



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Efecto de varios tiempos de isquemia e hipoxia *in vitro* sobre
la respuesta contráctil inducida química y eléctricamente en el
íleon de cobayo”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A N:

JANETH GONZÁLEZ CABAÑAS

MISAELE MONTES DE OCA MEJORADA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

Facultad de Medicina



México, D.F. 2011



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.

El presente trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Medicamentos del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Rosa Ventura Martínez y con asesoría de la Dra. María Teresa Corona Ortega, la Q.F.B. Leticia Cecilia Juárez, la Maestra María Isabel Garduño Pozadas y la Q.F.B. María del Rosario Benítez Velázquez.

**...farmacia,
que no sigas
vendiendo
la esperanza,
y que sean
victorias
de la vida,
de toda
vida
humana
contra
la poderosa
muerte,
tus victorias.
Y así serán mejores
tus laureles,
serán más olorosos tus sulfatos,
más azul el azul de metileno
y más dulce la paz de la quinina.**

(Pablo Neruda, Oda a la farmacia)

DEDICADA...

A mi padre Román González González

Por la vida, el amor y la libertad! Agradezco al destino por darme la oportunidad de ser tu hija, por apoyarme, y quererme incondicionalmente.

A mi madre Leticia Cabañas Reyes

Que privilegio decirte mamá al apenas un año de vida cuando me cuidabas y no sabía por qué, que privilegio llamarte madre cuando crecí y valore lo importante de tu existir, gracias “ma” por darme la vida, apoyarme y quererme infinitamente.

A mi hermana Mónica González Cabañas

Por la fortaleza que nos da nuestra unión en sentimientos, esfuerzos y proyectos. Por hacer de cada día uno distinto a otro y por que pronto serás también una Q.F.B. en toda la extensión de la palabra te quiero Monis!

Gracias a los tres porque sé que han estado y estarán conmigo no por un instante no por unos años. Por que llegaron para acompañar mi ruta existencial los amo!

Lo logramos familia...

(“Pa”, “Ma”, “Monis”, “Papá Costa”, abuelita Carmela)

AGRADECIMIENTOS

...cerca esta de agradecido quien se conoce deudor

(Calderón de la Barca, el gran teatro del mundo)

Esta tesis representa el parteaguas entre una etapa sumamente enriquecedora y el camino que esta por comenzar. En toda mi experiencia universitaria ya sea como estudiante o como tesista ha habido personas que merecen todo mi agradecimiento por que sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo, al igual que agradezco a todos mis amigos por haber plasmado su huella en mi camino.

POR QUE LOS MEJORES AÑOS DE MI VIDA LOS HE VIVIDO EN LA
UNAM...

Mi primer agradecimiento es para mi Alma Mater la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo generoso y desinteresado, que me brindo el privilegio de pertenecer a ella permitiéndome llegar hasta este momento.

Con admiración y total cariño!...

A la Dra. Rosa Ventura Martínez

Ser su alumna fue, ha sido y será un privilegio, permitiéndome llevarme mucho de su saber, considerándola más que mi directora de tesis. Gracias Dra. Rosy por que sin usted todo esto seguiría siendo un anhelo.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo

Por apoyarnos en todas las dudas, expresándonos sus acertadísimos comentarios, gracias por compartir con nosotros sus conocimientos y su buen humor haciendo que el equipo de trabajo en el laboratorio fuera muy ameno. Y por ultimo gracias por amistad!

Al Dr. Jacinto Santiago Mejía

Por sus observaciones, y por estar dispuesto ayudar cuando lo solicitábamos. Gracias!

Al Dr. Rodolfo Rodríguez Carranza

Que nos abrió las puertas de su laboratorio y nos permitió formar parte de un excelente equipo de trabajo. Gracias!

A las Sinodales

La Profesora Lety Juárez por todo su apoyo en la revisión del trabajo, y por ayudarnos en los tramites, así como los momentos amenos que compartimos! A la Mtra. Isabel Garduño por revisarnos el trabajo y ser muy accesible, a la Profesora Rosario Benítez y a la Dra. Teresa Corona por todas sus observaciones, y sugerencias.

Y SI PARA LA UNIVERSIDAD SU SANGRE ES SU GENTE, PARA MI MIS
AMIGOS SON LA ALEGRÍA DE TODOS MIS DÍAS...

Por permitirme vivir sus afectos y los valores excelsos de amistad, honestidad, confianza, lealtad, y firmeza de sentimientos.

Por su incondicional cariño y por cada una de las acciones que han tornado a mi favor gracias siempre... toda la vida!

A Sandra Paola, Daniel, Karla Michel, Maricela, Jonathan, Diana. Amigos de la infancia, adolescencia y de la vida.

Aidee G. Mosqueda, Jonathan Iván y Alfredo “mil jaus”. Amigos del “Colbach 12”

Agradecimiento especial a mis “superfriends” Perla A. Vázquez my best friend “cachorra”, Marco Antonio “marquito”, Jesús “morales”, Manuel de los Santos “bimbix”, Gaby, Mario “duende”, Amilcar “amy”, Misael “misa”, Jesús Chaires “chucho” (la banda 7.5 sigma), con quienes he compartido y seguiré compartiendo momentos inolvidables. Amigos saben que no hay paginas suficientes para describir y agradecer todo lo que la banda 7.5 sigma ha significado, así que por el momento espero basten estas líneas. Amigos del alma de la vida por siempre!

A Mirna Rendón, Miguel Peña “mike”, Sandra Saavedra “sandriux”, Consuelo Lezama “concha”, Raúl “rulo, mi padre”, Ángel, Giovanni, Carlos “beli”, Punki,

Irma, Kike “rostro”, Rueda, Rubén ”prieto”, Ramoncito, Lalilo, compañeros y amigos de generación de los cuales tengo los mejores recuerdos!

A mis compañeros y amigos de tesis Oscar Rivero “el conquistador, gua gua gua..”, Luz Pacheco, Amy, Marthita, y en especial al Doctor preferido Moises Fiesco “moy” por ayudarme, apoyarme y tener siempre las mejores palabras hacia mi. Y al señor Constantino por apoyarnos en la parte técnica

A Manu Arias, a los vecinos Rocio y Memo, por brindarme su amistad!

A mis compañeros y nuevos amigos del Diplomado de Administración Farmacéutica con quienes pase momentos muy pero muy agradables e inolvidables y que me permitieron visualizar distintas opciones en el nuevo camino por empezar a Mau, Chava, Lalo, Oscar y Fer.

En especial quiero agradecer a mi amor y motivo inspirador si a ti... a mi conejito, a mi novio el más guapo ¿ya adivinaste? A ti Jesús Chaires García “Chuchito”, por compartir las cosas buenas de la vida claro esta incluyendo las malas jajaja, por tu infinito amor y a un mas por tu comprensión y apoyo en todas mis decisiones. Gracias por alentarme y aconsejarme cuando todo se tornaba mal, por ayudarme en la realización de la tesis con tus sugerencias, por impulsarme a realizar la tesis experimental, por todas las desmañanadas y todas las desveladas por todo esto y por mucho más TE AMO!

No creas que se me olvidaba, bueno si ya casi jajajaja. Estas líneas son para ti Misa, mi compañero de generación, mi amigo y mi compañero de tesis, sabes que sin ti esta tesis no existiría, bueno no te lo creas mucho es un decir jajaja. Pasando a lo serio sabes que te quiero “priets”, que nos enojamos algunas veces, y que nos reímos muchísimas más, había que ponerle sal y pimienta al asunto ¿no crees? Bueno aunque parecía que jamás íbamos a terminar la tesis por fin lo logramos! Asi que te doy las gracias Misa por todo el apoyo en la tesis y sobre todas las cosas por ser mi amigo!

A todos los profesores que he tenido a lo largo de mi vida y que han compartido sus conocimientos gracias!

Por último a las personas que me pusieron obstáculos o que significaron un obstáculo, ya que sin saberlo me hicieron más perseverante y fuerte!



Dedicado a José Luis, Silvia, Yamel, Noel y Otniel.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a ella, ya que dentro de sus aulas fui formado como un ser humano racional, social y profesional, capaz de discernir del mundo que me rodea. Gracias por alojarme durante más de 10 años como estudiante, desde aquellos años de Iniciación Universitaria hasta mi formación profesional como Q.F.B. Además agradezco la dicha de sentir la grandeza de ser Universitario, que al final del camino se convierte en un sentimiento y un estilo de vida que aún es difícil poder expresar el orgullo que me invade el misticismo que este conlleva.

A mis padres, porque ellos fueron y han sido hasta el día de hoy ese invaluable apoyo y motivación para poder llegar hasta el final de este ciclo, ustedes siempre han sido el motor que día con día me impulsa a no claudicar en todos los proyectos que decido comenzar, sin importar la relevancia que conlleve en mi vida personal. Mil gracias por la confianza, el cariño y la libertad que siempre me han brindado para poder aprender de mis decisiones y las consecuencias que éstas han generado. No me queda más que decirles que los amo y que todos los éxitos que obtengo son por ustedes. ¡GRACIAS José Luis y Silvia!

A mis hermanos Yamel, Noel y Otniel, gracias por aguantarme tantos años y por ser partícipes de este proyecto que hoy concluye. Por aguantar todas mis pláticas relacionadas con mi carrera profesional jajajaja, los quiero mucho hermanos, no se olviden de que siempre pueden contar conmigo no hasta 1 o hasta, 10 si no contar conmigo aunque a veces tenga cara de gruñón pero ya saben que igual pueden contar conmigo jajaja.

A la Dra. Rosa Ventura Martínez, mis más sinceros agradecimientos por hacerme participe de éste proyecto tan importante y haber podido contribuir con un granito de arena, porque el camino aún es muy largo, pero yo sé que algún día el objetivo estará plasmado en los libros. Gracias por todos los conocimientos y las habilidades que me transmitió durante mi estancia en el laboratorio y por ser la guía de este trabajo ya que sin su paciencia y dedicación nada de esto hubiera sido posible. ¡GRACIAS!

Al Dr. Rodolfo Rodríguez Carranza jefe del Laboratorio de Desarrollo de Medicamentos del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por habernos permitido desarrollar nuestro proyecto de tesis dentro de éste hábitat del conocimiento y aprendizaje llamado Laboratorio de Desarrollo de Medicamentos y por no equivocarse al decirnos que de éste laboratorio nos íbamos a ir con muchísimas experiencias, amigos, conocimientos, pero sobre todo por el gusto de trabajar todos los días junto a personas con un mismo fin; la investigación implica dedicación y esfuerzo, pero la satisfacción de observar su aplicación es indescriptible.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo por la sencillez y calidez con la que siempre nos trató, por regalarnos siempre una sonrisa y brindarnos su apoyo en todas las cosas que llegábamos a necesitar, gracias por todo Dra. Gómez, usted ¡muy bien!.

Al Dr. Jacinto Santiago Mejía, porque siempre nos alentaba a estudiar un poco más y día con día, por compartirnos parte de su conocimiento y siempre tratar de explicar lo que estaba ocurriendo con los resultados de nuestro proyecto.

A la Dra. Teresa Corona Ortega por la ayuda en la revisión de éste trabajo, ya que con sus observaciones contribuyó a mejorar la calidad de éste escrito.

A la Q.F.B. Leticia Cecilia Juárez por su infinita ayuda en la asesoría de nuestro proyecto así como el apoyo con todos los trámites de titulación, gracias por su apreciable ayuda y además ¡por haber sido mi profesora.

A la Mtra. Isabel Garduño Pozadas porque aparte de que me aguanto como tres semestres como alumno y no conforme con eso, tuvo la paciencia y la disponibilidad para poder revisar nuestro trabajo. También agradezco todos sus consejos, regaños, bromas y su paciencia, pero sobre todo por siempre ser una gran persona conmigo. ¡Gracias por todo!

A la Q.F.B. Rosario Benítez por el tiempo dedicado para la revisión de nuestro trabajo.

A Janeth González Cabañas “la mimis ” por ser la compañera en la realización de éste trabajo; Gracias Janis por todas la experiencias que hemos compartido como compañeros de tesis, gracias por todos los consejos, “sugerencias” y regaños que con gran objetividad siempre me hacías notar, hay ajá jajajajaja, sabes que se te quiere mucho y que siempre estaré ahí para invitarte un taco de canasta y un omeprazol jajajajaja.

A mis hermanos postizos de toda la vida Fernando Díaz López, Fernando Martínez Ramírez, por permitirme ser su amigo y crecer juntos, por todas las vivencias que hemos compartido durante más de 10 años de amistad y por lo que vendrá en el futuro.

A mis dos hermanos postizos de profesión Rodrigo Rojas Gaspar y Jesús Chaires García por compartir casi toda la vida universitaria junto a ustedes, por todas las cosas que hemos vivido juntos; Cervantinos, fiestas, tareas, exámenes,etc. Pero sobre todo el apoyo que siempre me han brindado.

