

Aplicación de la teoría de receptores al efecto inhibitor de melatonina en tejido uterino de rata

ARTURO G. RILLO* ALBERTO HARDY PÉREZ** Y LIZETH VEGA-MON DRAGÓN ***

Receptors theory application usage of the inhibitory effect of melatonin in the rat's uterine tissue

Abstract. *Melatonin is secreted by the pineal gland. In vitro, this neurohormone inhibits muscular contraction of tracheobronchial, duodeno, ileo, colon and utero tissue. The inhibition effect on uterine tissue was analyzed on the Occupation Receptors Theory. Horn uterine of male wistar rat estrogenized were employed. The register of muscular contraction were realized with technical in vitro. The melatonin inhibition effect on spontaneous activity and contraction induced by carbachol were analyzed. Melatonin causes the diminution of spontaneous activity and right displaced the dose-response curves of carbachol. The pharmacological analyses with receptors theory shows that inhibitor effect is not pharmacologically antagonistic. Melatonin causes the diminution of efficacy and intrinsic activity of carbachol. This study suggests what action mechanic is physiologically antagonistic.*

Introducción

La glándula pineal está presente en gran número de vertebrados y participa en la regulación funcional de órganos endocrinos y procesos conductuales sobre los que influyen variaciones foto-periódicas (Axeirod, 1974). En mamíferos, es un

órgano endocrino que forma parte del sistema de células APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*) (Reiter, 1980).

De los Índoles pineales, la melatonina (MEL) es la hormona más ampliamente estudiada; es sintetizada y secretada conforme a un patrón circádico regulado por el ciclo luz-oscuridad. La glándula pineal no es la única fuente endógena de MEL en vertebrados, pues también se ha descrito su síntesis en glándula harderiana, retina y tracto intestinal (Cardinali, 1972; Bubenick, 1980).

La MEL participa en múltiples funciones, entre las que se encuentran la regulación de la liberación de factores hipotalámicos, actividad locomotora, temperatura corporal, mecanismos carcinogénicos e inmunológicos, depresión, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Foley, 1981). Sin embargo, la importancia de su estudio radica en la asignación de un papel específico en la coordinación y regulación de la reproducción, donde se ha descrito un efecto antigonadotrófico, principalmente en especies con reproducción estacional (Cardinali, 1981), aun cuando el mecanismo de

* *Coordinación General de Investigación y Estudios Avanzados, Universidad Autónoma del Estado de México. Av. Instituto Literario No. 100 Ote., Toluca, Méx., C. P. 50000.*

** *Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.*

*** *Alumno de 4º Año, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.*

acción de esta hormona no ha sido discernido por completo (Rillo y Bermúdez-López, 1992).

En humanos, las variaciones en la concentración de MEL han sido asociadas con el inicio de la pubertad, el embarazo, desarrollo fetal y trabajo de parto (Enrenkranz *et. al.*, 1982; Waldhauser *et. al.*, 1984; Mitchell *et. al.*, 1979).

Se ha propuesto que el sitio de acción de la MEL para regular las funciones reproductoras es el hipotálamo, mediante la inhibición de la liberación de factores que estimulan la liberación de hormonas gonadotróficas (GnH) (Vanecek, *et. al.*, 1987).

Estudios realizados por Zisapel y Laudon (1982) revelan que la MEL ejerce un efecto local que inhibe la liberación de dopamina dependiente de la concentración de calcio. Por otra parte, Dubocovich (1988) ha reportado que la MEL inhibe la liberación de dopamina en retina; en tanto que Bubenick y Dhanvantari (1989) han descrito que a nivel periférico, disminuye la motilidad intestinal. Además, también se ha observado un incremento en la concentración de MEL en líquido folicular, con posibles implicaciones fisiológicas en la reproducción (Ronberg *et. al.*, 1990). Estos estudios, entre otros, ponen de manifiesto que el sitio de acción de la MEL no es exclusivamente el Sistema Nervioso Central (SNC).

Desde 1965 se describió el efecto inhibitorio de MEL en la contracción del tejido uterino (Hertz-Eshel y Rahamimoff, 1965; Davis *et. al.*, 1971). Posteriormente se encontró una disminución del tono y la amplitud de la contracción del músculo liso traqueobronquial de perros (Bruderman y

Rahamimoff, 1967), así como en duodeno (Bubenick y Dhavantari, 1989), estómago (Fioretti *et. al.*, 1972), intestino delgado y grueso de rata (Quastel y Rahamimoff 1965, Harlow y Weekley, 1986). Sin embargo, se desconoce el papel fisiológico que pudiera tener esta neurohormona sobre los tejidos de musculatura lisa o en otros tejidos y el mecanismo por el cual ejerce este efecto.

Con el empleo de técnicas inmunoquímicas, autorradiográficas y estudios de unión *in vitro*, se han identificado sitios de unión a MEL en diversos tejidos, entre los que se encuentra el tejido uterino de rata, ratón y humano gestante (Stankov y Reiter, 1990). Aunque los resultados de múltiples estudios puntualizan la asociación de la MEL con un sitio específico como prerrequisito para ejercer su efecto, existen algunas incongruencias difíciles de explicar, por lo que muchos autores refieren que la MEL produce dos tipos de efectos: los fisiológicos y los farmacológicos.

