

87 *2 ejes*



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## NIVELES DE ACETILCOLINA EN MEDULA OBLONGADA DE RATAS ESTIMULADAS CON DOXOPRAM Y ACUPUNTURA (PUNTO GV-26)

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P r e s e n t a :

**BENJAMIN C. GONZALEZ BRIZUELA**

México, D. F.

1981



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.

## I N D I C E.

TEMA	
RESUMEN.	... 1.
I. INTRODUCCION.	... 2.
I.1. POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE LA ACUPUNTURA.	... 2-3.
I.2. EFECTIVIDAD DEL PUNTO GV-26 PARA ESTIMULAR EL CENTRO RESPIRATORIO.	... 3-4.
I.3. JUSTIFICACION.	... 4.
I.4. OBJETIVO.	... 4-5.
II. MATERIAL Y METODOS.	... 5.
II.1. OBTENCION DE ACETILCOLINA (ACIDO-ETANOL).	... 6-7.
II.2. METODO ESPECTOFOTOMETRICO (SURPLUS).	... 7.
II.3. VALORACION DE DATOS.	... 8.
III. RESULTADOS.	... 9-10
IV. DISCUSION.	... 17-18.
V. CONCLUSIONES.	... 19.
VI. LITERATURA CITADA.	... 20-22.

NIVELES DE ACETILCOLINA EN MEDULA OBLONGADA DE RATAS  
ESTIMULADAS CON DOXOPRAM Y ACUPUNTURA (PUNTO GV-26).

BENJAMIN C. GONZALEZ BRIZUELA.

Asesor:

HECTOR SUMANO LOPEZ. M.V.Z. Ph.D.

RESUMEN:

Se efectuó una evaluación de los niveles de acetilcolina en médula oblongada de ratas wister, utilizándose para tal efecto tres grupos: grupo control 8 evaluaciones grupo estimulado con Doxopram 7 evaluaciones y grupo estimulado con acupuntura en el punto GV-26 7 evaluaciones.

El grupo estimulado con acupuntura (punto GV-26) - dio muestras de un incremento significativo en las lecturas de extinción en comparación con el grupo control. Sin embargo el grupo tratado con Doxopram, no mostro cambios significativos en las lecturas de extinción en comparación con el grupo control.

## I. INTRODUCCION.

En la práctica veterinaria una de las áreas más nuevas (y más viejas) que se han incluido como ayuda adicional para el clínico, es el uso de la acupuntura (Del lat. acus, aguja, y punctura, punzada.), sola o acompañada con la medicina tradicional (9).

No se ha considerado a la acupuntura como un sustituto de la medicina occidental, pero bien, puede considerarse como un instrumento adicional para la práctica veterinaria diaria (9,10).

Uno de los problemas a los que se enfrenta la acupuntura en la práctica veterinaria es la falta de pruebas fisiológicas y farmacológicas que experimentalmente apoye en los beneficios de la práctica (2,4,10).

### I.1. POSIBLES MECANISMOS DE ACCION DE LA ACUPUNTURA.

Se han identificado varios efectos logrados por la estimulación con acupuntura (11,19,25) sin embargo, no se sabe aún la causa que los provoca.

Estaría fuera de los objetivos de este trabajo enlistar la multitud de experimentos que proveen pruebas tangibles de la efectividad de la acupuntura. Sin embargo, cabe mencionar que la acupuntura tiene dentro de sus acciones, efectos locales en los cuales se regula la síntesis de prostaglandinas (11,22), se disminuye la liberación de histamina (10,11); y otros mediadores químicos involucrados en el proceso de la inflamación (10,22).

Además, se han encontrado varios puntos en el cuerpo que al ser estimulados aumentan la actividad del sistema -

nervioso autónomo (7,22), y consecuencia de esto se reconocen en la actualidad múltiples efectos bien definidos en el sistema cardiovascular (13,14).

