



**UNIVERSIDAD NACIONALAUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Alteraciones funcionales del íleon aislado de
cobayo inducidas por diferentes concentraciones
de oxígeno, en ausencia y presencia de glucosa”.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANA ISABEL ALVARADO GALLARDO

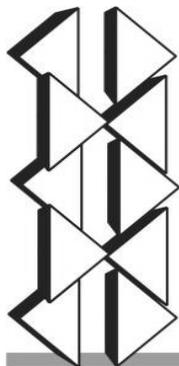
D I R E C T O R A :

DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

A S E S O R A I N T E R N A :

M. EN C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

México, Diciembre 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Biól. Evangelina López Nieto
VOCAL: Dra. Rosa Ventura Martínez
SECRETARIO: M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara
1er. SUPLENTE: Q.F.B. Ma. Elena Flores Ponce
2º SUPLENTE: Q.F.B. Jacqueline González Cervantes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS, DEPTO. DE FARMACOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

ASESOR DEL TEMA:
Dra. Rosa Ventura Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO:
Oscar RAMÍREZ GARCÍA

SUSTENTANTE:
Ana Isabel Alvarado Gallardo

AGRADECIMIENTO POR LA BECA OTORGADA

Investigación realizada gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM.**

Clave del proyecto: IN201713

Nombre del proyecto: Estudio del efecto neuroprotector de extractos de *Annona diversifolia saff* y *Tilia americana* variedad *mexicana* en la isquemia neuronal inducida en el modelo de íleon de cobayo.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido llegar a este momento y hacerme saber que siempre estuvo presente, incluso en las adversidades del camino y principalmente por ponerme pruebas fuertes para darme cuenta de mi capacidad.

A la máxima casa de estudios la UNAM por darme la oportunidad de educarme en sus aulas, no solamente para lo laboral, sino para la vida a través de la FES Zaragoza. Adquiero desde ahora el compromiso de retribuirle profesionalmente a mi amada universidad lo que me ha brindado. Gracias, porque en esta institución he pasado los mejores años de mi vida, en lo personal y educativo.

A la Facultad de Medicina de la UNAM por haberme adoptado y dado la oportunidad de incorporarme al área de la investigación realizando este trabajo que me dio muchas satisfacciones, entre ellas la oportunidad de conocer desde otra perspectiva el ámbito y trabajo de la ciencia, de abrirme la ventana hacia un mundo de conocimiento jamás imaginado y por permitirme conocer personas muy especiales e importantes en esta etapa de mi vida.

A la Dra. Rosa Ventura Martínez, quién hizo posible toda esta labor, primero por darme la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo, por su ayuda y asesoría a cada paso de este proyecto, pero sobre todo por su apoyo, empatía, su preocupación y enorme paciencia para conmigo, por sus regañones acompañados de un gran consejo y lecciones de vida, jamás voy a olvidar sus palabras pero sobre todo su apoyo, es ella una gran persona. Gracias de todo corazón.....

A mi colega la Dra. Guadalupe Esther Ángeles, por su asesoría y apoyo en mi trabajo, por ser una compañera, cómplice y amiga en muchas anécdotas del laboratorio. Gracias Lupita por enseñarme que nada en este mundo es imposible cuando te lo propones. Te deseo éxito en tu carrera de todo corazón aunque creo que está de más.

Al señor Oscar Ramírez García laboratorista, por su ayuda técnica, por sus preguntas, peripecias y experiencias compartidas durante el trabajo; gracias por enseñarme a nunca quedarnos con dudas sobre las cosas y a ser lo suficientemente humildes para acercarnos a las personas que pueden resolverlas. Le deseo lo mejor a usted y su familia.

A todos los compañeros que fueron y vinieron en el laboratorio por su ayuda, sus risas, su trabajo y sus buenos deseos hacia mí, entre ellos Adrián, Cecy, Dany, Maggy, Betsa, Ale, Beto, Nancy y la pequeña Nisa, de igual manera agradezco al doctor Jacinto por aportarme conocimiento y resolverme varias dudas.

A la profesora Griselda Fuentes por su apoyo y ayuda en mi trabajo, por dedicarme una parte de su valioso tiempo para preparar la etapa final de este proyecto, a su vez agradezco al resto de mis sinodales las profesoras Jacqueline, Evangelina y Ma. Elena, por su tiempo y apoyo para este último tramo del camino.

A mi padre, a quién le debo principalmente la vida, la oportunidad de estudiar una carrera y el llegar hasta aquí, gracias papá por tu apoyo, tus consejos acertados, tus palabras de aliento cuando caí muchas veces, pero sobre todo por tu ejemplo de trabajo, por enseñarme que las cosas difíciles son las que valen la pena y que solo con el trabajo y el esfuerzo uno puede alcanzar lo que se propone, gracias por el amor y la confianza que me diste toda mi vida. Te amo

A mi hermano, quién muchas veces me levanto el ánimo y me escuchó pero sobre todo por creer en mí, considerarme un ejemplo y alguien especial en su vida. ¡Gracias latoso!

A mis tíos y familiares, principalmente a mi tía Tere, Lupita y David, quienes me ayudaron y apoyaron en varias ocasiones durante este proceso.

A mis abuelitos: abuelito aunque ya no estés presente físicamente, yo sé que estás conmigo y con la familia, gracias por tus ánimos y tu cariño.

A Beto, quién ha sido mi compañero y amigo mucho antes de iniciar la carrera, quién ha recorrido este camino conmigo en las carencias, penas y logros, quién ha estado a mi lado en los momentos difíciles, en los momentos felices, quién ha compartido conmigo más de la mitad de nuestras vidas con experiencias, con buenos momentos, risas y recuerdos, quién me ha alentado, escuchado y dejado llorar sobre su hombro muchas veces, gracias por tu ayuda, pero sobre todo por el amor y paciencia que me has brindado. Te amo (siempre te quise, siempre te amé y siempre te amaré.).

A todas las personas que han estado conmigo en lo largo del camino y me han dado ayuda, un consejo y una palabra de aliento. A mis mejores amigas Mónica, Norma, Sara, Dyana y Aura con quienes crecí y siempre estuvieron presentes en mi vida, de igual manera al resto de mis amigos y amigas.

A mis compañeros de trabajo que me han dado un ejemplo de lucha y una palabra de apoyo y ánimo, de igual forma a muchas personas que he conocido a lo largo de toda mi vida y que la han marcado aportando su sabiduría, a todos ellos gracias....

A mi perrito Helpo y demás mascotas, quienes me reciben con gusto al llegar a casa y se desvelaron conmigo incontables veces junto a la computadora, quienes me vieron triste y feliz además de brindarme cariño y fidelidad.

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado”.....

Albert Szent-Györgi

“Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá”....

Julius Robert Oppenheimer

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa ”....

Mahatma Gandhi

“La muerte sólo tiene importancia en la medida en que nos hace reflexionar sobre el valor de la vida”.....

André Malraux

Me llamó mucho la atención al leer en varios trabajos de investigación los agradecimientos, todos suelen agradecer a su familia, maestros, amigos, instituciones; sin embargo no hay mención de aquellos seres que verdaderamente hacen posible la labor del investigador.... me refiero a todas aquellas especies animales incluidas el ser humano, quienes con su sacrificio y muerte ofrecen a otros la oportunidad de vivir.

Aprendí que la experimentación es muchas veces un mal necesario, debido a que aún no existe algo que pueda remplazar la perfección con la que funciona un organismo vivo. Considero que la vida es el regalo más grande que nos ha sido otorgado, por lo que quiero reconocer y dar mi más sincero agradecimiento a todas las especies animales en general, incluidas el ser humano y en particular a los cobayos pues sin ellos el trabajo de muchos investigadores incluido el de ésta servidora no sería posible.

Comparto una frase que me gustó mucho con el fin de que si este trabajo llega a manos de alguien, invitarle a tomar conciencia para tratar con respeto y ética a los animales.

UN HOMBRE NUEVO

Una nueva conciencia.....

Un hombre nuevo,

***tiene conciencia de la dignidad, el valor de la dignidad
para vivir, para trabajar, para devolver la dignidad a todos los géneros de vida;
que al igual que tú, que yo, existen y sienten....***

***Aún con su inefable inteligencia; sienten el maltrato, el hambre,
la sed, la angustia, el dolor, las manos del experimentador.***

***Gracias a esos seres, que sacrificados por la experimentación
dieron nuevos horizontes a la vida, viejas y nuevas generaciones
han visto alejar la muerte y el dolor.***

***Gracias reiteradamente a esas ratas, perros, gatos, simios
y demás “conejiillos de indias” que en aras de la ciencia, la enseñanza
o la investigación, mitigan la angustia, el dolor..... la agonía, del eterno sueño.***

Una nueva conciencia.....

Un hombre nuevo.

Antonio Duvalier

UNACH





CONTENIDO

ABREVIATURAS..... 3

ÍNDICE DE CUADROS 5

ÍNDICE DE FIGURAS 5

1. INTRODUCCIÓN: 7

2. MARCO TEÓRICO 8

 2.1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL 8

 2.1.1 DEFINICIÓN..... 8

 2.1.2 CLASIFICACIÓN 9

 2.1.3 SÍNTOMAS..... 12

 2.1.4 DIAGNÓSTICO 13

 2.1.5 TRATAMIENTO..... 13

 2.1.6 FACTORES DE RIESGO 14

 2.2. EVENTOS QUE SE PRESENTAN DURANTE LA ISQUEMIA..... 14

 2.2.1 EL NÚCLEO ISQUÉMICO Y LA PENUMBRA 14

 2.2.2 EVENTOS BIOQUÍMICOS 17

 2.2.2.1 LA CASCADA ISQUÉMICA 17

 2.2.2.2. LA HIPOXIA 20

 2.3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR EFECTO NEUROPROTECTOR 20

 2.3.1 MODELO DE ÍLEON DE COBAYO 22

 2.4. SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO 24

 2.4.1 TIPOS DE NEURONAS ENTÉRICAS 25

 2.4.2 CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO 28

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 30

4. HIPOTESIS 32

5. OBJETIVOS 32

 5.1 GENERAL..... 32

 5.2 PARTICULARES..... 32

6. DISEÑO EXPERIMENTAL..... 34



6.1 TIPO DE ESTUDIO	34
6.2 POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	34
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	34
6.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	34
6.5 VARIABLES A CONTROLAR.....	35
6.6 VARIABLE DE RESPUESTA	35
7. MATERIAL	35
7.1 BIOLÓGICO	35
7.2 MATERIALES	35
7.3 EQUIPO	36
7.4 INSTRUMENTOS.....	36
7.5 SUSTANCIAS	36
7.6 SOFTWARE.....	36
8. MÉTODO	37
8.1 PREPARACIÓN DEL TEJIDO.....	37
8.2 TEJIDOS SOMETIDOS A HIPOXIA	38
8.3 TEJIDOS SOMETIDOS A ISQUEMIA.	39
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
10. RESULTADOS	44
10.1 RESPUESTA CONTRÁCTIL DEL ÍLEON DE COBAYO SOMETIDO A DIFERENTES GRADOS DE HIPOXIA <i>IN VITRO</i>	44
10.2 RESPUESTA CONTRÁCTIL DEL ÍLEON DE COBAYO SOMETIDO A DIVERSAS CONDICIONES DE ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	49
11. DISCUSIÓN	56
12. CONCLUSIONES	63
13. PROPUESTAS	65
14. REFERENCIAS:.....	66



ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Accidente vascular cerebral
BaCl ₂	Cloruro de bario
Ca ⁺²	Ión calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DAG	Diacil glicerol
EE	Estimulo eléctrico
EVC	Enfermedad vascular cerebral
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GABA	Ácido gama aminobutírico
IP ₃	Inositol trifosfato
IPANs	Neuronas aferentes primarias intrínsecas
K ⁺	Ión potasio
KCl	Cloruro de potasio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MLCK	Cinasa de miosina de cadena corta
Na ⁺	Ión sodio
N ₂	Nitrógeno molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular



OMS	Organización Mundial de la Salud
IP ₂	Fosfatidilinositol difosfato
PLC	Fosfolipasa C
SNE	Sistema nervioso entérico
SNC	Sistema nervioso central



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Neurotransmisores y péptidos del SNE.	28
Cuadro 2. Comparación del efecto del estímulo químico y eléctrico en la respuesta contráctil del íleon de cobayo	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de EVC según su naturaleza.	9
Figura 2. Clasificación de la EVC.	10
Figura 3. Tipos de hemorragia cerebral	11
Figura 4. Núcleo y penumbra isquémica.....	16
Figura 5. Evolución temporal de la penumbra a núcleo isquémico.....	16
Figura 6. La cascada isquémica	19
Figura 7. Sistema nervioso entérico.	25
Figura 8. Tipos de neuronas en el sistema nervioso entérico.....	27
Figura 9. Contracción del músculo liso intestinal.	29
Figura 10. Diagrama de la metodología general.....	40
Figura 11. Diagrama de la metodología para inducir hipoxia.....	41
Figura 12. Diagrama de la metodología para inducir isquemia.....	42
Figura 13. Contracción inducida por estimulación eléctrica en tejidos hipóxicos.....	44



Figura 14. Contracción inducida por acetilcolina (ACh, 1×10^{-5} M) en tejidos hipóxicos45

Figura 15. Curva concentración respuesta de contracción expresada en gramos de tensión
de ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en tejidos hipóxicos.....46

Figura 16. Área Bajo la Curva (ABC) de la respuesta contráctil inducida por
ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en tejidos hipóxicos.....47

Figura 17. Contracción inducida por KCl (3.2×10^{-2} M) en tejidos hipóxicos48

Figura 18. Contracción inducida por BaCl₂ (1×10^{-2} M) en tejidos hipóxicos.....49

Figura 19. Contracción inducida por estimulación eléctrica en tejidos isquémicos.....50

Figura 20. Contracción inducida por ACh (1×10^{-5} M) en tejidos isquémicos.....51

Figura 21. Curva concentración respuesta de contracción expresada en gramos de tensión
de ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en tejidos isquémicos.....52

Figura 22. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M)
en tejidos isquémicos.....53

Figura 23. Contracción inducida por KCl (3.2×10^{-2} M) en tejidos isquémicos54

Figura 24. Contracción inducida por BaCl₂ (1×10^{-2} M) en tejidos isquémicos55



1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es un padecimiento que ocupa el tercer lugar en mortalidad a nivel mundial y el primero en producir discapacidad motora. Tomando en cuenta que el EVC de tipo isquémico es más común en la población que el de tipo hemorrágico, se han llevado a cabo estudios para obtener nuevos fármacos con efecto neuroprotector.

La búsqueda de una terapia neuroprotectora efectiva para la EVC sigue siendo un reto para investigadores y clínicos. La mejor herramienta de que disponemos actualmente para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral son los modelos experimentales, que nos permiten abordar de forma controlada el estudio de esta patología, que se caracteriza por su heterogeneidad y complejidad.

La información que se obtiene de los experimentos con modelo experimentales en animales ofrece una oportunidad en la terapéutica farmacológica de limitar la muerte y reducir el daño tisular así como la disfunción neuronal.

En la búsqueda de modelos experimentales para el desarrollo de fármacos neuroprotectores, recientemente se propuso el modelo de íleon de cobayo para el cernimiento farmacológico de compuestos con posible efecto neuroprotector, basándose principalmente en la presencia del Sistema Nervioso Entérico (SNE) en el íleon de cobayo.

Utilizando este modelo, en este estudio se evaluó la respuesta contráctil del íleon de cobayo después de inducir isquemia e hipoxia *in vitro* variando las concentraciones de oxígeno (5, 20 y 80%). El propósito del estudio fue determinar la funcionalidad del tejido a la estimulación química y eléctrica, así como establecer las condiciones experimentales que



inducen el mayor daño neuronal y a su vez determinar la utilidad del modelo de isquemia *in vitro* propuesto en el estudio de moléculas neuroprotectoras.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL

2.1.1 Definición

La enfermedad vascular cerebral (EVC), también conocida como accidente vascular cerebral (AVC), constituye la segunda causa de muerte (5.5 millones de defunciones al año) y la primera causa de discapacidad motriz a nivel mundial. Más del 85% de estas muertes se presentan en personas que viven en países de bajos y medianos ingresos; y una tercera parte, en personas menores de 70 años.¹ También contribuye al déficit económico de un país, debido a la asistencia médica que requieren los pacientes que la han padecido, la cual, es costosa e incluye consultas médicas, tratamientos, rehabilitación, etc.; además, en muchas ocasiones les produce incapacidad laboral permanente. Se calcula que cerca de un 16% de los pacientes permanecen hospitalizados a largo plazo, 20% necesita asistencia para caminar y 70% no puede regresar a su trabajo.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) define al AVC como un síndrome clínico caracterizado por el súbito desarrollo de síntomas y/o signos correspondientes usualmente a una afección neurológica focal, que persiste por más de 24 horas, sin otra causa aparente que la de origen vascular. Un AVC ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del cerebro o cuando un vaso sanguíneo cerebral se rompe, produciendo una hemorragia.¹

2.1.2 Clasificación

El EVC o AVC se clasifica en **isquémico** o infarto cerebral, que representa el 64% de los eventos en México y **hemorrágico**, (Figura 1) que representa el 36% según cifras reportadas por el Instituto Panvascular de Occidente y la Asociación Mexicana de Enfermedad Vasculare Cerebral² (Figura 2).

