuye la actividad multiunitaria inducida por ACh al inhibir la contracción.	19
DISCUSIÓN	24
REFERENCIAS.....	32
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	37
PERSPECTIVAS	37

Lista de figuras

Figura 1. La melatonina es un derivado de la serotonina.	2
Figura 2. Esquema representativo del equipo instalado para registro en nervio. .	14
Figura 3. El incremento en la actividad multiunitaria inducido por ACh es dependiente de la concentración.....	17
Figura 4. La inhibición de la contracción bloquea los efectos de la ACh sobre la actividad sensorial.....	18
Figura 5. La melatonina inhibe la actividad multiunitaria inducida por ACh en yeyuno de ratón.....	20
Figura 6. La nifedipina bloquea el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la actividad multiunitaria producida por la ACh 100 μ M	21
Figura 7. La melatonina inhibe la actividad multiunitaria inducida por ACh en colon de ratón.	23
Figura 8. La melatonina inhibe las corrientes inducidas por ACh (I_{ACh}) de manera dependiente de la concentración.....	29
Figura 9. La melatonina no tiene efecto sobre las ondas lentas ni el potencial de membrana del músculo liso intestinal.....	30
Figura 10. Modelo de acción de la melatonina en el intestino de ratón.	31
Figura 11. Imagen representativa de un registro de la actividad multiunitaria en el intestino de un cobayo en respuesta a una rampa de distensión intraluminal.....	39

Abreviaturas

AANAT	N-acetiltransferasa
ACh	Acetilcolina
AMK	N-acetil-5-metoxikinuramina
FMK	N-acetyl-N-formil-5-metoxikinuramina
HIOMT	Hidroxindol-O-metiltransferasa
I_{ACh}	Corriente inducida por ACh
IBS	Síndrome del intestino irritable (Irritable Bowel Syndrome)

Glosario

Acetilcolina: la acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico. Su función, al igual que otros neurotransmisores, es mediar en la actividad sináptica del sistema nervioso.

Citocromo P450: el citocromo P450 es una superfamilia muy diversa de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción monooxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular (O_2) en un sustrato orgánico (RH) a la vez que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua.

Dolor: el dolor es una experiencia sensorial (objetiva) y emocional (subjetiva), generalmente desagradable, que pueden experimentar todos aquellos seres vivos que disponen de un sistema nervioso. Es una experiencia asociada a una lesión tisular o expresada como si ésta existiera.

Fibras nociceptivas: son fibras nerviosas aferentes las cuales mandan señales al cerebro en respuesta estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Estas fibras se encuentran en muchos tejidos corporales como la piel, vísceras, vasos sanguíneos, músculo, tejido conectivo, periostio y meninges, etc. Estos receptores

transmiten la información a través de fibras nerviosas que son clasificadas dependiendo de su diámetro y grado de mielinización en fibras A y C.

Fibras A δ : Las fibras A se subdividen en los tipos α , β , γ y δ . De estos subtipos, las fibras A δ son las que conducen las señales nociceptivas. Son fibras de pequeño diámetro y mielinizadas que conducen impulsos nerviosos relativamente rápidos variando de 5 a 50 metros por segundo. Algunas de ellas responden a la estimulación química o térmica en forma proporcional con el grado de lesión tisular; otras, sin embargo, se activan principalmente por estimulación mecánica, como presión, lo que evidencia que se localizan en el lugar de la lesión. Algunas fibras A δ pueden tener respuestas polimodales y comenzar a excitarse después de que se haya alcanzado un umbral alto de excitación tras la producción del daño tisular.

Fibras C; Son fibras nerviosas de conducción lenta, inferior a la rapidez de conducción de las fibras A delta. Son estructuras no mielinizadas o amielínicas, que responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Se calcula que existen alrededor de 200 fibras tipo C por centímetro cuadrado de piel.

Melatonina: es una hormona encontrada en animales superiores y en algunas algas, en concentraciones que varían de acuerdo al ciclo diurno/nocturno. La melatonina es sintetizada a partir del neurotransmisor serotonina. En mamíferos se produce, principalmente, en la glándula pineal, y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos.

Mesenterio: membrana serosa que constituye un repliegue plano del peritoneo, principalmente de tejido conjuntivo, que contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos con destino a las vísceras abdominales, y que une al estómago y el intestino con las paredes posteriores del abdomen, dando así posicionamiento a estos órganos digestivos.

Monooxigenasa hepática del citocromo P450: la familia de las monooxigenasas de función mixta del citocromo P-450 constituye el principal catalizador de las reacciones de biotransformación de medicamentos (oxidación y reducción) y ejerce su actividad en un grupo de sustratos químicamente muy heterogéneo. La mayor parte de los tejidos de mamíferos, sobre todo hígado e intestino delgado, poseen uno o más de estos citocromos localizados principalmente en el retículo endoplásmico y en la mitocondria.

Nervio: es un conjunto de fibras nerviosas o axones (en ocasiones dendritas) asociados en fascículos por medio de tejido conjuntivo. Los nervios periféricos son manojos de prolongaciones nerviosas que hacen comunicar los centros nerviosos con todos los órganos del cuerpo. Forman parte del sistema nervioso periférico. Los nervios aferentes transportan señales sensoriales al cerebro, por ejemplo de la piel u otros órganos, mientras que los nervios eferentes conducen señales estimulantes desde el cerebro hacia los músculos y glándulas.

Nifedipina: es un bloqueador de canales de calcio del tipo dihidropiridina (Canales Tipo L), usado en medicina para el alivio de la angina de pecho, en especial la

angina de Prinzmetal, así como para la hipertensión arterial. Otros usos clínicos de la nifedipina incluyen la terapia del fenómeno de Raynaud, nacimientos prematuros y los espasmos dolorosos del esófago en pacientes con cáncer y tétano.

Potencial de acción: es una onda de descarga eléctrica que viaja a lo largo de la membrana celular modificando su distribución de carga eléctrica. Los potenciales de acción se utilizan en el cuerpo para llevar información entre unos tejidos y otros, lo que hace que sean una característica microscópica esencial para la vida de los animales. Pueden generarse por diversos tipos de células corporales, pero las más activas en su uso son las células del sistema nervioso para enviar mensajes entre células nerviosas (sinapsis) o desde células nerviosas a otros tejidos corporales, como el músculo o las glándulas.

Registros multiunitarios: es la adquisición de la actividad de un mayor número de neuronas de manera simultánea, en estos registros se pueden analizar la respuesta de varias neuronas a un mismo estímulo. Por ejemplo el estudio de la actividad eléctrica cerebral es necesariamente el estudio de la interacción eléctrica de poblaciones de neuronas. Registros multiunitarios permiten analizar estas interacciones con una resolución espacial imposible de lograr con registros unitarios.

Resumen

La melatonina inhibe el efecto estimulante de la acetilcolina sobre las neuronas sensoriales primarias del intestino del ratón.

Esta hormona disminuye el dolor en la colitis ulcerativa, en el síndrome del intestino irritable y durante las erosiones hemorrágicas gástricas inducidas por el estrés, sugiriendo que podría estar modulando las funciones de nervios entéricos. Aunque su efecto directo sobre la actividad espontánea e inducida por ACh en fibras nociceptivas mesentéricas se ignora por lo cual, este fue el objetivo del presente estudio. En cada ratón, se disecó un nervio del yeyuno y se introdujo dentro de una micropipeta de cristal para registrar la actividad multiunitaria de sus axones durante la actividad basal y en presencia de varias sustancias experimentales. La ACh incrementó la frecuencia de esta actividad, de manera dependiente de la concentración, y la melatonina (100 μ M) redujo este efecto colinérgico. La nifedipina (3 μ M) inhibió el efecto de la ACh y también el de melatonina. Esto indica que la ACh podría incrementar la motilidad intestinal y así, la frecuencia de la actividad multiunitaria en los nervios aferentes. La melatonina no parece afectar el potencial de membrana del músculo liso pero inhibe los receptores nicotínicos de neuronas mientéricas indicando que está previniendo la activación de las neuronas entéricas inducida por ACh y así, la contracción intestinal.

PALABRAS CLAVE:

Dolor, Fibras Nociceptivas, Potenciales de Acción, Registros Multiunitarios, Nervios Mesentéricos

Abstract

Melatonin inhibits the stimulatory effect of acetylcholine on primary sensory neurons from the mouse intestine.

This hormone has been reported to reduce the symptoms in ulcerative colitis, irritable bowel syndrome and gastric bleeding erosions induced by stress, which suggest that melatonin might be acting on the intestinal neural function. Although, its effects on spontaneous activity or on that induced by ACh on nociceptive mesenteric fibers are unknown and therefore, this was the objective of the present study. In each mouse, a jejunal nerve was dissected and placed inside a glass micropipette by applying gentle suction. Multiple action potentials were recorded from this nerve during basal conditions and in the presence of experimental substances. Serosal application of ACh induced an increase in the frequency of action potentials in a concentration-dependent manner. A similar application of melatonin (100 μ M) significantly reduced ACh effect on nerve activity. Nifedipine (3 μ M) application decreases ACh effect and also prevented the melatonin action. This indicates that ACh might be increasing elevating the intestinal motility and thus, the frequency of multiunit activity in the afferent nerves. Melatonin does not appear to affect the membrane potential of intestinal smooth muscle cells but it inhibited nicotinic receptors of myenteric neurons indicating that this hormone might be preventing the activation of enteric neurons by ACh and thus, the intestinal contraction.

KEY WORDS:

Pain, Nociceptive Fibers, Action Potential, Multi-unit Recording, Mesenteric Nerve

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El síndrome del intestino irritable (IBS), también llamado colon irritable, es una de las afecciones más frecuentes del tubo digestivo. Consiste en un conjunto de signos y síntomas entre los cuales sobresale el dolor abdominal, tipo cólico. Este padecimiento se diagnostica por exclusión, es decir se realiza después de demostrar la ausencia de otras patologías. Se ha reportado que la melatonina disminuye la intensidad de la sintomatología en el IBS pero se ignora su mecanismo de acción. En el presente estudio investigamos el efecto de la melatonina sobre las fibras nociceptoras de los nervios mesentéricos intestinales.