Debido a que la MEL provoca una reducción en la actividad eléctrica de las células del hipotálamo anterior y lateral, y disminuye la contracción espontánea del intestino y de otros tejidos con musculatura lisa, se apoya la hipótesis de que esta neurohormona ejerce una acción moduladora de tipo depresor e inhibitorio sobre la excitabilidad celular.

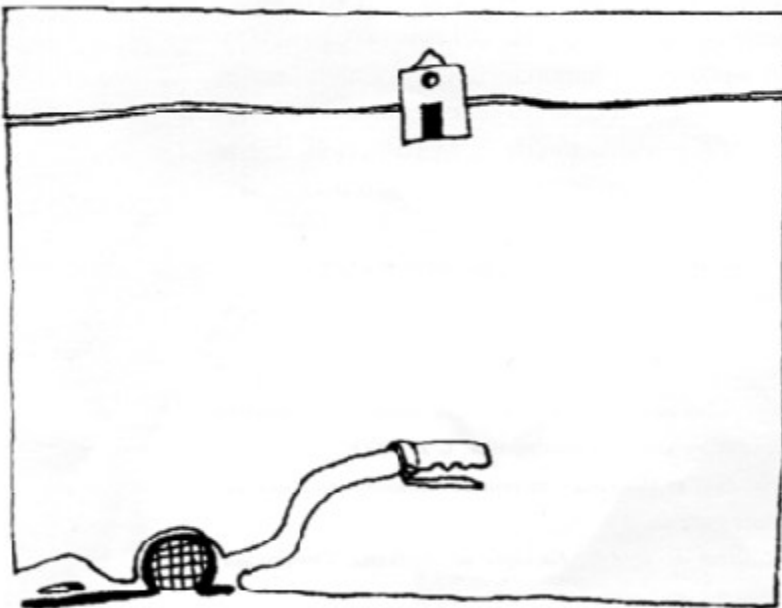
Bajo este contexto, el análisis farmacológico del efecto de la MEL, a través de la teoría de receptores, puede sugerir nuevos caminos para la búsqueda de su mecanismo de acción, motivo por el cual se realizó el presente estudio.

I. Material y métodos

El trabajo se desarrolló en dos fases: una experimental y otra teórica. En la primera, se analizó el efecto de la MEL sobre la actividad muscular espontánea y la contracción provocada por carbacol en tejido uterino, mediante la técnica *in vitro* de órgano aislado. La fase teórica consistió en aplicar los elementos matemáticos de la teoría de receptores a los resultados experimentales obtenidos.

a) Registro de contracción uterina

El tejido se obtuvo de 24 ratas de la cepa wistar, de 180-220 g de peso corporal, pretratadas con dietilestilbestrol (100 ug/vía subcutánea) 24 horas antes del sacrificio. Ambos cuernos uterinos fueron seccionados en anillos de dos centímetros de longitud, seleccionándose el segmento proximal a la línea media para el registro de la contracción uterina. Un extremo de dicho segmento se sujetó al piso de una cámara de 20 ml para órgano aislado. El



otro extremo se sujetó a un transductor de fuerza isométrica (Grass, FT05C) conectado a un preamplificador de corriente monofásica (Grass 7P1F) integrado a un polígrafo (Grass RSP7C8).

El segmento de tejido uterino permaneció entre 45 y 60 min en solución Ringer-Krebs-Henseleit (composición en mM: 4.6 de KCl, 119 de NaCl, 1.5 de CaCl_2 , 1.2 MgSO_4 , 1.2 de KH_2PO_4 , 11.1 de D-(+)-glucosa, pH de 7.4 y 37°C); con una tensión basal de 1 g. Fue burbujeadada con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. La calibración correspondió a 1 cm por cada gramo de fuerza de contracción. Los registros fueron en paralelo y la velocidad del papel de registro de 5 mm/min.

La actividad muscular espontánea basal se registró durante 10 min. Posteriormente se agregaron nueve concentraciones diferentes de MEL (de 10-9 a 0.1 M/ml de solución), registrándose la actividad muscular durante diez minutos después de la adición de cada concentración de MEL.

La contracción inducida por carbacol se realizó mediante la administración no acumulativa de diversas concentraciones en un rango de 6×10^{-6} a 10^5 M/ml de solución. En cada caso, la contracción muscular fue registrada durante cinco minutos posteriores a la adición de cada una de las concentraciones al baño del tejido. Para analizar el efecto de la MEL, se administró 10^{-6} M de MEL, la cual se incubó durante diez minutos previamente a la administración de cada una de las concentraciones de carbacol.