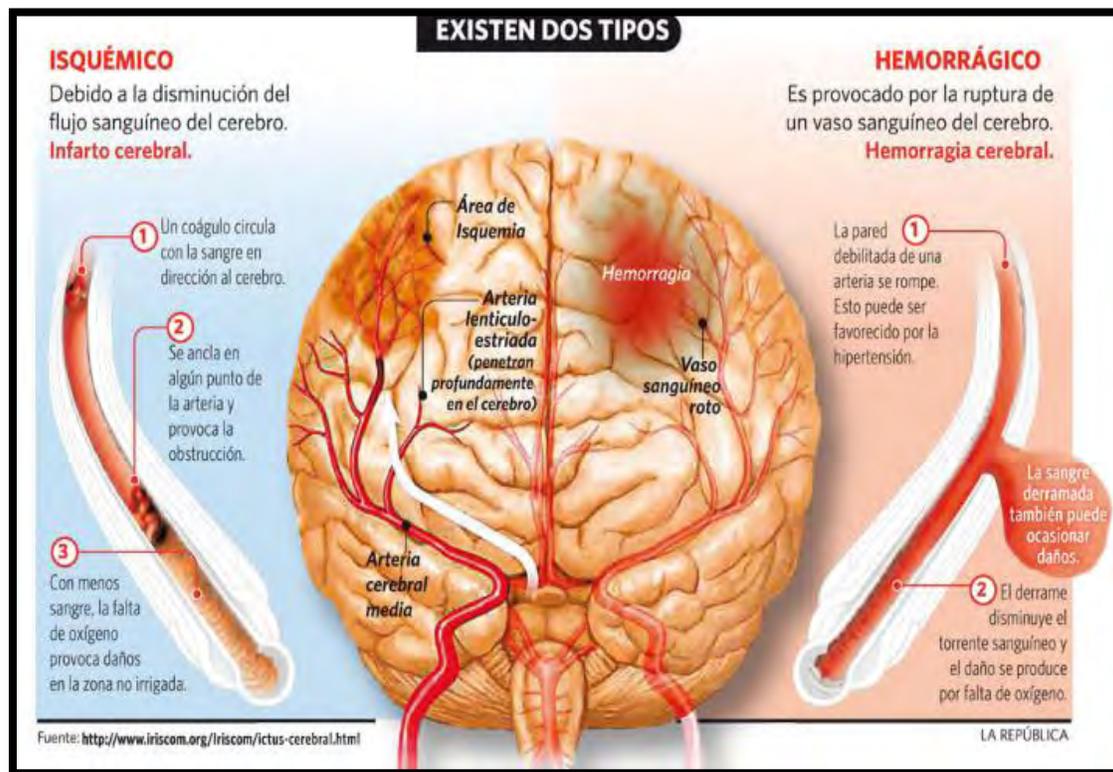


Figura 1. Tipos de EVC según su naturaleza.

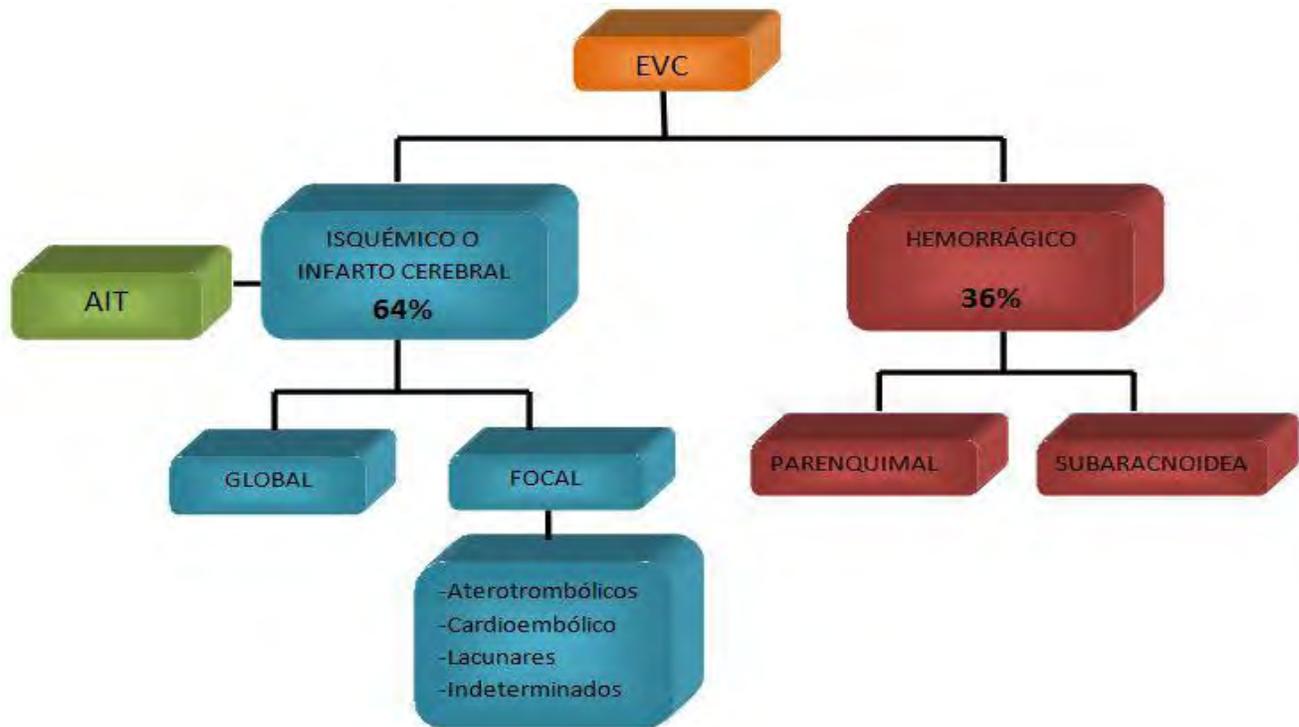


Figura 2. Clasificación de la EVC modificado de la Asociación Mexicana de Enfermedad Vasculat Cerebral y Díez –Tejedor. ATI (Accidente isquémico transitorio).

El EVC **isquémico** se produce por la disminución o interrupción del flujo sanguíneo a un área del cerebro a consecuencia de una reducción de la presión sanguínea; o bien, secundaria a una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre; y de acuerdo a su localización puede ser global ó focal. El de tipo global se produce cuando disminuye el flujo sanguíneo en todo el cerebro debido, generalmente, a hipotensión arterial sostenida; mientras que, el focal es el que afecta sólo algunas regiones del cerebro.³

El EVC **hemorrágico** se produce por la ruptura de un vaso o arteria y según su localización puede ser: parenquimatosa o intracerebral porque se produce en cualquiera de los

hemisferios cerebrales, tallo cerebral o cerebelo y subaracnoidea que se produce en el espacio subaracnoideo sobre la corteza cerebral (Figura 3).

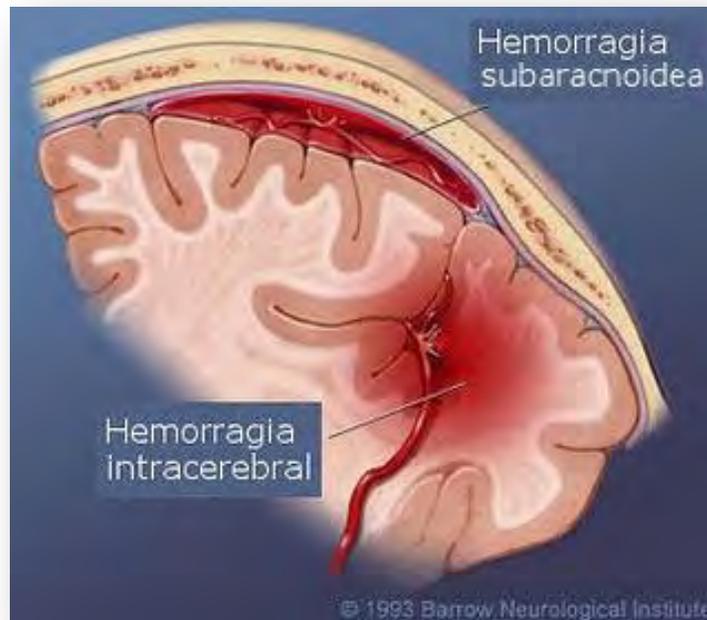


Figura 3. Tipos de hemorragia cerebral

Los EVC isquémicos también pueden clasificarse de acuerdo a la evolución temporal de los síntomas como **transitorios**, **en evolución** y **completos**. En los primeros, el déficit neurológico generalmente es reversible y se resuelve en menos de 24 horas con secuelas mínimas. La mayoría de éstos duran menos de una hora y no son considerados propiamente un infarto cerebral; sin embargo, los pacientes en los que se ha presentado corren riesgo de sufrir un infarto cerebral severo. En los que se encuentran en evolución, el déficit neurológico se agrava después del inicio. Finalmente, en los EVC completos, se induce un déficit permanente sin cambios tempranos luego de la evaluación inicial.³



La obstrucción o disminución en el flujo sanguíneo al cerebro en el EVC isquémico puede deberse a un proceso arterioesclerótico, trombótico, embólico o hipóxico.

La arteriosclerosis es una patología que consiste en la acumulación progresiva de calcio, colesterol y otras grasas en la pared de las arterias (placas de ateroma), lo que provoca que se vuelvan rígidas. En ciertas zonas de las arterias el estrechamiento puntual es más intenso, llegando a ocluir casi por completo el paso de sangre al cerebro.

La trombosis cerebral es producida como consecuencia de una zona obstruida por placas de ateroma que llevan a la formación de una agregación plaquetaria, formando coágulos o trombos que impiden la circulación sanguínea en esa área.

La embolia cerebral es producida por algunos trombos se pueden liberar llegando a arterias más pequeñas por las que no pueden pasar, las bloquean totalmente impidiendo el flujo de sangre. Esta situación es muy grave ya que puede evolucionar a la muerte de las células cerebrales implicadas y por ende la pérdida irreversible de las mismas.

La hipoxia generalmente se produce por hipotensión y poca perfusión lo cual causa un infarto sin oclusión vascular.³

2.1.3 Síntomas

Los síntomas de una isquemia cerebral dependen del lugar en el que se produzca la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y extensión de la misma; sin embargo, los principales síntomas que presentan los pacientes con un ataque isquémico son: cefalea intensa y repentina de origen desconocido; entumecimiento u hormigueo en el brazo, la pierna o el rostro, generalmente de un lado del cuerpo; seguido de debilidad o parálisis



muscular; incapacidad para caminar y/o ataxia; vista nublada o en uno o ambos ojos; disfagia, dislexia y/o afasia; mareo, confusión, desmayo o coma.⁴

2.1.4 Diagnóstico

En la mayoría de los casos, los médicos detectan la enfermedad mediante una exploración de rutina, a partir de la historia clínica y de los síntomas que presenta el paciente. Ocasionalmente, la obstrucción de la arteria carótida produce un soplo que a veces se puede escuchar con el estetoscopio.⁴ Otros métodos de diagnóstico utilizados son: ultrasonografía Doppler, angiografía por resonancia magnética o por sustracción digital, ecografía, resonancia magnética y arteriografía.⁵

2.1.5 Tratamiento

Hasta el momento, el tratamiento de la isquemia cerebral es solo preventivo, e involucra cambios en el estilo de vida así como atención a los problemas de arterioesclerosis y trastornos subyacentes que pueden provocar la isquemia. Además, pueden ser necesarios cateterismos e intervenciones quirúrgicas para contrarrestar los efectos de la enfermedad de las arterias carótidas y reducir el riesgo de sufrir un EVC.⁶

El único tratamiento que ha demostrado eficacia clínica en pacientes con isquemia cerebral es la alteplasa (t-PA o activador del plasminógeno tisular), un fibrinolítico que activa el plasminógeno tisular e incrementa su conversión a plasmina, enzima que hidroliza la fibrina y disuelve los coágulos.⁷ Los objetivos de la terapia trombolítica son recanalización arterial y la protección de las neuronas de la penumbra isquémica. Los beneficios clínicos del tratamiento con la alteplasa se basan en la reperusión del tejido y la disminución del



desarrollo del infarto, lo que depende del grado de daño irreversible, así como la presencia y extensión de la penumbra isquémica. Sin embargo, el uso de alteplasa a nivel clínico es limitado, su administración se recomienda dentro de las 3 primeras horas después del inicio de la enfermedad cerebrovascular⁸ y aunque puede minimizar las lesiones causadas por el EVC isquémico agudo, está absolutamente contraindicado en el EVC hemorrágico, de manera que la determinación del tipo de EVC es esencial antes de iniciar un tratamiento médico. Entre los requisitos para que un paciente pueda ser tratado con alteplasa es que no debe haber signos de hemorragia intracraneal, sospecha clínica importante de hemorragia subaracnoidea, antecedentes de cirugía intracraneal o en la columna vertebral, entre otras.⁹

2.1.6 Factores de riesgo

Existen algunos factores que aumentan el riesgo de sufrir un EVC, como: edad avanzada, género, hipertensión arterial, tabaquismo, diabetes mellitus, dislipidemia, ataque isquémico transitorio, alcohol, problemas cardiovasculares.^{4, 10}

2.2. EVENTOS QUE SE PRESENTAN DURANTE LA ISQUEMIA

2.2.1 El núcleo isquémico y la penumbra

El metabolismo y la viabilidad del tejido cerebral dependen principalmente del aporte de oxígeno y nutrientes a través de la circulación cerebral; por lo tanto, para comprender el daño y la evolución del evento isquémico, es necesario conocer datos del flujo sanguíneo cerebral (FSC). Un flujo sanguíneo normal de 50 a 55 mL/min/100g de tejido garantiza la actividad eléctrica de las neuronas y la preservación de sus funciones biósintéticas¹¹; sin embargo,



cuando el EVC comienza, se produce una hipoperfusión grave y el grado del daño que ocasione dependerá de la duración y grado de isquemia.

En los pacientes que sufrieron una isquemia cerebral es posible observar dos regiones cerebrales morfológicamente importantes: el núcleo del infarto y la penumbra (Figura 4). En la primera, el flujo sanguíneo cerebral (FSC) disminuye a 10 mL/min/100 g de tejido que corresponde a menos del 20 % del FSC normal y el daño neuronal puede ser irreversible después de 30 minutos. Las células en esta zona mueren rápidamente por lipólisis, proteólisis, fallo energético total y ruptura de la homeostasis iónica. La segunda región localizada en la periferia del núcleo isquémico se denomina penumbra isquémica, caracterizada por una perfusión cerebral críticamente disminuida, con un FSC de 10 a 22 mL/min/100g de tejido, pero en la que el suministro de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular. En las neuronas localizadas en esta zona, la capacidad de generar potenciales de acción se encuentran disminuidos, pero aún se mantienen los gradientes iónicos. Las neuronas de esta zona son potencialmente rescatables y si no se restablece una perfusión adecuada ó se protegen, éstas, con el transcurso del tiempo, se transformarán en una zona de núcleo del infarto, con muerte neuronal^{11, 12} (Figura 5).

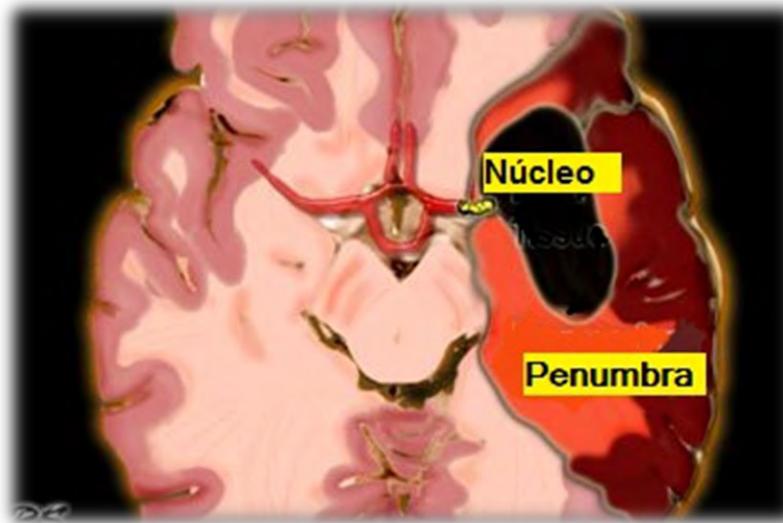


Figura 4. Núcleo y penumbra isquémica

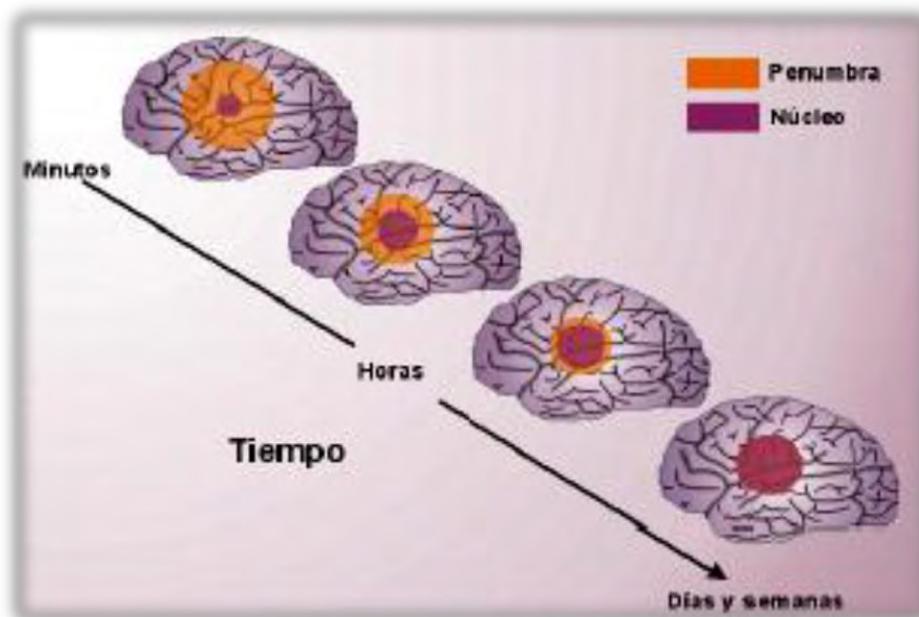


Figura 5. Evolución temporal de la penumbra a núcleo isquémico



2.2.2 Eventos Bioquímicos

2.2.2.1 La cascada isquémica

La cascada de eventos que se desencadena durante la isquemia es un proceso complejo al cual varios autores e investigadores han tratado de dar explicación. Se sabe que el tejido cerebral tiene un consumo relativamente alto de oxígeno y glucosa; y depende prácticamente de manera exclusiva de la fosforilación oxidativa para producir energía y llevar a cabo todos sus procesos metabólicos.^{12, 13,14} La isquemia cerebral aguda induce una falla energética que interrumpe los procesos de fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP.^{15, 16} El consecuente déficit energético ocasiona, en la zona del núcleo del infarto, la depleción energética casi total, la pérdida de la función de membrana y del gradiente iónico, la formación de edema y la destrucción celular; mientras que, en la zona de penumbra, en donde el déficit de energía es menor, la isquemia ocasiona la pérdida de funciones celulares produciendo diversas alteraciones bioquímicas con efectos nocivos a largo plazo.