Introducción a la biología de la melatonina

La melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina) es una neurohormona sintetizada a partir de la serotonina (5-Hidroxitriptamina) por medio de dos enzimas bien caracterizadas, la N-acetiltransferasa (AANAT), la cual convierte la serotonina en N-acetilserotonina y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), la cual convierte a la N-acetilserotonina en melatonina (Fig. 1). La principal enzima limitante para la síntesis de melatonina es AANAT. La melatonina es sintetizada y secretada, en forma circádica, principalmente por la glándula pineal, siguiendo los ciclos de luz y oscuridad (Konturek *et al.*, 2007).

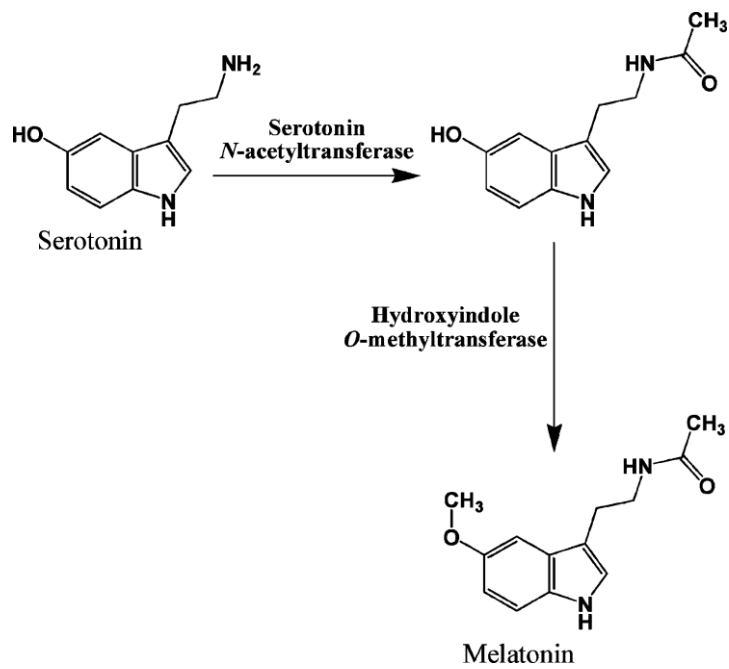


Figura 1. La melatonina es un derivado de la serotonina. La melatonina se sintetiza a partir de su precursor la serotonina por medio de dos enzimas la AANAT y la HIOMT. La primera convierte la serotonina en N-acetilserotonina y la segunda transforma a ésta en melatonina.

En mamíferos, la información visual llega a la glándula pineal, a través de las células fotosensibles retínales ganglionares que envían la información de luz hacia el núcleo supraquiasmático y este a su vez regula la secreción de la melatonina por la glándula pineal a través de los ganglios simpáticos superiores cervicales (Chen *et al.*, 2011). Se sabe que la información luminosa disminuye la producción y liberación de melatonina, por lo que su concentración en la sangre y los tejidos corporales es más alta durante la noche.

Una vez en el torrente sanguíneo, la mayor parte de la melatonina (70%) se encuentra unida a albuminas y el otro 30% libre. La porción libre es la que puede difundir a los tejidos circundantes (Hardeland *et al.*, 2006). Debido a su alta solubilidad en los lípidos, la melatonina fácilmente difunde a los diferentes espacios corporales a través del líquido: cefalorraquídeo, la bilis, la saliva, el semen, el líquido folicular ovárico y el líquido amniótico (Carpentieri *et al.*, 2012). Pequeñas cantidades de melatonina no metabolizada suelen ser excretadas en la orina (Lane & Moss, 1985).

El catabolismo de la melatonina circulante es casi exclusivamente realizado por la monooxigenasa hepática del citocromo P450, seguido por la conjugación de 6-hidroxi-melatonina para dar el mayor metabolito urinario, 6-sulfatoxi-melatonina. El catabolismo que predomina en el sistema nervioso central es la oxidación del anillo pirrólico y el producto primario obtenido es N-acetil-N-formil-5-metoxikinuramina (AFMK); varias reacciones diferentes generan el mismo producto AFMK, después éste compuesto es convertido a N-acetil-5-metoxikinuramina (AMK). Finalmente, AFMK y AMK son metabolitos que interaccionan con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Carpentieri *et al.*,

2012). Se ha calculado que la vida media de la melatonina en el suero es entre 30-50 min. (Lane & Moss, 1985).

La melatonina tiene efecto hormonal en muchos tejidos y órganos y participa en una gran variedad de procesos fisiológicos como los ciclos circadianos del ciclo sueño vigilia (Moore, 1997), termorregulación (Dollins *et al.*, 1994), presión sanguínea (Arangino *et al.*, 1999), varias funciones del sistema inmunológico (Srinivasan *et al.*, 2005) y acciones citoprotectoras (Tan *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que en los mamíferos los niveles de melatonina disminuyen con la edad. Algunas etapas de la vida en las que la secreción de melatonina parece ser importante son el embarazo y el parto. Los niveles de melatonina plasmática materna, son muy elevados durante el embarazo y regresan rápidamente a niveles basales después de dar a luz (Tamura *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Esa melatonina rápidamente cruza la placenta y la barrera hematoencefálica fetal (Sadowsky *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2012). Después de nacer el nivel de melatonina en suero del recién nacido es muy bajo en las primeras semanas, además no presenta cambios diurnos (Carpentieri *et al.*, 2012). La biosíntesis de la melatonina comienza entre la séptima y octava semana de vida (Seron-Ferre *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2012). Una oscilación circádica en el nivel de melatonina se observa entre el tercero y sexto mes, lo cual coincide con el desarrollo normal del ritmo del sueño. Los niveles máximos de secreción de melatonina aparecen entre los 4 y 7 años. (Arendt, 2006; Chen *et al.*, 2012). Un marcado decremento en la secreción de melatonina se da durante la maduración sexual y después de eso los niveles de melatonina disminuyen

gradualmente, en la adultez la producción de melatonina en la glándula pineal declina progresivamente con la edad (Chen *et al.*, 2012). A los 40-50 años decrecienta notablemente la síntesis de melatonina durante el día y a los 70 años la síntesis desaparece casi por completo (Carpentieri *et al.*, 2012).

La melatonina ejerce efectos fisiológicos a través de la activación de receptores de membrana específicos, denominados MT1, MT2 y MT3 (Masana & Dubocovich, 2001). MT1 y MT2 son miembros de la familia de los receptores con 7 dominios transmembranales unidos a proteínas G (GPCR). Ambos están clasificados en el grupo A de los receptores GPCR parecidos a rodopsina. Estos dos receptores están formados por 350 y 362 aminoácidos y sus pesos calculados son de 39 y 40 kDa respectivamente. El gen MTRN1A de MT1 está localizado en la posición 4q35-1 y el gen MTNR1B de MT2 está en 11q21-22 (Carpentieri *et al.*, 2012). Estos receptores muestran una alta homología a nivel de aminoácidos, con un 55% de homología total y un 70% de homología en la región transmembranal (Jockers *et al.*, 2008). MT1 presenta 2 sitios de glicosilación en la región N-terminal y MT2 tiene un sitio potencial de glicosilación en la misma región. Ambos receptores están involucrados en la señalización a través de la inhibición de la formación de AMP cíclico y de la actividad de la proteína cinasa A, así como efectos en la fosfolipasa A2 y C y en los canales de calcio y potasio (Mathes, 2010). La activación de MT3 el cual es una quinona reductasa 2 (QR2) puede explicar parte del efecto de la melatonina en contra del estrés oxidativo, ya que esta enzima al ser una reductasa es capaz de recibir y donar electrones, puede llegar a transferir de 1 a 4 electrones dependiendo de la naturaleza del substrato (Anisimov & Popovic, 2004). La melatonina actúa

también a nivel nuclear por medio de la activación de los receptores nucleares denominados RZR (Retinoid Z Receptor) o ROR (Retinoid Orphan Receptor), así mismo la melatonina puede unirse de manera directa a calmodulina, calreticulina o tubulina (Carlberg, 2000; Chen *et al.*, 2011).

La melatonina es el mayor eliminador de moléculas reactivas de oxígeno y basadas en nitrógeno, varios de sus metabolitos pueden también detoxificar de radicales libres y sus derivados, por ejemplo las indolaminas eliminan los productos de descomposición de los peroxinitritos, incluyendo los radicales libres hidroxilo y los radicales de dióxido de nitrógeno (Peyrot *et al.*, 2006; Carpentieri *et al.*, 2012). La melatonina también contribuye de otra manera en la eliminación de estrés oxidativo, ya que regula la expresión de varios genes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Rodríguez *et al.*, 2004). La concentración de melatonina correspondiente al pico fisiológico de la noche, puede activar los receptores nucleares, y regular la expresión de los genes de estas enzimas, mientras que la concentración durante el día no la afecta. El efecto antioxidante de melatonina a bajas concentraciones parece ser indirectamente por la vía de sobre-regulación de la expresión del gen GPx, mientras que el efecto de las altas concentraciones de melatonina es atribuido de manera directa a sus acciones de eliminador de radicales. (Carpentieri *et al.*, 2012).

En algunos estudios en pacientes, se ha observado que la ingesta de 1 mg de melatonina fue capaz de disminuir la presión sanguínea, la reactividad vascular y los niveles de norepinefrina en hombre y mujer (Cagnacci *et al.*, 1997; Arangino *et al.*, 1999). Estudios colectivos recientes muestran que varias condiciones cardíacas severas son consecuencia de daño producido por radicales libre y

procesos que involucran respuestas inflamatorias. Los efectos benéficos de la administración de melatonina en contra de estas condiciones son debido a la actividad directa de eliminador de radicales libres, y de manera indirecta sus propiedades antioxidantes y sus efectos anti-inflamatorios. Cuando se administra melatonina, esta se distribuye rápidamente a través del organismo, cruzando todas las barreras morfológicas y entra en células cardiacas con facilidad. Este efecto protector de la melatonina puede ser potencialmente aplicable para individuos con enfermedades cardiovasculares (Tengattini *et al.*, 2008).