MEL y carbacol se administraron en volúmenes de 0.1 ml/10 ml de solución del baño. Todos los reactivos y fármacos fueron obtenidos de Sigma Co. LTD,

b) Análisis farmacológico

El análisis farmacológico consistió en aplicar los conceptos de la teoría de ocupación de receptores (clásica y modificada por Stephenson) (Ariens, 1964; Tallarida, 1979; Kenarkin, 1984), para lo cual se construyeron curvas logaritmo de la concentración - porcentaje de respuesta máxima (CDR) en cada uno de los 12 ensayos realizados con MEL y actividad espontánea, y 12 ensayos con MEL y carbacol. A partir de estas curvas, se obtuvo la concentración efectiva media (CE_{50}) de MEL y carbacol para producir el efecto estudiado.

La teoría clásica de ocupación del receptor postula que la respuesta obtenida es proporcional al número de receptores ocupados. En este caso, el 100% de la respuesta requiere que el fármaco se una al 100% de receptores, y para obtener el 50% de la respuesta, es necesario que ocupe el 50% del

total de receptores (Ariens, 1964; Tallarida, 1979). La expresión matemática que refleja este evento es:

$$y = (E M A X I I A)$$

Donde Y = respuesta; E_{max} = respuesta máxima; A = concentración del fármaco, y K = constante de disociación fármaco-receptor.

Al sustituir los datos experimentales en cada una de las variables respectivas, se obtienen los valores para construir una CDR teórica que refleja el comportamiento del evento estudiado, con base en el modelo de la teoría clásica de ocupación de Receptores. Este modelo sólo se aplicó al efecto de MEL en la actividad espontánea uterina.

La teoría de ocupación de receptores modificada por Stephenson postula que el efecto máximo producido por un fármaco se presenta sin ocupar el total de receptores. Propone dos componentes para analizar el efecto: uno que depende de la droga y otro del tejido, lo cual da origen al concepto de eficacia o actividad intrínseca definida como la capacidad del fármaco para producir un efecto (Tallarida, 1979).

La expresión matemática que refleja la participación del fármaco en la respuesta es:

Donde Ea = eficacia del fármaco; CE_{50} = concentración efectiva media, y Ka = constante de disociación fármaco-receptor.

El valor de la CE_{50} se obtiene de la CDR. Para calcular la Ka , se graficaron los inversos de la concentración de carbacol (sin MEL y con MEL) que produce 10%, 20%, 30%, ..., 90% de la respuesta. El valor de la pendiente y el intercepto en Y se calculan mediante regresión lineal y son sustituidos en la expresión:

Para cuantificar la participación del tejido en la respuesta inducida por carbacol y su relación con MEL, se calculó el "estímulo" (S) para la respuesta obtenida, mediante la siguiente expresión matemática:

Donde S = estímulo, Ea = eficacia del fármaco, A = concentración del fármaco y Ka = constante de disociación fármaco-receptor.

Los valores de S_{se} calcularon para cada concentración de carbacol en todas las CDR. Posteriormente, se granearon mediante la relación S vs R/R_{max} % ([respuesta / respuesta máxima] x 100).

c) Análisis estadístico.

A los resultados experimentales y los valores obtenidos al aplicar las ecuaciones anteriores, se aplicaron diversas pruebas estadísticas, paramétricas y no paramétricas, según el caso.

Inicialmente, se aplicó la prueba χ^2 de Bartlett para determinar la homogeneidad de varianzas entre los valores obtenidos en cada dosis de MEL (experimental y teóricos) o de carbacol (en ausencia o presencia de MEL). Si las varianzas eran homogéneas se procedía a emplear la prueba t de Student para muestras pareadas; si las varianzas eran heterogéneas, se aplicaba la prueba de Wilcoxon.

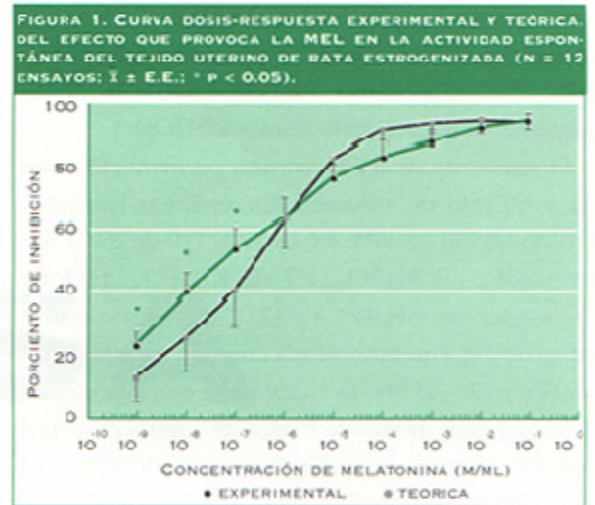
El análisis de covarianza se aplicó para comparar el comportamiento de la curva experimental con respecto a la teórica en el primer tipo de experimentos, y entre la CDR en ausencia y presencia de MEL en el segundo grupo de experimentos. La prueba de Kmskall Wallis fue empleada debido a la amplia variación experimental entre las familias de CDR que se observó. El empleo de estas pruebas estadísticas fue con el fin de comparar el comportamiento global de cada una de las CDR obtenidas experimental o teóricamente entre sí, según el caso; sin embargo, ningún valor fue estadísticamente significativo (Castilla-Serna y Cravioto, 1991).