La inhibición del dolor en la acupuntura, se ha relacionado con un efecto de "Puenteo". Este efecto se lleva a cabo en la sustancia gelatinosa de la médula espinal y se logra impidiendo que los estímulos del dolor pasen a través de los tramos ascendentes a la corteza cerebral (16,21).

Por otro lado, se ha postulado que el hipotálamo, y sobre todo el tálamo, son núcleos cerebrales claves en los cuales se inhibe el dolor, después de estimulación con acupuntura (12,16,21). Resulta particularmente interesante el señalar que también se ha demostrado después de la estimulación con acupuntura un incremento en la concentración de péptidos cerebrales (endorfinas y encefalinas) (15,20) que son los inhibidores del dolor en forma natural a nivel de receptores de la morfina (12, 23).

## I.2. EFECTIVIDAD DEL PUNTO GV-26 PARA ESTIMULAR EL CENTRO RESPIRATORIO.

Entre los múltiples efectos observados experimentalmente con acupuntura, se ha demostrado que el punto GV-26 tiene una marcada efectividad para estimular el centro respiratorio (3,14) y se ha demostrado que su estimulación nos permite restaurar la frecuencia respiratoria en perros con paro respiratorio, inducidos con una sobredosis de barbitúricos (23,24).

Nuevamente se desconoce como se logra este efecto y no hay estudios acerca de las modificaciones que puede sufrir el centro respiratorio. En cuanto al centro respiratorio, la evidencia acumulada a la fecha nos indica que el principal mediador químico de este centro es la acetilcolina (5,6,17,19).

### I.3. JUSTIFICACION.

En virtud del escepticismo que rodea esta disciplina y por no existir referencias que identifiquen el mecanismo de acción del punto GV-26 sobre el centro respiratorio, se considera de valor fisiológico el determinar si la estimulación en dicho punto tiene un efecto directo sobre el centro respiratorio que se podría observar a partir de los niveles de acetilcolina.

En virtud de que el centro respiratorio (nucleo neuromotórico, apnéustico y de integración) ocupa gran parte de la médula oblongada, se considera a toda esta como representativa del centro respiratorio.

### I.4. OBJETIVO.

Determinar la concentración de acetilcolina en medulas oblongadas de ratas control, ratas estimuladas con doxopram, un analéptico respiratorio de uso común en medicina veterinaria (18), y ratas estimuladas con el punto de acupuntura GV-26 (ver Fig. 1).

En los tres grupos las ratas son anestesiadas con pentobarbital sodico.

Durante la evaluación de los niveles de acetilcolina

en la médula oblongada (centro respiratorio) implementar la técnica de detección de acetilcolina que se basa en la combinación de dos métodos; el ácido-etanol para la obtención de acetilcolina (4) y el de Surplus (espectofotométrico) para su detección (3).



## II. MATERIAL Y METODOS.

El material utilizado se menciona a lo largo de la explicación de cada método.

Los grupos consistieron de ocho ratas cada uno. Las ratas (wistar ) alcanzaron un peso promedio de 323 g.

### II.1. OBTENCION DE ACETILCOLINA ( ACIDO-ETANOL ).

- 1.- Anestesia de las ratas con una aplicación intraperitoneal de pentobarbital sodico (25mg/Kg). Aplicación de la estimulación con aguja de acupuntura en el punto GV-26 (ver Fig. 1) en un grupo, administración de doxopram (6mg/Kg) en otro grupo; y no estimulación - de ningun tipo en el grupo control.
- 2.- Sacrificio de los animales (anestesiados) en nitrógeno líquido.
- 3.- Obtención de médula oblongada. Evitando la descongelación (ver Fig. 2).
- 4.- Pesado de la muestra y maserado en mortero de acero. Evitar descongelación.
- 5.- Transferir a un mortero de vidrio conteniendo 5 ml. por gramo de muestra de una solución 95% etanol y - 0.2% ácido acetico glacial. Se homogeniza la muestra (sobre hielo frape).
- 6.- Reposo de la preparación en hielo frape durante 20- minutos.
- 7.- Transferir a tubos de centrifuga y centrifugar a - 2500r.p.m. durante 5 minutos.
- 8.- Recuperar el sobrenadante y conservarlo en refrigeración hasta su uso.