A mis amigos preparatorianos Pablo (el gordo), Priscila (Priz), Itzel (Bruja), Brenda Roa, Joss, Diana, Carlos (Timmy O'toul), Israel (pelón), Nancy (China), Alejandra (peque), Leslie(la 8), Edwin, Borja, Isaak, Plata, Lucho. Fer Valdéz, Daniel, Cuau, Giovanna, Paola y creo que ya jajaja gracias por su amistad.

A mis amigos Q.F.B.'s Gaby Buenfíl, Perla Vázquez (La cachorra), Mario (duende), Marco, Jesús Morales, Amilcar (Ami), Manuel (bimbo), Gerardo (chaparro) Alicia, gracias por ser mis equipos de laboratorio, compañeros de clase, pero sobre todo por ser mis amigos de profesión y juergas jajajajajaja.

A la banda del laboratorio de Farma, Moy, Oscar, Martha, Luz, Amy, Perla, Chucho, Sr. Constantino, gracias por todo su apoyo para la realización de éste trabajo, y por darle ese toque de alegría, amistad y cordialidad al trabajo diario durante todo el tiempo que compartimos como compañeros de trabajo y que al día de hoy se ha convertido en una gran amistad.

A Alma Alejo García por haber compartido gran parte de mi vida universitaria aguantándome y motivándome a ser un mejor estudiante y no caer en la mediocridad, gracias a todas las enseñanzas y experiencias vividas, porque gracias a todo eso, el día de hoy me considero ser una mejor persona en todos los aspectos.

A Sir Murcielot y toda la familia Alejo García porque siempre me brindaron su apoyo durante gran parte de mi carrera profesional, gracias por su amistad y confianza.

Gracias a todas y cada una de las personas que confiaron en mí, desde el principio , algunas de ellas siguen hasta hoy, otras de ellas nos han dejado el camino, pero sé que si estuvieran aquí estarían orgullosas de ver la culminación de éste trabajo. A todos, las gracias...Totales.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
ÍNDICE DE FIGURAS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	19
I. MARCO TEÓRICO	20
1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL	20
1.1 DEFINICIÓN	20
1.2. CLASIFICACIÓN	21
2. MODELOS EXPERIMENTALES	34
3. MODELO DE ÍLEON DE COBAYO	37
4. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO	39
4.1.1. NEURONAS MOTORAS	42
4.1.2. NEURONAS SENSORIALES	43
4.1.3. INTERNEURONAS	44
4.2. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN EL SNE	46
4.3. NEUROTRANSMISORES DEL SNE	46
4.3.1. ACETILCOLINA	48
4.3.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN EN EL MÚSCULO LISO	49
4.3.2. SEROTONINA.....	51
4.3.3. HISTAMINA.....	53
4.3.4. EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE K ⁺ EXTRACELULAR	54
4.3.5. EFECTO DEL BARIO EN EL MÚSCULO LISO.....	55
4.3.6. ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL INTESTINO DELGADO.....	55

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	57
III. HIPÓTESIS	59
IV. OBJETIVOS	60
4.1 GENERAL	60
4.2. ESPECÍFICOS	60
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	61
5.3.1. Inclusión:	61
5.3.2. Exclusión:	61
5.3.3. Eliminación:	61
VI. METODOLOGÍA.....	62
6.1.1. BIOLÓGICO:	62
6.1.2. MATERIAL	62
6.1.3. EQUIPO	63
6.1.4. INSTRUMENTOS.....	63
6.1.5. SUSTANCIAS	63
6.1.6. SOFTWARE.....	64
VII. MÉTODO	65
VIII. RESULTADOS.....	69
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	89
X. CONCLUSIONES.....	95
ANEXO 1 (Resumen del método)	96
ANEXO 1.1.....	1
ANEXO 1.2.....	97
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AC	Adenilato Ciclasa
ACh	Acetilcolina
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Monofostato cíclico de Adenosina
AVC	Accidente Vascular Cerebral
ATP	Trifosfato de Adenosina
BaCl₂	Cloruro de Bario
CaCl₂	Cloruro de Calcio
CCK	Colecistoquinina
CO	Monóxido de Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono.
DAG	Diacilglicerol
e.e.	Estimulo electrico
EPSPs	Potenciales Postsinápticos Excitatorios
EVC	Enfermedad Vascular Cerebral
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
GABA	Ácido gamma-amino-butírico
GMPc	Monofostato cíclico de Guanosina
GPCRs	Receptores unidos a proteína G
HCl	Ácido Clorhídrico
IP₃	Inositol Trifosfato

IPANs	Neuronas Aferentes Primarias Intrínsecas
KCl	Cloruro de Potasio
LGIC	Canales iónicos operados por ligando
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MLCK	Cinasa de Miosina de Cadena Corta
MMC	Complejo Motor Migratorio
N₂	Nitrógeno molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaH₂PO₄	Fosfato diácido de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NK1	Neuroquinina 1
NK3	Neuroquinina 3
NKA	Neuroquinina A
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
O₂	Oxígeno molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACAP	Péptido Activador de Adenil-ciclasa-pituitaria
PEPL	Potencial Excitatorio Postsináptico Lento
PEPR	Potencial Excitatorio Postsináptico Rápido
PG's	Prostaglandinas
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico

TIA	Ataque Transitorio Isquémico
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los Accidentes Vasculares Cerebrales según su etiología.....	21
Figura 2. Tipos de infartos.	24
Figura 3. Zonas morfológicas secundarias a la privación del flujo sanguíneo cerebral. ...	26
Figura 4. Efectos de la reducción del Flujo Sanguíneo Cerebral.....	27
Figura 5. Evolución temporal de la zona de penumbra a núcleo isquémico.	28
Figura 6. Cascada de eventos que se desencadenan durante la isquemia cerebral.	30
Figura 7. Localización de los plexos mienterico y submucoso.	40
Figura 8. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático	41
Figura 9. Tipos de Neuronas del Intestino de cobayo	45
Figura 10. Mecanismo de acción de ACh en receptores M ₃	50
Figura 11. Contracción inducida por la entrada de calcio extracelular.....	54
Figura 12. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por Estimulo Eléctrico .	69
Figura 13. Curva dosis respuesta en g de tensión de ACh	70
Figura 14. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh.....	71
Figura 15. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Histamina.....	72
Figura 16. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Histamina.....	73
Figura 17. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Serotonina	74
Figura 18. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Serotonina	75
Figura 19. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por KCl	76
Figura 20. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de BaCl ₂	77
Figura 21. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por BaCl ₂	78
Figura 22. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por Estimulo Eléctrico .	79
Figura 23. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de ACh.....	80

Figura 24. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh.....	81
Figura 25. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Histamina.....	82
Figura 26. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Histamina.....	83
Figura 27. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Serotonina	84
Figura 28. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Serotonina	85
Figura 29. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por KCl.	86
Figura 30. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de BaCl ₂	87
Figura 31. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por BaCl ₂	88

INTRODUCCIÓN

La reducción parcial severa, o la suspensión total del flujo sanguíneo cerebral, produce (dependiendo de la duración) una lesión severa (necrosis tisular), irreversible en el tejido cerebral. Sin embargo, el tejido cerebral ubicado alrededor de la zona de infarto es viable y susceptible al tratamiento farmacológico.

A la fecha, el manejo terapéutico de la enfermedad vascular cerebral está orientado a la prevención del primer evento y a evitar su recurrencia a través de la eliminación de los factores de riesgo. Con la aplicación de esta estrategia se ha logrado una disminución aceptable en la incidencia de este padecimiento³⁰. La terapia postinfarto sólo se refiere a las medidas generales de sostén y a la disminución de la presión intracraneal. Sin embargo, recientemente, se aprobó la trombolisis con la administración temprana del activador del plasminógeno tisular (rtPA), que favorece la reperfusión temprana de la zona infartada³¹. El rtPA es actualmente la única opción disponible para el tratamiento en la fase aguda del evento cerebrovascular, ya que los fármacos denominados neuroprotectores carecen de eficacias clínicas.

Tanto la identificación como la caracterización de las consecuencias del daño isquémico resultan difíciles de modelar en animales, particularmente al emplear roedores, debido a la complejidad de los efectos y, en algunos casos, a la sutileza de éstos. Lo anterior, dificulta la obtención de datos que permitan determinar la presencia, cuantificación de la severidad y descripción de la evolución de las alteraciones inducidas por la isquemia cerebral, así como los resultados de la intervención farmacológica a largo plazo. Experimentalmente se han probado moléculas capaces de reducir el daño estructural, es decir, el volumen del infarto, en animales de laboratorio, conocidas como neuroprotectoras; sin embargo, al emplearse en la clínica como parte del tratamiento en la fase aguda, se observan escasos efectos en la reducción del índice de mortalidad, así como poca efectividad en la limitación de la disfunción neurológica en los pacientes con infarto cerebral.

Con todo lo anterior, en este trabajo se decidió emplear el modelo de íleon aislado de cobayo *in vitro* con el propósito de reducir los costos que genera la experimentación con animales, además de disminuir el gran número de animales que se utilizan en este tipo de investigaciones. Por otro lado la utilización del íleon nos ha permitido mantener durante largos periodos de tiempo la evaluación del padecimiento, ya que por las características anatómicas del plexo, nos permite tener al músculo y a las neuronas funcionales, permitiéndonos la evaluación de las alteraciones en ambos tipos celulares de manera simultánea.

I. MARCO TEÓRICO

1. ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL

1.1 DEFINICIÓN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) constituye la tercera causa de muerte en los países industrializados, y es considerada como la primera causa de invalidez a nivel mundial. Según la estadística de mortalidad en México, la enfermedad vascular cerebral forma parte de las diez primeras causas de mortalidad. En EUA se considera que aproximadamente 500,000 a 700,000 casos nuevos aparecen en un año y cuyo costo de atención asciende a 30 billones de dólares en ese país¹.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) ó Accidente Vascular Cerebral (AVC) se define como un síndrome clínico caracterizado por el rápido desarrollo de síntomas y/o signos correspondientes usualmente a afección neurológica focal, sin otra causa aparente que el origen vascular.

El término latino “Ictus”, que al igual que su correspondiente anglosajona “stroke” significa “golpe”, y describen perfectamente el carácter brusco y súbito del proceso².

Es de vital importancia reconocer que la EVC, como síndrome completo, es producida por una gran cantidad de patologías diversas, que terminan en la oclusión y/o ruptura de un vaso arterial ó venoso. Esto ocasiona la reducción o suspensión total del flujo sanguíneo hacia el cerebro y produce lesión irreversible (necrosis) del tejido cerebral.

Un accidente cerebrovascular ocurre cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del cerebro o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se rompe, derramando

sangre. De la misma forma que se dice que una persona que sufre una pérdida de flujo sanguíneo al corazón tiene un ataque cardiaco, puede decirse que una persona con una pérdida de flujo sanguíneo al cerebro o una hemorragia repentina en el cerebro tiene un "ataque cerebral" o sufre un accidente cerebrovascular¹.

1.2. CLASIFICACIÓN

En 1990 fue propuesta la III Clasificación de Enfermedades Cerebrovasculares, por el National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS, 1990) con la finalidad de definir de forma precisa los tipos de accidentes vasculares cerebrales, así como los diversos aspectos etiológicos, patogénicos y diagnósticos.

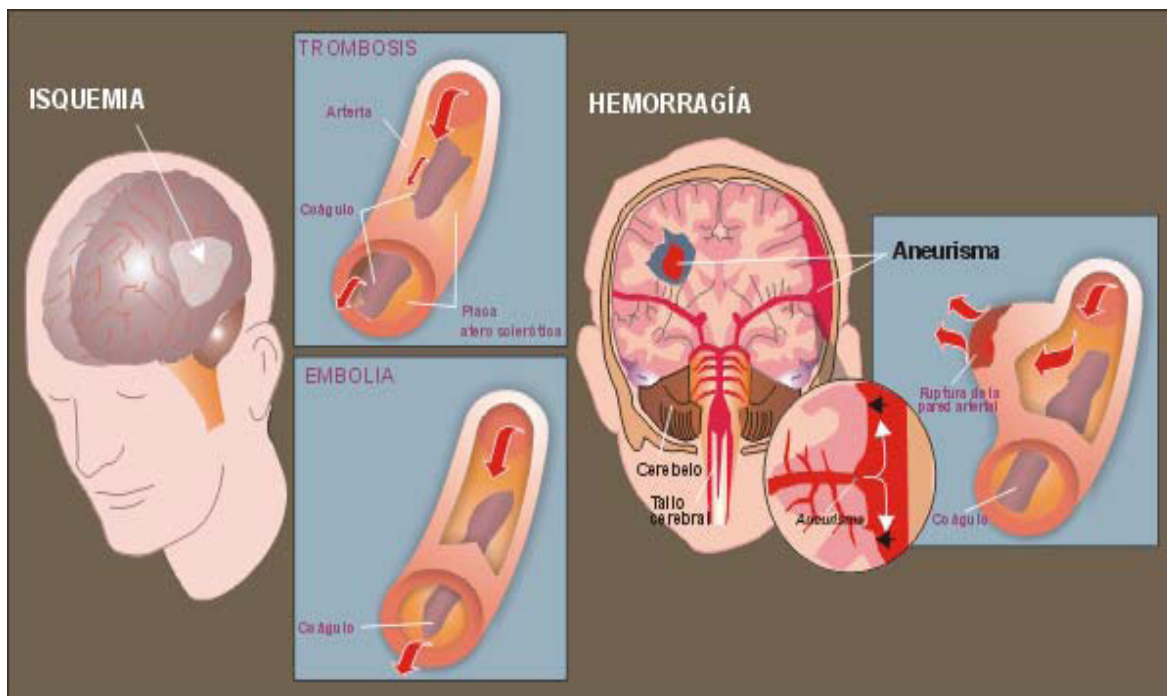


Figura 1. Clasificación de los Accidentes Vasculares Cerebrales según su etiología.