Diversos investigadores han determinado que durante los primeros minutos de la isquemia, el déficit de oxígeno provoca un metabolismo anaeróbico de la glucosa, produciendo un aumento de ácido láctico y acidosis.^{16,17} La acidosis inhibe la fosforilación oxidativa, contribuyendo a la depleción energética que afecta al correcto funcionamiento de los procesos celulares activos dependientes de trifosfato de adenosina (ATP). Entre ellos se observa un descenso en la actividad de las bombas de Na^+/K^+ , provocando la entrada de Na^+ a la célula y la salida de K^+ al espacio extracelular, resultando en una despolarización membranal anóxica.¹⁴ Esto produce la entrada de calcio a través de los canales de calcio



dependiente de voltaje, desencadenando la liberación de aminoácidos excitadores como glutamato¹² en el espacio sináptico. La sobre-estimulación de los receptores NMDA por el glutamato induce un incremento en la concentración de calcio intracelular, el cual activa diversas enzimas líticas que destruyen componentes celulares (proteasas, lipasas, endonucleasas), esto facilita la síntesis de óxido nítrico y la formación de radicales libres derivados de óxido nítrico (peroxinitritos), desacoplando la fosforilación oxidativa y comprometiendo aun más la disponibilidad energética, lo que finalmente produce la muerte neuronal¹⁵ (Figura 6).

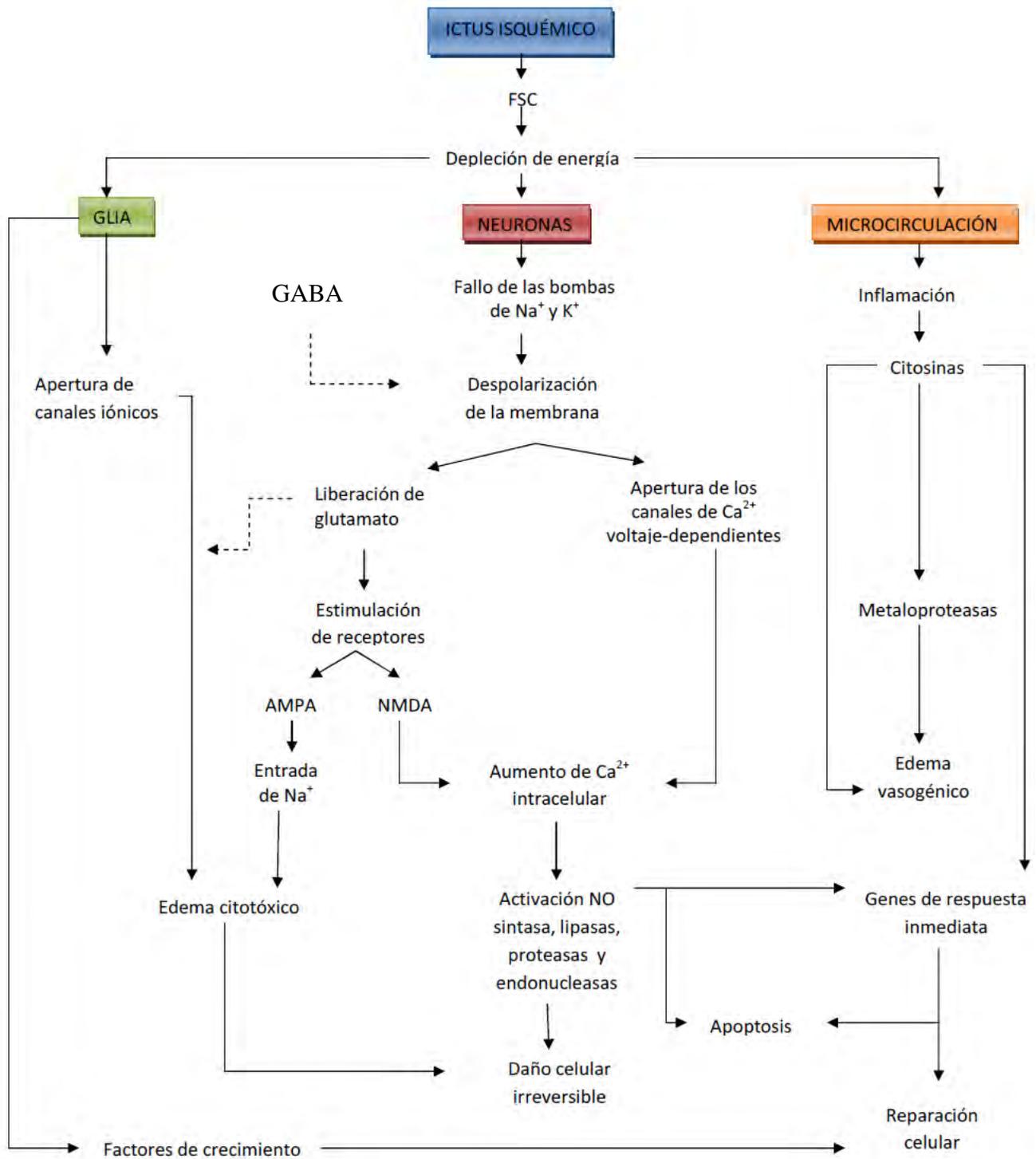


Figura 6. La cascada isquémica



2.2.2.2. La hipoxia

Una de las causas principales de lesión cerebral secundaria es la hipoxia cerebral, fundamentalmente de origen isquémico. La hipoxia se define como la disminución de oxígeno en los tejidos, incluido el cerebro. Este fenómeno puede producirse por isquemia, asfixia, anemia, envenenamiento (p.ej. monóxido de carbono) o disminución en la presión parcial de oxígeno atmosférico.¹⁸

Las células del cerebro son extremadamente sensibles a la disminución del aporte de oxígeno, algunas comienzan a morir en menos de cinco minutos después de iniciada la hipoxia, resultando en la muerte o daño cerebral grave de manera rápida.¹¹ En condiciones normales, las mitocondrias consumen la mayor cantidad (aproximadamente 85-90%) de oxígeno en las células para permitir la fosforilación oxidativa, que es la principal vía metabólica para la producción de ATP. Por lo tanto, la hipoxia produce una disminución en la síntesis de ATP, como consecuencia la célula consume glucosa más rápido en un intento de producir ATP a través de la glucólisis anaeróbica, menos eficiente energéticamente y la cual produce desechos metabólicos como el lactato, esto ocasiona que disminuya el pH celular. De igual forma, se promueve la síntesis de NO y especies reactivas de oxígeno. Todos estos procesos pueden resultar en la muerte celular.^{18, 19,20}

2.3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR EFECTO NEUROPROTECTOR

La búsqueda de una terapia neuroprotectora efectiva para el daño inducido por isquemia cerebral sigue siendo un reto para investigadores y clínicos.²¹ La mejor herramienta de que



disponemos para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral son los modelos experimentales, que nos permiten abordar de forma controlada el estudio de la isquemia, que se caracteriza por su heterogeneidad y complejidad.²²

El objetivo principal de los modelos experimentales de isquemia cerebral es el estudio del daño isquémico en las neuronas en condiciones fisiológicamente controladas y reproducibles, además de adquirir conocimientos válidos de carácter básico sobre la fisiopatología del daño cerebral isquémico y los efectos de nuevos compuestos capaces de minimizar dicho daño, lo que es de especial interés para su aplicación clínica. El conocimiento de los mecanismos subyacentes al daño cerebral es el paso previo al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos fármacos que eviten la aparición de lesiones irreversibles.²²

Sin embargo, a pesar de que se han evaluado varios agentes neuroprotectores en ensayos clínicos de fase III que evidencian efectos terapéuticos en modelos de isquemia cerebral en ratas, ratones, o jerbos, ninguno de ellos ha demostrado eficacia en pacientes. Esta falta de correlación entre los estudios experimentales y clínicos fundamenta los cuestionamientos a los modelos de isquemia cerebral y las críticas a los protocolos de estudio utilizados, principal motivo por el que se ha generado un gran interés en el desarrollo de modelos experimentales alternativos, especialmente en aquellos que permitan la identificación de moléculas clínicamente útiles.²³

Los animales utilizados con mayor frecuencia en el estudio de esta enfermedad, han sido ratas y jerbos; además de una serie de mamíferos como perros, gatos, conejos y simios. Sin embargo, los pequeños roedores como las ratas, son los animales más utilizados en



modelos de isquemia cerebral. La decisión de los investigadores para utilizar estos animales, es principalmente, por su aceptación desde un punto de vista ecológico y ético, además de ser más económicos que otros animales, fáciles de manipular y permiten utilizar sistemas simples y accesibles para el estudio de mecanismos fisiopatológicos específicos.²⁴

Los modelos experimentales para el estudio de la isquemia cerebral se clasifican en modelos *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* pueden ser de tipo global, dentro de los que se encuentran paro cardiaco e interrupción de la circulación cerebral (interrupción completa o incompleta de la circulación cerebral); o de tipo focal donde encontramos oclusión de la arteria carótida común, oclusión de la arteria cerebral media, oclusión microvascular de la arteria cerebral media e infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas. Dentro de los modelos *in vitro* encontramos principalmente los cultivos celulares que pueden ser de neuronas, organotípicos y cortes de cerebro.^{22, 25,26}

En general, los principales problemas de los modelos de isquemia cerebral son su alta variabilidad y su elevada mortalidad.²⁴

2.3.1 Modelo de ileon de cobayo

Las técnicas *in vitro* involucran el aislamiento de un tejido que ha sido tomado de un animal y se mantienen viables en una solución de sales adecuada, temperatura, pH, etc., para la evaluación biológica de los fármacos en investigación. Algunas de las ventajas de las técnicas *in vitro* son que varios medicamentos nuevos pueden ser probados en los tejidos obtenidos a partir de un solo animal, la cantidad del material que se requiere para la prueba es relativamente menor, se prueba directamente el efecto del fármaco manteniéndolo libre de



los factores de absorción, metabolismo, excreción o interferencia debida a reflejos nerviosos del organismo.

Muchas preparaciones *in vitro* se han utilizado para estudiar los patrones de motilidad y las respuestas del músculo liso gastrointestinal, estos incluyen íleon de cobayo, íleon del conejo, duodeno, yeyuno y estómago de ratones, rata y hámster, siendo los intestinos de cobayo y conejo utilizados con mayor preferencia que los de otras especies.

Los segmentos del intestino de un animal producirán respuestas fisiológicas “normales” por varias horas si se mantiene en una solución fisiológica adecuada y con temperatura y aporte de oxígeno apropiados. El tejido que se prefiere para los estudios farmacológicos es el íleon de cobayo, debido a que muestra una línea basal más constante en su respuesta, además de ser relativamente más resistente al trauma y más fácil de manipular.²⁴

Recientemente, un grupo de investigadores propuso el íleon de cobayo como un modelo útil para el estudio de la isquemia neuronal y propiedades neuroprotectoras de diversas moléculas.²⁷

Esta propuesta se basa en la existencia del sistema nervioso entérico (SNE), presente en el íleon de cobayo; y su similitud en funcionalidad con las neuronas y neurotransmisores presentes en el sistema nervioso central (SNC). Además, como ya se mencionó, la supervivencia y la integridad de las neuronas del intestino delgado requieren un suministro continuo de oxígeno y glucosa, por lo que se ha demostrado que la isquemia intestinal desencadena la cascada de eventos moleculares patológicos que juegan un papel central en la patogénesis de la lesión neuronal asociada con el accidente cerebrovascular en el SNC.²⁷



2.4. SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO

El sistema nervioso entérico (SNE) tiene la capacidad de funcionar de forma independiente al SNC para el control intrínseco de las funciones del tracto digestivo, regulando su motilidad, secreción, flujo sanguíneo y el sistema inmunológico. Por esta razón, el SNE se considera como el "segundo cerebro". Además, tanto el SNC como el SNE tienen un origen común.^{28,29} El SNE está organizado en dos plexos ganglionares: mientérico y submucoso, compuesto por neuronas y células gliales entéricas. El plexo mientérico (o plexo de Auerbach) se encuentra entre las capas del músculo longitudinal y el músculo circular; y se encarga de controlar la actividad del músculo liso del intestino. El plexo submucoso (o plexo de Meissner) se encuentra entre la capa del músculo circular y la submucosa y se encarga de regular las funciones de absorción y secreción del epitelio gastrointestinal y el flujo sanguíneo local^{29,30} (Figura 7).

Los dos plexos están conectados entre sí y contienen neuronas motoras que inervan tanto al músculo liso como a las células secretoras de la mucosa, así como a las neuronas sensitivas que responden a la distensión, a la tonicidad y a las señales químicas específicas.²⁹

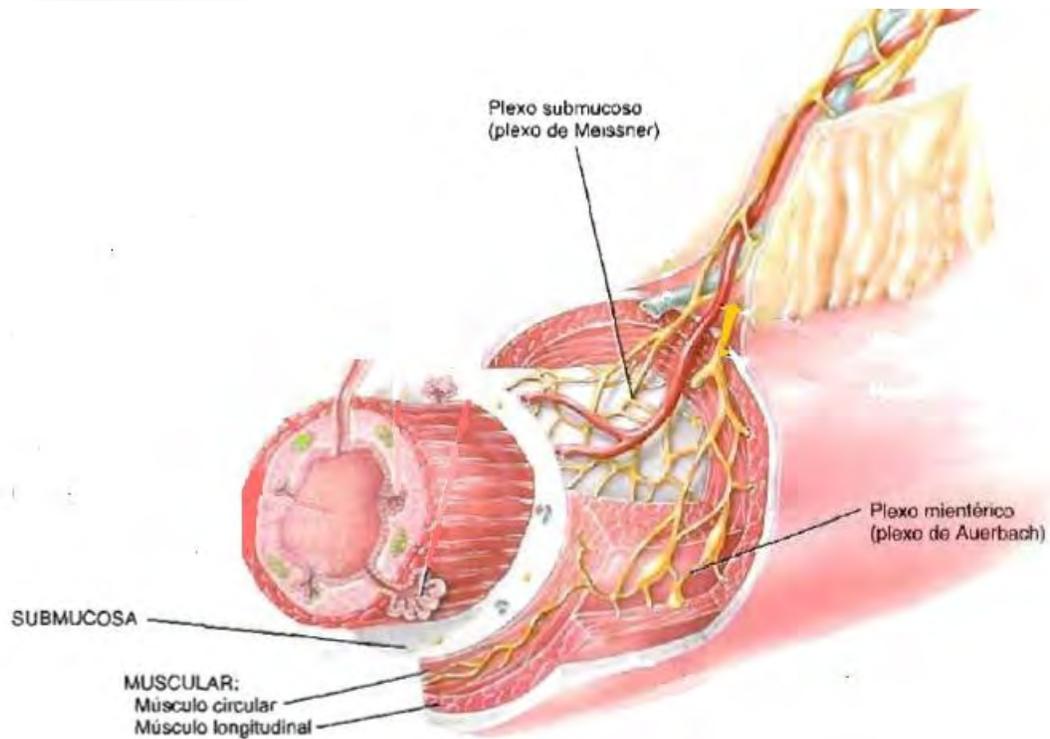


Figura 7. Sistema nervioso entérico.