II. Resultados

Para analizar la acción inhibitoria de la MEL en tejido uterino, se realizaron dos experimentos diferentes en preparaciones farmacológicas. En el

TABLA 1		
VALOR DE LA CE_{50} DE MELATONINA EN CADA UNO DE LOS ENSAYOS REALIZADOS		
NO. DE CURVA	CE_{50} EXPERIMENTAL	CE_{50} TEÓRICA
1	1.1872×10^7	2.0360×10^7
2	1.8556×10^8	1.1492×10^8
3	2.5018×10^{10}	2.3466×10^{10}
4	4.9306×10^7	4.3195×10^7
5	7.9663×10^6	1.1525×10^6
6	9.9875×10^8	1.2739×10^8
7	3.4682×10^7	4.5551×10^7
8	3.2404×10^7	1.0037×10^6
9	8.6339×10^7	8.9944×10^7
10	7.9382×10^{10}	3.1819×10^{10}
11	6.7952×10^8	8.7828×10^8
12	3.4498×10^6	3.3703×10^6

CE_{50} = CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA.



primero se evaluó el efecto de la MEL sobre la actividad muscular espontánea del tejido uterino, observándose que ésta disminuye progresivamente conforme se incrementa la concentración de MEL, lo cual sugiere un efecto farmacológico dependiente de la concentración.

A partir de estos resultados experimentales, se calculó la CE_{50} de MEL para provocar este efecto (tabla 1), obteniéndose un valor de $2.7443 \times 10^{-6} \pm 1.58$ M/ml de solución ($n = 12$ ensayos).

Partiendo del supuesto teórico de que la CE_{50} corresponde al valor de K , pues representa el complejo MEL-sitio de unión, en cada una de las CDR experimentales se aplicó la Teoría Clásica de Ocupación del Receptor. Al sustituir los valores experimentales en la ecuación (a), se obtuvieron los datos para construir las CDR teóricas. El promedio de la CE_{50} de estas curvas fue de $1.9705 \times 10^{-5} \pm 1.29$ M/ml ($n = 12$ curvas). La diferencia entre la CE_{50} experimental y teórica no fue estadísticamente significativa mediante la prueba de Wilcoxon (tabla 1).

En la figura 1, se representa la CDR experimental y teórica. Puede observarse que el efecto experimental de la MEL difiere estadísticamente del calculado teóricamente a las concentraciones de 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M/ml de solución ($p < 0.05$ mediante la prueba *t* de Student pareada). Aun cuando el análisis de covarianza no revela diferencias significativas entre ambas curvas ($p > 0.05$), se aprecia que la CDR teórica no se ajusta a la CDR experimental. En este punto, es importante destacar que a bajas concentraciones, el efecto experimental está por arriba del efecto teórico esperado (*t* de Student para muestras pareadas $p < 0.05$), mientras que a dosis elevadas, la diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), lo que implica que en estas concentraciones el efecto experimental y el teórico son estadísticamente iguales.

FIGURA 2. CURVA DOSES-RESPUESTA DEL EFECTO PROVOCADO POR CARBACOL EN TEJIDO UTERINO DE RATA ESTROGENIZADA, EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MEL A LA CONCENTRACIÓN DE 10^{-6} M/ML DE SOLUCIÓN (N = 12 ENSAYOS; $\bar{x} \pm E.E.$; * $P < 0.05$)

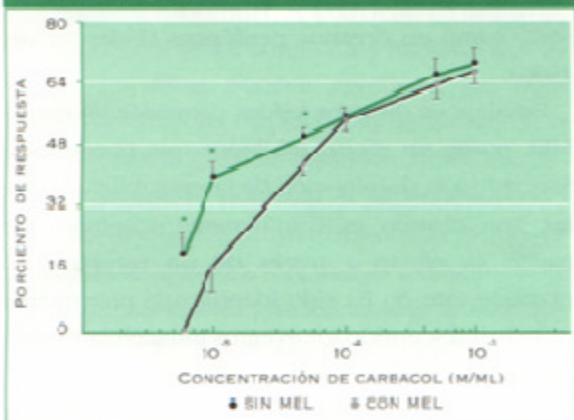
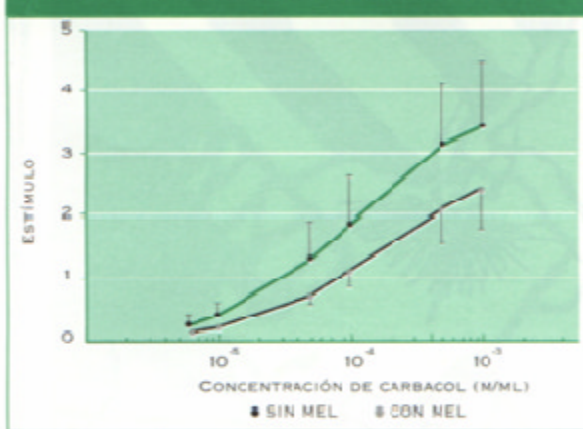


FIGURA 3. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CARBACOL EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MEL (10^{-6} M/ML DE SOLUCIÓN) Y EL ESTÍMULO PRODUCIDO (N=12 ENSAYOS; $\bar{x} \pm E.E.$)