Según su presentación clínica, la enfermedad vascular cerebral puede ser “asintomática” o “sintomática”. Según su naturaleza, se puede presentar como hemorrágica o isquémica, en una proporción del 16% para la primera y el 84% para la segunda². La diferencia entre una y otra es la presencia o ausencia de sangre, respectivamente, (Fig. 1).

a. Hemorragia cerebral: ésta se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo. La hemorragia puede ser dentro de los hemisferios cerebrales, tallo cerebral o cerebelo denominándose “intraparenquimal”, o bien, en el espacio subaracnoideo sobre la superficie cerebral denominándose “subaracnoidea”. La intraparenquimal se presenta en un 10% del total de las hemorragias cerebrales en tanto que la subaracnoidea sólo representa el 6%. La causa más frecuente de ruptura de un vaso sanguíneo cerebral es la presencia de un aneurisma (dilatación permanente de una arteria ocasionada por la debilidad de su pared)^{3,4}.

b. Isquemia cerebral: se produce por la disminución o interrupción del flujo sanguíneo a una área del cerebro y puede deberse a una reducción de la presión de perfusión o ser secundaria a una obstrucción de vasos de pequeño o gran calibre. En base a la localización anatómica y al tamaño preciso de la lesión a que da lugar, la isquemia que involucra al cerebro completo y ocurre durante un ataque cardíaco o hipotensión sistémica severa se denomina “isquemia cerebral global”, y aquella que afecta regiones restringidas del cerebro y ocurre en una amplia variedad de cuadros clínicos, se denomina “isquemia cerebral focal”⁵.

El mecanismo que produce la obstrucción o disminución en el flujo sanguíneo al cerebro puede deberse a:

-
- 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.
 - 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 trombosis ocupa el mayor porcentaje (53%) de las isquemias cerebrales.
 - 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.
 - Hipoxia: generalmente se produce por hipotensión y poca perfusión lo cual causa un infarto sin oclusión vascular (Figura 2).

Independientemente de su origen, las EVC pueden ocurrir a cualquier edad y por diversas causas que incluyen enfermedades cardíacas, traumas, infecciones, deformaciones vasculares, desórdenes inmunológicos y toxinas exógena^{6, 7}.

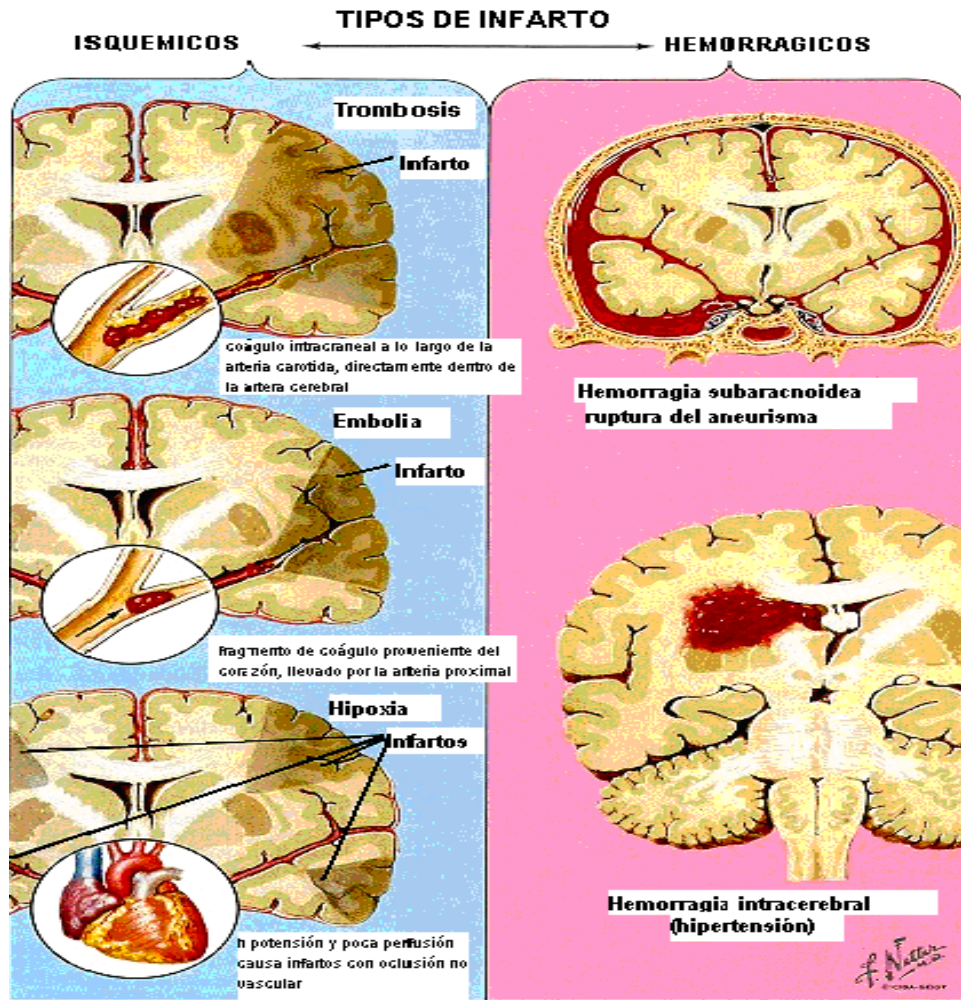


Figura 2. Tipos de infartos.

Generalmente el tiempo de instalación de los síndromes isquémicos cerebrales es breve (minutos u horas). Así, si la duración es menor de 24 horas, se recupera espontáneamente y no hay secuelas. En este caso se trata de isquemia cerebral transitoria o ataque isquémico transitorio (TIA). Por otro lado, si los síntomas persisten, se considera como isquemia cerebral permanente o infarto isquémico cerebral (CII)⁸. Aproximadamente el 10% de los infartos isquémicos es precedido por un TIA, y el 40% de los pacientes que experimentan un TIA presentan un infarto posterior. El infarto puede

desarrollarse en vasos sanguíneos pequeños profundos del cerebro conocido como infarto de pequeños vasos o bien; en vasos principales en la superficie del cerebro, conocido como infarto de grandes vasos.

1.3. EVENTOS VASCULARES Y CELULARES EN LA ISQUEMIA

Uno de los principales logros de la neurología vascular moderna es la descripción y la comprensión de los cambios vasculares, celulares, eléctricos y bioquímicos que constituyen la cascada de eventos bioquímicos que suceden después de la disminución del FSC⁹. El metabolismo y la viabilidad del tejido cerebral dependen principalmente del aporte de oxígeno y nutrientes a través de la circulación cerebral, con su intrincada red de ramas colaterales que suplen la irrigación en caso de necesidad y de estrictas medidas de autorregulación¹⁰.

Para comprender la evolución y consecuentemente el evento isquémico se debe considerar el FSC¹¹. Un flujo sanguíneo normal de 50 a 55 ml/min/100 g de tejido garantiza la actividad eléctrica de las neuronas y la preservación de sus funciones biosintéticas. Después de la aparición de una isquemia cerebral es posible observar dos regiones morfológicas de importancia fisiológica para el desarrollo del daño debido a que la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el territorio isquémico^{12, 13, 14}. Ambas zonas serán determinadas por la extensión del tejido cerebral que sufre de la disminución de sangre secundaria a la oclusión del vaso sanguíneo durante la isquemia (Figura 3).

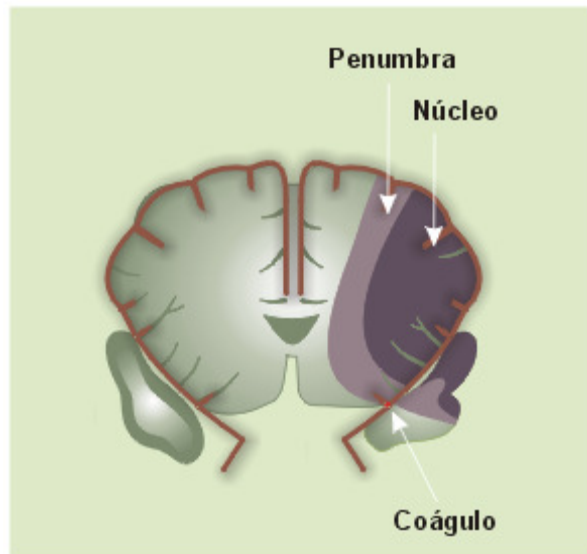


Figura 3. Zonas morfológicas secundarias a la privación del flujo sanguíneo cerebral.

La primera región es denominada núcleo del infarto donde el flujo sanguíneo cerebral disminuye a 10 ml/min/100 g de tejido o menos que corresponde al $\leq 20\%$ del FSC normal y el daño neuronal puede ser irreversible. Después de 30 minutos, sus neuronas comienzan a perder gradientes iónicos, se despolarizan y mueren por procesos necróticos inmediatos. La segunda región localizada en la periferia del núcleo isquémico, es denominada penumbra isquémica, en donde la reducción del flujo sanguíneo cerebral es hasta de 10 a 25 ml/min/100 g de tejido ($\leq 50\%$ del FSC normal) y la evolución a irreversible es menos rápida (Figura 4)^{15, 16}. En las neuronas se deteriora su capacidad para generar potenciales de acción pero se mantienen gradientes iónicos intactos hasta que la producción de trifosfato de adenosina (ATP) cae por debajo del 50% de sus niveles normales⁵.

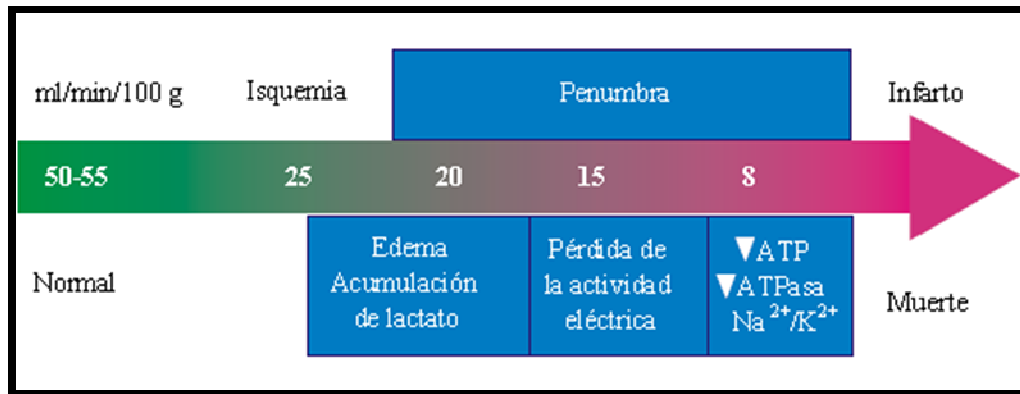


Figura 4. Efectos de la reducción del Flujo Sanguíneo Cerebral.

La zona de penumbra es una zona potencialmente viable, en la que la integridad de la membrana celular se preserva y puede ser rescatada de su conversión a núcleo isquémico (Figura 5). Aún cuando es un fenómeno relativamente progresivo debido a la excitotoxicidad en curso o a un fenómeno deletéreo secundario como despolarización expansiva, inflamación post-isquémica, apoptosis o necrosis tardía^{15, 4}.

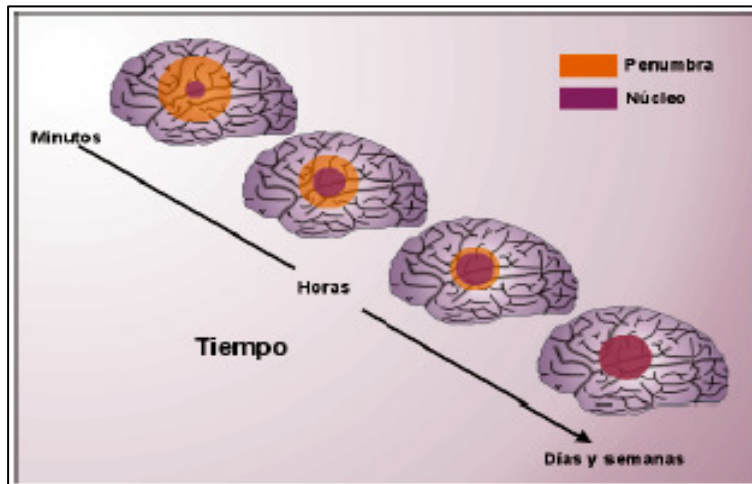


Figura 5. Evolución temporal de la zona de penumbra a núcleo isquémico.