2.4.1 Tipos de neuronas entéricas

Los movimientos del intestino son el resultado de la interacción de las células neuronales y las musculares. El aparato neuronal se compone de un gran número de neuronas entéricas que se pueden clasificar principalmente por su funcionalidad en neuronas aferentes intrínsecas primarias, neuronas motoras e interneuronas.^{29, 31}

Las neuronas aferentes primarias entéricas o neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs) están presentes en los plexos tanto mientérico y submucoso y son neuronas colinérgicas. Estas neuronas responden a estímulos mecánicos y químicos y regulan las funciones fisiológicas del tubo digestivo, transmitiendo la información a otras neuronas. No



conducen información sensorial; esta función se lleva a cabo a través de las células enterocromafines, localizadas en el epitelio entérico y funcionan como transductores sensoriales.³¹ En el cobayo estas neuronas tienen propiedades electrofisiológicas tipo AH (After hyperpolarization) que se caracterizan por una hiperpolarización de larga duración seguida por un potencial de acción. Las IPANs reciben potenciales postsinápticos excitatorios lentos los cuales son principalmente mediados por sustancias P y taquicininas. Las IPANs están interconectadas formando redes y reciben entradas de otras IPANs, además se conectan con interneuronas y con motoneuronas.²⁹

Las neuronas motoras representan la conexión final motora con las células del músculo liso de las capas circular y longitudinal, vasos sanguíneos y las glándulas. Los cuerpos celulares se encuentran en los ganglios mientéricos, pero puede haber algunos en los ganglios submucosos. De acuerdo a su función pueden dividirse en excitatorias o inhibitorias³¹ (Figura 8). Los principales neurotransmisores relacionados con las neuronas excitatorias son: acetilcolina y taquicininas (substancia P y neuroquininas). Las neuronas inhibitorias utilizan un espectro más amplio de neurotransmisores como óxido nítrico, péptido intestinal vasoactivo y ácido gamma-aminobutírico (GABA). Hay un subgrupo de estas células encargadas de regular la secreción de agua y electrolitos (neuronas secretomotoras) y del flujo sanguíneo (vasomotoras). Por sus características electrofisiológicas se les clasifica como neuronas "S", que al ser estimuladas eléctricamente se generan potenciales postsinápticos excitatorios rápidos.²⁹

Las interneuronas son las encargadas de integrar la información generada por las IPANs y de enviar la información a las neuronas motoras. Se clasifican en ascendentes o descendentes, de acuerdo a la dirección de las señales que emiten (oral – caudal).³¹ Se han

descrito diversos tipos, siendo las ascendentes principalmente colinérgicas. Las descendentes tienen mayor complejidad neuroquímica, inervan el plexo submucoso y contienen la enzima para la síntesis de la acetilcolina (la colina acetiltransferasa); mientras que, las ascendentes contienen no sólo la enzima para la síntesis de acetilcolina, sino también taquicinas y péptidos opioides. Las interneuronas, al igual que las motoneuronas, se clasifican como neuronas "S".²⁹

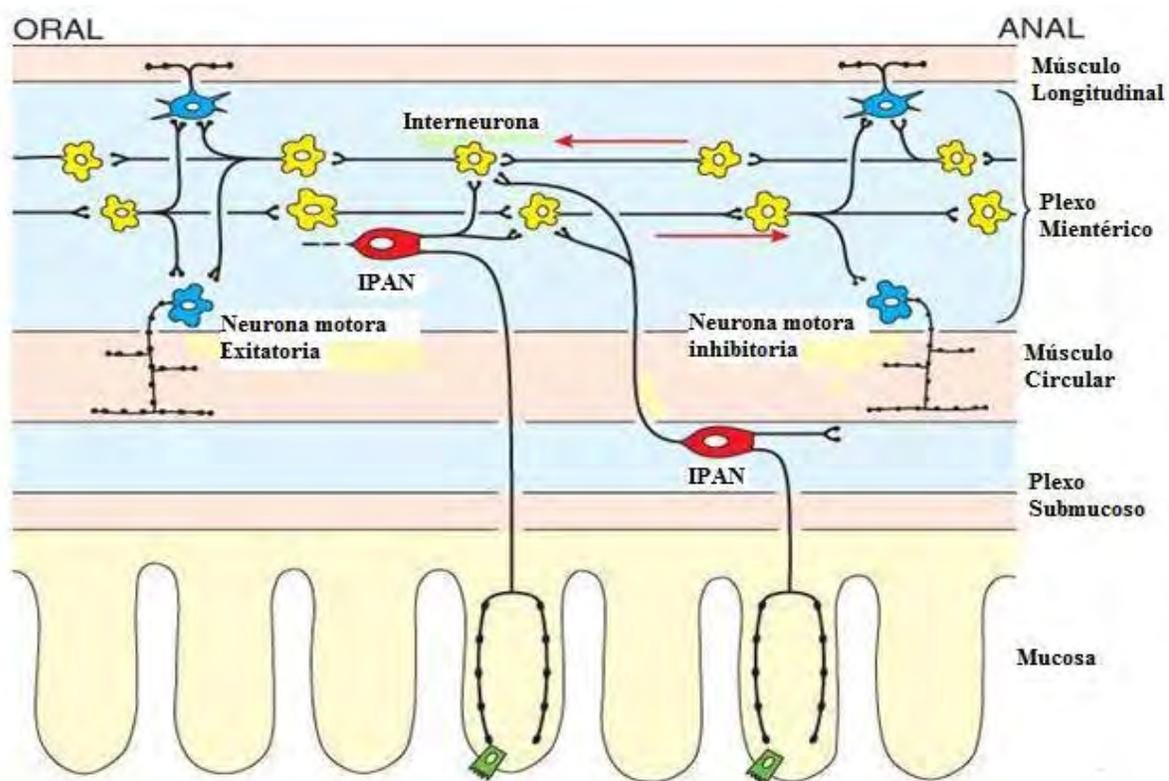


Figura 8. Tipos de neuronas en el sistema nervioso entérico

A continuación se enlistan algunos neurotransmisores que se encuentran en las neuronas del SNE así como sus funciones^{30, 32} (Cuadro 1).



Cuadro 1. Neurotransmisores y péptidos del SNE. Modificado de Benarroch, 2007

Neurona	Neurotransmisor	Función
IPAN	Acetilcolina	Activado por estímulo mecánico o químico, inicia la peristalsis y reflejos secretomotores.
Interneuronas ascendentes	Acetilcolina, sustancia P	Activa neuronas motoras ascendentes
Interneuronas descendentes	Acetilcolina, serotonina, ATP	Activa motoneuronas mientéricas descendentes.
Motoneuronas descendentes (inhibitorias)	VIP, óxido nítrico, NPY, ATP, GABA	Provoca relajación del músculo liso.
Células enterocromafines	Serotonina	Activa IPANS vía 5-HT ₃
Células intersticiales de Cajal	Oxido nítrico	Media la influencia de las neuronas del SNE sobre el músculo liso

2.4.2 Contracción del músculo liso

Como ya se mencionó, el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso entérico es la acetilcolina, por lo que juega un papel importante en la contracción del músculo liso intestinal²⁹; por tal motivo, a continuación explicaremos detalladamente como participa ésta en este proceso.

Los receptores de membrana, cuya función principal es la transducción de señales, pueden dividirse en dos tipos: los receptores ionotrópicos que permiten la apertura de canales iónicos, como los nicotínicos para ACh, receptores GABA_A y los receptores de glicina, que poseen un sitio de unión para el neurotransmisor y contiene el canal iónico responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula y un segundo tipo de receptores que interactúan con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G), como los colinérgicos de tipo muscarínico.³³ Se han identificado varios subtipos de receptores muscarínicos (M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅).^{34,35,36,37} En el músculo liso los que predominan son los

del subtipo M_2 y M_3 .^{33,35,36} En general, la vía de señalización que desencadena al activarse el receptor M_3 es activar a una proteína Gq, la cual a su vez activa la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (IP_2) por medio de la fosfolipasa C (PLC). De esta hidrólisis se obtiene el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG).³⁸ El receptor para IP_3 (receptor de inositol trifosfato r IP_3) es un canal iónico formado por cuatro subunidades proteicas, cuyos extremos carboxilo forman la pared del canal. Cuando el IP_3 activa a su receptor, estos sufren un cambio conformacional que origina la apertura del canal y promueve la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares.³³ Tras la salida del Ca^{2+} , éste se une a la calmodulina (una proteína con 4 sitios de unión de calcio), la cual funciona como activador de la cinasa de miosina de cadena corta (MCLK, por sus siglas en inglés). La MLCK lleva a cabo la fosforilación de la miosina induciendo que se desplace entre los filamentos de actina, generando así, una respuesta contráctil en las fibras musculares del músculo liso³⁸(Figura 9).

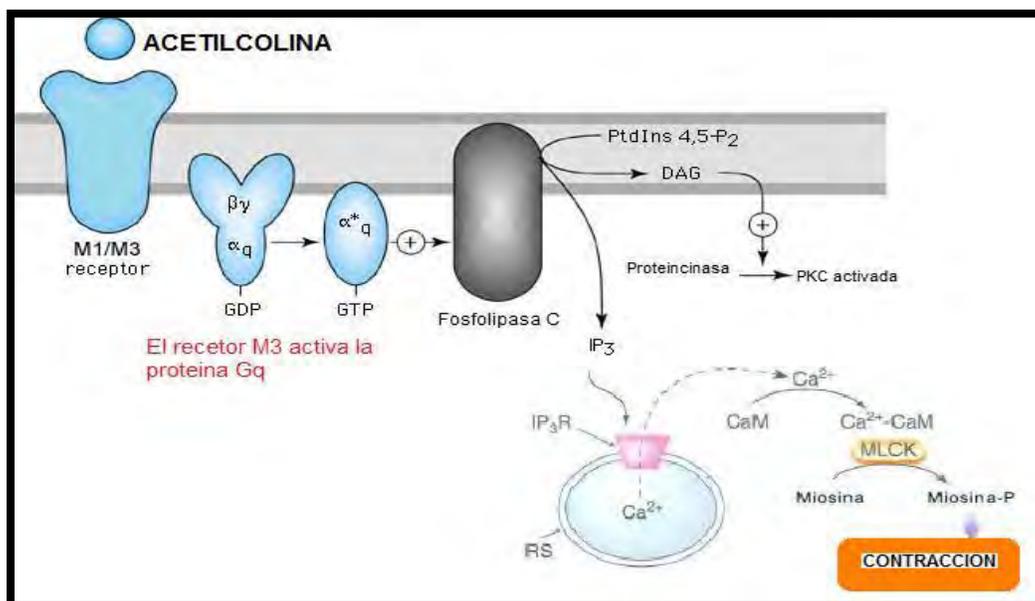


Figura 9. Contracción del músculo liso intestinal.



Por otro lado, el receptor ACh neuronal es un receptor de ligando con dos subunidades y cuatro dominios transmembranales que se localizan en interneuronas y neuronas motoras donde median la excitación.³³ La ACh se sintetiza en el citoplasma celular de las neuronas y puede ser liberada de las vesículas al espacio sináptico; o bien, ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada a través de la propagación del impulso nervioso que genera una despolarización y la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes para promover el aumento de Ca^{2+} y así su liberación. La acetilcolina liberada actúa sobre sus receptores o puede ser hidrolizada por acción de la acetilcolinesterasa.³³ Lo anterior permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica, que depende del tipo de receptor y de la forma en que éste se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción, por ejemplo en el músculo liso genera la contracción por unión en receptores de tipo muscarínico.³³

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos animales *in vivo* para el estudio del daño neuronal inducido por isquemia han sido muy útiles para el conocimiento de la fisiopatología responsable del daño celular, así como para la identificación de blancos farmacológicos. Estos modelos también han sido utilizados en el estudio de fármacos con efecto neuroprotector; sin embargo, su valor se ha visto cuestionado por las evidencias que indican que los fármacos que han tenido éxito en los modelos experimentales no reproducen los mismos resultados en la clínica. En ese sentido es importante el desarrollo de nuevos modelos experimentales que nos permitan estudiar un amplio número de moléculas nuevas con posible efecto neuroprotector.



Estudios recientes de un grupo de investigadores del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, ha demostrado la utilidad de un modelo de isquemia neuronal *in vitro* en el que se emplea el íleon aislado de cobayo para el estudio del daño neuronal inducido por la isquemia intestinal y lo propone como un modelo adecuado para el cernimiento de moléculas con posible efecto neuroprotector. Con el empleo de este modelo se pudo demostrar que la isquemia *in situ* y la superfusión *in vitro* disminuye la respuesta contráctil del tejido a la estimulación eléctrica y química de manera dependiente al periodo de isquemia y que esta respuesta fue más sensible a la estimulación eléctrica que a la química en los tejidos isquémicos. El trabajo experimental sobre la utilidad de este modelo para el estudio de la isquemia neuronal indica que la disminución en la reactividad de tejidos isquémicos a la estimulación eléctrica se mejoró con el dexrazoxano, un agente antioxidante que, en un modelo de isquemia cerebral, ha mostrado ser un buen agente neuroprotector. Estos resultados señalan la utilidad de este modelo para el cernimiento de moléculas con potencial efecto neuroprotector y que la reducción en la máxima contracción producida por estimulación eléctrica en tejidos isquémicos es un parámetro útil para evaluar neuroprotección. Sin embargo, el modelo desarrollado no permite el control preciso de las concentraciones de oxígeno durante los procesos de isquemia y superfusión generando una variación importante en los datos obtenidos. Por lo tanto, se consideró importante la evaluación de diferentes grados de daño por isquemia y/o por hipoxia bajo un control preciso de las concentraciones de oxígeno.



4. HIPOTESIS

En este proyecto se postula que al inducir hipoxia e isquemia *in vitro* en el íleon aislado de cobayo se producirá una disminución de la actividad contráctil a la estimulación química y eléctrica de manera dependiente de la concentración de oxígeno. Esta disminución en la respuesta del tejido será más evidente en los tejidos sometidos a isquemia que en los tejidos sometidos solo a hipoxia.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- ✓ Determinar las alteraciones en la respuesta contráctil inducidas por diferentes concentraciones de oxígeno, en ausencia (isquemia) y presencia (hipoxia) de glucosa en el modelo experimental de íleon aislado de cobayo. Con el propósito de determinar la utilidad del modelo de isquemia *in vitro* para el estudio de moléculas neuroprotectoras.

5.2 Particulares

- ✓ Determinar las alteraciones funcionales por medio de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico producidas por hipoxia con diferentes concentraciones de oxígeno (5, 20 y 80%) en el íleon aislado de cobayo.
- ✓ Determinar las alteraciones funcionales por medio de la respuesta contráctil a diversos estímulos químicos producidas por hipoxia con diferentes concentraciones de oxígeno (5,20 y 80%) en el íleon aislado de cobayo.



- ✓ Determinar las alteraciones funcionales por medio de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico producidas por isquemia con diferentes concentraciones de oxígeno (5, 20 y 80%) en el íleon aislado de cobayo.
- ✓ Determinar las alteraciones funcionales por medio de la respuesta contráctil a diversos estímulos químicos producidas por isquemia a diferentes concentraciones de oxígeno (5, 20 y 80%) en el íleon aislado de cobayo.
- ✓ Determinar las diferencias entre las respuestas funcionales del tejido hipóxico y el tejido isquémico a los diversos estímulos.
- ✓ Determinar las condiciones experimentales en el modelo de íleon de cobayo *in vitro* que induzcan daño neuronal sin dañar las células musculares para determinar la utilidad del modelo de isquemia *in vitro* en el estudio de moléculas neuroprotectoras.



6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

De tipo experimental en un modelo *in vitro*.

6.2 Población en estudio

Segmentos intestinales del íleon de cobayo obtenidos de cobayos macho de 400 a 600 g de peso en condiciones previas de ayuno y mantenidos en un cuarto con temperatura controlada y un ciclo de luz obscuridad.

6.3 Criterios de inclusión

- Segmentos de íleon de cobayo de 2 cm, limpios y sin alteraciones físicas evidentes.
- Segmentos que alcancen una contracción de 4 a 5 gramos de tensión en respuesta a acetilcolina (1×10^{-5} M), después de 30 min de equilibrio.

6.4 Criterios de exclusión

- Segmentos de íleon de cobayo con fisuras, necrosis y alteraciones físicas notables.
- Segmentos que no alcancen una contracción de 4 a 5 gramos de tensión en respuesta a acetilcolina (1×10^{-5} M), después de 30 min de equilibrio.



6.5 Variables a controlar

Concentración de oxígeno y ausencia o presencia de glucosa en la solución Krebs.

6.6 Variable de respuesta

Fuerza de contracción en gramos de tensión del íleon de cobayo ante diversos estímulos bajo las diferentes condiciones experimentales.

7. MATERIAL

7.1 Biológico

- 6 porciones de 2 cm de íleon de cobayo macho entre 400 y 600 g de peso corporal, para cada experimento.

7.2 Materiales

- Cámaras para órgano aislado
- Estuche de disección
- Estuche de cirugía
- Agujas
- Vasos de precipitados plástico y vidrio (50, 100, 250, 1000 mL)
- Matraz Erlenmeyer 4000 mL
- Espátula
- Agitador de vidrio
- Hilo nylon blanco y verde
- Lámpara con lupa
- Caja de Petri
- Agitador magnético
- Algodón
- Sanitas
- Jeringas de vidrio de 1mL y de 15 mL
- Frascos de vidrio de 10 mL
- Embudo de vidrio
- Probetas de vidrio de 10, 50, 100 y 250 mL



7.3 Equipo

- Polígrafo Grass. Modelo 7D
- Equipo para estudios de órgano aislado (serpentes, cámaras de órgano aislado, mangueras para agua, soportes universales, pinzas de tres dedos con nuez, tapones de hule)
- Transductor para polígrafo Grass, modelo 7B
- Recirculador Haake E2
- Placa de agitación y calentamiento
- Estimulador Grass S88
- Oxystreamer

7.4 Instrumentos

- Balanza analítica
- Termómetros

7.5 Sustancias

- Agua destilada
- Agua corriente
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de calcio (CaCl_2)
- Cloruro de magnesio (MgCl_2)
- Fosfato dibásico de sodio (NaH_2PO_4)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Dextrosa
- Colina
- Acetilcolina (ACh)
- Cloruro de bario (BaCl_2)
- Oxígeno (O_2)
- Nitrógeno (N_2)
- Dióxido de carbono (CO_2)

7.6 Software

- PolyView, versión 2.5 (Grass Instruments).



- GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

8. MÉTODO

8.1 Preparación del tejido

Se utilizó un cobayo macho de 400 a 600 g por experimento. El animal se sacrificó por dislocación cervical. Se extrajo una porción de 15 cm de íleon y se colocó en una cámara con solución Krebs bicarbonato a 37° C y burbujeo continuo con 95% O₂ y 5% CO₂. La solución de Krebs-bicarbonato se preparó con las siguientes concentraciones de sales (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.2; NaH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; dextrosa, 11 y colina, 0.3. Posteriormente se limpió el tejido y se obtuvieron seis porciones de aproximadamente 2 cm de longitud. Cada porción de íleon se colocó en una cámara de órgano aislado de 30 mL con solución Krebs-bicarbonato a 37° C y burbujeo continuo con 95% O₂ y 5% CO₂. La parte proximal de cada segmento se conectó a un transductor y se fijó una tensión de 1 gramo. Una vez colocado el tejido se comenzó a registrar su actividad espontánea a través de un polígrafo. Se mantuvieron las preparaciones en equilibrio para que se estabilizaran durante treinta minutos. Para asegurar la viabilidad del tejido se estimuló con una solución de acetilcolina (ACh, 1x10⁻⁵ M) durante treinta segundos registrando la contracción del tejido en el polígrafo y en el software Polyview. Finalmente, se lavaron los tejidos con solución de Krebs-



bicarbonato para eliminar los residuos de acetilcolina. Los tejidos que no alcanzaron una contracción de entre 4 y 5 g de respuesta a la ACh se descartaron.

8.2 Tejidos sometidos a hipoxia

Para inducir la hipoxia se formaron tres grupos, en cada uno de ellos se sustituyó la mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ por las siguientes mezclas de gases durante 80 minutos:

- a) Grupo 1, 5% de O₂, 5 de % CO₂ y 90 % de N₂,
- b) Grupo 2, 20% de O₂, 5 de % CO₂ y 75 % de N₂,
- c) Grupo 3, 80% de O₂, 5 de % CO₂ y 15 % de N₂.

Después de transcurrido el tiempo de hipoxia, se cambió la mezcla de gases por la mezcla inicial (95% O₂ y 5% CO₂). Se dejaron estabilizar los tejidos por 10 minutos y se estimularon eléctricamente aplicando pulsos de corriente de 3 ms de duración, 0.3 Hz y un voltaje progresivo de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 V por medio del estimulador Grass S88. Posteriormente se dejaron reposar 10 minutos los tejidos y se realizó una curva concentración respuesta no acumulativa de acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M). También se estimularon con KCl (3.2×10^{-2} M) y BaCl₂ (1×10^{-2} M). Los tejidos se lavaron entre cada administración de las diferentes concentraciones de los fármacos.



8.3 Tejidos sometidos a Isquemia

Para inducir la isquemia se formaron otros tres grupos, en los cuales, además de cambiar la mezcla de gases por las anteriormente descritas, se sustituyó la solución Krebs-bicarbonato por una solución sin glucosa durante 80 minutos.

- d) Grupo 4, 5% de O₂, 5 de % CO₂ y 90 % de N₂ + Krebs sin glucosa,
- e) Grupo 5, 20% de O₂, 5 de % CO₂ y 75 % de N₂+ Krebs sin glucosa,
- f) Grupo 6, 80% de O₂, 5 de % CO₂ y 15 % de N₂+ Krebs sin glucosa.

Después de transcurrido el tiempo de isquemia, se cambió la mezcla de gases por la mezcla inicial (95% O₂ y 5% CO₂) y la solución Krebs sin glucosa por una completa. Se dejaron estabilizar los tejidos por 10 minutos y se estimularon tanto eléctrica como químicamente como se describió previamente.



Figura 10. Diagrama de la metodología general

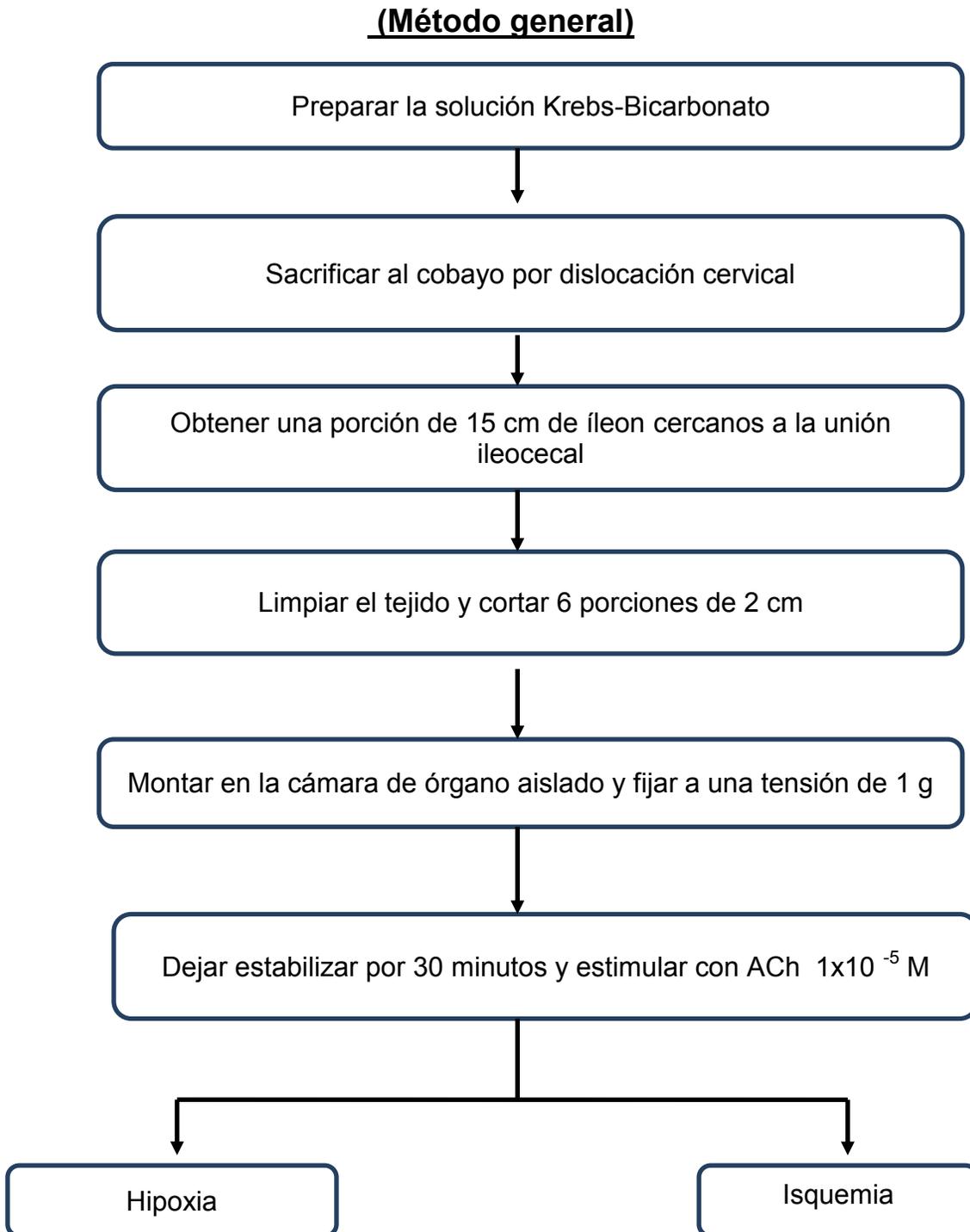


Figura 11. Diagrama de la metodología para inducir hipoxia



Inducción de hipoxia

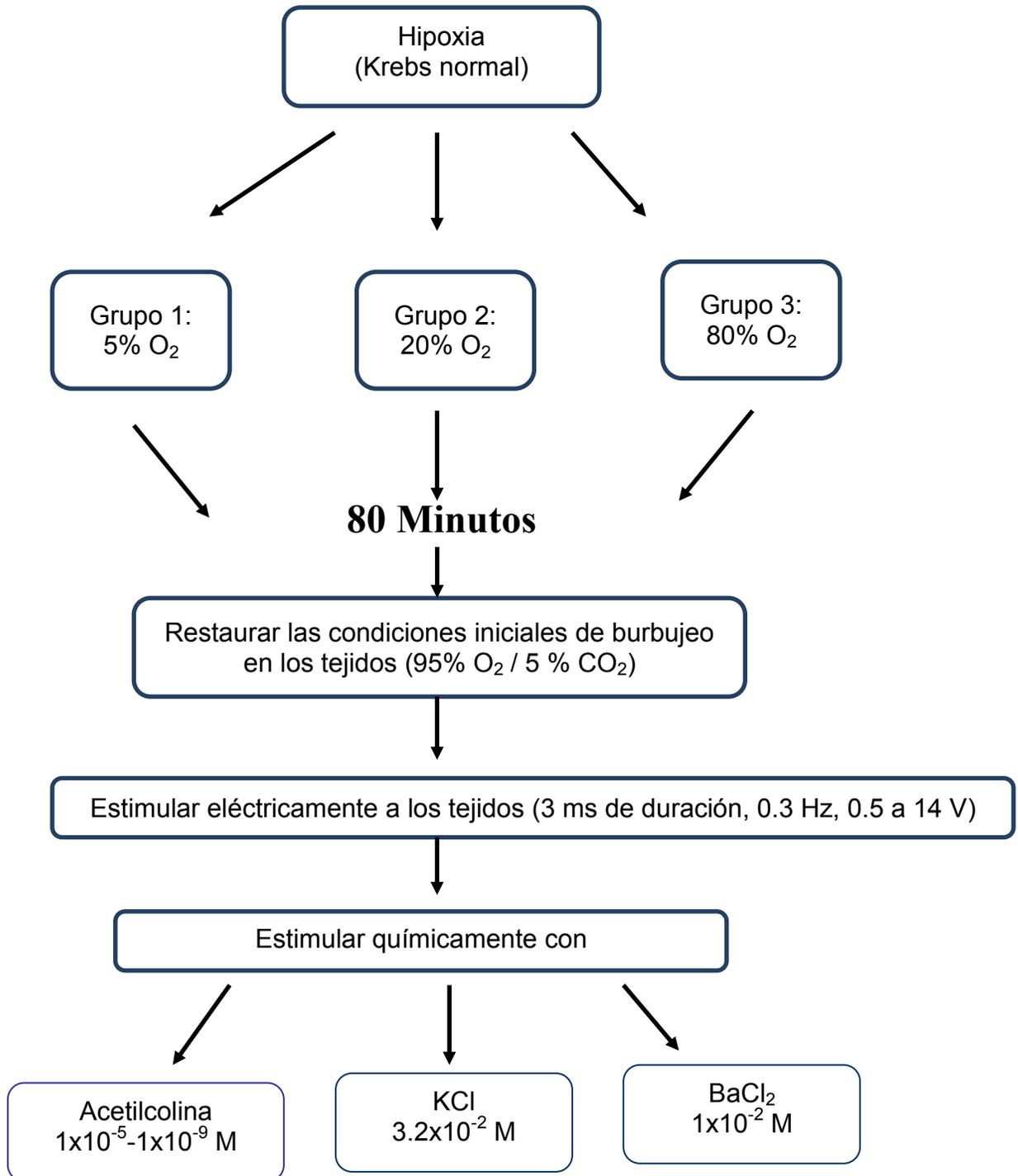
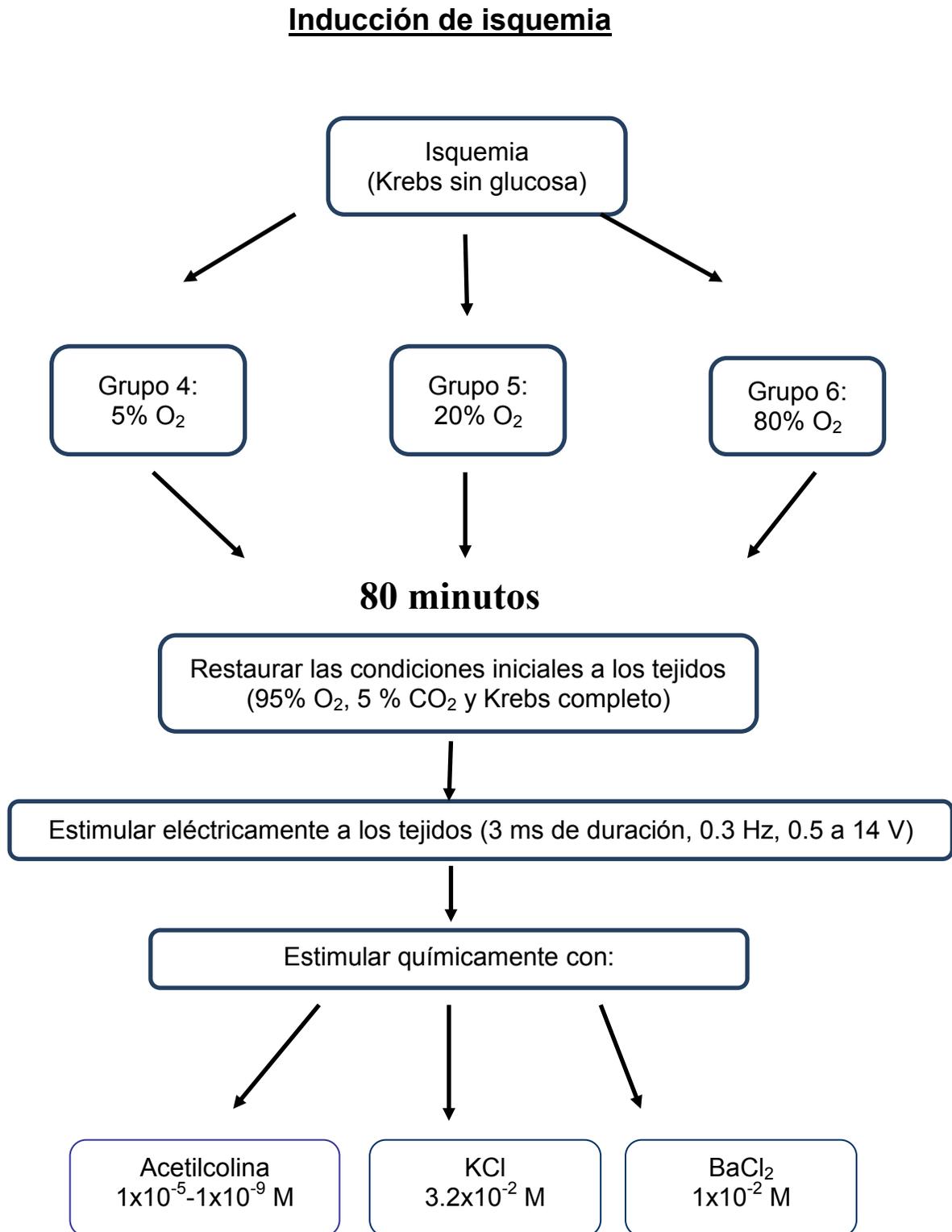




Figura 12. Diagrama de la metodología para inducir isquemia





9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se obtuvieron como gramos de tensión del efecto contráctil de los tejidos sometidos a diferentes estimulaciones. En cada experimento, la respuesta de los tejidos a la estimulación química y eléctrica en condiciones normales (con 95% de oxígeno y con solución Krebs) se utilizó como control contra el cual se compararon las respuestas contráctiles de los tejidos sometidos a los diferentes tratamientos. También, en el caso del análisis de la respuesta de los tejidos a concentraciones crecientes de ACh (curva concentración respuesta de ACh), se comparó la respuesta de cada tratamiento experimental con la respuesta inicial de los tejidos (antes de la hipoxia ó la isquemia). En este caso, se calculó el área bajo la curva (ABC) de la curva concentración respuesta a la acetilcolina de los tejidos sometidos a los diferentes tratamientos.

Los resultados del efecto contráctil de los tejidos sometidos a los diferentes tratamientos se expresaron como la media \pm error estándar, con una $n=6$, para cada tratamiento experimental. Los valores se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), seguida de una prueba de Dunnett. Un valor de $P<0.05$ fue considerado como significativo.



10. RESULTADOS

10.1 Respuesta contráctil del íleon de cobayo sometido a diferentes grados de HIPOXIA *in vitro*

En este grupo de experimentos, para inducir diferentes grados de hipoxia *in vitro*, los segmentos intestinales se sometieron a un burbujeo con 80, 20 ó 5% de oxígeno durante 80 min. Después, se restauraron las concentraciones habituales de oxígeno (al 95%) y se dejó reposar a los tejidos durante 20 min (reperfusión). Bajo estas condiciones, se determinaron las alteraciones funcionales en la respuesta contráctil a estímulos químicos o eléctricos de los tejidos sometidos a diversos grados de hipoxia.