Melatonina extrapineal

La melatonina no solo es secretada por la glándula pineal sino que también es secretada de manera extrapineal por algunas células tales como leucocitos, médula ósea, células epiteliales y células enterocromafines del intestino (Conti *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). La síntesis de melatonina se ha localizado en varios leucocitos incluyendo monocitos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos T y células asesinas naturales; en todas estas células la melatonina actúa de manera autocrina y paracrina. Los leucocitos poseen receptores MT1, MT2 y receptores nucleares, los cuales proveen la capacidad para responder a melatonina, es por esto que puede regular las respuestas inflamatorias y los procesos inmunológicos actuando tanto como inhibidor o activador de estas respuestas (Chen *et al.*, 2012).

Melatonina en el tracto gastrointestinal

La melatonina producida en el intestino actúa como una hormona paracrina (Maestroni, 2001). En varias especies se ha encontrado una distribución diferencial de la melatonina a lo largo del intestino, con altos niveles en recto y colon, y bajos niveles en yeyuno e íleon. La producción de melatonina en el tracto gastrointestinal no sigue un ritmo circadiano como ocurre en la glándula pineal, pero responde a la periodicidad de la ingesta de comida rica en triptófano. Se ha observado que después de una pinealectomía, los niveles de melatonina en el suero no mantienen un ritmo de acuerdo con los ciclos de luz y oscuridad, pero los valores no son muy bajos en el día debido a la contribución de la melatonina por las fuentes extrapineales, principalmente por el tracto gastrointestinal. Han sido detectados los receptores MT1, MT2 y MT3 tanto en íleon como en colon de varios roedores, también se ha observado la presencia de MT1 en la mucosa y de MT2 en la *muscularis mucosae*, en la submucosa y en la *muscularis propria* en rata (Bubenik, 1980; Bubenik *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2011; Carpentieri *et al.*, 2012).

Se propone también que la melatonina altera la motilidad del tracto gastrointestinal posiblemente a través de la activación de los receptores membranales MT (MT1, MT2 y MT3) en células musculares lisas (Chen *et al.*, 2011). En este contexto, (Reyes-Vazquez *et al.*, 1997) y (Storr *et al.*, 2000) reportan que la contracción producida por serotonina y agonistas colinérgicos en el estómago e íleon se ve disminuida por melatonina y que este efecto está relacionado con los canales de K⁺ activados por Ca²⁺. La motilidad y otras funciones del tracto gastrointestinal también podrían ser afectadas por el efecto

inhibitorio de la melatonina sobre los canales nicotínicos presentes en las neuronas entéricas como ha sido demostrado por nuestro laboratorio (Barajas-Lopez *et al.*, 1996).

Efectos benéficos de la melatonina en pacientes con enfermedades intestinales

Se han reportado efectos benéficos de la melatonina sobre la disminución de la sintomatología en padecimientos tales como colitis ulcerativa (Nosjean *et al.*, 2000), la enfermedad de Crohn (Calvo *et al.*, 2002), IBS, (Lu *et al.*, 2005) y erosiones hemorragias gástricas inducidas por el estrés (Brzozowski *et al.*, 2007).

El IBS es una enfermedad crónica de origen desconocido y que afecta a un gran número de personas. Los síntomas son variados, caracterizados principalmente por molestias o dolor abdominal, diarrea o estreñimiento crónicos a veces alternados o a veces con solo uno de estos síntomas. Pero siempre se trata de molestias abdominales con algún tipo de disfunción en la motilidad intestinal. Otro dato indicativo es la hipersensibilidad a cualquier distensión abdominal producida por gases o alimentos irritantes. Suele ser una afección crónica y acompañar al paciente a lo largo de su vida, unas veces con síntomas leves que no precisan ir al médico, otras veces representa un importante trastorno en su vida diaria.

Se han reportado varios estudios en los cuales la melatonina disminuye los síntomas ocasionados por el IBS. Uno de estos estudios mostró que la administración de 3 mg de melatonina antes de dormir por dos semanas disminuyó significativamente el dolor abdominal e incrementó el umbral de dolor rectal (Song *et al.*, 2005). En otro estudio, la administración de melatonina

incrementó el tránsito intestinal en pacientes con IBS y disminuyó los síntomas clínicos de este padecimiento (Lu *et al.*, 2009). En otro estudio con mujeres que padecen IBS la administración oral de la melatonina disminuyó el dolor abdominal, la distensión abdominal y la sensación anormal de defecar (Lu *et al.*, 2005). En conclusión, la melatonina disminuye la sintomatología de pacientes con IBS y resultados experimentales muestran que estos efectos podrían deberse a una disminución de la motilidad intestinal. Otro mecanismo de acción de esta hormona podría ser la modulación de fibras nociceptivas intestinales, sobre lo cual falta evidencia experimental.

Objetivo

Investigar los efectos directos de la melatonina sobre las fibras nerviosas sensoriales del intestino, tanto sobre la actividad eléctrica basal como la inducida por ACh.

MÉTODOS

Animales

El estudio se llevó a cabo utilizando, ratones C57BL/6 de entre 20-30 g, de cualquier sexo (obtenidos de los laboratorios de Charles River, en Montreal, Q,C, Canadá y del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM). Los ratones fueron mantenidos con acceso a agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos realizados fueron revisados y aprobados por el Comité de Bienestar Animal del IPICYT de acuerdo con los de *The American Physiological Society*. Los animales fueron sacrificados mediante dislocamiento cervical.

Fármacos

La melatonina y la nifedipina fueron diluidas en DMSO (1M). La ACh se diluyó en solución de Krebs. Todos los fármacos fueron comprados a *Sigma-Aldrich*.

Registro de la actividad multiunitaria de un nervio mesentérico

Después del sacrificio del ratón, se extrajo el yeyuno con los nervios mesentéricos adjuntos, se limpió el interior del intestino con una jeringa que contenía solución de Krebs. Se puso un segmento del yeyuno de 5 a 7 cm de largo en la cámara de órgano (Fig. 2), la cual contiene una base de Sylgard. El yeyuno se perfundió de manera constante con solución de Krebs (mM: 118.4 NaCl, 24.9 NaHCO₃, 1.9 CaCl₂, 1.2 MgSO₄ 7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 11.7 D-glucosa,

gasificada con 95% O₂ y 5% CO₂) con un flujo de 7ml/min a una temperatura de 32-33°C.

Se tomaron los extremos del yeyuno y se ataron a la cámara. La cual, cuenta con una perfusión extraluminal (en baño) para el recambio constante de solución de Krebs y para la aplicación de fármacos. Una vez que se estabilizó el tejido, se realizó la micro-disección de uno de los nervios mesentéricos. Primero con la ayuda de alfileres se extendió el mesenterio, sin estirarlo demasiado, con pinzas finas se fue abriendo el tejido graso hasta descubrir uno de los nervios, este fue separado completamente de cualquier tejido adyacente, procurando dejar un poco de tejido graso en la parte proximal del nervio. Se realizó un corte fino en la parte distal del nervio y se introdujo a una micropipeta de vidrio aplicando una ligera succión, hasta que el tejido graso permitía el sello de la boca de la micropipeta (Fig 2 B). La micropipeta fue conectada a una sonda (NL 100, Digitimer Ltd). La actividad eléctrica fue filtrada (con un preamplificador NL125), amplificada (con un amplificador NL104, Digitimer Ltd) y digitalizada (a 20 kHz) utilizando un convertidor A/D (Micro 1401 MKII, Digitimer Ltd). La actividad eléctrica fue analizada en una PC con el software SPIKE 2 (Cambridge Electronic Design).

Una vez que se registró la actividad basal del nervio, se dejó estabilizar la preparación por 20 min con perfusión constante de solución de Krebs. Después se prosiguió a registrar la actividad multiunitaria inducida mediante la aplicación de los fármacos de interés. Todos los fármacos fueron aplicados de manera extraluminal.

Análisis de Datos

La actividad multiunitaria aferente completa fue cuantificada por el conteo del número de potenciales de acción por segundo que sobrepasan un umbral predeterminado. Este umbral constituye el doble del ruido basal en cada uno de los registros. Toda respuesta fue analizada como el cambio de la actividad aferente por segundo. Para las gráficas se normalizó con respecto a su basal para medir las variaciones de actividad inducidas por una maniobra experimental dada.