Lógicamente, el periodo de tiempo durante el cuál la penumbra persiste representa una ventana de oportunidad terapéutica potencial que depende fundamentalmente de la severidad de la isquemia, del flujo sanguíneo cerebral proveniente de colaterales, de la vulnerabilidad selectiva del tejido neuronal afectado y de factores sistémicos, tales como la glucemia sérica, la presión arterial sistémica y la temperatura corporal^{4, 17, 9}.

1.4. EVENTOS ELÉCTRICOS EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

En las primeras fases de la isquemia se observan diversas alteraciones en la electrofisiología cerebral: disminución de la amplitud, disminución en la velocidad de las señales electroencefalográficas espontáneas, y disminución de los potenciales evocados somatosensoriales. A medida que la isquemia progresa se produce un fallo eléctrico. No todas las regiones cerebrales, ni todas las células del SNC presentan la misma vulnerabilidad selectiva frente a la isquemia (las neuronas son más sensibles que las

células gliales como oligodendrocitos y astrocitos), por lo que el desarrollo de muerte celular e infarto puede variar de minutos a horas³. En varios tejidos del SNC se presenta un cambio bifásico del potencial de membrana por la inhibición de la fosforilación oxidativa. La hiperpolarización transitoria es seguida por una despolarización terminal, finalmente irreversible¹⁸.

1.5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

La falta absoluta de oxígeno y glucosa al tejido neuronal activa una serie de cascadas patológicas que conllevan a la producción de la muerte neuronal. Entre estas vías con un papel crítico en el daño isquémico, especialmente en la zona de penumbra, están la sobreactivación de receptores de glutamato, la acumulación intracelular de iones calcio, la activación de células inflamatorias, el aumento de la producción de radicales libres y procesos patológicos de apoptosis (Figura 6)¹⁹.

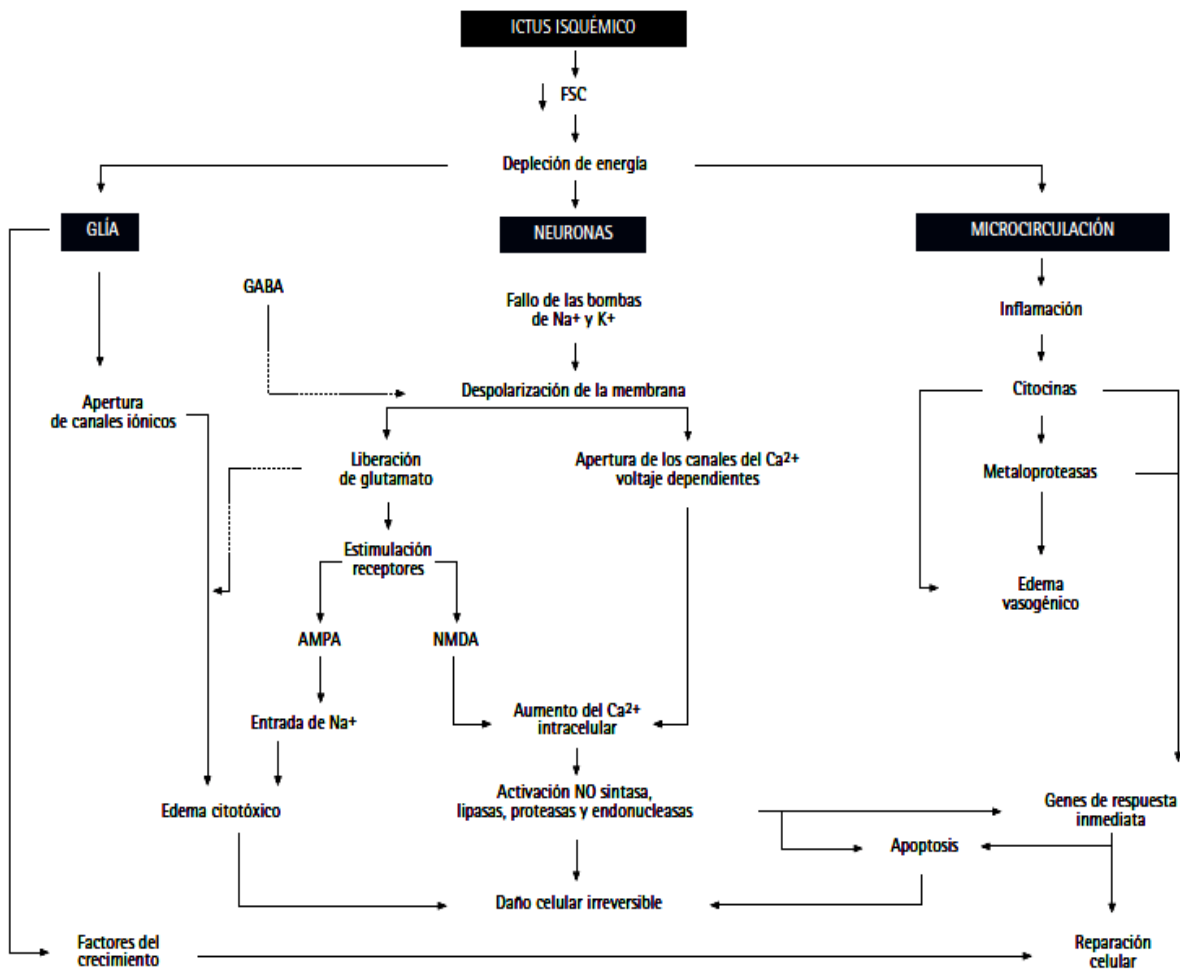


Figura 6. Cascada de eventos que se desencadenan durante la isquemia cerebral.

La cascada de eventos que se desencadenan durante la isquemia es muy compleja, pero puede explicarse de la siguiente manera.

La isquemia cerebral aguda inicia con la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y una disminución de ATP, lo cual origina una disfunción de las bombas iónicas (bombas de sodio-potasio ATPasa y otras

bombas iónicas dependientes de energía) y una pérdida progresiva del potencial de membrana. En estas condiciones, las neuronas y las células gliales se despolarizan (despolarización anóxica) por la entrada excesiva de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma²⁰, así como la salida de potasio; incrementando la concentración de potasio extracelular²¹. La falla energética y la despolarización anóxica ocasionan la liberación de cantidades excesivas de glutamato y otros aminoácidos excitadores en el espacio sináptico²², que estimulan a los receptores AMPA, NMDA. La sobre-estimulación de los receptores NMDA induce un incremento en las concentraciones de calcio intracelular¹⁵ que activa una serie de enzimas (proteincinasas, proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, proteinfosfatasa, y sintasa del óxido nítrico) e induce la formación excesiva de radicales libres²⁵ produciendo muerte neuronal. (Figura 6).

1.6. SÍNTOMAS CLÍNICOS

Si el tejido cerebral es privado de sangre y oxígeno durante dos horas o más, las células cerebrales mueren y no pueden ser sustituidas. De esta manera las partes del cuerpo que son controladas por el área afectada del cerebro presentan disfunciones. Esta pérdida de la función, puede ser temporal o permanente según la severidad del evento isquémico. Los síntomas producidos por un infarto cerebral dependen del lugar en el que se produzca la disminución del flujo sanguíneo, así como de la intensidad y extensión de la isquemia. Conviene recordar que el principal aporte de sangre al cerebro se consigue mediante las dos arterias carótidas y las dos arterias vertebrales que se unen formando el tronco basilar; mismo que en la base del cráneo establecen una comunicación formando el polígono de Willis.

Los principales síntomas que se producen durante un infarto cerebral 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.
 - Debilidad o parálisis del brazo, la pierna o el rostro; generalmente de un lado del cuerpo.
 - Incapacidad para caminar y/o ataxia.
 - Vista nublada en uno o ambos ojos.
 - Tinnitus y/o hipoacusia.
 - Dislexia.
 - Mareo, confusión, desmayo o coma.

1.7. 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 sujeto. Ocasionalmente, la obstrucción de la arteria carótida produce un soplo que se puede escuchar colocando un estetoscopio en el cuello encima de la misma; sin embargo, no siempre se escuchan soplos.

Otros métodos de diagnóstico utilizados son:

- Ultrasonografía Doppler: ecografía que utiliza ondas sonoras para examinar el flujo sanguíneo y medir el grosor de las arterias carótidas.
- Angiografía por resonancia magnética: resonancia magnética que emplea campos magnéticos inofensivos pero potentes para producir una imagen detallada de las arterias del cerebro.

-
- Oculopleletismografía: mide los pulsos de las arterias que se encuentran en el fondo del ojo. Es una manera indirecta de detectar obstrucciones en las arterias carótidas.
 - Arteriografía y angiografía por sustracción digital: métodos radiográficos que permiten visualizar las arterias carótidas después de inyectar un medio de contraste especial en el torrente sanguíneo.

1.8. TRATAMIENTO

La estrategia del tratamiento de la isquemia cerebral en su fase aguda tiene dos objetivos principales: la restauración del flujo sanguíneo cerebral (reperusión) y la limitación del daño neuronal (neuroprotección). La orientación terapéutica más importante en estos pacientes con infarto cerebral consiste en mejorar el flujo sanguíneo cerebral y reducir o bloquear las consecuencias metabólicas a nivel celular y subcelular²⁶.

Por su significado terapéutico y como ya se mencionó anteriormente, es importante recalcar que entre la zona de infarto y el tejido con perfusión sanguínea normal se encuentra zona de penumbra, potencialmente recuperable y que es el blanco del tratamiento farmacológico (neuroprotección). En esta zona la función neuronal eléctrica está disminuida, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva su integridad estructural durante algún tiempo, hasta que la producción de ATP cae por debajo del 50% de los niveles normales²⁷. La viabilidad de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado ya que la disminución de las reservas de oxígeno y glucosa desencadena diversos procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular²⁸. De manera que la zona de penumbra constituye el blanco principal para la

mayoría de las intervenciones médicas agudas utilizadas entre las 3 y 6 horas post-infarto²⁹.

La terapia postinfarto sólo se refiere a las medidas generales de mantenimiento y a la disminución de la presión intracraneal, ya que los fármacos capaces de reducir el tamaño del infarto en animales de laboratorio carecen de eficacia clínica³⁰. En este sentido, los modelos animales juegan un papel importante en la continua búsqueda de compuestos con potencial efecto neuroprotector. En estos se han evaluado fármacos que han demostrado ser útiles en la reducción del área de necrosis. Se ha confirmado en estos modelos, que si se inicia la terapia al mismo tiempo que la isquemia, y antes de la reperusión, se obtiene un beneficio mayor. Esto se alcanza sólo cuando la terapia se inicia a las pocas horas del inicio de la isquemia³¹.

2. MODELOS EXPERIMENTALES

A nivel experimental, con el empleo de diversos modelos animales de isquemia cerebral, se ha demostrado la existencia de un gran número de moléculas capaces de interferir con la cascada de eventos que producen daño celular durante el evento isquémico; sin embargo, ninguna de ellas reduce la mortalidad ni favorece la recuperación funcional de los pacientes con infarto cerebral. Esta falta de correlación entre los estudios experimentales y clínicos fundamenta los cuestionamientos a los modelos animales 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 útiles³².

El desarrollo de los modelos animales experimentales de isquemia cerebral focal, han permitido mejorar el conocimiento que se tiene acerca de ésta fisiopatología, así como implementar nuevas estrategias terapéuticas.

Estos modelos son objeto de el desarrollo de una situación experimental similar a la que ocurriría en una condición clínica humana, las cuales han estudiado los mecanismos de daño de las lesiones y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. El avance de estos estudios radica en que han podido reproducir la isquemia cerebral bajo condiciones estándar, controlando variables que pudieran interferir con los resultados deseados (gravedad, duración y localización del evento), facilitando la omisión de variables inherentes a la enfermedad.

Un nuevo modelo experimental debe conocer algunos de los requerimientos que tienen que ser evaluados. Este debe ser reproducible, fácil y adecuadamente similar a las condiciones clínicas, intentando imitarlo en la medida de lo posible, con la introducción de algunas variables y equipos.

Existen modelos experimentales de isquemia cerebral, global y focal. 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 específicamente las ratas, son los animales con los que los diversos modelos de isquemia cerebral han decidido trabajar. La decisión de los investigadores para utilizar estos animales, son primeramente, por su aceptación desde un punto de vista ecológico, 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.

Existen 5 modelos básicos para el estudio de este padecimiento, de los cuales, algunos de ellos han sido modificados para mejorarlos o adaptarlos a el objetivo de las investigaciones.