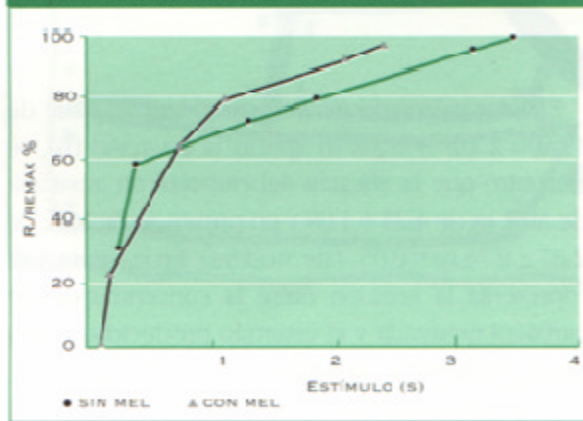


En el segundo tipo de experimentos se analiza el efecto de MEL en la contracción uterina producida por carbacol. En este caso la contracción muscular oscila en un rango de $19.84 \pm 5.55\%$ al $68.52 \pm 3.74\%$ de la contracción máxima del tejido. En presencia de MEL (10^{-6} M/ml de solución), la CDR al carbacol se desplaza hacia la derecha, lo que se interpreta como un efecto inhibidor de la MEL a la respuesta inducida por carbacol (figura 2). La CE_{50} calculada para el carbacol en ausencia de MEL fue de 2.1937×10^{-4} M/ml de solución y en presencia de MEL de 2.3045×10^{-5} M/ml de solución ($p > 0.05$) ($n = 12$ ensayos) (tabla 2).

Ambas curvas no difieren significativamente ($p > 0.05$) al ser comparadas por análisis de covarianza; pero la disminución de la contracción en las concentraciones de carbacol de 6×10^{-6} , 10^{-5} y 5×10^{-5} M en presencia y ausencia de MEL son significativamente diferentes ($p < 0.05$, /de Student pareada).

Para aplicar la teoría modificada por Stephenson, se calculó (por el método de mínimos cuadrados)

FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA RELACIÓN ESTÍMULO-RESPUESTA DEL EFECTO PROVOCADO POR CARBACOL EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MEL (10^{-6} M/ML DE SOLUCIÓN) EN TEJIDO UTERINO DE RATA ESTROGENIZADA (CADA VALOR REPRESENTA EL PROMEDIO DE 12 ENSAYOS)



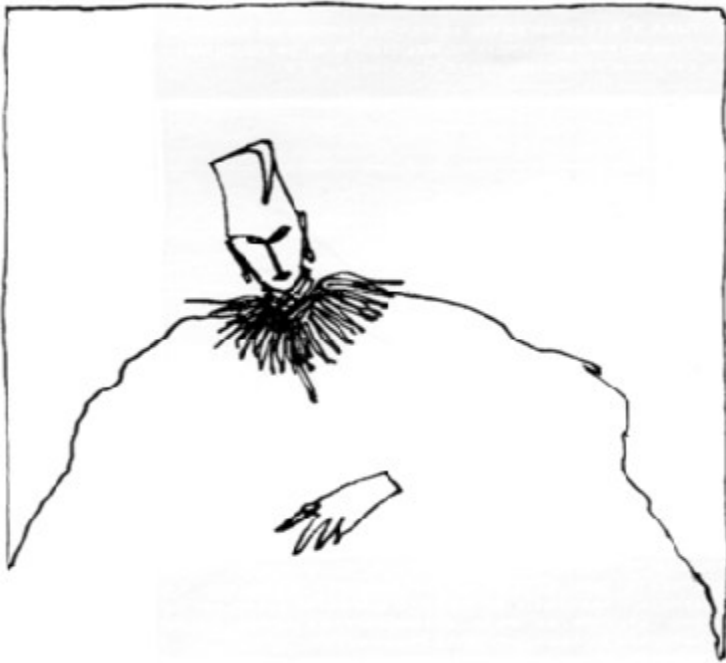
la concentración de carbacol a la que produce la misma respuesta (10%, 20%, 30%, ... 90%) en ausencia y presencia de melatonina. Con estos valores, se aplica la ecuación (c) y se obtiene la constante de disociación del complejo fármaco-receptor (K_a).