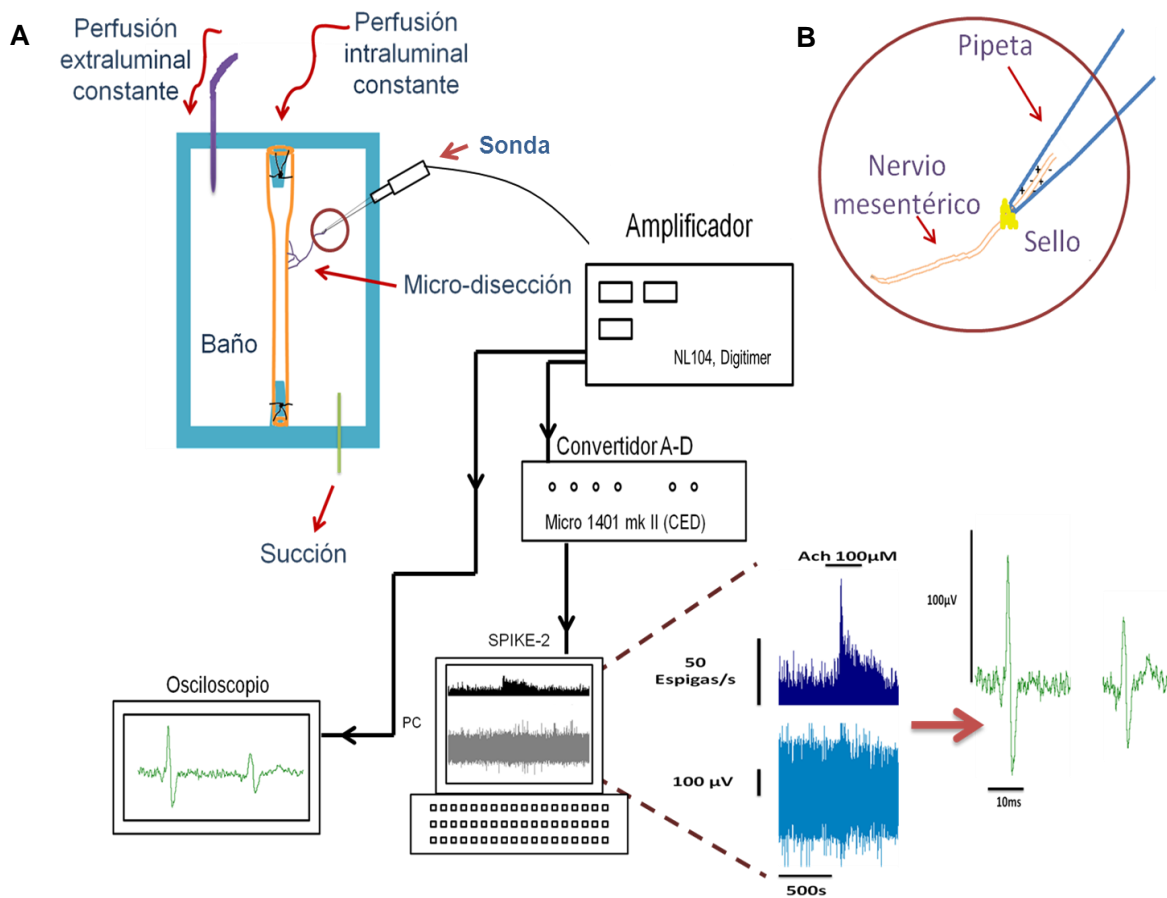


Figura 2. Esquema representativo del equipo instalado para registro en nervio. A) Se observan las partes de la cámara (perfusión, succión, cabezal, etc.). La micropipeta se une al sonda (NL 100, Digitimer Ltd) que a su vez se conecta con el amplificador (NL104, Digitimer Ltd), este se conecta con el osciloscopio y el convertidor (Micro 1401 mk II CED). El convertidor digitaliza la señal para que pueda ser procesada por la computadora. El software Spike 2 (Cambridge Electronic Design) nos ayuda a registrar y analizar los potenciales de acción del nervio y en la presencia de los fármacos problema. **B)** Representación gráfica de cómo realiza el sello entre la micropipeta de vidrio y el nervio.

RESULTADOS

La ACh incrementa la actividad multiunitaria en los nervios mesentéricos de intestino delgado de ratón

Una vez disecado el nervio mesentérico, se inició el registro de la actividad multiunitaria y se realizaron aplicaciones extraluminales sucesivas de ACh (0.1-1000 μ M). Cada aplicación de ACh fue por 3 min iniciando con las concentraciones bajas, hasta llegar a 1 mM, el tiempo de lavado entre dos aplicaciones sucesivas fue de 15 min con solución de Krebs. Se obtuvo un incremento en la actividad multiunitaria inducido por ACh, el cual fue dependiente de la concentración. Así mismo se observaron dos fases en la curva concentración respuesta. A concentraciones bajas de ACh de hasta 10 μ M, se alcanza un primer máximo de la respuesta, además a concentraciones superiores de 100 μ M se observa un incremento más pronunciado de la actividad multiunitaria el cual alcanza una segunda respuesta máxima (Fig. 3). Se sabe que en el intestino existen receptores muscarínicos y nicotínicos, los cuales son activados por concentraciones bajas (<10 μ M) y altas (>30 μ M) de ACh, respectivamente (Barajas-Lopez *et al.*, 2001). Los receptores muscarínicos se han descrito en neuronas entéricas, células musculares lisas, en las células epiteliales y en fibras sensoriales (Sakamoto *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2010). Los receptores nicotínicos han sido descritos en neuronas entéricas (Zhou *et al.*, 2002). Nuestras observaciones sugieren que la ACh podría incrementar la actividad multiunitaria al activar receptores muscarínicos a bajas concentraciones y al activar también receptores nicotínicos a altas concentraciones.

El efecto de la ACh sobre la actividad multiunitaria disminuye al prevenir la contracción muscular

La ACh podría incrementar la actividad multiunitaria en los nervios mesentéricos por una acción directa sobre las fibras nociceptoras o indirectamente al incrementar la contracción muscular intestinal, ya sea por su acción sobre las células musculares o sobre las neuronas mientéricas. El efecto directo de la ACh sobre la actividad de los nervios se investigó utilizando nifedipina la cual disminuye la contracción muscular del intestino por medio del bloqueo los canales de calcio tipo L. Se aplicó ACh 10 μ M por 3 min como control, se lavó con solución de Krebs por 15 min y después se co-aplicó nifedipina 1 μ M con ACh 10 μ M. La aplicación de nifedipina disminuyó el efecto de la ACh sobre la actividad multiunitaria (Fig. 4). Estas observaciones sugieren que la ACh incrementa la actividad multiunitaria al actuar directamente sobre las fibras nerviosas (o al menos sobre un mecanismo insensible a nifedipina) e indirectamente al incrementar la contracción muscular.

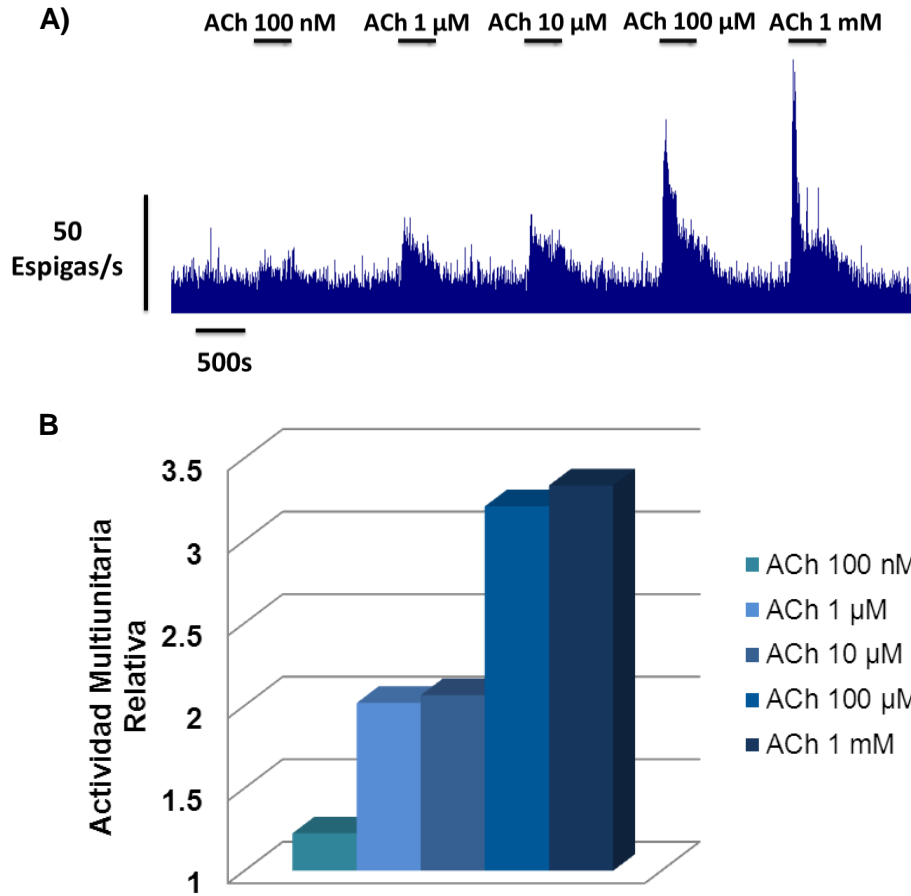


Figura 3. El incremento en la actividad multiunitaria inducido por ACh es dependiente de la concentración. A) Registro representativo de la actividad multiunitaria de un nervio mesentérico de yeyuno de ratón mostrando que la aplicación serosa de ACh a diferentes concentraciones (100 nM -1 mM) induce un aumento en la actividad del nervio. **B)** La gráfica muestra que la respuesta multiunitaria a ACh es dependiente de la concentración. La actividad multiunitaria producida por ACh está normalizada con respecto a su actividad basal.

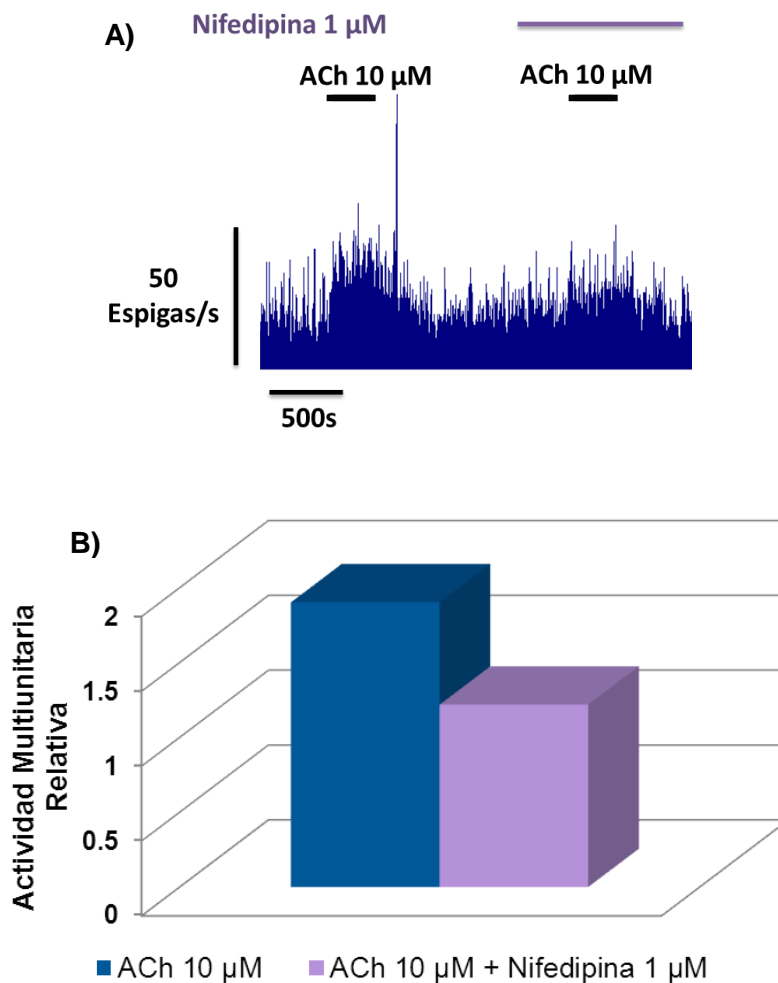


Figura 4. La inhibición de la contracción bloquea los efectos de la ACh sobre la actividad sensorial. A) En el registro se observa la actividad multiunitaria en un nervio mesentérico de yeyuno de ratón, el cual muestra una disminución en el efecto de ACh 10 μM cuando es co-aplicado con nifedipina 1 μM . **B)** La gráfica muestra de manera más clara el efecto de la nifedipina 1 μM sobre la respuesta a ACh 10 μM . La actividad multiunitaria producida por ACh está normalizada con respecto a su actividad basal.