- Ligadura de la arteria cerebral media
- Ligadura adicional en una o ambas carótidas
- Trombosis focal inducida fotoquímicamente
- Oclusión arterial por un nudo intravascular
- Oclusión arterial por Embolia

Microesferas

Trombo

Todos los modelos animales de isquemia cerebral focal han demostrado dos principales desventajas cuando son usados para el estudio de agentes neuroprotectores. La primera desventaja es la variabilidad en el tamaño de la lesión producida. La cual requiere un control extremo de variables que pueden afectar el desarrollo del daño isquémico y el incremento sustancial del tamaño de la muestra para obtener diferencias significativas entre grupos, la cual reduce el intervalo costo-eficacia, y en gran medida el costo económico de los experimentos.

Por otro lado, esto podría sugerir la necesidad para usar otros métodos para evaluar la acción terapéutica de un agente y en adición efectos en el tamaño del daño isquémico producido.

La segunda gran desventaja, es la alta tasa de mortalidad, particularmente en modelos de isquemia cerebral global y cuando se ocluyen grandes arterias lo que provoca un daño cerebral extenso, pero si estos resultados muestran una reducción el costo-

eficacia del modelo, desde que se involucran la necesidad de estudiar un gran número de animales y lograr un adecuado número de sobrevivientes, si la mortalidad puede ser mostrada gracias al daño, cerebral producido por la isquemia, los efectos benéficos de un agente terapéutico podrían ser medidos en términos de la reducción en la mortalidad del daño cerebral.

3. MODELO DE ÍLEON DE COBAYO

El Sistema Nervioso Entérico (SNE) comprende una colección de neuronas presentes en los plexos mientérico y submucoso³³ que pueden funcionar relativamente de manera independiente del SNC y que produce 25 o más sustancias transmisoras^{34, 35, 36} que han sido involucradas en la transmisión de las sinapsis entéricas. Como otros órganos, la integridad del intestino delgado requiere un continuo aporte de oxígeno y glucosa; y, aparentemente, la isquemia/reperfusión en el intestino dispara una cascada de eventos moleculares patológicos^{37,38,39,40}, los cuales también juegan un papel central en la patogénesis del infarto asociado con daño neuronal en el SNC^{25,41,42}.

La mayoría de los estudios sobre la isquemia intestinal se han enfocado al efecto de la isquemia/reperfusión sobre la mucosa intestinal^{40, 43}, indicando que el daño en la mucosa después de la isquemia induce un incremento en la permeabilidad vascular, edema intestinal, pérdida de la función de la barrera y translocación bacteriana, así como absorción de endotoxinas, produciendo un incremento en la respuesta inflamatoria sistémica^{44,45,46,47}; pero pocos estudios han determinado los cambios sobre las neuronas entéricas y la función contráctil del intestino.

Por otra parte, dependiendo del tiempo y la intensidad de la isquemia, cuando un tejido es reoxigenado, el daño tisular puede ser exacerbado⁴⁸. Esto ha sido atribuido principalmente a la generación de radicales libres, ya que se ha demostrado que estos juegan un papel central en el daño intestinal postisquémico⁴⁹⁻⁵³, incrementando la peroxidación lipídica en membranas celulares, y el daño oxidativo al ADN y a las proteínas⁵³.

4. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO

Las funciones gastrointestinales requieren del funcionamiento coordinado e integrado de varios componentes del tubo digestivo como son: el epitelio mucoso, submucoso, la musculatura lisa, vasos sanguíneos, ganglios linfáticos y glándulas anexas como son: glándulas salivales, páncreas o la vesícula biliar⁵⁴. El SNE integra motilidad, secreciones, flujo sanguíneo y respuestas inmunes a través de una red neural cuyos cuerpos celulares se encuentran en la pared del tubo digestivo (inervación intrínseca) y que está comunicado con el SNC (inervación extrínseca)⁵⁵. Otros subcomponentes importantes del sistema digestivo como es el sistema endocrino⁵⁶ y el sistema inmunológico⁵⁷ también tienen relaciones estructurales y funcionales con el sistema neural, automodulándose.

Las neuronas entéricas llevan a cabo sus funciones utilizando múltiples mecanismos de neurotransmisión que aumentan o disminuyen la excitabilidad neuronal. Los cuerpos celulares de las neuronas del SNE se encuentran agrupadas en estructuras ganglionares las que, a su vez, se interconectan entre si formando dos grandes plexos: el plexo mientérico, situado entre la capa muscular lisa longitudinal externa y circular interna, y se extiende a lo largo de todo el tubo digestivo, del esófago hasta el recto; y el plexo submucoso ubicado entre la capa muscular circular y la mucosa, se localiza sólo en el intestino delgado y grueso (Figura 7). En general, el plexo mientérico controla la contracción y relajación del músculo liso intestinal, mientras que el plexo submucoso se ocupa del control de las funciones de absorción y secreción del epitelio gastrointestinal y el flujo sanguíneo local. 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^{56,58,59}.

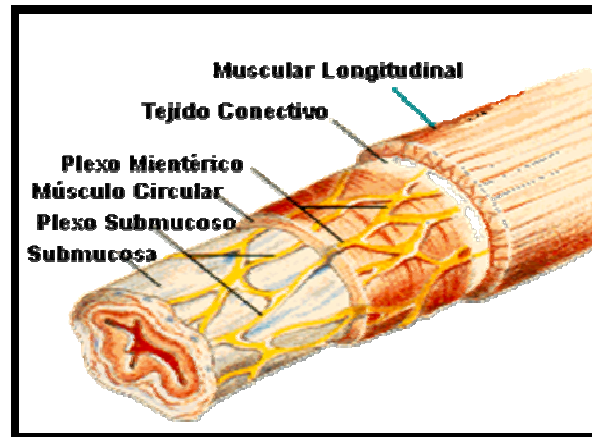


Figura 7. Localización de los plexos mientérico y submucoso.

El SNE tiene tantas neuronas como las de la médula espinal y controla varias funciones de la musculatura lisa, de la micro-circulación local y del transporte transepitelial, además de ser responsable de importantes reflejos como el peristáltico y el complejo motor migratorio (MMC). Aunque es altamente autónomo, el SNE mantiene estrechas conexiones con el SNC. Posee una doble inervación extrínseca a través de los sistemas simpático y parasimpático. Ambos contienen fibras aferentes, sensoriales que transmiten información al SNC, y fibras eferentes motoras que inervan los órganos efectores (Figura 8).

Las fibras preganglionares parasimpáticas proyectan hacia los ganglios entéricos del estómago, el colon y el recto a través de los nervios vagos, pélvicos y esplácnicos. Las fibras simpáticas se originan fundamentalmente en los ganglios paravertebrales, aunque algunas lo hacen en los ganglios prevertebrales, y se proyectan a los plexos mientérico y submucoso^{59,60}.

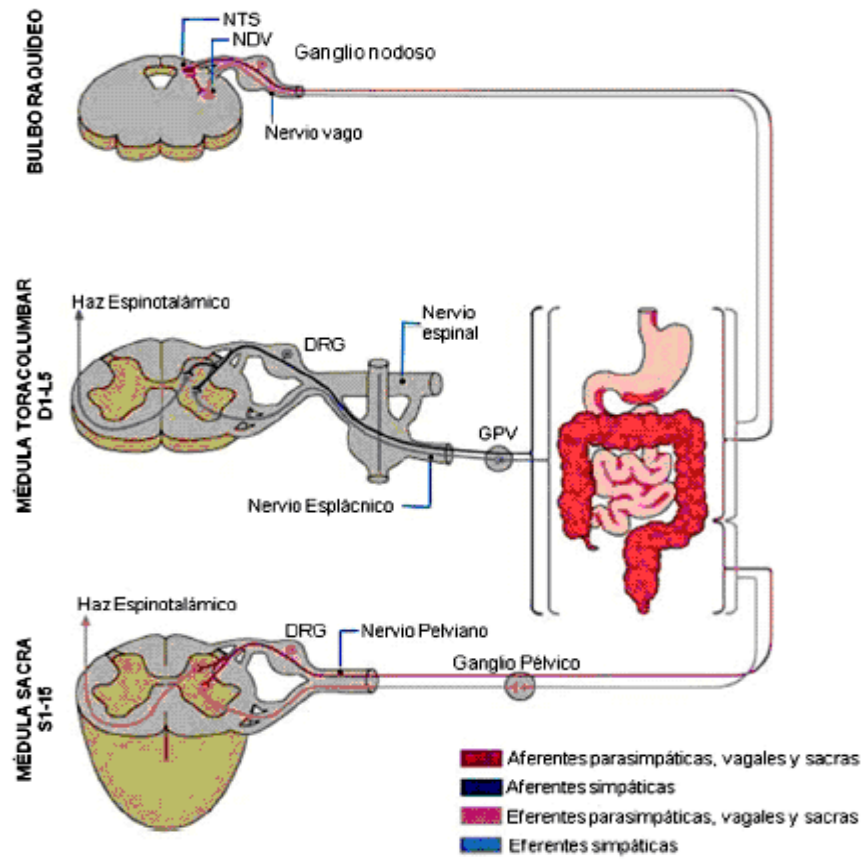


Figura 8. Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático. NTS: núcleo del tracto solitario. DRG: ganglio de la raíz dorsal. NVD: núcleo dorsal del vago. GPV: ganglios prevertebrales (celíaco, m. superior, m. inferior, pélvico) (Modificado de Kandel y cols., 2000).

4.1. TIPOS DE NEURONAS ENTÉRICAS.

Al igual que el sistema nervioso central, las neuronas del Sistema Nervioso Entérico se pueden clasificar de acuerdo a su funcionalidad en: motoras, sensoriales e interneuronas.

4.1.1. NEURONAS MOTORAS

Las neuronas motoras representan la conexión final motora con las células del músculo liso de las capas circular y longitudinal. Se pueden subclasificar en motoneuronas excitatorias e inhibitorias, según los neurotransmisores que codifican⁵⁶, y también se pueden subclasificar según la capa muscular³⁵. Se ha establecido que los neurotransmisores que codifican mayoritariamente las motoneuronas excitatorias son la acetilcolina (ACh) y las taquininas, como son la neuroquinina A (NKA) y la sustancia P. como principales neurotransmisores inhibitorios codificados por motoneuronas se han propuesto el óxido nítrico (NO), el ATP, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de adenil-ciclasa-pituitaria (PACAP) y el monóxido de carbono (CO). Por sus características electrofisiológicas se les clasifica como neuronas “S”, que al ser estimuladas eléctricamente se generan potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) rápidos. Dentro de las motoneuronas podemos encontrar un pequeño subgrupo, las neuronas secretomotoras y vasomotoras (Figura 9), que son neuronas que se proyectan a la mucosa y a vasos sanguíneos locales⁵⁶.

4.1.2. NEURONAS SENSORIALES

Las neuronas sensoriales son llamadas también neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs), tienen sus cuerpos celulares tanto en los ganglios del plexo mientérico como en los del plexo submucoso y proyectan sus terminales hacia la mucosa intestinal. Responden a estímulos químicos, deformación mecánica de la mucosa y otros estímulos como el estiramiento radial y la tensión muscular³⁵. En el cobayo estas neuronas son Dogiel tipo II (poseen diversos axones que se pueden o no ramificar a poca distancia del cuerpo celular) y tienen propiedades electrofisiológicas tipo AH (Afterhyperpolarization) que se caracteriza por una hiperpolarización de larga duración seguida por un potencial de acción (AHP). Se piensa que está AHP reduce grandemente la excitabilidad de los cuerpos neuronales de las células sensoriales³⁵. Esta hiperpolarización se debe a la entrada de Calcio (Ca^{2+}) durante el potencial de acción que abre canales de potasio activados por Ca^{2+} . Las IPANs recibe EPSPs lentos, la fuente de estos potenciales son otras neuronas sensoriales intrínsecas formando redes inervadas recíprocamente. Estos EPSPs lentos son principalmente mediados por sustancias P y taquininas actuando sobre receptores a neuroquinina como NK3 y posiblemente NK1. Además presentan varios receptores unidos a proteínas G que cuando se activan también producen despolarizaciones similares a EPSPs lentos, en particular receptores activados por Serotonina (5-HT), colecistoquinina (CCK), prostaglandina PGE_2 , histamina y ATP, éste último actuando a través de los receptores P_2Y inhibidores. Las IPANs están interconectadas formando redes y reciben entradas de otras IPANs, además se conectan con interneuronas y con motoneuronas. Por lo general, no es frecuente que las neuronas sensoriales intrínsecas reciban entradas sinápticas rápidas pero se ha encontrado que poseen muchos de los receptores que median éstas entradas como son los receptores nicotínicos a ACh, $5-HT_3$, $GABA_A$ y P_2X ³⁵.