TABLA 2

VALORES CALCULADOS A PARTIR DEL EFECTO PROVOCADO POR CARBACOL EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MELATONINA (10^{-6} M)

CURVA	K_a	EN AUSENCIA DE MELATONINA		EN PRESENCIA DE MELATONINA	
		CE_{50}	E_1	CE_{50}	E_1
1	2.2221×10^{-4}	7.0665×10^{-5}	4.1357	1.7500×10^{-4}	2.2698
2	1.4580×10^{-4}	4.3309×10^{-4}	1.3367	4.3002×10^{-4}	10.0584
3	2.6095×10^{-4}	1.2106×10^{-4}	3.1515	2.2759×10^{-4}	2.1466
4	4.4791×10^{-4}	6.6189×10^{-5}	6.1968	1.0072×10^{-4}	5.4471
5	5.5435×10^{-5}	4.8089×10^{-5}	2.1528	7.1725×10^{-5}	1.7729
6	1.2186×10^{-4}	7.9772×10^{-4}	1.1528	7.0272×10^{-4}	1.7341
7	9.5506×10^{-5}	1.2788×10^{-4}	1.7468	2.1601×10^{-4}	1.4421
8	3.7858×10^{-4}	7.7222×10^{-5}	5.9025	1.5518×10^{-4}	3.4396
9	2.6758×10^{-4}	5.9183×10^{-5}	1.4521	7.6508×10^{-5}	1.3497
10	1.5583×10^{-4}	7.9119×10^{-4}	1.1970	4.2523×10^{-4}	1.3665
11	8.3990×10^{-5}	1.6625×10^{-5}	6.0520	1.2967×10^{-4}	1.6477
12	4.2278×10^{-5}	3.2807×10^{-6}	13.8869	5.5018×10^{-5}	1.7684

K_a = CONSTANTE DE ASOCIACIÓN.
 CE_{50} = CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA.
 E_1 = EFICACIA DEL CARBACOL.



El valor calculado de Ka para el carbacol fue de $1.6976 \times 10^{-4} \pm 0.39$. Al aplicar la ecuación (b), se encontró que la eficacia del carbacol en ausencia de MEL es de 4.24 ± 1.09 y en presencia de MEL de 2.87 ± 0.74 ($p < 0.05$, t de Student). En la figura 3 se representa la relación entre la concentración de carbacol ensayada y el estímulo producido. Como puede observarse, la presencia de MEL disminuye la proporción del estímulo que produce el carbacol en el tejido, siendo más evidente a nivel de las concentraciones superiores a 10^{-4} M/ml de solución de carbacol.

Los valores calculados de S fueron sustituidos en la ecuación (d) y se obtuvieron los datos para obtener la figura 4, que relaciona S con R/R_{max} %. Puede observarse que el estímulo provocado por carbacol en ausencia de MEL es prácticamente lineal (a excepción de la concentración de 6×10^{-6} M/ml de solución). Los valores de la recta obtenidos mediante el análisis de correlación de Pearson indicó que el valor de r era de 0.9342; la pendiente, de 17.6887, y el intercepto en Y , de 41.35. Mientras que en el estímulo y la proporción de respuesta del carbacol en presencia de MEL poseen un comportamiento gráficamente no lineal, y se caracteriza por un valor de r de 0.9114, una pendiente de 37.29 y un intercepto en Y de 16.81.

III. Discusión

La MEL posee un efecto farmacológico de tipo inhibitorio en el SNC, así como en el aparato reproductor de diversas especies, específicamente en el desarrollo y maduración de los órganos gonadales,

mediante la inhibición de la liberación de hormona luteinizante (Cardinali, 1972); sin embargo, este metoxi-indol parece actuar tanto a nivel del SNC, como en órganos periféricos (Foley, *et al.*, 1986).

Estudios en diversos tejidos coinciden en que la MEL posee un efecto inhibitorio que puede estar asociado a la disminución de la excitabilidad celular, aun cuando es comúnmente aceptado que ejerce su efecto a través de un receptor, no obstante éste no ha sido identificado plenamente ni se han discernido los eventos intracelulares subsecuentes (Stankov y Reiter, 1990).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la MEL disminuye la contracción espontánea, dependiendo de la concentración, tratándose de un efecto farmacológico (figura 1). Los rangos de inhibición concuerdan con los reportados previamente por otros autores (Hertz-Eshel y Rahamimoff, 1965; Davis *et al.*, 1971; Rillo *et al.*, 1991).

La CDR experimental y teórica del efecto de MEL sobre la actividad espontánea del tejido uterino no difieren estadísticamente; sin embargo, se observa que, en la forma de representar gráficamente el fenómeno, la CDR experimental no se ajusta a la CDR teórica, además de que la respuesta experimental de las concentraciones de 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M/ml de solución difieren estadísticamente de la respuesta teórica. Esto apoya que la MEL no ejerce su efecto siguiendo el esquema clásico de la unión a un receptor farmacológico clásico, sino que puede ser inespecífico sobre estructuras celulares tales como los canales de calcio (Zisapel y Laudon, 1983) o el citoesqueleto (Benitez-King *et al.*, 1990). La interacción con el citoesqueleto ha propiciado el estudio de la hipótesis de que la MEL pueda tener un efecto intracelular (uniéndose a proteínas intracelulares como calmodulina) (Benitez-King *et al.*, 1991). Por otra parte, los resultados sugieren que la MEL posee una mayor actividad intrínseca a concentraciones inferiores al rango micromolar ($p < 0.05$), mientras que a concentraciones superiores a este rango el efecto experimental es similar al teórico ($p > 0.05$), situación que ha sido expresada por diversos autores en estudios realizados en animal íntegro.