La melatonina disminuye la actividad multiunitaria inducida por ACh

Se aplicó de manera extraluminal ACh 100 μ M por 3 min como control, se lavó con solución de Krebs por 15 min, se aplicó melatonina 100 μ M por 5 min seguido de la co-aplicación de melatonina 100 μ M y ACh 100 μ M por 3 min, nuevamente se lavó con solución de Krebs por 15 min y se hizo la aplicación del control de salida con ACh 100 μ M por 3 min. La melatonina (100 μ M) no produjo cambios en la actividad multiunitaria basal del nervio como se aprecia en la Fig. 5. Sin embargo, se observó una disminución importante en la actividad multiunitaria inducida por ACh al aplicar melatonina (100 μ M).

La melatonina no disminuye la actividad multiunitaria inducida por ACh al inhibir la contracción.

El efecto que tiene la melatonina sobre la acción de ACh en ausencia de la contracción intestinal, se observó al aplicar nifedipina 3 μ M en baño de manera constante. Se usó ACh 100 μ M como control por 3 min, se aplicó nifedipina 3 μ M y se co-aplicó melatonina 100 μ M y ACh 100 μ M, por 3 min. La melatonina no presentó ningún efecto sobre la respuesta inducida por ACh cuando se disminuye la contracción por medio de nifedipina 3 μ M. Lo cual nos sugiere que el efecto de la melatonina sobre la actividad multiunitaria inducida por ACh parece estar ligada a la contracción intestinal (Fig. 6).

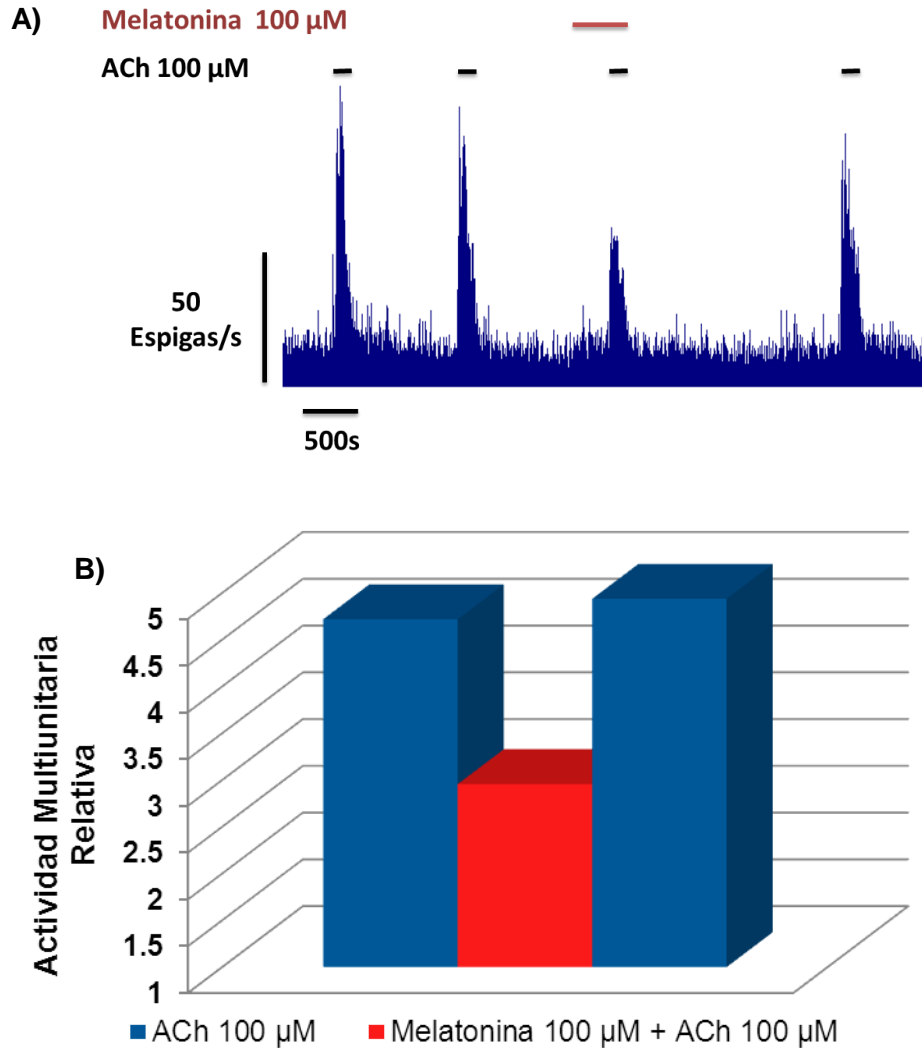


Figura 5. La melatonina inhibe la actividad multiunitaria inducida por ACh en yeyuno de ratón. A) El registro muestra el aumento en la actividad multiunitaria producido por ACh 100 μ M aplicada, este aumento se ve disminuido con la aplicación serosa de melatonina 100 μ M. Los efectos de la ACh y melatonina son reversibles. **B)** La gráfica muestra la inhibición de la respuesta multiunitaria producida por ACh. La actividad multiunitaria producida por ACh está normalizada con respecto a su basal.

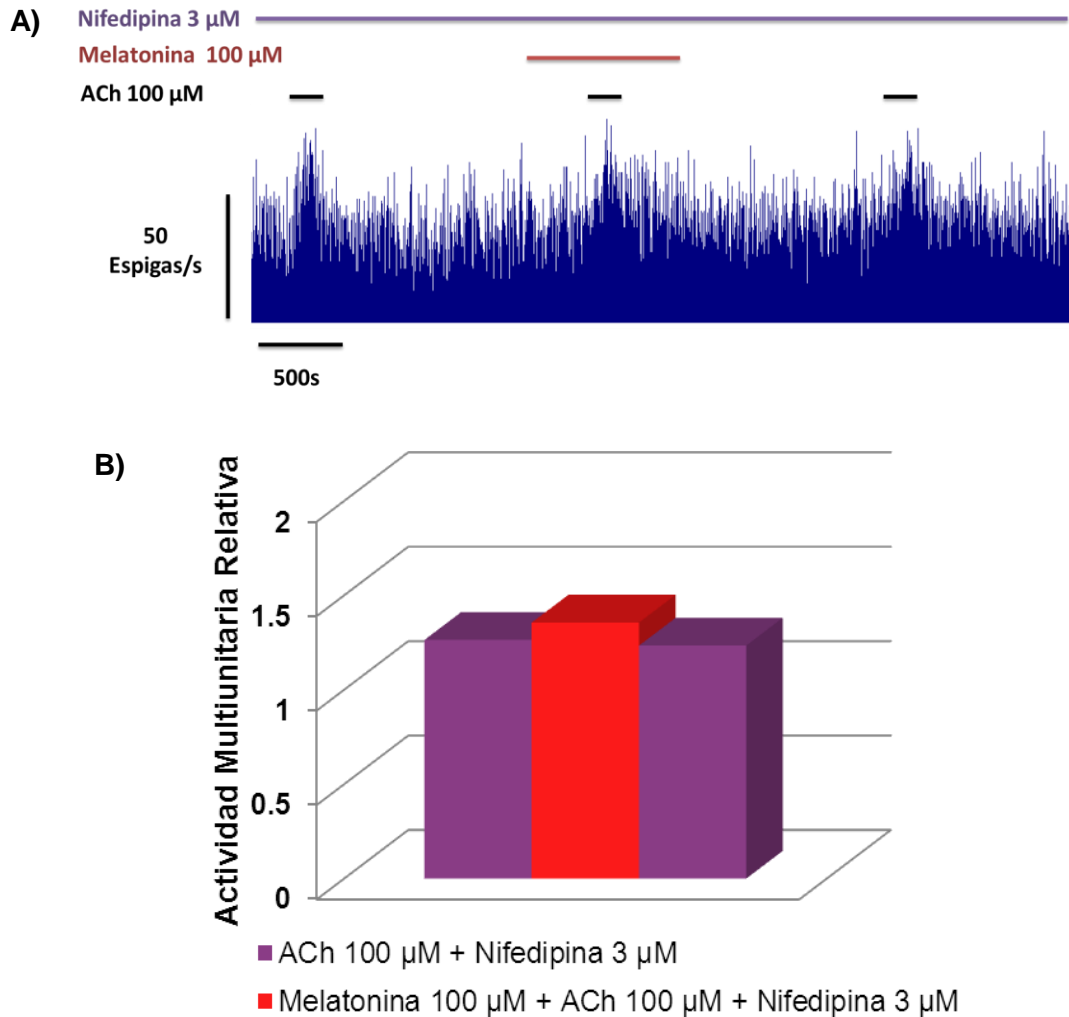


Figura 6. La nifedipina bloquea el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la actividad multiunitaria producida por la ACh 100 μM . **A)** Registro de la actividad multiunitaria en un nervio mesentérico de yeyuno de ratón, el cual muestra una disminución en el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la respuesta de ACh 100 μM cuando es aplicada Nifedipina 3 μM de manera constante. Los fármacos se aplicaron de manera serosa. **B)** La gráfica muestra que la melatonina 100 μM no inhibe la actividad multiunitaria producida por ACh 100 μM en presencia de nifedipina 3 μM . La actividad multiunitaria producida por ACh y melatonina está normalizada con respecto a su basal.

La melatonina también disminuyó la actividad multiunitaria inducida por ACh en colon

Se aplicó de manera serosa ACh 100 μ M por 3 min, se lavó con solución de Krebs por 15 min, después se co-aplicó melatonina 100 μ M y ACh 100 μ M por 3 min, este procedimiento se repitió con el control de salida. Se observó una disminución importante en la actividad multiunitaria inducida por ACh al aplicar melatonina 100 μ M (Figura 7). En este experimento se hicieron dos controles de salida, debido a que el efecto inhibitorio producido por melatonina parece durar más tiempo cuando se aplica en el colon. La melatonina también disminuye la actividad aferente producida por ACh.