- 9.- Lavar los residuos con 5 ml. de alcohol etílico al 70% y 0.1% de ácido acético glacial. Repita la centrifugación a 2500r.p.m.
- 10.- Añadir a los sobrenadantes obtenidos 1 ml. de agua destilada y evaporar hasta secar a 35-40 °C (baño maría modelo CB25QZ)\*.
- 11.- Resuspender la muestra con 3 ml. de agua destilada y centrifugar por 20 minutos a 2500r.p.m. (centrífuga - modelo UJ1)\*\*.
- 12.- Decantar la solución sobrenadante a un tubo de ensaye y ajustar la muestra a un pH de 4. Guardar en congelación hasta su uso.

## II.2. METODO ESPECTOFOTOMETRICO ( SURPLUS ).

- 1.- Tomar 1ml. de la muestra a estudiar.
- 2.- Adicionar 2 ml. de clorhidrato de hidroxilamina 2 M.
- 3.- Adicionar 2 ml. de una solución al 14% de hidroxido de sodio.
- 4.- Mezclar vigorosamente y dejar reposar por 1 minuto.
- 5.- Adicionar 2 ml. de una solución de ácido clorhídrico - ( 1:2 de agua destilada) y mezclar.
- 6.- Adicionar 2 ml. de una solución de cloruro férrico en 0.1 N. de ácido clorhídrico y mezclar vigorosamente.
- 7.- Transferir inmediatamente a espectofotometro (modelo- PM2DL)\*\*\* y leer a 540 nm.
- 8.- Calibrar a cero con agua destilada.
- 9.- Se corre agua destilada a través de ambos metodos como un control de las técnicas.

### II.3. VALORACION DE DATOS.

Se estableció una curva de recuperación para esta técnica dentro de los límites esperados de concentración de a cetilcolina en el cerebro de ratas (15,17,19). La línea de mejor acoplamiento a los valores de las recuperaciones hechas se estableció por medio de regresión lineal.

Los valores de extinción de los tres grupos se compararon entre sí por medio de pruebas de "t" de Student.

---

\* Grant Instruments. (Cambridge) Ltd. England.

\*\* Martin Christ. Osterode Harz, Gramany.

\*\*\* Carl Zeiss de México, S.A.

### III. RESULTADOS.

Se hicieron 20 determinaciones de acetilcolina en medula oblongada de rata.

Un tercio de estas (8) se utilizaron como controles - para obtener un nivel basal de acetilcolina en ratas no estimuladas, la otra tercera parte se utilizó para detectar los niveles de acetilcolina en ratas estimuladas con el analéptico respiratorio doxopram y en el tercio restante de las ratas se se determinaron los niveles de este neurotransmisor bajo la estimulación con acupuntura en el punto GV-26 (Fig. 1).

Los valores de extinción para los tres grupos así como el porcentaje de cambio en los niveles de extinción están enlistados en el cuadro 1, donde se puede observar que la estimulación con acupuntura provoca un incremento considerable de +47%. Doxopram por el contrario dio una disminución de -2.3% en el porcentaje de cambio de extinción. Cuando se comparan las medias de estos grupos por medio de pruebas de Student "t" (cuadro 2), se puede observar que existe una diferencia altamente significativa entre el grupo de la acupuntura y los otros dos grupos, mientras que la estimulación con doxopram no resultó significativa en relación al grupo control. En la figura 3 se representa gráficamente las diferencias de extinción entre los diferentes grupos, así como los valores de extinción de la columna blanco.

Con el objeto de establecer la confiabilidad de las determinaciones de acetilcolina basándose en los niveles -

de extinción a 540 nm. se llevo a cabo una curva de recuperación de acetilcolina (Fig. 4) la cual nos indica que los valores de los tres grupos trabajados (control, doxopram, acupuntura) caen dentro de dicha curva de recuperación, lo que nos indica que las concentraciones de acetilcolina en la medula oblongada de ratas varia deaproximadamente 0.5 - microgramos a 3.5 microgramos.