Sin embargo, en estudios *in vitro*, los efectos observados son debidos a concentraciones 100 o 1,000 veces mayores a las encontradas fisiológicamente, por lo que este modelo matemático no es aplicable del todo para la interpretación del efecto inducido por la MEL. Esta idea surge debido a que el efecto de la MEL no es directamente proporcional al número de receptores estimulados, o

bien, el efecto de MEL a este nivel puede no estar asociado a receptores sino a otros mecanismos intracelulares, como ha sido reportado experimentalmente (Benitez-King, *et. al.*, 1990).

En conclusión, podemos considerar que debido a los supuestos teóricos que fundamentan la teoría clásica de ocupación del receptor y al comportamiento experimental del efecto de la MEL, se requiere de un modelo teórico que permita considerar la participación del tejido en la respuesta provocada por la MEL.

Para analizar el efecto inhibitor de la MEL sobre la contracción inducida por carbacol según la teoría clásica modificada por Stephenson, partimos del supuesto de que la contracción muscular máxima provocada por carbacol, se obtiene por la ocupación de una fracción del total de receptores. En el presente estudio, la actividad muscular inducida por carbacol, también es inhibida por MEL a la concentración probada.

La CE_{50} de carbacol en ausencia de MEL es menor que la CE_{50} de carbacol en presencia de MEL, pero no difiere significativamente, debido probablemente a la variabilidad observada durante el estudio, además de emplearse la CE_{50} de la MEL. La eficacia del carbacol disminuye en un tercio en presencia de MEL, además de que en la figura 2 se aprecia que a concentraciones menores a 5×10^{-5} M/ml de solución el efecto de MEL es mayor; perdiéndose este efecto a concentraciones de carbacol superiores. Este evento permite pensar que la MEL provoca un efecto de tal magnitud que va desapareciendo conforme se incrementa el número de receptores a carbacol ocupados; sin embargo, el comportamiento del estímulo presentado en la figura 4 permite pensar que la disminución de la contracción provocada por carbacol no es mediada por un antagonismo farmacológico, pues de ser así, la curva correspondiente a carbacol con MEL presentaría un comportamiento casi lineal, como se puede apreciar en la curva de carbacol sin MEL.

Estos resultados sugieren que la MEL modifica el efecto del carbacol, probablemente a través de un antagonismo fisiológico, y no necesariamente a un antagonismo (competitivo o no) de tipo farmacológico a nivel de receptor.

El análisis farmacológico realizado permitió diferenciar la participación del tejido. En este caso, puede observarse nuevamente en la figura 4 que la MEL disminuye la relación existente entre el estímulo y la respuesta del tejido. Ambas curvas en este caso, difieren en el valor de su pendiente alrededor de un 50% y casi duplicando la diferen-

cia en el intercepto en Y, en tanto que el coeficiente de correlación difiere en un valor de 0.02, lo que indica que no se trata de curvas paralelas.

Si el estímulo es directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados y representa el componente del efecto que depende del tejido en la relación fármaco-efecto, la disminución del estímulo refleja que la acción de la MEL está asociada a mecanismos que no afectan directamente el mecanismo de acción del carbacol, sino la capacidad del tejido para responder a este fármaco. Pero al igual que en el caso de la contracción espontánea uterina, y de la CDR del carbacol, el efecto atribuido a la MEL se presenta a bajas concentraciones.

El hecho de que la actividad muscular espontánea del tejido uterino está regulada por corrientes de calcio (Bolton, 1979), mientras que la contracción inducida por carbacol implica principalmente cambios en la corriente iónica de sodio e inhibición de AMPc además de un componente de participación de corrientes de calcio dependiente de voltaje (Huszar y Roberts, 1982); destaca la conducta inhibitor de la MEL, apoyando la idea de que esta neurohormona actúa de manera inespecífica, por lo que puede sugerirse que el mecanismo de acción para la producción del efecto inhibitor observado esté relacionado con cambios en la excitabilidad celular que regulen los flujos de calcio, ya sea mediante el bloqueo de canales de calcio o la formación de complejos calmodulina-melatonina (Rillo y Bemúdez-López, 1992).

Finalmente, el desarrollo de este trabajo y los resultados reportados en él, permiten sugerir el estudio del efecto de MEL en la contracción provocada



por calcio, y poder aplicar, en este tipo de experimentos, los conceptos del modelo de la teoría de la velocidad de ocupación del receptor, lo que pudiera

proporcionar nuevos elementos para una interpretación y distinción de los efectos tanto farmacológicos como fisiológicos que produce la MEL. •