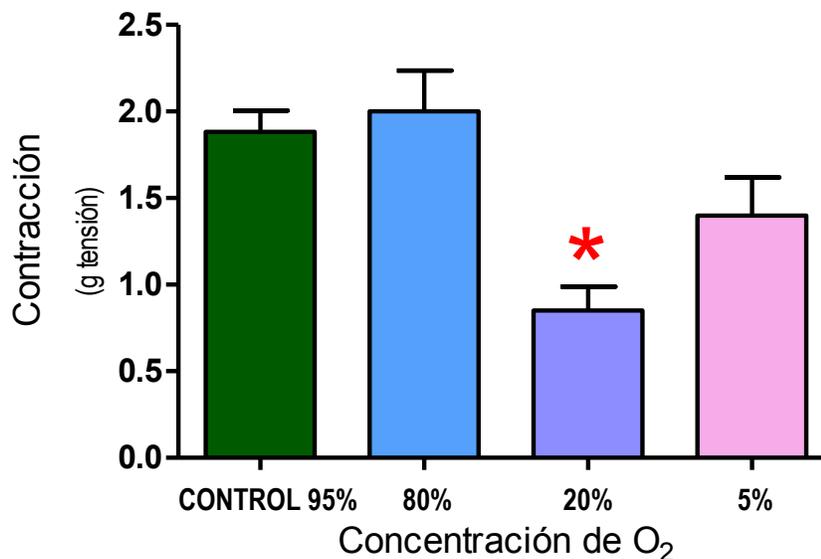


Figura 13. Contracción inducida por estimulación eléctrica (0.3 ms de duración, 3 Hz de frecuencia y 14 volts de intensidad) en íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. El asterisco muestra diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo control (barra verde), con oxígeno al 95% ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).



Como se puede observar en la figura 13, en los tejidos sometidos hipoxia con 80% de oxígeno no se alteró la respuesta contráctil inducida por la estimulación eléctrica en comparación con su respuesta control con oxígeno al 95% (2.0 ± 0.23 vs 1.88 ± 0.12 g de tensión). Sin embargo, en los tejidos sometidos a hipoxia con concentraciones de 20 y 5% de oxígeno, la respuesta contráctil de los tejidos a la estimulación eléctrica disminuyó en un 50 y 20%, respectivamente en comparación a su respuesta control. Esta disminución sólo alcanzó significancia estadística en los tejidos sometidos a hipoxia con 20% de oxígeno (0.85 ± 0.13 vs 1.88 ± 0.12 g de tensión, $P < 0.05$, ANOVA seguida por una prueba de Dunnett); pero no en los tejidos sometidos a 5% de oxígeno (1.40 ± 0.21 vs 1.88 ± 0.12 g de tensión).

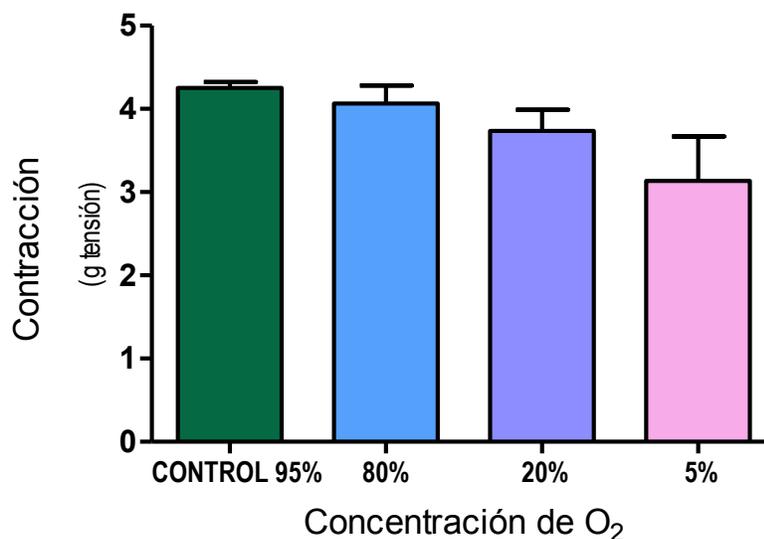


Figura 14. Contracción inducida por acetilcolina (ACh, 1×10^{-5} M) en segmentos de íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. La barra verde representa la respuesta de los tejidos en condiciones control, con oxígeno al 95%.



Con relación a la respuesta de los tejidos inducida por estimulación química con acetilcolina, la hipoxia disminuyó la respuesta contráctil de manera dependiente de la concentración de oxígeno (80, 20 y 5% de oxígeno) en un 7, 9 y 25%, respectivamente, con relación a la respuesta del tejido sin hipoxia (Control, 95% de oxígeno) (Figura 14). Sin embargo, la disminución en la respuesta de los tejidos sometidos a diferentes grados de hipoxia no mostró diferencia significativa respecto a los tejidos control (4.06 ± 0.21 , 3.73 ± 0.25 , 3.13 ± 0.53 vs 4.25 ± 0.07 g de tensión).

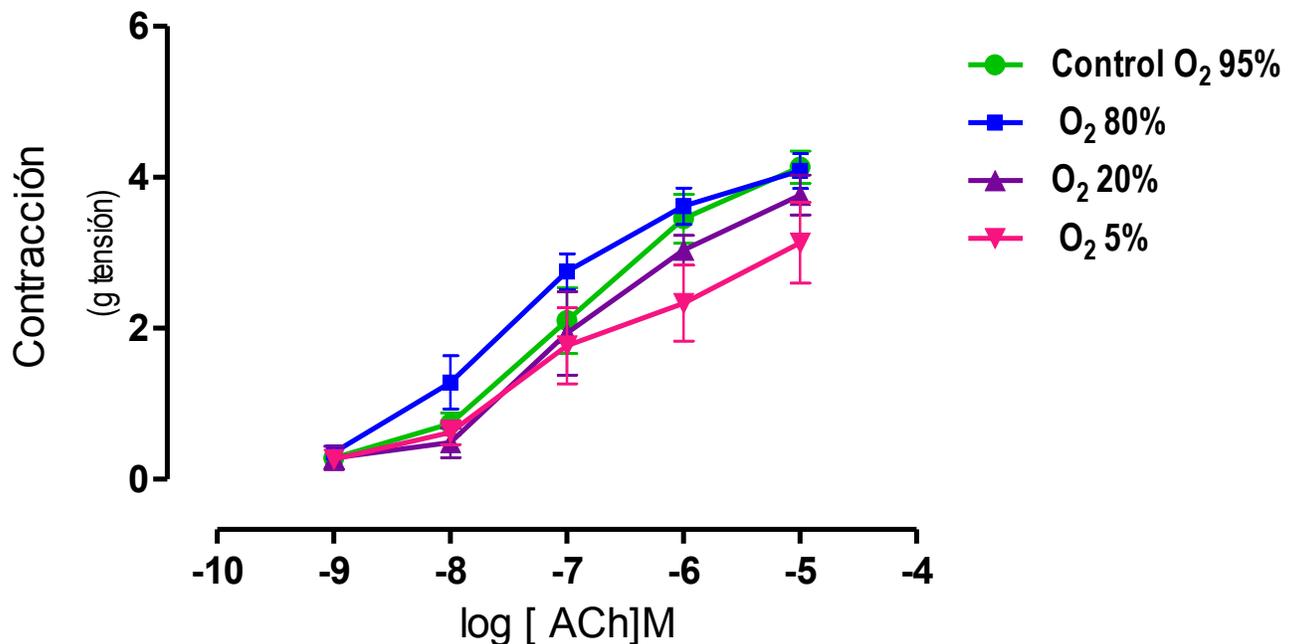


Figura 15. Curva concentración respuesta de contracción expresada en gramos de tensión de ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno.

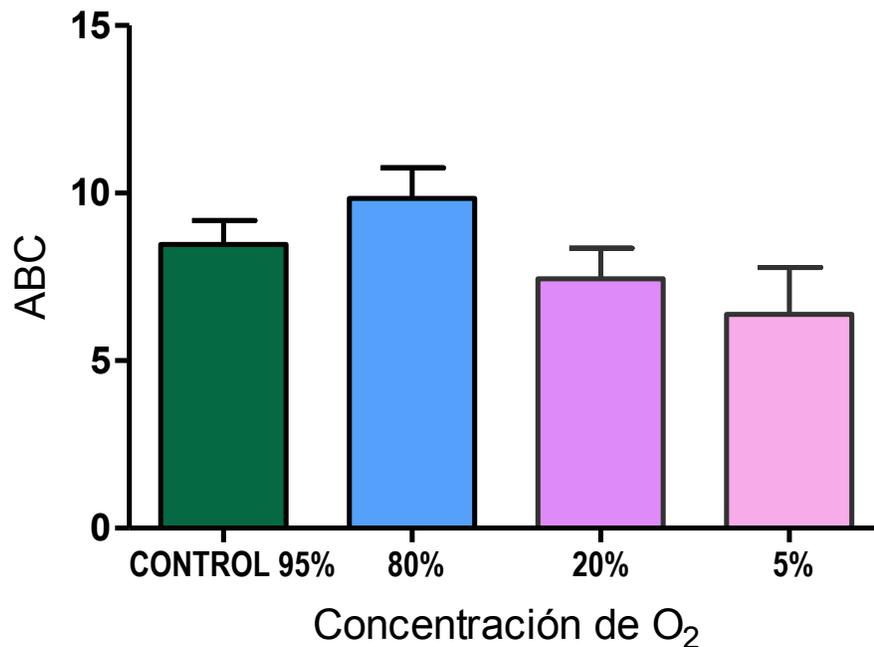


Figura 16. Área Bajo la Curva (ABC) de la respuesta contráctil inducida por ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en el íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones (ANOVA, NS).

Por otro lado, las curvas concentración respuesta-contráctil inducidas por acetilcolina (1×10^{-9} a 1×10^{-5} M) muestran que existe una ligera disminución en la respuesta de los tejidos sometidos a concentraciones bajas de oxígeno (5%), respecto a la respuesta de tejidos control (Figura 15); sin embargo, para analizar el efecto global de la acetilcolina sobre tejidos sometidos a los diferentes grados de hipoxia, se obtuvieron las áreas bajo la curva (ABC) a partir de las curvas concentración respuesta de los tejidos sometidos a este tratamiento. El análisis del área bajo la curva confirma que sólo los tejidos sometidos a hipoxia con 5% de oxígeno muestran una disminución en la respuesta contráctil de aproximadamente el 18%, respecto al control; sin embargo, esta disminución no alcanzó significancia estadística (6.38 ± 1.4 vs 8.46 ± 0.70 g de tensión) (Figura 16).

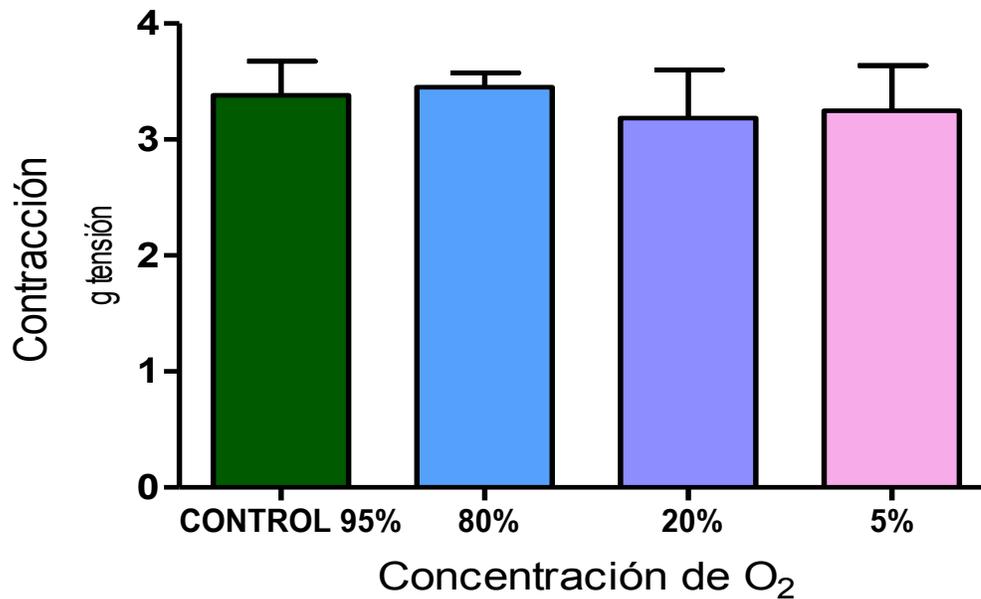


Figura 17. Contracción inducida por KCl (3.2×10^{-2} M) en íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones.

Finalmente, ninguna de las condiciones de hipoxia (con 80, 20 ó 5% de oxígeno) alteró la respuesta contráctil inducida por KCl en comparación a los tejidos control (3.45 ± 0.12 , 3.18 ± 0.41 , 3.25 ± 0.38 vs 3.38 ± 0.29 g de tensión, respectivamente) (Figura 17). Tampoco la respuesta contráctil inducida químicamente con BaCl₂ (Figura 18) se alteró en tejidos sometidos a hipoxia (con 80, 20 o 5% de oxígeno) (4.23 ± 0.11 , 4.18 ± 0.19 , 4.2 ± 0.31 vs 3.68 ± 0.20 g de tensión, respectivamente).

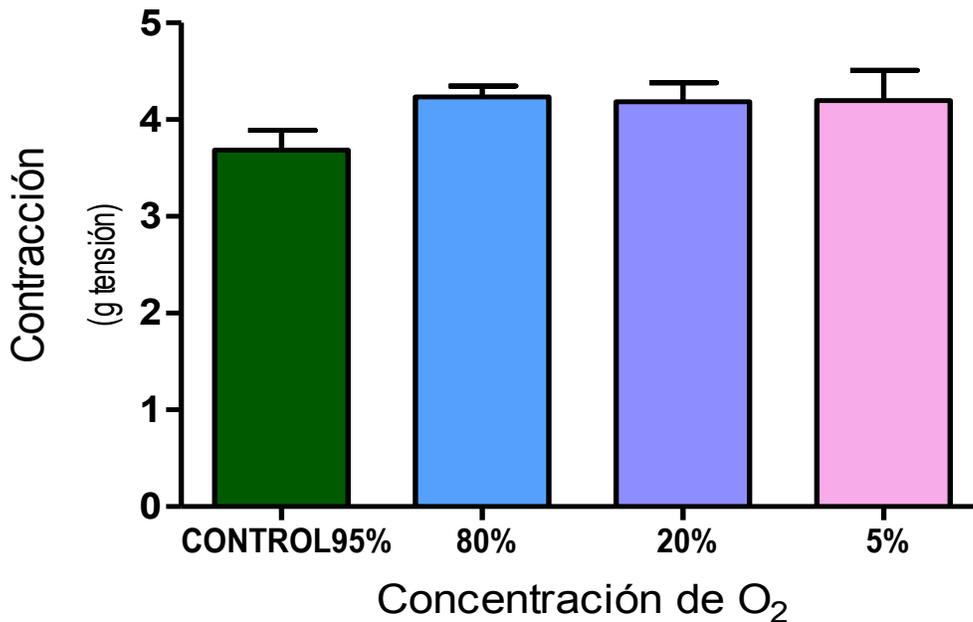


Figura 18. Contracción inducida por BaCl₂ (1 x 10⁻² M) en íleon de cobayo sometido a hipoxia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media ± error estándar de 6 preparaciones.

10.2 Respuesta contráctil del íleon de cobayo sometido a diversas condiciones de ISQUEMIA *in vitro*

En este grupo de experimentos, para inducir la isquemia *in vitro* en los segmentos intestinales, se utilizó solución Krebs sin glucosa y se analizaron las alteraciones funcionales en la respuesta contráctil producidas por diversas concentraciones de oxígeno en los tejidos intestinales bajo estas condiciones experimentales.

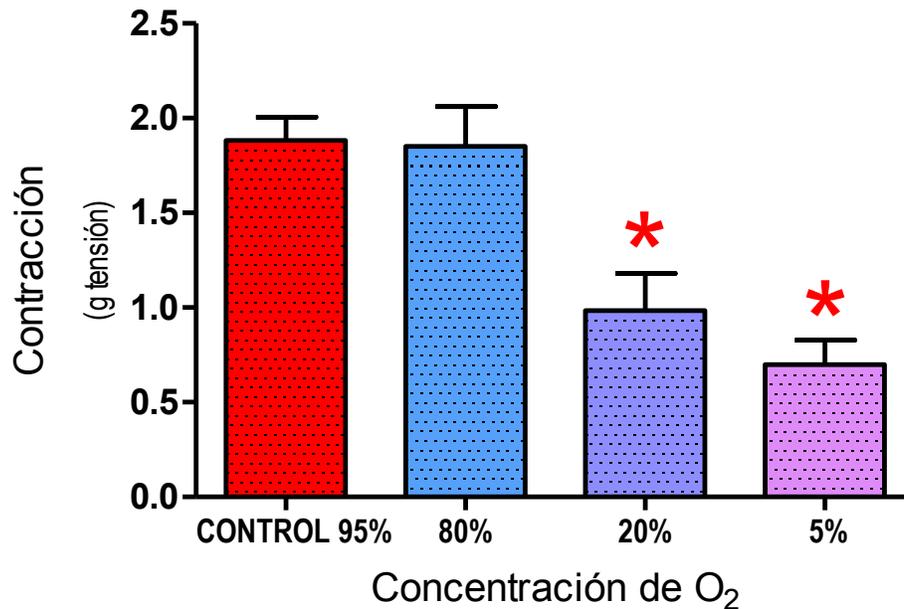


Figura 19. Contracción inducida por estimulación eléctrica (0.3 ms de duración, 3 Hz de frecuencia y 14 volts de intensidad) en íleon de cobayo sometido a isquemia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. El asterisco muestra diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo control con oxígeno al 95% ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Como se puede observar en la figura 19, la isquemia *in vitro* disminuyó de manera dependiente de la concentración de oxígeno la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica en aproximadamente el 42 y 68% con la concentración de oxígeno del 20 y 5%, respectivamente. Esta disminución fue significativamente diferente respecto al grupo control (95% de oxígeno) (0.98 ± 0.19 , 0.70 ± 0.12 vs 1.88 ± 0.12 g de tensión, $P < 0.05$, ANOVA, seguida por una prueba de Dunnett). Sin embargo, la isquemia inducida con 80% de oxígeno no alteró significativamente la respuesta contráctil de los tejidos a la estimulación eléctrica respecto al control (1.85 ± 0.21 vs 1.88 ± 0.12 g de tensión).