El cambio de porcentaje de extinción de 47% del grupo de acupuntura equivale aproximadamente a un aumento de 1.7 microgramos de acetilcolina, de acuerdo a la curva de extinción de la figura 4.

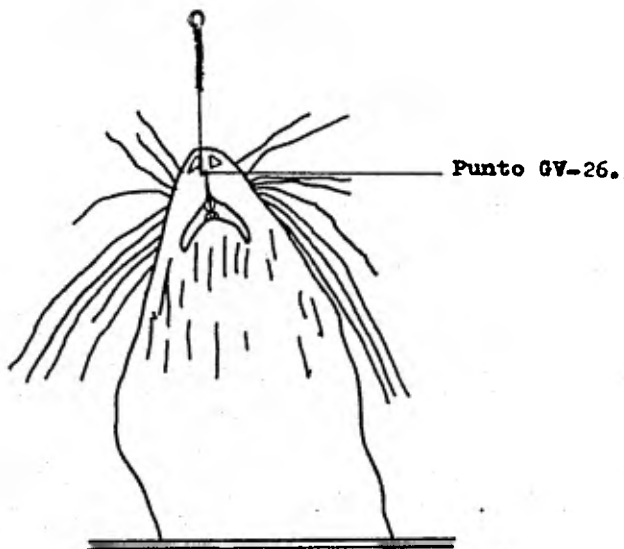


Figura 1. Lugar de aplicació del punto GV-26 en la rata.

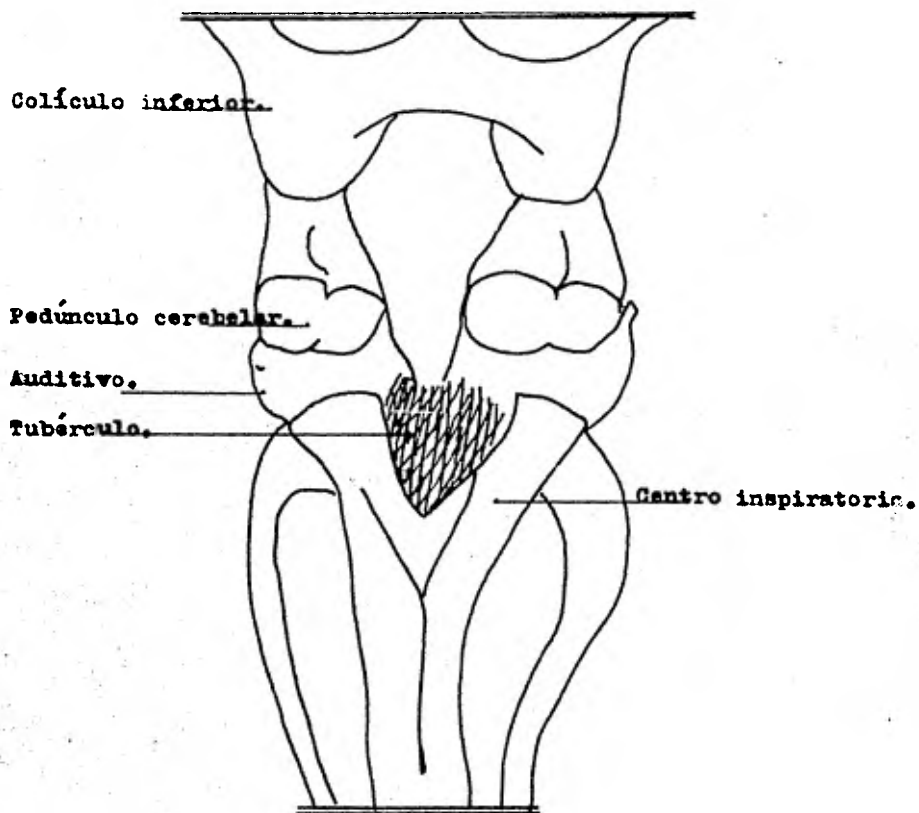


Figura 2. Vista dorsal del centro respiratorio de rata.