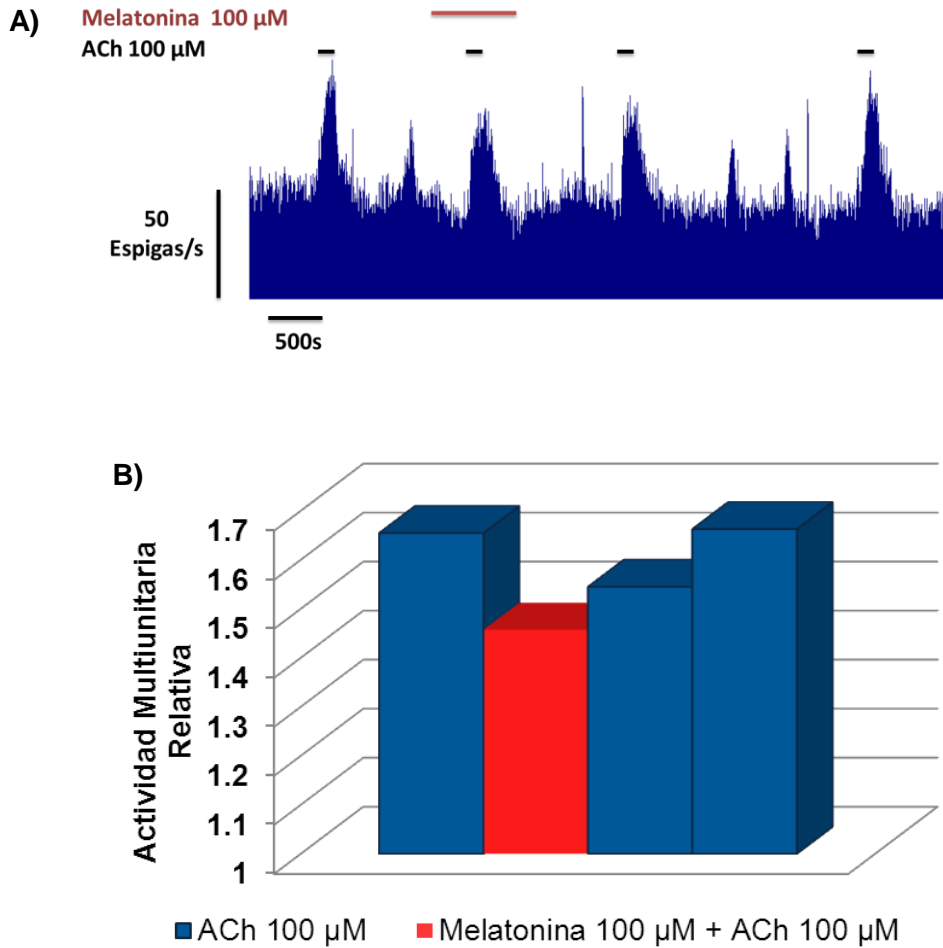


Figura 7. La melatonina inhibe la actividad multiunitaria inducida por ACh en colon de ratón. A) El registro muestra el aumento en la actividad multiunitaria de un nervio mesentérico de colon de ratón producido por ACh, este aumento se ve disminuido con la aplicación serosa de melatonina. Los efectos de la ACh y melatonina son reversibles. **B)** La gráfica muestra la inhibición de la respuesta multiunitaria producida por ACh, cuando se le aplica melatonina. La actividad multiunitaria producida por ACh y melatonina está normalizada con respecto a su basal.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la ACh incrementa la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos intestinales, efecto que parece ser mediado por la activación de receptores muscarínicos y nicotínicos. La mayor parte del efecto de la ACh es bloqueado mediante la prevención de la contracción muscular con nifedipina y también por la melatonina. El efecto de la melatonina fue inhibido por el pre-tratamiento con nifedipina. Finalmente, la melatonina no tiene efecto sobre la actividad basal. Nuestras observaciones sugieren que la ACh incrementa la actividad multiunitaria principalmente por incremento en la contracción muscular. La melatonina parece modular la actividad sensorial al prevenir la contracción muscular.

El efecto de la ACh sobre la actividad multiunitaria es dependiente de la concentración. Además como se observa en la gráfica (Fig. 3) se obtienen dos fases en la curva concentración respuesta, lo que sugiere la presencia de dos poblaciones de receptores con diferente sensibilidad que están siendo activados al aplicar ACh. Se han encontrado los 5 subtipos (M1-M5) de receptores muscarínicos distribuidos en neuronas entéricas y en células musculares del tracto gastrointestinal de ratón, aunque los subtipos que se expresan principalmente en las células musculares son M2 y M3 (Kondo *et al.*, 2011). Algunos resultados indican que estos dos receptores parecen estar involucrados en la contracción intestinal a través de diferentes mecanismos (Sakamoto *et al.*, 2007). Los receptores muscarínicos son altamente sensibles a ACh ya que se activan desde concentraciones nanomolares y son del tipo metabotrópico. Estos no son los

únicos receptores del sistema nervioso entérico que responden a ACh; también se encuentran los nicotínicos, los cuales son menos sensibles a ACh ya que responden a concentraciones mayores de 10 μM (Barajas-Lopez *et al.*, 2001). Estos receptores son canales inotrópicos formados por 5 subunidades, de las cuales $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$, han sido detectadas en el plexo mientérico del intestino de rata; en el plexo submucoso se ha encontrado la presencia de $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$ y se han detectado receptores heteroméricos en ambos plexos, así como la posibilidad de homoméricos formados por $\alpha 7$ (Garza *et al.*, 2009). Debido a esta diversidad en los tipos de receptores que responden a ACh, es necesario el uso de agonistas y antagonistas específicos para caracterizar los receptores que participan. Sin embargo, sugerimos que la primera fase de la curva, a concentraciones menores a 10 μM , podría deberse a algún subtipo o varios subtipos de los receptores muscarínicos y la segunda fase de la curva a concentraciones mayores de 10 μM podría deberse a receptores nicotínicos. En una extensión del actual proyecto se pretende utilizar fármacos específicos (p.ej. hexametonio, atropina) para diferenciar estas dos poblaciones de receptores activados por ACh y el mecanismo de la melatonina.

La inhibición de la contracción bloquea el efecto de la ACh sobre la actividad aferente; al aplicar nifedipina, ésta bloquea los canales de calcio tipo L, al haber una menor cantidad de Ca^{2+} en las células musculares se inhibe la contracción. Sin embargo, existen otras células que también expresan canales de Ca^{2+} tipo L y podrían ser, al menos en parte, responsables de los efectos de la nifedipina observados aquí. Para descartar esta posibilidad, proponemos usar bloqueadores de la contracción dirigidos al aparato contráctil, p.ej. latrunculina B

(Spector *et al.*, 1983), citocalasina D (Flanagan & Lin, 1980; Lin *et al.*, 1980) y ML-9 (Ito *et al.*, 2004), evitando así afectar los canales tipo L.

La inhibición de la actividad multiunitaria provocada por la melatonina en presencia de ACh podría ser debida al bloqueo de los canales nicotínicos en neuronas entéricas. En apoyo a esta interpretación encontramos que los efectos de la melatonina son prevenidos por la nifedipina, también ha sido demostrado que la melatonina bloquea canales nicotínicos tanto en neuronas del plexo submucoso (Barajas-Lopez *et al.*, 1996) como en el mientérico (Fig. 8). Dicho efecto disminuiría el efecto excitatorio de ACh sobre neuronas entéricas y por consiguiente la liberación de neurotransmisores excitatorios de la contracción muscular, disminuyendo la contracción muscular y la actividad multiunitaria.

La inhibición provocada por la melatonina de la actividad multiunitaria en presencia de ACh podría también deberse a un incremento de la conductancia al potasio en el músculo liso, lo cual produciría relajación muscular y la subsecuente inhibición de la actividad multiunitaria. En apoyo a esta interpretación, se ha reportado que la melatonina inhibe la contracción inducida por la activación de receptores muscarínicos o serotoninérgicos, este efecto es bloqueado por apamina, toxina que inhibe los canales K^+ de conductancia pequeña, activados por Ca^{2+} (Reyes-Vazquez *et al.*, 1997; Storr *et al.*, 2000). Estos hallazgos, sin embargo, deben tomarse con reserva ya que ninguno de estos estudios reporta experimentos controles del efecto del solvente, etanol, el cual fue utilizado a concentraciones de 20 mM hasta 2 M. Además, el etanol (20-120 mM) ha sido reportado que hiperpolariza el músculo liso gastrointestinal (Lu *et al.*, 1997). Observaciones preliminares mías, indican que la aplicación de melatonina (100

μM) no modifica el potencial de membrana del músculo liso del yeyuno de ratón (Fig. 9), lo cual apoya la idea de que la melatonina está actuando sobre las neuronas entéricas, posiblemente bloqueando los receptores nicotínicos.

El efecto inhibitorio de la melatonina también pudo observarse en colon, sin embargo, no sabemos aún si los efectos en el yeyuno y en el colon comparten el mismo mecanismo, ya que existen diferencias en el tiempo que tarda en recuperarse la respuesta a la ACh después del lavado de melatonina. El análisis de los efectos de la melatonina en colon es relevante ya que este órgano está involucrado en el efecto benéfico de la melatonina que se observa en pacientes que padecen el IBS. Por lo cual se planea continuar con estos experimentos en un futuro.

La nifedipina bloquea el efecto inhibitorio de la melatonina sobre la actividad multiunitaria producida por ACh y también disminuye el efecto estimulante de la ACh sobre la actividad multiunitaria. Implicando a la contracción muscular como uno de los factores determinantes que activan a las fibras nerviosas sensoriales en el intestino, se propone (Fig. 10) que el mecanismo por el cual está actuando es el siguiente. La ACh induciría contracción al activar receptores muscarínicos en el músculo liso y al producir liberación de neurotransmisores excitatorios que activarían canales muscarínicos y nicotínicos en neuronas entéricas. Estos receptores podrían ser el blanco fundamental de la melatonina la cual no tendría efecto en ausencia de contracción muscular, en presencia de nifedipina. Estos experimentos son relevantes porque existen medicamentos que combinan bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo L, antagonistas serotoninérgicos y melatonina para el tratamiento del IBS (<http://www.drugdevelopment->

technology.com/projects/rezular/). También falta por descartar si la melatonina tiene efectos directos sobre la actividad aferente, para lo cual nos hemos propuesto probar el efecto de la melatonina con los bloqueadores de la contracción dirigidos al aparato contráctil antes mencionados.