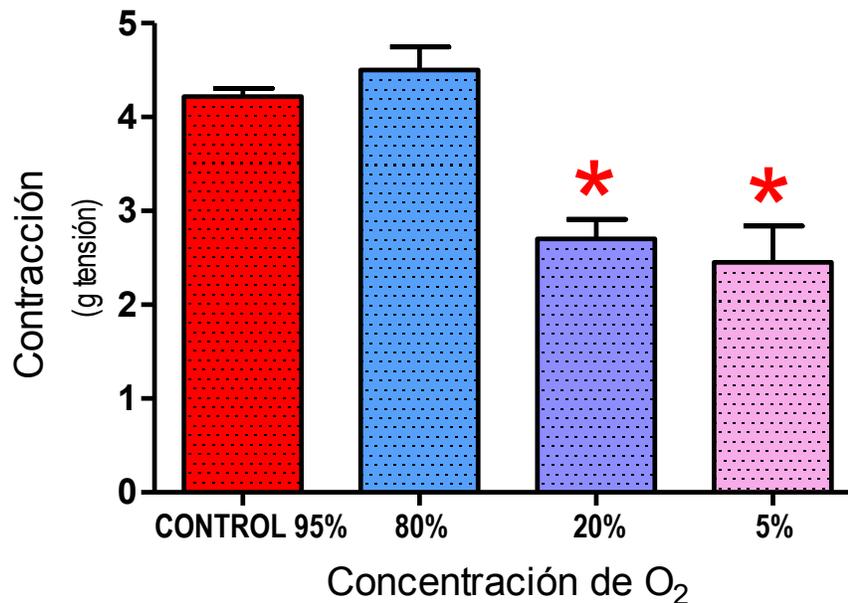


Figura 20. Contracción inducida por ACh (1×10^{-5} M) en fleón de cobayo sometido a isquemia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. El asterisco muestra diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

De la misma manera como se comportaron los tejidos sometidos a isquemia a la estimulación eléctrica, con la estimulación química con acetilcolina, la isquemia *in vitro* disminuyó de manera dependiente de la concentración de oxígeno la respuesta contráctil inducida por la ACh en aproximadamente el 42 y el 50% con la concentración de oxígeno del 20 y 5%, respectivamente (Figura 20). Esta disminución fue significativa respecto al grupo control (95% de oxígeno) (2.70 ± 0.20 , 2.45 ± 0.39 vs 4.21 ± 0.09 g de tensión, $P < 0.05$, ANOVA, seguida de una prueba de Dunnett). Sin embargo, la isquemia inducida con 80% de oxígeno no alteró significativamente la respuesta contráctil de los tejidos a la acetilcolina



respecto al grupo control (4.50 ± 0.24 vs 4.21 ± 0.09 g de tensión, respectivamente).

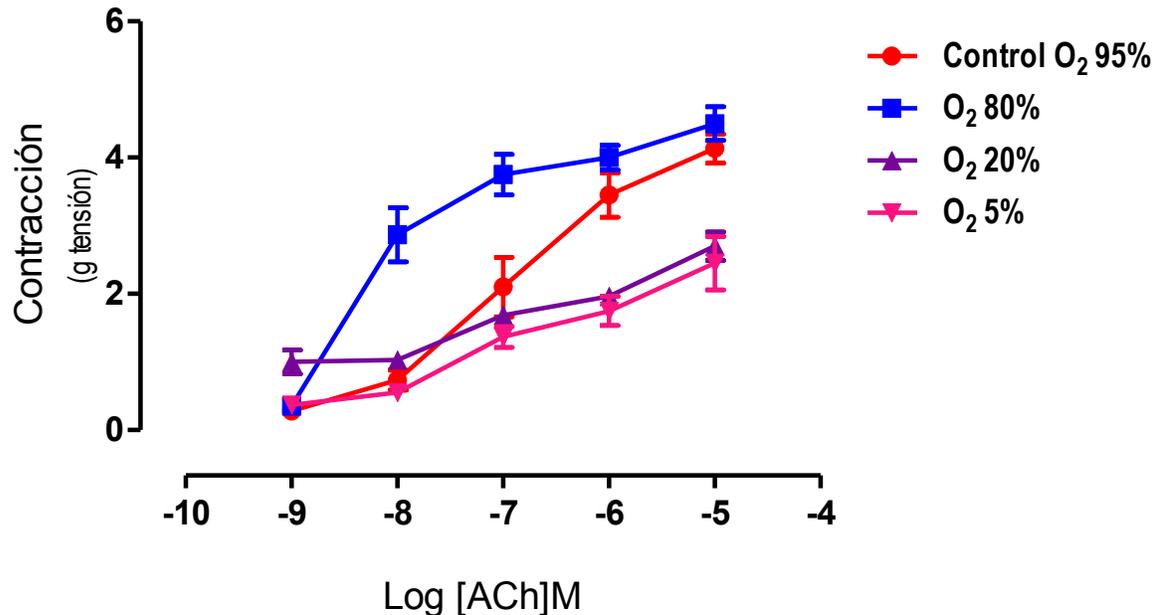


Figura 21. Curva concentración respuesta de contracción expresada en gramos de tensión de ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a isquemia con varias concentraciones de oxígeno.

Por otro lado, las curvas concentración respuesta-contráctil inducidas por acetilcolina (1×10^{-9} a 1×10^{-5} M) muestran que la isquemia *in vitro* alteró la respuesta de los tejidos a la acetilcolina en todas las concentraciones de oxígeno utilizadas en este protocolo con respecto a los tejidos control (Figura 21).

Para analizar cómo se alteró de manera global la respuesta de los tejidos a la acetilcolina por la isquemia *in vitro*, se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) a partir de las curvas concentración respuesta a acetilcolina. El análisis de las áreas bajo la curva muestra que los tejidos sometidos a isquemia con 80% de oxígeno



incrementaron su respuesta contráctil a la ACh en aproximadamente un 72% respecto a los tejidos control. Por el contrario, la isquemia *in vitro* con oxígeno al 20 y 5%, disminuyeron la respuesta contráctil a la acetilcolina en aproximadamente 20 y 43% respecto al control, respectivamente. Estas alteraciones en la respuesta contráctil a acetilcolina mostraron una diferencia significativa en los tejidos isquémicos con oxígeno al 80% y al 5% (13.02 ± 0.70 y 5.05 ± 0.60 vs 8.46 ± 0.70 g de tensión, $P < 0.05$, ANOVA, seguida de una prueba de Dunnett); mientras que la disminución en la respuesta a acetilcolina en los tejidos con isquemia con 20% de oxígeno, no mostró diferencia significativa (6.50 ± 0.31 vs 8.46 ± 0.70 g de tensión) (Figura 22).

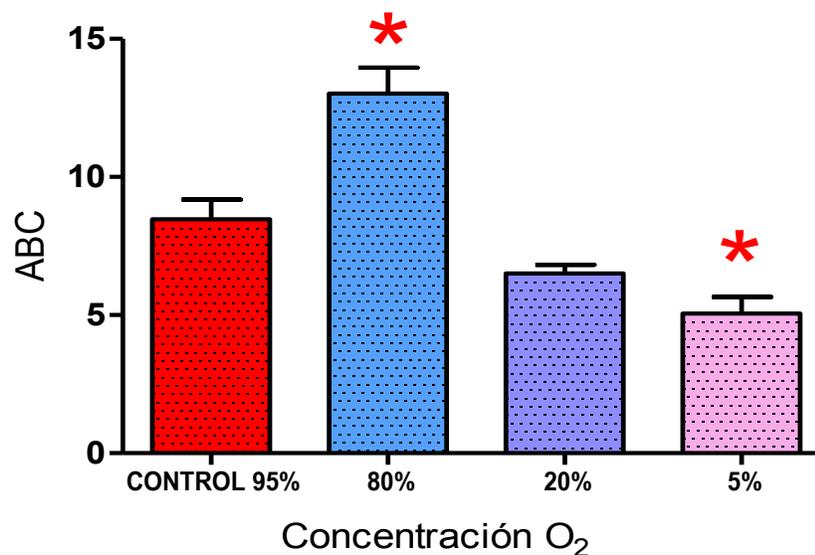


Figura 22. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a isquemia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. El asterisco muestra diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido de Dunnett).



Finalmente, la isquemia *in vitro* con 20 y 5% de oxígeno disminuyó en aproximadamente el 16 y el 58%, respectivamente, la respuesta contráctil inducida por KCl en comparación a los tejidos control; sin embargo esta disminución sólo mostro diferencia significativa en los tejidos sometidos a isquemia con 5% de oxígeno (1.60 ± 0.24 vs 3.38 ± 0.29 g de tensión, $P < 0.05$, ANOVA seguido de una prueba de Dunnett) (Figura 23). Por el contrario, la respuesta contráctil inducida químicamente con BaCl_2 (Figura 24) no alteró la respuesta de los tejidos sometidos a isquemia con ninguna de las concentraciones de oxígeno utilizadas (80, 20 y 5% de oxígeno) (3.96 ± 0.27 , 3.26 ± 0.21 y 2.86 ± 0.30 vs 3.68 ± 0.20 g de tensión, respectivamente).

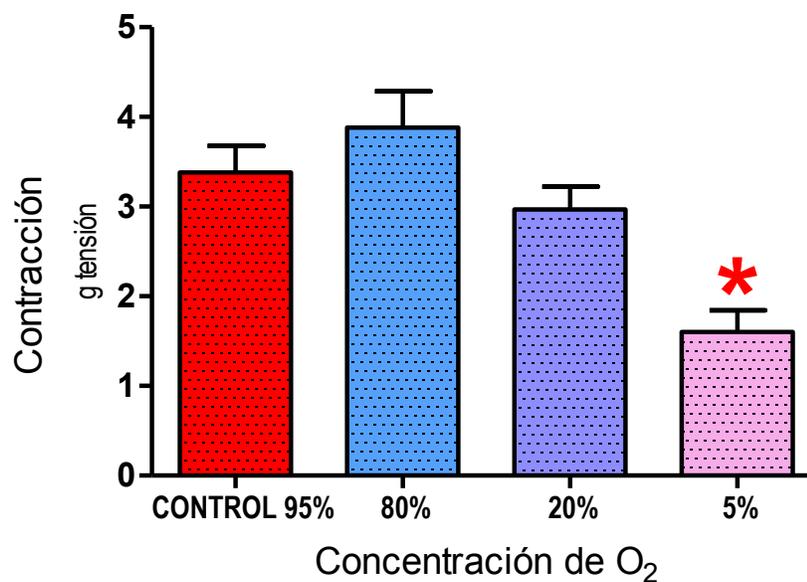


Figura 23. Contracción inducida por KCl (3.2×10^{-2} M) en fleón de cobayo sometido a isquemia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. El asterisco muestra diferencia significativa del tratamiento con respecto al grupo control, con 95% de oxígeno ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

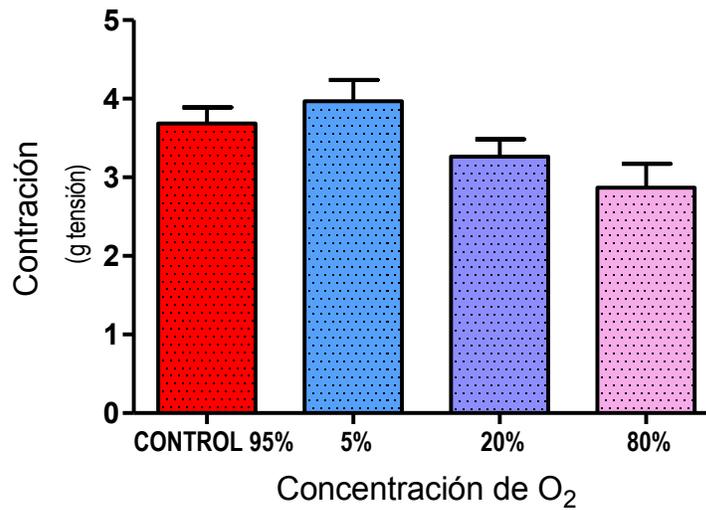


Figura 24. Contracción inducida por BaCl₂ (1x10⁻² M) en íleon de cobayo sometido a isquemia *in vitro* con varias concentraciones de oxígeno. Cada barra representa la media ± error estándar de 6 preparaciones.

Cuadro 2. Efecto contráctil inducido por estimulación química y eléctrica de los tejidos sometidos a hipoxia e isquemia *in vitro*.

[] Oxígeno	EE		ACh		KCl		BaCl ₂	
	Hipoxia	Isquemia	Hipoxia	Isquemia	Hipoxia	Isquemia	Hipoxia	Isquemia
80 %	2.0±0.23	1.85±0.21	4.06±0.21	4.50±0.24	3.45±0.12	3.88±0.40	4.23±0.11	3.96±0.27
20%	0.85±0.13	0.98±0.19	3.73±0.25	2.70±0.20	3.18±0.41	2.96±0.25	4.18±0.19	3.26±0.21
5%	1.40±0.21	0.70±0.12	3.13±0.53	2.45±0.39	3.25±0.38	1.60±0.24	4.20±0.31	2.86±0.30
Control 95%	1.9±0.12	1.9±0.12	4.25±0.07	4.21±0.09	3.38±0.29	3.38±0.29	3.68±0.20	3.68±0.20

En el cuadro 2 se muestra la respuesta contráctil a los diferentes tipos de estimulación de los tejidos sometidos a hipoxia ó isquemia *in vitro*. Como se puede observar, la disminución de la respuesta contráctil fue más evidente en los tejidos sometidos a isquemia que en los tejidos sometidos a hipoxia.



11. DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos modelos experimentales que faciliten la búsqueda de fármacos neuroprotectores para el daño inducido por la isquemia es el principal propósito de varios grupos de investigadores.^{21, 22, 26, 27,39} En este contexto, en el laboratorio donde se desarrolló el presente estudio, recientemente se propuso la utilidad del modelo de isquemia intestinal *in situ* en el íleon de cobayo para el cernimiento farmacológico de compuestos con posible efecto neuroprotector. Esta propuesta se basa en la presencia de un circuito neuronal (el sistema nervioso entérico) en este tejido.²⁷ Como ya se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el sistema nervioso entérico (SNE) es una red neuronal organizada en dos plexos ganglionares, mientérico y submucoso; conformados por neuronas y células gliales entéricas. Estas neuronas son responsables de controlar la actividad del músculo liso del tracto gastrointestinal, la secreción de mucosa y el flujo sanguíneo, entre otras funciones. Al igual que en las neuronas del SNC, en las del SNE se lleva a cabo la síntesis y liberación de diversos neurotransmisores²⁸ que, al interactuar con los receptores de membrana de las células del músculo liso del intestino, inducen movimientos intestinales “independientes” del SNC, entre otras funciones.⁴⁰

Sin embargo, en el modelo de isquemia intestinal *in situ* propuesto por Rodríguez y cols. (2006) no ha sido posible tener un control apropiado de las concentraciones de oxígeno que permitan determinar el daño neuronal en



diferentes condiciones de hipoperfusión; por lo tanto, con el propósito de tener un mayor control sobre las variables de este modelo en este estudio se determinaron las alteraciones funcionales inducidas por la isquemia ó hipoxia en el íleon de cobayo variando las concentraciones de oxígeno a través de un sistema *in vitro*.