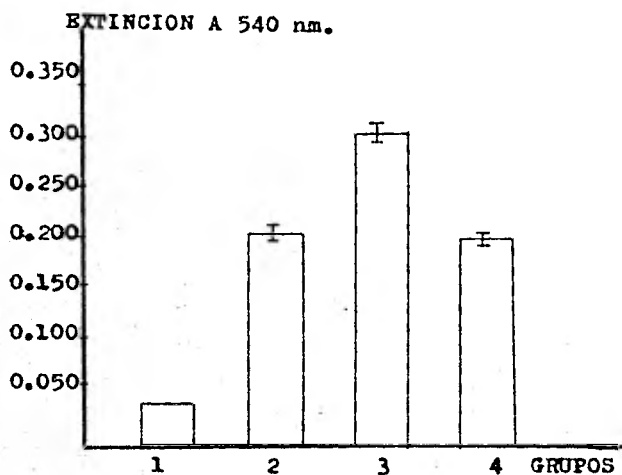


Figura 3. En este histograma se muestran las lecturas promedio y desviaciones estandar de; el blanco en columna 1; el grupo control en la columna 2; el grupo es timulado en el punto GV-26 columna 3; grupo tratado con doxopram columna 4.



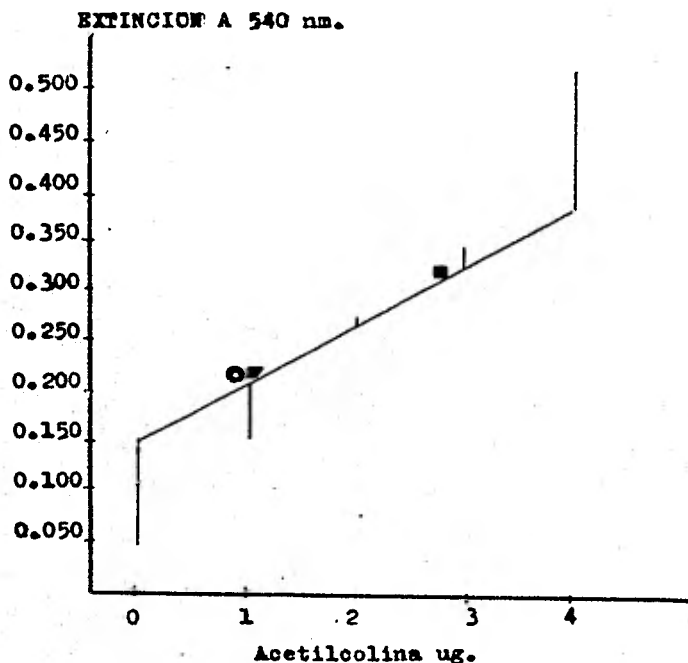


Figura 4. Curva de recuperación de acetilcolina, trazada con -  
regresión lineal. Los valores del grupo control (■) -  
se ubican dentro de la lectura de 200-300 nm. Los -  
valores del grupo experimental estimulado con el -  
punto GV-26 (■) se ubica entre los 300-400 nm. Los -  
valores del grupo tratado con Doxopram (○) se ubi-  
can entre los 200-300 nm.

Cuadro 1.

Porcentaje de cambio en los valores de extinción observado -  
después de la estimulación con acupuntura (Punto GV-26) o con  
el analeptico Doxopram con respecto al grupo control.

Grupos.	nm. de Extinción X	Porcentaje de cam - bic en los niveles- de extinción.
Control	0.215	
Acupuntura	0.316	+47
Doxopram	0.210	-2.3

Cuadro 2.

Análisis "t" de Student comparando las medidas de los tres grupos acupuntura, control y doxopram.