En resumen, nuestros datos indican que la ACh incrementa la actividad multiunitaria principalmente a través de un incremento en la contracción del músculo liso. La melatonina no produce efecto sobre la frecuencia de los potenciales de acción basales, sin embargo, inhibe la actividad multiunitaria inducida por ACh, probablemente a través del bloqueo de los canales nicotínicos en neuronas entéricas (Fig. 10).

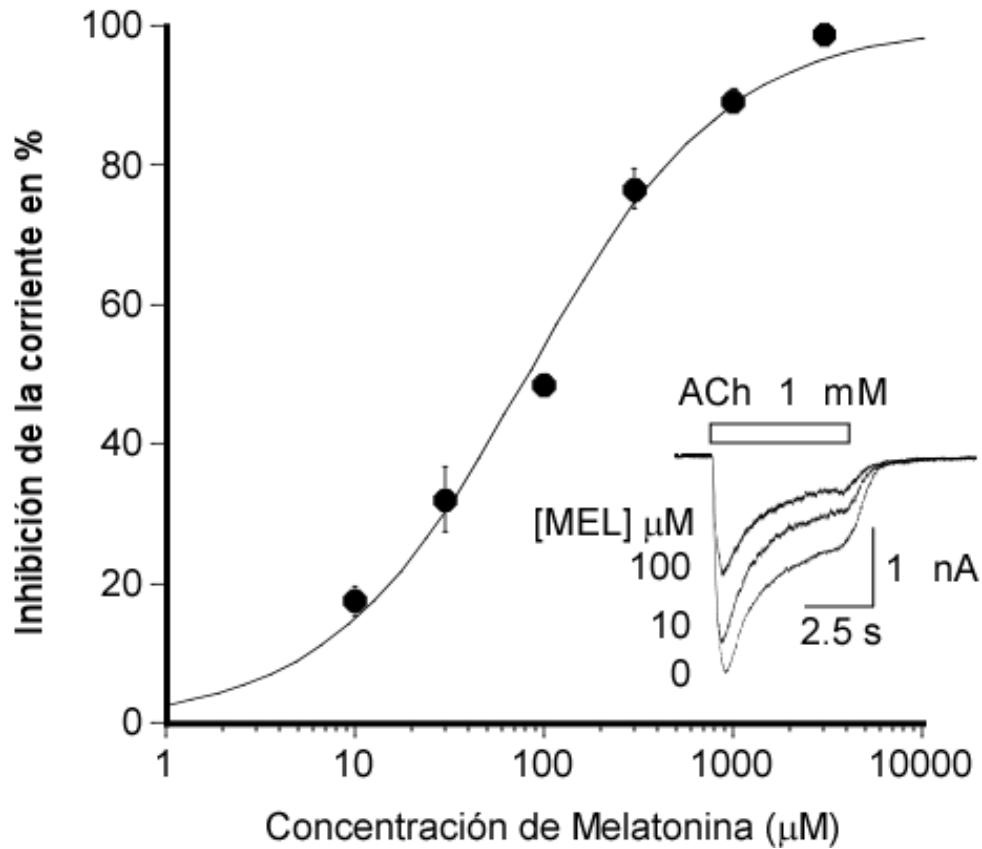


Figura 8. La melatonina inhibe las corrientes inducidas por ACh (I_{ACh}) de manera dependiente de la concentración. Curva concentración respuesta de los efectos de la melatonina sobre las corrientes inducidas por ACh a diferentes concentraciones. Los círculos representan la media \pm S.E.M. de 4-7 neuronas del plexo mientérico. La máxima inhibición se tomó como el 100%. Imagen proporcionada por Esri Hazael Juárez (datos no publicados). Este experimento se realizó con la técnica de Patch-Clamp en su modalidad de célula completa.

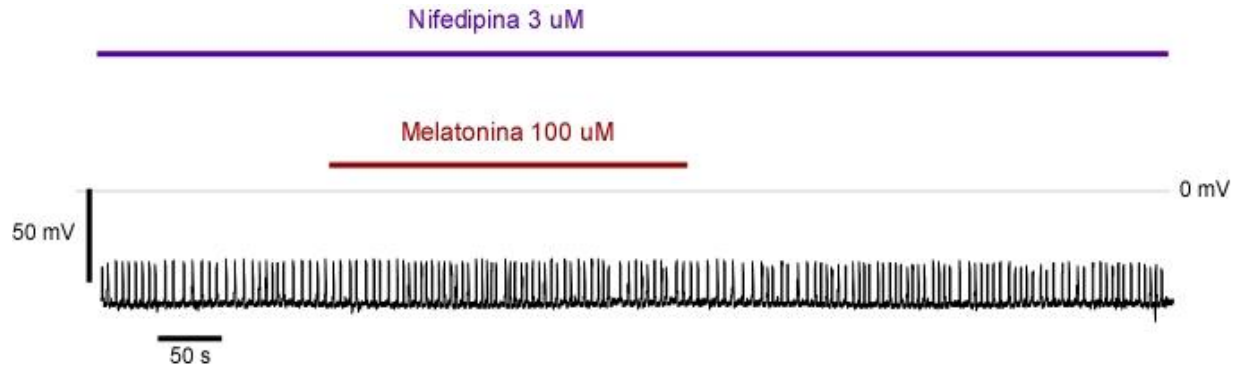


Figura 9. La melatonina no tiene efecto sobre las ondas lentas ni el potencial de membrana del músculo liso intestinal. Figura representativa donde se observa que la aplicación de melatonina 100 μM no modifica la actividad del músculo liso intestinal en presencia de nifedipina. Se realizó la aplicación de nifedipina 3 μM de manera constante y de melatonina 100 μM por 5 min. Este experimento se realizó mediante la técnica de registro intracelular, usando una preparación de músculo circular, longitudinal y plexo mientérico, fijada a un bloque de sylgard.

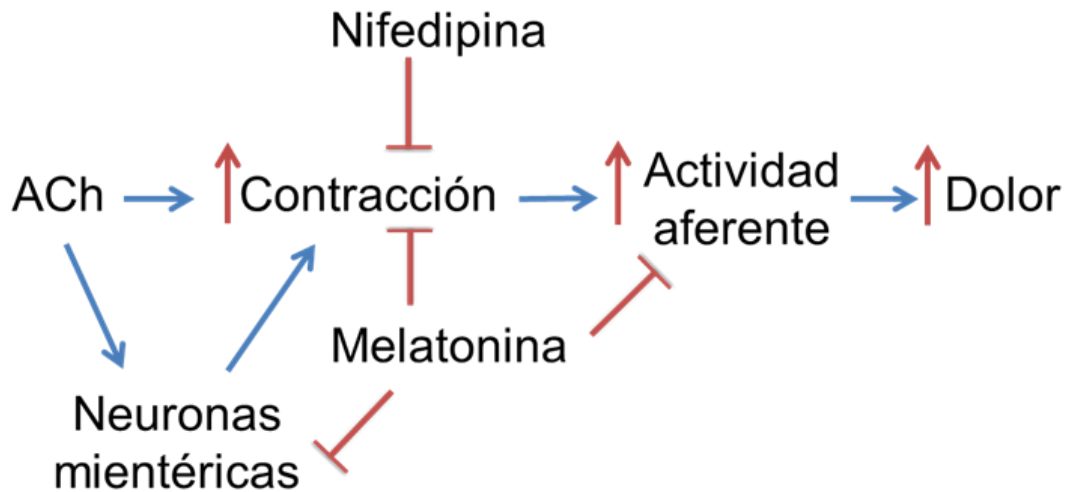


Figura 10. Modelo de acción de la melatonina en el intestino de ratón. La aplicación de ACh al intestino, incrementa la contracción, lo cual incrementa a su vez la actividad aferente, traduciéndose en un incremento de la actividad multiunitaria. Este incremento en la actividad aferente incrementaría el dolor en un modelo *in vivo*. La ACh también incrementa la actividad de las neuronas mientéricas, estas a su vez incrementan la contracción, mediante la liberación de neurotransmisores excitatorios. La nifedipina actúa directamente sobre el músculo liso, disminuyendo la contracción. La melatonina parece inhibir de igual manera la contracción, pero no por medio del músculo liso, sino que podría estar inhibiendo la actividad de las neuronas mientéricas lo que produciría una disminución en la actividad aferente y una disminución en del dolor en una modelo *in vivo*. La ACh parece modular directamente la actividad de las fibras sensoriales, efecto que no es modificado por la melatonina.

REFERENCIAS

- Anisimov SV & Popovic N. (2004). Genetic aspects of melatonin biology. *Rev Neurosci* 15, 209-230.
- Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, Vacca AM, Longu G, Volpe A & Melis GB. (1999). Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol* 83, 1417-1419.
- Arendt J. (2006). Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int* 23, 21-37.
- Barajas-Lopez C, Karanjia R & Espinosa-Luna R. (2001). 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* 414, 113-123.
- Barajas-Lopez C, Peres AL, Espinosa-Luna R, Reyes-Vazquez C & Prieto-Gomez B. (1996). Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur J Pharmacol* 312, 319-325.
- Brzozowski T, Zwirska-Korczala K, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Kwiecien S, Drozdowicz D, Mazurkiewicz-Janik M, Bielanski W & Pawlik WW. (2007). Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 6, 53-64.
- Bubenik GA. (1980). Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Horm Res* 12, 313-323.
- Bubenik GA, Ball RO & Pang SF. (1992). The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J Pineal Res* 12, 7-16.
- Cagnacci A, Arangino S, Angiolucci M, Maschio E, Longu G & Melis GB. (1997). Potentially beneficial cardiovascular effects of melatonin administration in women. *J Pineal Res* 22, 16-19.
- Calvo JR, Guerrero JM, Osuna C, Molinero P & Carrillo-Vico A. (2002). Melatonin triggers Crohn's disease symptoms. *J Pineal Res* 32, 277-278.
- Carlberg C. (2000). Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 917, 387-396.