Los resultados del presente estudio demuestran que la hipoxia *in vitro* disminuye moderadamente la respuesta contráctil del tejido a la estimulación eléctrica sólo de los tejidos sometidos a una concentración intermedia de oxígeno (20 %); mientras que, en los tejidos isquémicos, esta respuesta disminuye de manera dependiente a la concentración de oxígeno. Estos resultados sugieren que las neuronas mientéricas del íleon de cobayo son más sensibles al daño inducido por isquemia que por hipoxia.⁴¹

La disminución en la respuesta del íleon de cobayo a la estimulación eléctrica se ha relacionado directamente con el daño neuronal,²⁷ ya que se sabe que la estimulación eléctrica de larga duración induce la liberación de más de un neurotransmisor como consecuencia de la generación de potenciales de acción. Esta respuesta contráctil presenta un componente fásico inicial provocado por la liberación de acetilcolina y por neurotransmisores no adrenérgicos, así como un componente tónico que se mantiene en mayor parte por las prostaglandinas liberadas.⁴² Por lo que las respuestas contráctiles del músculo liso del íleon a la estimulación eléctrica se consideran el producto de la propagación de los potenciales de acción que inducen la liberación local de los neurotransmisores.^{42,43} Posteriormente, los neurotransmisores liberados activan a sus receptores en la superficie de las células del músculo liso induciendo la activación de diversos



sistemas de transducción que resultan en el incremento de la concentración intracelular de calcio. El calcio activa a las cinasas de miosina de cadena corta, fosforilándolas y activando a la miosina II, produciendo la contracción del tejido.^{27,38,44}

La mayor sensibilidad al daño sobre las neuronas mientéricas producida por la isquemia puede ser consecuencia de la ausencia tanto de oxígeno como de glucosa que se induce durante este proceso; produciendo una disminución en la síntesis de ATP.¹⁶ Esto resulta en un daño en las bombas de Na^+ y K^+ originando una depleción de K^+ intracelular y ocasionando despolarización de la membrana neuronal,^{11,45} hecho que promueve la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje e induce la liberación de aminoácidos excitadores como glutamato en el espacio sináptico. El exceso de glutamato sobreestimula a los receptores AMPA, NMDA, e induce un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, el cual activa diversas enzimas líticas como proteasas, lipasas y endonucleasas que destruyen componentes celulares, esto facilita la síntesis de óxido nítrico⁴⁶ y la formación de radicales libres derivados de óxido nítrico (peroxinitritos), desacoplando la fosforilación oxidativa y comprometiendo aún más la disponibilidad energética,⁴⁵ lo que finalmente produce la muerte neuronal.

En el caso de los resultados de los tejidos sometidos a hipoxia, su mecanismo de daño parece ser menos severo, ya que se sabe que en condiciones de hipoxia los eventos bioquímicos que producen daño neuronal son ligeramente diferentes porque durante este proceso el metabolismo de las células cambia.



El metabolismo de las células neuronales es aeróbico por medio de la fosforilación oxidativa que produce ATP por lo que requiere de un constante suministro de oxígeno que se obtiene a través del flujo sanguíneo.^{14,15,17,27,47} La hipoxia obstaculiza esta vía metabólica y debido a la insuficiente disponibilidad de ATP, la célula consume glucosa más rápido en un intento de producirlo a través de la glucólisis anaeróbica, que es un proceso menos eficiente energéticamente y que produce desechos metabólicos incluidos el lactato que pueden acumularse y llegar a concentraciones tóxicas, esto también hace que caiga el pH celular además de promover la síntesis de NO y especies reactivas de oxígeno.^{14,17} Todos estos eventos pueden resultar en la muerte celular,^{18,19,20} sin embargo cabe aclarar que este proceso requiere de un mayor periodo de tiempo para propiciar la muerte que la isquemia.¹⁴

Por otro lado, la respuesta contráctil tanto de los tejidos isquémicos como de los tejidos hipóxicos a la acetilcolina fue similar a la respuesta de éstos a la estimulación eléctrica, sugiriendo también que las neuronas son más susceptibles al daño por isquemia que por hipoxia bajo nuestras condiciones experimentales. Esto se deduce porque el mecanismo por el cual la ACh produce contracción intestinal involucra tanto un componente muscular como neuronal.

En el músculo liso intestinal se encuentran los receptores de membrana, cuya función principal es la transducción de señales provenientes de las neuronas, estos pueden dividirse en dos tipos: los receptores que permiten la apertura de canales iónicos, como los nicotínicos para ACh, GABA_A, los de glicina y un segundo tipo de receptor que interactúa con proteínas G, como los colinérgicos de



tipo muscarínico,³³ estos últimos pueden ser de subtipo M_1 - M_5 .^{34,35,36,37} En el músculo liso, en su mayoría, los receptores presentes son los subtipos M_2 y M_3 .^{33,35,36} Al parecer el mecanismo por el cual actúa la acetilcolina en el músculo liso es activando a los receptores M_3 , los cuales se encuentran acoplados a una proteína Gq, la cual activa la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) a través de la fosfolipasa C (PLC). De esta hidrólisis se obtiene el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG).³⁸ Cuando el IP_3 se une a sus receptores en el retículo endoplásmico, se produce un cambio conformacional que origina la apertura de canales de calcio, promoviendo su liberación de los almacenes intracelulares.³³ El Ca^{2+} se une a la calmodulina y el complejo formado activa a la cinasa de miosina de cadena corta (MCKK), la cual fosforila a la miosina haciendo que se desplace entre los filamentos de actina, generando así, la respuesta contráctil en las fibras musculares del músculo liso.^{27,38,45}

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados del presente estudio, la disminución en la respuesta contráctil de los tejidos isquémicos inducida por acetilcolina a concentraciones intermedias y bajas de oxígeno sugiere un daño en las neuronas y/o una disminución funcional de las mismas a causa de: 1) el proceso de isquemia que desencadena eventos como la alteración en la generación de potenciales de acción o bien, 2) de la reperfusión que desencadena eventos dañinos, principalmente la generación de radicales libres que pueden tener como consecuencia la muerte neuronal.^{45,48,49} Los resultados podrían indicarnos de igual manera un daño muscular reflejado en la disminución de la fuerza contráctil al estímulo del neurotransmisor.



Con relación a los resultados de la respuesta de los tejidos estimulados con potasio (KCl), los resultados muestran que sólo con la isquemia a bajas concentraciones de oxígeno (5%) disminuyó la respuesta contráctil del tejido inducida químicamente por KCl. Estos resultados sugieren un daño ocasionado por los eventos bioquímicos de la isquemia pero a muy bajas concentraciones de oxígeno.

El cloruro de potasio (KCl) produce contracción en el íleon de cobayo inducido por despolarización de la membrana celular debido a un aumento de potasio intracelular y una disminución del potencial de membrana. Esta despolarización induce la liberación de Ca^{2+} intracelular el cual promueve la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina, de las neuronas mientéricas.^{32,33} Por otro lado, en la musculatura lisa el KCl sigue directamente un mecanismo electromecánico donde la elevada concentración de K^+ extracelular induce la despolarización de la membrana promoviendo la apertura de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} tipo L, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula.^{50,51} El calcio se une a la calmodulina para activar a la cinasa de miosina de cadena corta, que fosforila a la miosina para que se desplace entre los filamentos de actina y se genere la contracción.³⁸

Finalmente, ni la isquemia ni la hipoxia alteraron la respuesta contráctil de los tejidos a la estimulación química con BaCl_2 . La administración del cloruro de bario en este modelo tiene como propósito comprobar la integridad de las células musculares en esta preparación, ya que se sabe que el bario, produce contracción



del íleon de cobayo actuando específicamente en el tejido muscular independientemente de la integridad de las células neuronales.⁵² El ión Ba^{2+} al pertenecer a la misma familia periódica del Ca^{2+} tiene propiedades similares. Se han propuesto dos mecanismos por los cuales el Ba^{2+} induce la contracción en el músculo liso: 1) Que el bario actúa mediante el aumento de la afluencia de calcio extracelular o para liberar calcio de los almacenes intracelulares; o bien, 2) el bario actúa directamente sobre los mecanismos de regulación contráctil intracelular del músculo liso para producir la contracción sin requerimiento de Calcio, a través de la formación de un complejo Ba^{2+} -calmodulina.^{53,54} Lo que sí es claro es que el bario actúa directamente a nivel de músculo liso, sugiriendo que ni la hipoxia ni la isquemia *in vitro* inducen daño sobre la maquinaria contráctil en el íleon de cobayo. Esto confirma que las neuronas mientéricas son más susceptibles al daño inducido por isquemia y/o hipoxia que las células del músculo liso.



12. CONCLUSIONES

1. La hipoxia produjo una disminución en la sensibilidad a la respuesta contráctil inducida por el estímulo eléctrico del íleon aislado de cobayo, pero sólo a concentraciones intermedias de oxígeno, sugiriendo un posible daño neuronal en estas condiciones.
2. Sin embargo, la hipoxia no fue capaz de producir ninguna alteración en la respuesta contráctil del íleon de cobayo a los diversos estímulos químicos (ACh, KCl y BaCl₂); sugiriendo que en estas condiciones no se produce daño en el músculo liso intestinal.
3. Por otro lado, la isquemia inducida con concentraciones intermedias a bajas de oxígeno produjeron una disminución en la respuesta contráctil del íleon aislado de cobayo inducidas por estímulo eléctrico y químico con ACh y KCl de forma concentración dependiente, sugiriéndonos que bajo estas condiciones experimentales se produce daño neuronal.
4. Por el contrario, la isquemia no alteró la repuesta contráctil inducida por BaCl₂ en el íleon aislado de cobayo, sugiriéndonos que bajo estas condiciones experimentales no se induce daño en las células del músculo liso intestinal.



5. Utilizando el modelo de íleon aislado de cobayo, el daño neuronal se induce en mayor proporción bajo condiciones de isquemia y no de hipoxia, por lo menos bajo las condiciones experimentales utilizadas con este modelo; por lo que la hipótesis del trabajo se cumplió.

6. Además se puede concluir que la integridad de las neuronas mientéricas es dependiente de la concentración de oxígeno, ya que a menor concentración de oxígeno es mayor el daño neuronal.

7. Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó que la isquemia *in vitro* con 5% de O₂ produce daño neuronal sin dañar las células musculares, por lo que podemos sugerir que bajo estas condiciones el modelo es adecuado para la evaluación de fármacos neuroprotectores.



13. PROPUESTAS

1. Se sugiere que para saber con más precisión en el proceso de isquemia la concentración de oxígeno que induce daño neuronal, se realice el estudio con más concentraciones intermedias en el rango de 20 a 80% de oxígeno y se prueben las concentraciones establecidas en este estudio en un rango más amplio de tiempo.
2. Se sugiere que se realicen pruebas experimentales de fármacos neuroprotectores en el modelo de íleon aislado de cobayo con las condiciones que se determinaron en este estudio, que corresponden a 5% de oxígeno y 80 minutos de isquemia *in vitro*.



14. REFERENCIAS:

1. Organización Mundial de la Salud. Manual de la OMS para la vigilancia paso a paso de accidentes cerebrovasculares. [Manual en internet]. Suiza: OMS, 2005.[Acceso 21 de agosto de 2013]. Disponible en <http://www.who.int/chp/steps/stroke/en/index.html>
2. Luis murillo, Instituto Panvascular de Occidente [sede web]. Guadalajara Jalisco: Luis Murillo; 2006 [acceso 20 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://www.institutopanvascular.com/> y <http://www.ipao.com.mx/evc.htm>
3. Díez Tejedor E, Del Brutto O, Alvarez Sabín J, Muñoz M, Abiusí G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares Sociedad Iberoamericana de ECV. Acta Neurol Colomb. 2001; 17(4): 335-346.
4. Leiguarda RC. Neurología. Buenos Aires Argentina : El ateneo; 2005.
5. Blanco González M, Arias Rivas S, Castillo Sánchez J. Diagnóstico del accidente cerebrovascular isquémico. Protocolos de práctica asistencial. Medicine. 2011; 10(72): 4919-4923.
6. Trouillas P, Nighoghossian N, Derex L. Tratamiento de los accidentes cerebrovasculares. EMC - Anestesia-Reanimación 2002:1-9 [Article 36-911-A-10].
7. Mendoza N. Farmacología médica. México: Panamericana; 2008.
8. Davis SM, Donnan GA, Parsons MW, Levi C, Butcher KS, Peeters A et. al. Effects of alteplase beyond 3h after stroke in Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial. Lancet Neurol. 2008; 7: 299-309.



9. Miller J, Elmore S. ¡Aviso de accidente vascular cerebral!. *Nursing*. 2006; 24(3): 14-19.
10. Martínez- Vila E, Murie- Fernández M, Pagola I, Irimia P. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine*. 2011; 10(72): 4871-4881.
11. Castillo J, Álvarez-Sabín J, Dávalos A, Díez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Vila E, et. al. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*. 2003; 18(3): 368-384.
12. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosur*. 2009; 111: 483-495.
13. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008 ; 55 : 310-318.
14. Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther*. 1998; 80(2): 203-229.
15. Small DL, Morley P, Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc dis*. 1999; 42(3): 185-207.
16. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 289-309.
17. Rehncrona S, Rosén I, Siesjö BK. Brain Lactic Acidosis and Ischemic Cell Damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metabol*. 1981; 1(3): 297-311.
18. Lee KA, Roth RA, LaPres JJ. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol Therapeut*. 2007; 113: 229-246.
19. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *BBA-Bioenergetics*. 2010; 1797: 1171-1177.



20. Gatz RN, Piiper J. Anaerobic energy metabolism during severe hypoxia in the lungless salamander *desmognathus fuscus* (plethodontidae). *Resp Physiol.* 1979; 38: 377-384.
21. García-Bonilla L, Rosell A, Torregrosa G, Salom JB, Alborch E, Gutiérrez M, et. al. Guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus. *Neurología.* 2011; 26(2): 105-110.
22. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, et. al. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol.* 2008; 47 (8): 414-26.
23. Green AR, Odergren T, Ashwood T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(8): 402-408.
24. Peddireddy MKR. *In vitro* evaluation techniques for gastrointestinal motility. *Ind J Pharm Edu Res.* 2011; 45(2): 184-191.
25. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental models Pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Be.* 2007; 87: 179-197.
26. Hossmann KA. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 2008; 55: 257-270.
27. Rodriguez R, Ventura-Martínez R, Santiago-Mejía J, Ávila-Costa MR, Fortoul TI. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. *Brit J Pharmacol.* 2006; 147: 371-378.



28. Serio R, Zizzo MG, Mastropaolo M. The enteric nervous system: New developments and emerging concepts. *Malta Medical Journal*. 2011; 23 (3).
29. Furness JB. *The enteric nervous system*. Usa: Blacwell Publishing; 2006.
30. Benarroch EE. Enteric nervous system functional organization and neurologic implications. *Neurology*. 2007; 69: 1953-1957.
31. Romero-Trujillo JO, Frank-Márquez N, Cervantes-Bustamante R, Cadena-León JF, Montijo-Barrios E, Zárate-Mondragón F, et. al. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex*. 2012; 33(4): 207-214.
32. Galligan JJ. Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol*. 2002; 2(6):623-9.
33. Flores Soto ME, Segura Torres JE. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*. 2005; 6 (4): 315-26.
34. Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytoc*. 2010; 44: 173-202.
35. Brett A, Jones CK. Cholinergic Neurotransmission. En: Robertson D, Biaggioni I, Burnstock G, Low P A, Paton J FR. *Primer on the Autonomic Nervous System* 3^a ed. San Diego California: Elsevier Academic Press; 2012. p 71-4.
36. Eglén RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Physiol Rev*. 1996; 48 (4): 531-65.
37. Piccioto MR, Alreja M, Jentsch JD. Acetylcholine. En: Davis KL, Charney D, Coyle J T, Nemeroff C, editores. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. 1^a ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott, Williams, & Wilkins; 2002.



p 3-14. [acceso 8 de agosto del 2013]. Disponible en <http://www.acnp.org/publications/neuro5thgeneration.aspx>

38. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Farmacología. 7a edición. Barcelona españa: Elsevier; 2012.
39. Prieto-Arribas R, Pascual-Garvi JM, González-Llanos F, Roda JM. ¿Cómo reparar el daño cerebral isquémico? Utilidad de los modelos experimentales en la búsqueda de respuestas. Neurología. 2011; 26(2): 65-73.
40. Costa M, Brookes SJH, Henning GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. Gut. 2000; 47 (Suppl 7): iv 15-19.
41. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal Motility during Hypoxia and Reoxygenation *in vitro*. Digest Dis Sci. 1997; 42(5): 878-884.
42. Radomirov R, Venkova K. Pharmacological characteristics of the postsynaptically mediated contractile responses of guinea-pig ileum to long-lasting electrical field stimulation. Neuropharmacology. 1988; 27(7): 729-35.
43. Ren J, Galligan JJ. Dynamics of fast synaptic excitation during trains of stimulation in myenteric neurons of guinea-pig ileum. Auton Neurosci. 2005; 117: 67-78.
44. Tortora G J, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 11ª edición. Editorial Panamericana ;2006
45. Hermes AK. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis Lecture. Am J Physiol. 1992; 263(5 Pt 2):H1356-62.
46. Corbett AD, Less GM. Depressant effects of hypoxia and hypoglycemia on neuro-effector transmission of guinea-pig intestine studied *in vitro* with a pharmacological model. Brit J Pharmacol. 1997; 120: 107-115.



47. Schaller B, Rudolf G. Cerebral ischemia and Reperfusion: the pathophysiology concept as a basis for clinical therapy. *J Cerebr Blood F Met.* 2004; 24: 351-71.
48. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Bio Med.* 2005; 38: 1433-1444.
49. White BC, Sullivan M, De Gracia DJ, O'Neil B, Neumar RW, Grossman LI. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179: 1-33.
50. Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J.* 2002; 364: 431-440.
51. Muneoka Y. Mechanical responses in potassium-depolarized smooth muscle of *mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol.* 1974; 47 A : 61-70..
52. Hansen T R, Dineen DX, Petrak R. Mechanism of action of barium ion on aortic smooth muscle. *Am J Physiol.* 1984; 246(3 Pt 1): C235-41.
53. Potreau D, Raymond G. Slow barium current and contraction on frog single muscle fibers. *J Physiol.* 1980; 303: 91-109.
54. Satoh S, Kubota Y, Itoh T, Kuriyama H. Mechanisms of the Ba²⁺-induced contraction in smooth muscle cells of the rabbit mesenteric artery. *J Gen Physiol.* 1987; 89: 215-37