Grupos.	n-1	"t"	P
Acupuntura-Control	14	3.14	< 0.005
Acupuntura-Doxopram	12	2.85	< 0.005
Doxopram-Control	12	-0.037	> 0.05

#### IV. DISCUSION.

La combinación de los metodos ácido-etanol y Surplus para la determinación de acetilcolina resulto ampliamente-satisfactoria como lo demuestra la curva de extinción (Fig. 4).

Resulta evidente que el aumento en los valores de extinción al grupo de la acupuntura indican un notable aumento en la concentración de acetilcolina lo cual puede muy bien indicar que el proceso de neurotransmisión entre el centro apnéustico, centro neumotáxico y el centro de integración esta notablemente aumentado, especialmente si se considera que es probable que acetilcolina sea en neuro-transmisor responsable de la actividad del centro respiratorio (5).

Resulta interesante puntualizar el hecho de que los niveles de acetilcolina permanecieron casi inalterados despues de la estimulación con doxoprám, el cual se ha considerado como el mejor analéptico respiratorio a la fecha (16) y el cual se utiliza ampliamente en la clínica práctica diaria (16).

De acuerdo a las teorías de acupuntura, el punto utilizado ampliamente (GV-26) se considera como un punto de emergencia útil en los casos de shock, incluyendo los casos de paro respiratorio (23,24). Sin embargo, la evidencia experimental presentada en esta disertación solo nos indica la existencia de un cambio radical en los niveles de acetilcolina, pero aun queda por elucidar el mecanismo por medio del cual se consigue este efecto. Es probable que, al menos en parte el efecto observado este mediado por una

vía neurogénica (16,25), ya que otras investigaciones similares han demostrado que la acupuntura es capaz de aumentar los niveles de algunos neurotransmisores, V.G., en delfinas (15,18).

Vale la pena señalar que puede practicarse la estimulación del punto GV-26 en forma rutinaria en los casos clínicos prácticos que lo requieran y se espera que la evidencia obtenida en este trabajo sirva para disminuir el escepticismo con el que por lo general se mira a esta disciplina.

Resulta interesante señalar que el mecanismo de acción del doxopram se basa en una acción directa sobre los quimorreceptores de la región yugular y carotídea así como una acción no bien determinada sobre el centro pneumotáxico (18), sin embargo este trabajo demuestra que el doxopram no tiene un efecto directo sobre el centro respiratorio en términos de un incremento en los niveles de acetilcolina.

## V. CONCLUSIONES.

1. Los niveles de acetilcolina del grupo estimulado con acupuntura, (punto GV-26) fueron significativamente - más altos en relación con los niveles obtenidos en el - grupo control.

2. Los niveles de acetilcolina del grupo control - comparado con los niveles de acetilcolina del grupo esti- mulado con doxopram nos muestra que no hubo cambios sig- nificativos, con lo cual se puede postular que su efecto no es específico sobre la acetilcolina de médula oblonga da de rata.

3. Se podría afirmar que la aplicación de la acupun- tura en casos de paro respiratorio es de alta utilidad - en situaciones de emergencia en la clínica, ya que esta- estimulación está involucrando directamente a los centros apnéustico, neumotáxico y de integración incrementando - los niveles de acetilcolina, el cual es uno de los media- dores químicos presentes en forma importante en el meca- nismo de la estimulación de la respiración en médula o - blongada.