- Carpentieri A, Diaz de Barboza G, Areco V, Peralta Lopez M & Tolosa de Talamoni N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* 65, 437-444.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M & Maestroni JM. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28, 193-202.
- Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY & Storr M. (2011). Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol* 17, 3888-3898.
- Chen YC, Tain YL, Sheen JM & Huang LT. (2012). Melatonin utility in neonates and children. *J Formos Med Assoc* 111, 57-66.
- Daly DM, Chess-Williams R, Chapple C & Grundy D. (2010). The inhibitory role of acetylcholine and muscarinic receptors in bladder afferent activity. *Eur Urol* 58, 22-28; discussion 31-22.
- Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ & Deng MH. (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1824-1828.
- Flanagan MD & Lin S. (1980). Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol Chem* 255, 835-838.
- Garza A, Huang LZ, Son JH & Winzer-Serhan UH. (2009). Expression of nicotinic acetylcholine receptors and subunit messenger RNAs in the enteric nervous system of the neonatal rat. *Neuroscience* 158, 1521-1529.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR & Cardinali DP. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 313-316.
- Ibeakanma C, Miranda-Morales M, Richards M, Bautista-Cruz F, Martin N, Hurlbut D & Vanner S. (2009). *Citrobacter rodentium* colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 587, 3505-3521.
- Ito S, Kume H, Honjo H, Kodama I, Katoh H, Hayashi H & Shimokata K. (2004). ML-9, a myosin light chain kinase inhibitor, reduces intracellular Ca²⁺ concentration in guinea pig trachealis. *Eur J Pharmacol* 486, 325-333.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA & Delagrangre P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154, 1182-1195.

- Kondo T, Nakajima M, Teraoka H, Unno T, Komori S, Yamada M & Kitazawa T. (2011). Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 670, 236-243.
- Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Czesnikiewicz-Guzik M, Kwiecien S, Brzozowski T, Bubenik GA & Pawlik WW. (2007). Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol* 58, 381-405.
- Lane EA & Moss HB. (1985). Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 61, 1214-1216.
- Lin DC, Tobin KD, Grumet M & Lin S. (1980). Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J Cell Biol* 84, 455-460.
- Lu G, Sarr MG & Szurszewski JH. (1997). Effects of ethyl alcohol on canine jejunal circular smooth muscle. *Dig Dis Sci* 42, 2403-2410.
- Lu WZ, Gwee KA, Mochhalla S & Ho KY. (2005). Melatonin improves bowel symptoms in female patients with irritable bowel syndrome: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 927-934.
- Lu WZ, Song GH, Gwee KA & Ho KY. (2009). The effects of melatonin on colonic transit time in normal controls and IBS patients. *Dig Dis Sci* 54, 1087-1093.
- Maestroni GJ. (2001). The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 10, 467-476.
- Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC & Calvo JR. (2010). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res* 62, 282-287.
- Masana MI & Dubocovich ML. (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* 2001, pe39.
- Mathes AM. (2010). Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol* 16, 6087-6097.
- Moore RY. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med* 48, 253-266.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E & Boutin JA. (2000). Identification of the melatonin-

- binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275, 31311-31317.
- Peyrot F, Houee-Levin C & Ducrocq C. (2006). Melatonin nitrosation promoted by NO²; comparison with the peroxynitrite reaction. *Free Radic Res* 40, 910-920.
- Reyes-Vazquez C, Naranjo-Rodriguez EB, Garcia-Segoviano JA, Trujillo-Santana JT & Prieto-Gomez B. (1997). Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. *J Pineal Res* 22, 1-8.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V & Reiter RJ. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36, 1-9.
- Sadowsky DW, Yellon S, Mitchell MD & Nathanielsz PW. (1991). Lack of effect of melatonin on myometrial electromyographic activity in the pregnant sheep at 138-142 days gestation (term = 147 days gestation). *Endocrinology* 128, 1812-1818.
- Sakamoto T, Unno T, Kitazawa T, Taneike T, Yamada M, Wess J, Nishimura M & Komori S. (2007). Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *J Physiol* 582, 41-61.
- Sakamoto T, Unno T, Matsuyama H, Uchiyama M, Hattori M, Nishimura M & Komori S. (2006). Characterization of muscarinic receptor-mediated cationic currents in longitudinal smooth muscle cells of mouse small intestine. *J Pharmacol Sci* 100, 215-226.
- Seron-Ferre M, Torres-Farfan C, Forcelledo ML & Valenzuela GJ. (2001). The development of circadian rhythms in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 25, 363-370.
- Song GH, Leng PH, Gwee KA, Moochhala SM & Ho KY. (2005). Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 54, 1402-1407.
- Spector I, Shochet NR, Kashman Y & Groweiss A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219, 493-495.
- Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR & Miller SC. (2005). Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing* 2, 17.

- Storr M, Schusdziarra V & Allescher HD. (2000). Inhibition of small conductance K⁺ -channels attenuated melatonin-induced relaxation of serotonin-contracted rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 78, 799-806.
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, Sugino N & Reiter RJ. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol* 25, 291-303.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ & Reiter RJ. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42, 28-42.
- Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF & Rezzani R. (2008). Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 44, 16-25.
- Zhou X, Ren J, Brown E, Schneider D, Caraballo-Lopez Y & Galligan JJ. (2002). Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 889-897.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de experimentos que se han realizado.
- Utilizar antagonistas (p.ej. hexametonio, atropina) y agonistas (p.e. carbacol, nicotina, etc.) específicos para diferenciar los efectos mediados por receptores nicotínicos y muscarínicos.
- Usar bloqueadores de la contracción dirigidos al aparato contráctil (p.ej. latrunculina B, citocalasina D y ML-9) para observar el efecto directo de la melatonina sobre los nervios aferentes.
- Continuar con los experimentos de registro intracelular en músculo; para investigar el efecto de la melatonina sin nifedipina, el papel de los nervios en los efectos de la melatonina sobre el músculo liso usado bloqueadores de la actividad neuronal (tetrodotoxina).
- Probar el efecto de la melatonina mediante la técnica de Patch clamp, en cultivos primarios de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal y en neuronas mientéricas de yeyuno de ratón.
- Medir la actividad inducida por la distensión intraluminal del intestino, mediante el uso del equipo actualmente adquirido que consta de una bomba de perfusión programable (AL-1000), que permite la perfusión intraluminal constante de solución de Krebs a través del segmento de intestino o una distensión periódica cuando se cierra la válvula de paso (Fig. sup. 11). La presión intraluminal es registrada por medio de un

amplificador de presión (NL 108, Digitimer) conectado al convertidor (Ibeakanma *et al.*, 2009). De esta manera podremos registrar los potenciales de acción de nervios aferentes que llevan información nociceptiva. Con este modelo de distensión podemos simular el dolor cólico que padecen algunas personas.

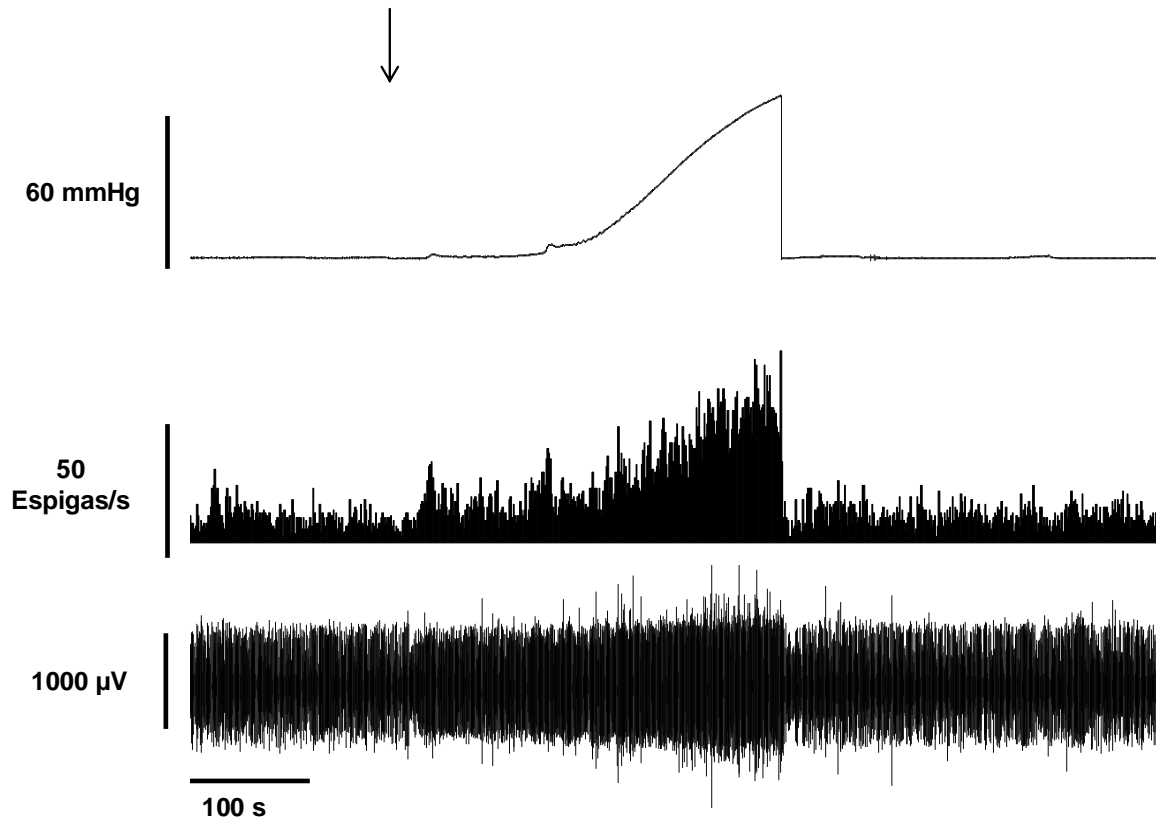


Figura 11. Imagen representativa de un registro de la actividad multiunitaria en el intestino de un cobayo en respuesta a una rampa de distensión intraluminal. La flecha indica el cierre de la válvula para que el líquido inicie la distensión intraluminal del segmento intestinal, la presión en aumento de este segmento se observa en el panel superior. En el panel intermedio se observa la frecuencia de disparo del nervio, es decir el número de espigas o potenciales de acción generados en un segundo. En el panel inferior se observa el incremento de la frecuencia o amplitud de los potenciales de acción al incrementar la presión.