BIBLIOGRAFÍA

- Ariens, E. J. (1964). *Molecular pharmacology*. Vol. 1, Academic Press, New York.
- Axelrod, J. (1974). "The pineal gland; a neurochemical transducer", en *Science*. Vol. 84, pp.341-1348.
- Benitez-King, G.; Huerto-Delgadillo, L.; Anton-Tay, F. (1990). "Melatonin effects on the cito.skeletal organization of MPCK and neuroblastoma N1E-115 cells", en *Pineal Res*. Vol. 9, pp. 209-220.
- Benitez-King G.; Huerto-Delgadillo, L. Anton-Tay, F. (1991). "Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro", en *Brain Res*. Vol. 557, pp. 289-292.
- Bolton, T. B. (1979). "Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle", en *Physiol Rev*. Vol. 59, pp. 606-718.
- Bruderman, I.; Rahamimoff, R. (1967). "Alterations in tracheobronchial smooth muscle activity following melatonin", en *J. Appl Physiol*. Vol. 23, pp. 938-943.
- Buhenik, G. A. (1980). "Localization of melatonin in the digestive tract of the rat: effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy", en *Horm Res*. Vol. 12, pp. 313-323.
- Buhenik, G. A.; Dhavantari, S. (1989). "Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity", en *J. Pineal Res*. Vol. 7, pp. 333-344.
- Cardinali, D. P. (1981). "Melatonin: a mammalian pineal hormone", en *Endocr Rev*. Vol. 2, pp. 327-354.
- Cardinali, D. P.; Wurtman, R.J. (1972). "Hydroxyindole-O-methyl-transferases in rat pineal, retina and hardierian gland", en *Endocrinology*. Vol. 91, pp. 247-252.
- Castilla-Serna, L.; Cravioto, J. (1991). *Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud*. Trillas. México.
- Oavis, R. H.; McGowan, L.; Uroskie, T.W. (1971). "Inhibition of pitocin induced contractility by melatonin", en *Proc Soc Exp Biol Med*. Vol. 138, pp. 1002-1004.
- Dubocovich, M. L. (1988). "Pharmacology and function of melatonin", en *FEBS Lett*. Vol. 2, pp. 2765-2773.
- Enrenkranz, J. R. L.; Tamarkin, L.; Comité, F.; Johnsonhaug, R. E.; Bybee, D. E.; Ioriaux, L.; Cotler, G. B. (1982). "Daily rhythm of plasma melatonin in normal and precocious puberty", en *J. Clin Metab*. Vol. 55, pp. 307-310.
- Fioretti, M. C.; Barzi, F.; Martini, L. (1972). "Affinity of melatonin for serotonin receptors in the isolated rat stomach in vitro". en *Rev Pharmacol Ther*. Vol. 3, pp. 383-391.
- Foley, P. B.; Cairucross, K. D.; Foldes, A. (1986). "Pinealindoles: significance and measurement", en *Neurosci Behaviour Rev*. Vol. 10, pp. 273-293.
- Harlow, H.J.;Weekley,B. I.. (1986). "Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine", en *Pineal Res*. Vol. 3, pp. 277-284.
- Hertz-Eshel, M.; Rahamimoff, R. (1965). "Effect of melatonin on uterine contractility", en *Lije Sci*. Vol. 4. pp. 1367-1372.
- Huszar, G.; Roberts, J. M. (1982). "Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels", en *Am J Obstet Gynecol*. Vol. 142, pp. 225-237.
- Kenarkin, T. P. (1984). "The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues", en *Pharmacol Rev*. Vol. 36, pp. 165-222.
- Mitchell, M. D.; Bibby, J. G.; Sayers, L.; Anderson, A. B. M.; Turnbull, A.C.(1979). "Melatonin in the maternal and umbilical circulations during human parturition". en *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 86, pp. 26-31.
- Quastel, M. R.; Rahamimoff, R. (1965). "Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenal", en *Brits J Pharmacol*. Vol. 24, pp. 455-461.
- Reiter. R.). (1980). *The pineal*. Vol. 5. Edén Press Incorporated.
- Rillo, A. G.; Bermudez-López. C. (1992). "Mecanismo de acción de melatonina", en *Acta Médica*. Vol. 28. pp. 49-53
- Rillo. A. G.; Perusquia, M.; Reyes-Vázquez, C. (1991). "Efecto inhibidor de la melatonina sobre la contracción de músculo liso uterino de rata", en *Rev. Pac. Med. UNAM*. Vol. 34. pp. 113.
- Ronnberg, L.; Kauppila, A.; Leppaluoto, J.; Martikainen, H.; Vakkuri, O. (1990). "Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration", en *J. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 71. pp. 493-496.
- Stankov, B.; Reiter, R. J. (1990). "Melatonin receptors: current status, facts and hypotheses", en *Lije Sci*. Vol. 46, pp. 971-982.
- Tallaricla. R.J.; Jacob, L. S. (1979). *The dose-response relation in pharmacology*. Springer-Verlag Ed.
- Vanecek, J.; Paulik, A.; Illnerova. H. (1987). "Hypothalamic melatonin receptors sites revealed by autoradiography", en *Brain Res*. Vol. 435, pp. 359-362.
- Waldhauser. F.; Frisch, H.; Waldhauser, M.; Weissenbacher, G.; Zeithuber, U.; Wurtman, R. (1984). "Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence", en *Lancet*. Vol. 8372, pp. 362-365.
- Zisapel, N.; Laudon, M. (1982). "Dopamine release induced by electrical field stimulation of rat hypothalamus in vitro: inhibition by melatonin", en *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 104, pp. 1610-1616.
- Zisapel. N.; Laudon, M. (1983). "Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry", en *Brain Res*. Vol. 272, pp. 378-381