VI. LITERATURA CITADA.

1. Alder, L.H.; Roessler, B.E.: Probability and Statistics. - Third Edition. California State University Press. Davis; U.S.A. 1964.
2. Altman, S.: Taking a Closer Look. Mod. vet. Pract., 1003 - 1006 (1977).
3. Association of Official Analytical Chemists. (A.O.A.C.): Standardization of Acetylcholine Substrate. Twelfth Edition. pp 53, 1975.
4. Fuentes, V.O.: Some Effects of Chronic and Acute Morphine Administration in the Rat. Tesis Doctoral; Nottingham England. pp 44-45 (1977).
5. Ganong, W.F.: Manual de Fisiología Médica. Cuarta Edición México., 1973.
6. Giarman, N.J. and Pepeu, G.: Drug-Induced Changes in Brain-Acetylcholine. Brit. J. Pharmacol., (19): 226-224 (1962).
7. Ionescu-Tirgoviste, C.: Theory of Mechanism of Action in Acupuncture. Am. J. Acupuncture, 1: 193-198 (1973).
8. Janssens, L.: Respiratory and Cardiac Arrest Under General Anesthesia: Treatment by Acupuncture of the Naloxonium. Vet. Rec., 105: 273-276 (1979).
9. Joechel, W.: Veterinary Acupuncture in Europe and Americas Past and Present. Am. J. Acupuncture, 6 (2): 149-156 (1978).
10. Joechel, W.: Acupuncture in Veterinary Medicine: Fact, - Fraud or Hoax?. The Practicing Veterinarian, 47 (3): 3-7 (1975).
11. Kim, S.S.: Mediators of Acupuncture. Am. J. Acupuncture, 4 (1): 25-32 (1976).

12. Kim, S.S.: Acupuncture: Mode of Action in Migraine Headache. Am. J. Acupuncture, 3 (1): 108-114 (1975).
13. Loe, D.C.: Comparison of the Cardiovascular Effects of Acupuncture by Various Forms of Stimulation in Dogs During Halothane Anesthesia. Am J. Acupuncture, 6 (3): 209-217 (1978).
14. Lee, D.C.; Lee, M.O. and Clifford, D.H.: Some Effects of Acupuncture at Jen Chung (Go-26) on Cardiovascular Dynamics in Dogs. Can. J. Comp. Med., 41 (4): 446-454 (1977).
15. Lee, D.C.; Lee, M.D. and Clifford, D.H.: Does Beta Endorphin in the Sympathomimetic Effects of Acupuncture During Anesthesia in Dogs?. Am. J. Acupuncture, 8 (3): 215-224 (1980).
16. Lee, T.N.: The Thalamic Neuron Theory and Classical Acupuncture. Am. J. Acupuncture, 4 (6): 273-278 (1978).
17. Mason, S.T. and Fibiger, H.C.: Possible Behavioural Function for Noradrenaline-Acetylcholine Interaction in Brain. Nature, 277 (5695): 396-397 (1979).
18. Meyer, L.J.; Booth, N.H. and Mc.Donald, L.E.: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Fourth Edition. Iowa State University Press. Iowa, U.S.A., 1977.
19. Pepeu, G.; Schmidt, R.P.; Giarman, N.J.: Identity with Authentic Acetylcholine of Acetylcholine-Like Activity in Extracts of Rat Brain. Biochem. Pharmacol., 12: 385-395 (1963).
20. Pomeroy, B.: Do Endorphins Mediate Acupuncture Analgesia. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 18: 351-359 (1978).



21. Rossier, L.; Battenberg, F.; Pittman, Q.; Bayon, A.; Koda, L.; Miller, R.; Guillemin, R. and Bloom, F.  $\times$  Hypothalamic Enkephalin Neurons may Regulate the Neurohypophysis. Nature, 227 (5698): 653-655 (1979).
22. Small, T.J.  $\times$  The Neurophysiological Basis for Acupuncture. Am. J. Acupuncture, 2: 77-778 (1979).
23. Sumano, L.H.  $\times$  Acupuntura en Situaciones de Emergencia, - Memorias del Ciclo de Conferencias para la Divulgación de Temas Selectos de Fisiología; Facultad de Estudios - Superiores, Cuautitlan (1980).
24. Toyama, P.M.  $\times$  The Physiological Basis of Acupuncture and Moxibustion Therapy. Am. J. Acupuncture, 3 (2): 115-128 (1975).
25. Wei, L.Y.  $\times$  Nerve Transmission and Acupuncture Mechanism. Am. J. Acupuncture, 5 (1): 69-83 (1977).