4.1.3. INTERNEURONAS

Las interneuronas se han identificado en todas las regiones del tracto gastrointestinal y forman cadenas en dirección oral. Por lo que, se pueden diferenciar en ascendentes y descendentes. Las interneuronas ascendentes son colinérgicas y forman cadenas que se extienden a lo largo del intestino. Al parecer estas interneuronas están implicadas en reflejos locales así como dos de los tipos de interneuronas descendentes. Las interneuronas tienen el siguiente código químico: ChAT/NOS/VIP-±BN± GABA±NPY, ChAT/SOM y ChAT/5-HT. Estudios de las conexiones de estas neuronas sostienen la hipótesis de que, las neuronas ChAT/NOS/VIP, están involucrados en los reflejos de motilidad local, que las neuronas ChAT/SOM están involucradas en la conducción de MMC en el intestino delgado y las neuronas ChAT/5-HT están involucradas en los reflejos secreto-motores, pero no directamente en los reflejos de motilidad⁵⁶. Investigaciones farmacológicas de transmisión de neurona a neurona en el intestino delgado han revelado dos EPSP rápidos no colinérgicos, uno mediado por ATP y el otro por 5-HT. La transmisión por ATP es una vía descendente, sin embargo, ésta al parecer, no es una vía para el control de la motilidad a través de reflejos locales. Así pues, el ATP podría ser un neurotransmisor de las interneuronas ChAT/SOM o ChAT/5-HT. Otra posibilidad es que el ATP sería un neurotransmisor de un sub-grupo de neuronas aferentes primarias, las cuales tienen axones largos analmente dirigidos. Al igual que las motoneuronas, se clasifican como neuronas "S"⁵⁶.

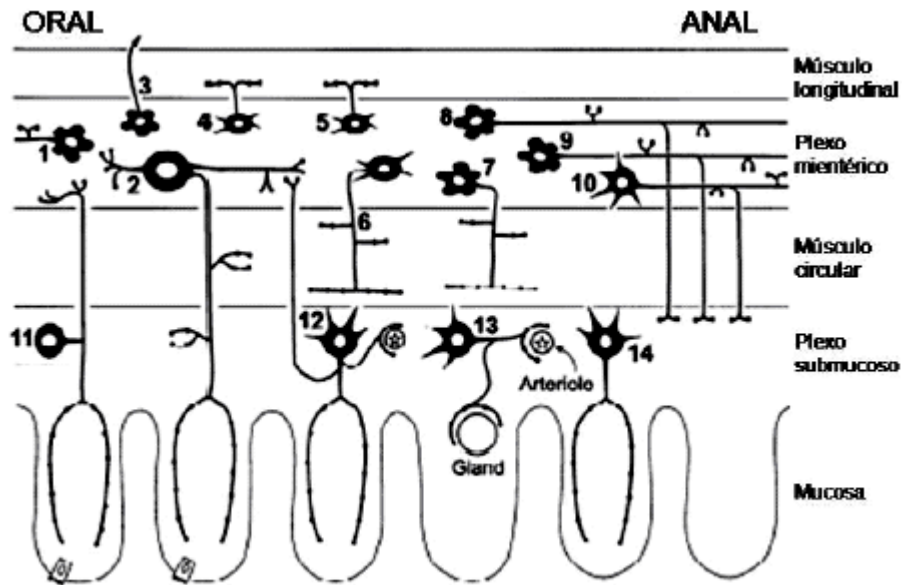


Figura 9. Tipos de Neuronas del Intestino de cobayo: (1) interneuronas ascendentes; (2)IPAN mientérica; (3) neurona intestinfugal; (4) motoneurona longitudinal excitatoria; (5) motoneurona longitudinal inhibitoria; (6) motoneurona circular excitatoria; (7) motoneurona circular inhibitoria; (8) interneurona descendente (reflejo local); (9) interneurona descendente(reflejo secretomotor); (10) interneurona descendente (MMC); (11) IPAN submucosa; (12) neurona secretomotora y vasodilatadora no colinérgica; (13) neurona secretomotora y vasodilatadora colinérgica; (14) neurona secretomotora (no vasodilatadora) colinérgica: (Furness, 2000).

Además de las neuronas, en el SNE encontramos la glía entérica, que fue en un principio descrita por Dogiel. Actualmente se sabe que superan a las neuronas entéricas en un número 4 a 1. En un principio se pensaba que la glía entérica tenía básicamente un papel de soporte y de aporte de nutrientes, pero recientemente se ha demostrado que la glía entérica puede tener varias funciones asociadas a la neurotransmisión, participando a su vez, en diversas funciones motoras y de barrera. Diversas evidencias experimentales apoyan dichas hipótesis⁶¹. Aunque en la actualidad, la función de la glía en el SNE es aún poco conocida.

4.2. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN EL SNE

El sitio donde una neurona se comunica con otra célula se le conoce como sinapsis. Dos elementos pueden ser identificados en todas las sinapsis, el presináptico y el postsináptico. La transmisión sináptica puede ser de dos tipos: una eléctrica debido a que la comunicación se establece a través de canales intercelulares (uniones comunicantes) que se caracterizan por una baja resistencia eléctrica, y otra química debido a que se utilizan sustancias llamadas neurotransmisores, las cuales son liberadas del elemento presináptico y activan proteínas receptoras en el postsináptico. En ambos tipos de comunicación sináptica se modula el potencial de membrana en reposo del elemento postsináptico. En la transmisión sináptica química, estos cambios de potencial suceden por la activación de receptores que modifican del flujo iónico a través de la membrana plasmática⁶⁰. La transmisión sináptica en el SNE se realiza mediante receptores unidos a proteínas G (GPCRs) o receptores metabotrópicos y receptores directamente asociados a canales iónicos mejor conocidos como canales ionotrópicos o canales iónicos operados por ligando (LGIC)⁵⁸.

4.3. NEUROTRANSMISORES DEL SNE

El SNE es una colección de neuronas que se encuentran dentro de los plexos mientérico y submucoso³³ las cuales pueden funcionar relativamente independiente al SNC y controlar o modular la motilidad, secreciones endocrinas o exocrinas, la microcirculación y procesos a las respuestas inmunes e inflamatoria⁵⁷. Producen alrededor de 25 o más neurotransmisores, los cuales pueden ser péptidos, aminas,

aminoácidos, y los monóxidos NO y CO^{62,63,36} uno de los cuales podría estar involucrado en la transmisión de la sinapsis entérica⁶⁴.

La estimulación eléctrica del SNE provoca respuestas secretoras⁶⁵. Los reflejos secretomotores son iniciados fisiológicamente por interacción química y mecánica con las sustancias de la luz intestinal. Un importante estímulo de secreción aparece por la presencia de la recaptura activa de nutrientes, como la glucosa^{66,36,56,67}.

Estos efectos no sólo son locales, también aparecen en otras partes del intestino, principalmente con la participación de reflejos intrínsecos, los cuales indican una activación general del SNE⁶³. Estos reflejos son circuitos integrados, que consisten en neuronas sensoriales (principalmente neuronas intrínsecas) con terminaciones en la mucosa y un circuito integrado en los plexos mientérico y submucoso que alimenta a neuronas secretomotoras con células en los ganglios del plexo submucoso. Las neuronas no colinérgicas parecen mediar más de las respuestas locales, utilizando taquicininas (Sustancia P) y el péptido intestinal vasoactivo (PIV) como sus principales neurotransmisores.

Otros neurotransmisores involucrados en los procesos de secreción son el ATP, el cual es liberado desde la mucosa y causa secreción de HCl después de la activación de los receptores P₂Y. Otro importante neurotransmisor involucrado en la secreción es el 5-HT, que es liberado por células enterocromafines. 5-HT activa neuronas intrínsecas, estas activan tetodrotoxin sensible colinérgico y el péptido intestinal vasoactivo enlazan los receptores epiteliales y estimulan la secreción de fluidos, HCl e inhibe la absorción de Na⁺⁶⁸. Numerosas sustancias (ej. Adenilato Ciclasa y glutamato) modulan la actividad de neuronas secretomotoras. De tal modo estos potencian o inhiben secreciones de iones y agua^{65-67,56}.

4.3.1. ACETILCOLINA

La Acetilcolina (ACh) que actúa en receptores neuronales muscarínicos. El mecanismo predominante de neurotransmisión excitatoria en el sistema nervioso entérico. La ACh esta, por lo tanto, involucrada en casi todas las funciones gatrointestinales. Todos los potenciales eléctricos evocados de potenciales sinápticos excitatorios, desde neuronas entéricas tipo S (Synaptic) y AH (afterhyperpolarization)^{57,69} son inhibidos, al menos una parte, por receptores antagonistas de ACh⁷⁰. La ACh actúa en los receptores neuronales muscarínicos de ACh activando la conductancia, la cual incluye permeabilidad de calcio. El receptor neuronal de ACh es un ligando con dos subunidades y cuatro dominios transmembranales. Los receptores neuronales de ACh están localizados en las interneuronas y neuronas motoras en donde medían la excitación. Los receptores presinápticos de ACh tal vez, también pueden mediar la liberación de neurotransmisores en ganglios mientéricos y uniones neuroefectoras⁷⁰. Un número significante de interneuronas, en particular del tipo descendentes, contienen acetiltransferasa y serotonina, sugiriendo que la ACh y serotonina son cotransmisores en muchos procesos moduladores⁷⁰.

4.3.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN EN EL MÚSCULO LISO

La activación del sistema nervioso parasimpático modifica la función de órganos, por dos mecanismos principales. En primer lugar, la ACh liberada de los nervios parasimpáticos activa los receptores muscarínicos en las células efectoras, para modificar en forma directa la función de ese órgano. Luego, dicha catecolamina del mismo origen, interactúa con receptores muscarínicos en las terminaciones nerviosas para inhibir la liberación de su neurotransmisor. A través de este mecanismo, la ACh liberada modifica de manera indirecta la función de los órganos, al modular los efectos de los sistemas simpático y parasimpático.

Se han definido subtipos de receptores muscarínicos (M_1 - M_5), los cuales se activan y uno o más de ellos podrían actuar como segundos mensajeros para la activación muscarínica. En el músculo liso, en su mayoría, los receptores presentes son los subtipos M_2 y M_3 . Al igual que en otros tejidos con músculo liso, en el intestino delgado se presentan una combinación del 20% de receptores M_3 y un 80% de receptores M_2 ⁷¹.

Estos receptores muscarínicos al parecer son del tipo acoplado a proteína G y están asociados a la respuesta contráctil del músculo liso. Al parecer el mecanismo por el cual actúa la ACh a través de los receptores M_3 parte cuando la ACh activa dicho receptor, produciendo un efecto en la proteína G_q la cual activa la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato por medio de la fosfolipasa C. De esta hidrólisis se obtiene el inositol trifosfato y el diacilglicerol (DAG). Algunos datos indican que DAG participa en la apertura de canales de calcio de músculo liso; el trifosfato de inositol actúa sobre el receptor de inositol trifosfato (IP_3R) en la membrana del retículo sarcoplásmico. Este permite un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} debido a su liberación desde el retículo sarcoplásmico⁷². 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 (MLCK, en inglés). La MLCK lleva a cabo la fosforilación de la miosina de cadena corta generando que se desplace entre los filamentos de actina, generando una respuesta contráctil en las fibras musculares del músculo liso. Los agentes muscarínicos también incrementan las concentraciones del monofosfato cíclico de guanosina intracelular (GMPc). La activación de receptores muscarínicos también intensifica el flujo de potasio a través de las membranas de los miocardiocitos y lo disminuye en las células ganglionares y del músculo liso. La activación del receptor muscarínico en algunos tejidos como corazón e intestinos inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y modula el incremento de monofosfato cíclico de adenina (AMPc).

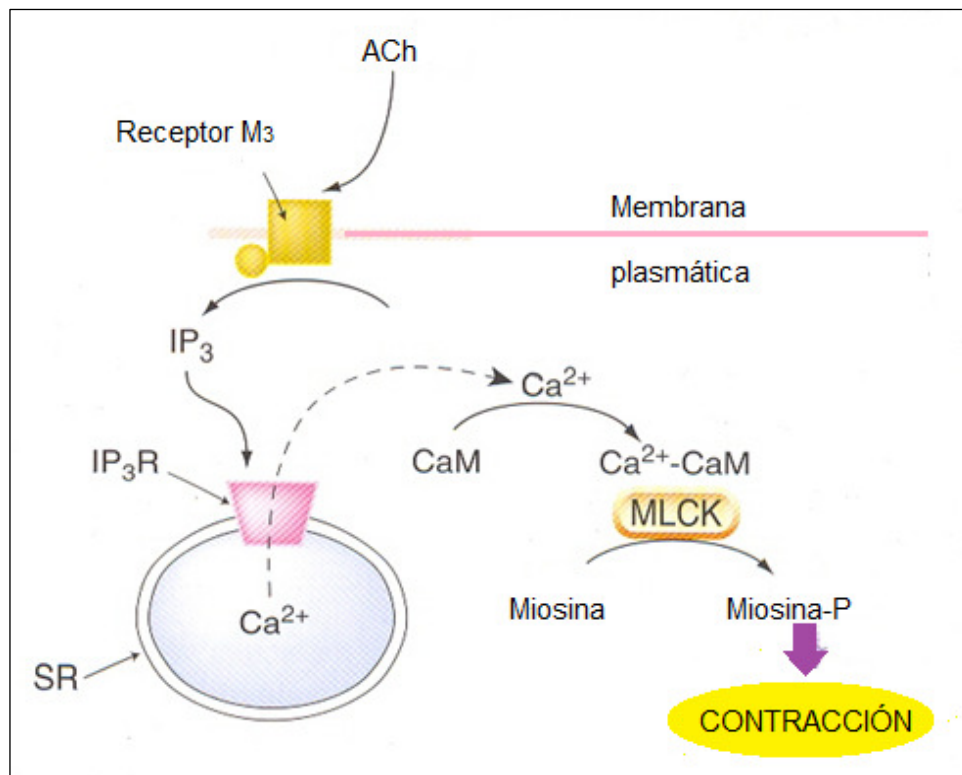


Figura 10. Mecanismo de acción de ACh en receptores M₃

En conclusión la acetilcolina y los agonistas muscarínicos presentan un efecto doble sobre la contracción del intestino delgado; ya que mientras que la activación de los

receptores M3 producen una contracción directa del tejido, los receptores M2 inhiben la relajación del tejido por una disminución de AMPc.

4.3.2. SEROTONINA

La serotonina (5-hidroritriptamina, 5-HT) es un importante neurotransmisor endócrino en el tracto gastrointestinal y tiene acciones complejas en el intestino. Es sintetizada, almacenada y liberada por células enterocromafines y neuronas entéricas, participando en funciones motoras y de secreción. A lo largo del tracto gastrointestinal las neuronas inmunorreactivas de 5-HT son principalmente interneuronas del plexo mientérico. Las neuronas mientéricas serotoninérgicas son relativamente largas y actúan en sentido descendente.

La serotonina se libera desde células enterocromafines en respuestas al contenido intestinal y estímulos. La liberación de la serotonina ejerce varios reflejos, a través de receptores, los cuales son localizados en neuronas aferentes primarias intrínsecas y extrínsecas, en ganglios, en membranas axonales, nervios terminales, células enterocromafines, enterocitos y células del sistema inmune.

La serotonina en general, es un agente procinético liberador de ACh, pero tal vez también inhiba la peristalsis intestinal bloqueando la liberación de ACh desde nervios colinérgicos presinápticos que terminan en los ganglios⁶⁹. Esto parece ser provocado por la acción de 5-HT sobre múltiples receptores de 5-HT. Con excepción del receptor 5-HT₃, quien forma un ligando con canal iónico, todos los receptores 5-HT pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G⁷³. Los receptores 5-HT están dispuestos funcionalmente en parejas o en series. Por primera instancia los receptores 5-HT₃ y 5-HT₄ son dispuestos en vías paralelas, las cuales medían los reflejos de motilidad

y secreción. Estos son expresados por distintas neuronas en el tracto gastrointestinal⁷⁴. Los receptores excitatorios son del subtipo 5-HT_{1B}, 5-HT₃, y 5-HT₄ y el receptor inhibitorio es el 5-HT_{1A}. Los receptores 5-HT₄ median respuestas rápidas promoviendo la facilitación presináptica de potenciales postsinápticos excitatorios rápidos de neuronas mientéricas, por lo tanto facilitan el peristaltismo. La 5-HT activa la submucosa generando potenciales y respuestas por secreción de ACh, calcitonina o sustancia P en el sistema nervioso entérico⁷⁵.

Los nervios entéricos que contienen 5-HT exhiben el mismo mecanismo de recaptura para 5-HT como lo hacen las neuronas serotoninérgicas del SNC. La importancia de la neurotransmisión serotoninérgica para la motilidad intestinal ha sido demostrada por experimentos, en los cuales la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina, fue empleada para destruir neuronas serotoninérgicas selectivas. Estos experimentos establecen que la motilidad normal es disminuida y el tránsito del intestino es lento cuando se pierden las neuronas serotoninérgicas⁷⁶.

Al menos los receptores 5-HT₃, y 5-HT₄ están involucrados como mediadores de la secreción de 5-HT y actividad peristáltica, el antagonismo de estos dos receptores reduce la secreción y peristaltismo de 5-HT^{68,55}.

4.3.3. HISTAMINA

La histamina ejerce sus acciones biológicas al combinarse con receptores específicos que están en la membrana de la célula. Los cuatro receptores distintos de esta sustancia que se han identificado se han clasificado como H₁, H₂, H₃, H₄. A diferencia de otros receptores de transmisión amínicos, dentro de esta división no hay subfamilias. Se ha logrado la clonación de los cuatro tipos de receptores y pertenecen a la gran super familia de las estructuras que tienen siete regiones de membrana y se acoplan a proteínas G. La estructura de los receptores H₁ y H₂ difiere de manera significativa y al parecer guarda una semejanza con los receptores muscarínicos y de 5-HT₁, respectivamente, que entre sí.

En el encéfalo los receptores H₁ y H₂ se encuentran en las membranas postinápticas, mientras que los receptores H₃ son presinápticos de manera predominante. La activación de los receptores H₁ que están en endotelio, células de músculo liso y terminaciones nerviosas, suelen desencadenar un incremento en la hidrólisis de fosfoinositol y también en la concentración de calcio intracelular⁷².

En el músculo liso del tubo digestivo, la histamina contrae el músculo liso y la contracción inducida en el íleon de cobayo es un bioensayo estándar para identificar la amina. El intestino de los seres humanos no es tan sensible como el de cobayo, pero dosis grandes de histamina pueden ocasionar diarrea, en parte como consecuencia de dicho efecto; tal acción de la histamina es mediada por receptores H₁⁷².

4.3.4. EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE K⁺ EXTRACELULAR

La contracción del músculo liso está directamente relacionada con la concentración citosólica de Ca²⁺. A su vez, las contracciones y la elevación del Ca²⁺ intracelular, se encuentran reguladas por mecanismos fisiológicos y por mecanismos electromecánicos. Estos últimos involucran la despolarización de la membrana, en donde no es necesaria la presencia de receptores específicos como en los mecanismos farmacológicos. En el caso de la administración de concentraciones altas de cloruro de potasio (KCl) sobre el músculo liso, se sigue un mecanismo electromecánico donde la elevada concentración de K⁺ extracelular induce la despolarización de la membrana, lo cual abre los canales dependientes de voltaje de Ca²⁺ tipo L, generando de esta manera un incremento en la concentración de este ion en el interior de la célula, y por consiguiente, la generación de la contracción (Figura 11)⁷⁷.

Canales de Ca²⁺ dependientes de ligando

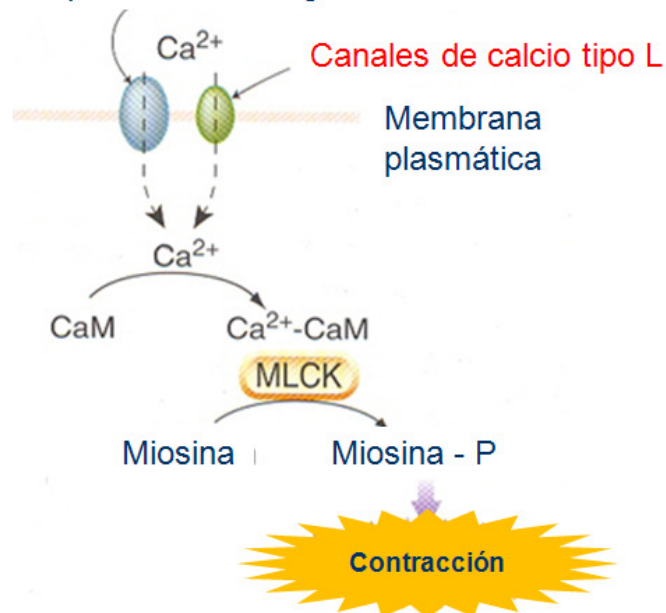


Figura 11. Contracción inducida por la entrada de calcio extracelular

4.3.5. EFECTO DEL BARIO EN EL MÚSCULO LISO.

El ión Bario (Ba^{2+}), el cual entra en el espacio intracelular, estimula directamente el mecanismo contráctil, indicando que el Ba^{2+} funciona mediante la activación del canal de Ca^{2+} , libera Ca^{2+} de las vesículas, pero no se acumula en ésta, y se activan directamente las proteínas contráctiles a través de la formación de un complejo Ca^{2+} - calmodulina, siguiendo un mecanismo contráctil muy similar al de el ion Ca^{2+} ⁷⁸.

4.3.6. ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL INTESTINO DELGADO

Además de la clasificación que ya se había revisado sobre las neuronas presentes en el SNE, existe otra clasificación desde un punto de vista electrofisiológico donde las neuronas son designadas como “S” y “AH”. Las neuronas de tipo S, al ser estimuladas eléctricamente, presentan un potencial excitatorio postsináptico rápido (PEPR); mientras que las neuronas tipo AH, presentan un potencial excitatorio postsináptico lento (PEPL). Se ha demostrado, mediante estudios funcionales y neuroanatómicos, que las neuronas de tipo S representan a las interneuronas y a las neuronas motoras de la clasificación revisada anteriormente. Por otro lado, las neuronas AH representan a las neuronas intrínsecas aferentes primarias⁷⁰.

Como ya se ha mencionado, el mecanismo excitatorio predominante en el SNE se encuentra mediado por ACh quien a la vez, también es responsable del PEPR de las neuronas S. Varios estudios han mostrado que al igual que las neuronas AH, las neuronas tipo S presentan un PEPL. Sin embargo, éste no se encuentra principalmente mediado por ACh. En el caso del PEPL, la influencia de otros transmisores como las taquicininas, serotonina (5HT), prostaglandinas, somastatina y glutamato (exógeno) son de gran importancia⁷⁹.

Por lo tanto, al estimular eléctricamente el intestino delgado se produce la contracción del músculo liso debido a la secreción de varios transmisores, principalmente ACh.

Además de liberarse estos transmisores excitatorios, también se produce la estimulación de nervios inhibitorios provocando de esta manera la secreción de norepinefrina y ATP, dando como resultado una disminución en la contracción del músculo liso⁸⁰.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al ser la enfermedad vascular cerebral (EVC) un problema de salud pública que está considerada como la tercera causa de muerte en el mundo, y al ser el proceso isquémico el más recurrente en la población, se buscan fármacos neuroprotectores que actúen en la zona de penumbra que es potencialmente recuperable.

Es muy importante recalcar que existen diversos modelos experimentales de isquemia cerebral en animal íntegro que han sido empleados para estudiar los mecanismos que inducen daño durante el proceso de isquemia y encontrar fármacos capaces de proteger contra este daño. El número de animales empleados en estos modelos aunado a su mantenimiento durante el tiempo de evaluación de las alteraciones inducidas por el procedimiento experimental, los convierte en modelos poco prácticos y costosos. En contraste, el modelo de íleon de cobayo es un modelo práctico y menos costoso que los modelos *in vivo*. Esto se debe a que una vez que se obtienen varios segmentos intestinales de un animal, cada uno se puede someter a diversos tratamientos, convirtiéndolos en sujetos experimentales independientes. De esta manera podemos tener una n de 6 a 9 segmentos de un solo animal.

En estudios recientes del Laboratorio de Desarrollo de Medicamentos de la Facultad de Medicina, UNAM, se ha demostrado la utilidad del modelo de íleon de cobayo con isquemia *in situ* y superfusión *in vitro* para el estudio de la isquemia neuronal, ya que se probó que el dexrazoxano, un agente antioxidante, mostró ser un buen agente neuroprotector. Estos estudios señalan la utilidad de este modelo para el cernimiento de moléculas con potencial efecto neuroprotector.

Por estas razones se pretende usar el modelo de íleon aislado de cobayo *in vitro* sometido a diferentes tiempos de hipoxia e isquemia *in vitro*, como una herramienta farmacológica que pueda ser usada como primera instancia para probar fármacos capaces de interferir con la cascada de eventos que producen daño celular durante el evento isquémico.

III. HIPÓTESIS

Al inducir hipoxia o isquemia en el tejido de íleon de cobayo *in vitro*, se producirá una disminución de la actividad contráctil del tejido, al ser estimulada química y eléctricamente, de manera tiempo-dependiente, y esta disminución se reflejará más en los tejidos sometidos a isquemia que en los tejidos sometidos a hipoxia.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

- Evaluar las alteraciones funcionales en el íleon aislado de cobayo producidas por diferentes tiempos de hipoxia/reoxigenación e isquemia/reoxigenación a través de las respuestas contráctiles del tejido

4.2. ESPECÍFICOS

- Determinar las alteraciones funcionales en el íleon de cobayo producidas por varios periodos de hipoxia seguida por reoxigenación *in vitro* en la presencia de varios estímulos químicos.
- Determinar las alteraciones funcionales en el íleon de cobayo producidas por varios periodos de hipoxia seguida por reoxigenación *in vitro* en la presencia de un estímulo eléctrico.
- Determinar las alteraciones funcionales en el íleon de cobayo producidas por varios periodos de isquemia seguida por reoxigenación *in vitro* en la presencia de varios estímulos químicos
- Determinar las alteraciones funcionales en el íleon de cobayo producidas por varios periodos de isquemia seguida por reoxigenación *in vitro* en la presencia de un estímulo eléctrico.
- Establecer el tiempo al cual se produce el daño neuronal en tejidos sometidos a ambas condiciones experimentales.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1. TIPO DE ESTUDIO

- Experimental

5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cobayos machos de 400 a 600 g de peso corporal, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina. El manejo de los animales esta apegado a la NOM-062-ZOO-1995. Los animales se colocarán en cajas individuales en un cuarto con temperatura controlada (22+/- 2°C) con un ciclo automático de luz/oscuridad (12h/12h, luz de 07:00-19:00). 24 horas antes del experimento, se les retirará el alimento y se dejara libre acceso de agua.

5.3. CRITERIOS DE:

5.3.1. Inclusión: cobayos machos de 400-600g de peso, en condiciones de ayuno, porción de íleon de aproximadamente 15 cm., seis porciones de 2 cm. del íleon del mismo animal que se contraigan por lo menos 4 g Con ACh $1 \times 10^{-5}M$.

5.3.2. Exclusión: peso menor o mayor al indicado, tejidos que se contraigan a menos de 4 g con ACh $1 \times 10^{-5}M$.

5.3.3. Eliminación: cobayos hembras, polígrafo descalibrado o descompuesto, cámara de órgano aislado rota, tejido rasgado o roto, animal enfermo, el tejido no presenta actividad espontánea.

5.4. VARIABLE DE RESPUESTA

- Fuerza de contracción del tejido en gramos de tensión o ABC.

VI. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES

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

6.1.2. MATERIAL

- Cámaras de 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

6.1.3. EQUIPO

- Polígrafo 7D polygraph
- 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 Grass 7B polygraph
- Recirculador Haake E2
- Placa de agitación y calentamiento
- Estimulador Grass S88

6.1.4. INSTRUMENTOS

- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Termómetros

6.1.5. SUSTANCIAS

- Agua destilada
- Agua corriente
- NaCl
- KCl
- CaCl₂
- MgCl₂
- NaH₂PO₄
- NaHCO₃
- Dextrosa
- Colina

-
- Acetilcolina
 - Serotonina
 - Histamina
 - BaCl₂
 - O₂
 - N₂
 - CO₂

6.1.6. SOFTWARE

- PolyView, versión 2.5 (Grass Instruments)
- GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

VII. MÉTODO

7.1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Los experimentos se realizaron de las 7:00 a las 15:00 horas. Se usaron cobayos de 400 a 600 g de peso con 24 horas de ayuno; los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvo una porción de íleon de aproximadamente 15 cm, (descartando los 10 cm cercanos a la unión ileocecal). La porción de íleon removida se colocó en una caja Petri con solución de Krebs-bicarbonato (K-B) a 37°C, bajo continuo burbujeo con una mezcla de 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.

El tejido se limpió, quitando el tejido conectivo y restos del bolo alimenticio. Posteriormente, se cortaron seis porciones de 2.0 cm de íleon, sujetando un hilo de color blanco para la parte proximal y un hilo de color verde para la parte distal, cada porción se montó en una cámara de órgano aislado de 30 mL con solución K-B a 37°C, con 95% O₂ y 5% CO₂. La parte proximal del íleon se conectó a un transductor y se fijó una tensión de 1g a cada tejido. Las preparaciones se mantuvieron en equilibrio por 30 minutos, con superfusión (10ml/min), a 37°C y con 95% O₂ y 5% CO₂, registrando la actividad espontánea. Para asegurar la viabilidad de los tejidos, se estimularon con ACh (1X10⁻⁵ M), se registró la contracción durante 30 segundos, con ayuda del polígrafo y con el software Polyview, al terminar el registro se lavó el tejido con la solución K-B para asegurar la eliminación de la ACh de la cámara.

7.2. HIPOXIA 10, 20 40 Y 80 MINUTOS

La hipoxia tisular se indujo sustituyendo la mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ por N₂ en las seis cámaras de órgano aislado durante 10, 20, 40 y 80 minutos, después de transcurrido el tiempo de hipoxia se hizo el cambio de N₂ por la mezcla de gases inicial y se dejó reposar el tejido 10 minutos, pasado este tiempo los segmentos se estimularon eléctricamente a través de dos electrodos de una aleación de plata que están posicionados paralelamente al segmento. Se les aplicó pulsos de corriente de 3 ms de duración con un voltaje progresivo desde 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 volts, por medio de un estimulador Grass S88. Al final de este periodo las mismas preparaciones se utilizaron para hacer una curva concentración respuesta no acumulativa de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M), Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), entre cada curva se dejó reposar el tejido 10 minutos, terminadas las curva se realizó un estímulo con KCl (3.2×10^{-2} M) y finalmente una curva de BaCl₂ (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M). Es importante mencionar que se hicieron lavados después de cada concentración y cada curva de las diferentes sustancias ya que es una curva no acumulativa.

7.3. ISQUEMIA 10, 20, 40 Y 80 MINUTOS

La isquemia tisular se indujo sustituyéndola mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ por N₂ y sustituyendo el K-B normal por Krebs sin glucosa, en las seis cámaras de órgano aislado durante 10, 20, 40 y 80 minutos. Después de transcurrido el tiempo de isquemia se hizo el cambio de N₂ por la mezcla de O₂/CO₂ inicial y se sustituyó la solución Krebs sin glucosa por K-B (con glucosa) y se dejó reposar durante 10 minutos, pasado este tiempo los segmentos se estimularon eléctricamente aplicándoles pulsos de corriente de 3 ms de

duración con un voltaje progresivo desde 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 volts, por medio de un estimulador Grass S88. Al final de este periodo las mismas preparaciones se utilizaron para hacer una curva concentración respuesta no acumulativa de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M), Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), entre cada curva se dejó reposar el tejido 10 minutos, terminadas las curva se realizó un estímulo con KCl (3.2×10^{-2} M) y finalmente una curva de BaCl₂ (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M). Es importante escribir que se hicieron lavados después de cada concentración y cada curva de las diferentes sustancias ya que es una curva no acumulativa. Cada periodo de isquemia representa un experimento desde la preparación del tejido hasta la inducción de la isquemia.

7.4. CONTROL

Se realizó un experimento control, preparando el tejido como se mencionó anteriormente, y realizando el estímulo eléctrico y químico anteriormente descrito y manteniendo las condiciones de K-B a 37°C bajo continuo burbujeo con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las respuestas contráctiles a la estimulación química y eléctrica se obtuvieron usando el sistema PolyView, versión 2.5 (Grass Instruments). En todos los casos, las respuestas contráctiles se expresaron como gramos de tensión y los datos de las curvas contracción-tiempo de hipoxia e isquemia se analizaron por comparación de la respuesta del grupo control a las diversas condiciones experimentales.

Se calculó el área bajo la curva (ABC) de las curvas concentración-respuesta a los diferentes estímulos químicos en los tejidos sometidos a hipoxia e isquemia así como del grupo control.

Para el caso del estímulo eléctrico, y KCl, sólo se calcularon los gramos de tensión, ya que sólo se graficó el efecto contráctil inducido por 14 volts para estímulo eléctrico y la concentración de 3.2×10^{-2} M para KCl.

En todos los casos los resultados se expresaron como la media +/- desviación estándar, con una n=6, para cada tratamiento. Los valores se compararon mediante una ANOVA de una vía, seguida por una prueba de Dunnett, un valor de $P < 0.05$ fue considerado como significativo. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, versión 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

VIII. RESULTADOS

8.1. RESPUESTA CONTRÁCTIL DEL ÍLEON DE COBAYO SOMETIDO A DIFERENTES TIEMPOS DE HIPOXIA

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo un estímulo eléctrico en diferentes tiempos de hipoxia, se realizó una estimulación eléctrica a 14 volts en los segmentos de íleon de cobayo y estos resultados se pueden observar en la figura 12 indicando que a los 10, 20 y 40 minutos de hipoxia hay diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por e.e. (0.5 ± 0.04 , 1.5 ± 0.1 , 0.4 ± 0.05 vs el grupo control 2.1 ± 0.1 ANOVA, Dunnett $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil es de aprox. 63% con respecto al control a los 10, 20 y 40 min. de hipoxia.

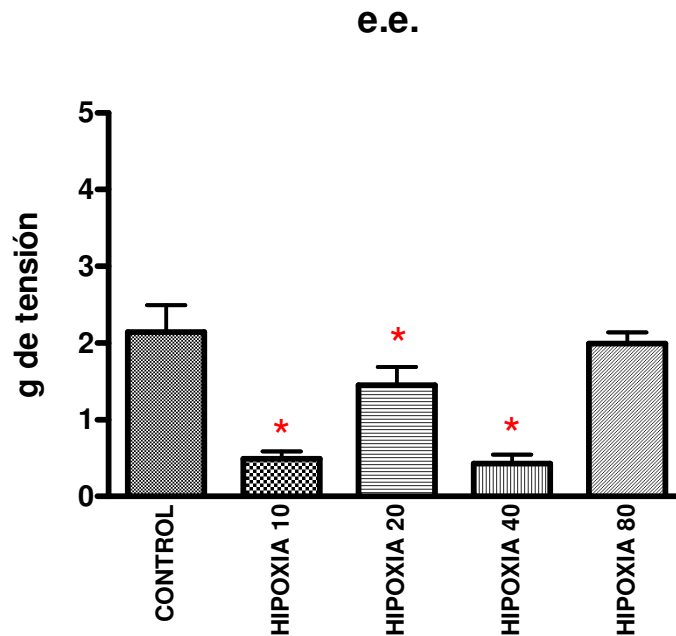


Figura 12. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por un Estímulo Eléctrico (14 volts.) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con ACh en diferentes tiempos de hipoxia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) estos resultados obtenidos en gramos de tensión se pueden observar en la figura 13, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 14 indicando que en todos los tiempos de hipoxia disminuyó significativamente el efecto contráctil inducido por ACh (9.8 ± 0.5 , 10.6 ± 0.5 , 5.1 ± 0.3 , 10.4 ± 0.6 vs el grupo control 13.6 ± 1.2 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil fue aprox. del 34% con respecto al control.

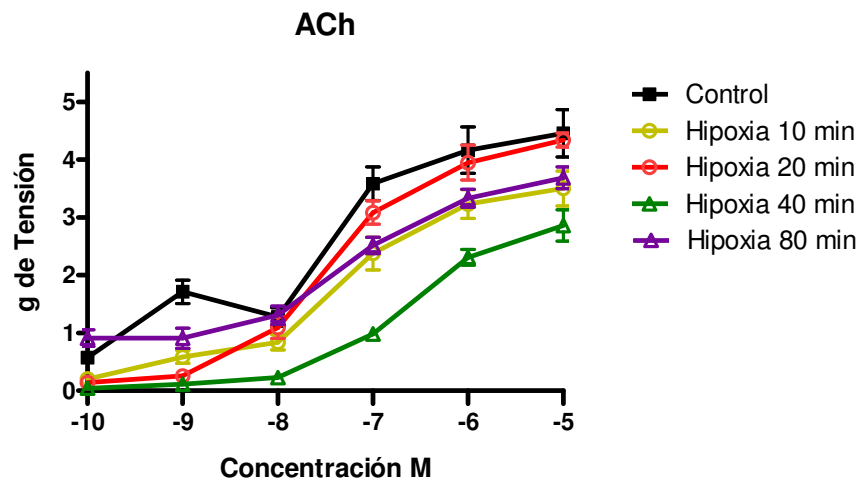


Figura 13. Curva dosis respuesta en g de tensión de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia.

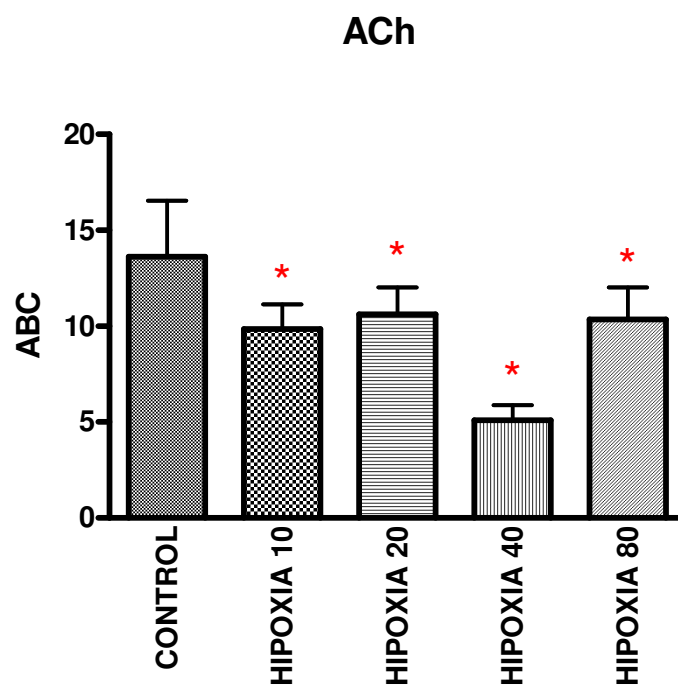


Figura 14. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con Histamina en diferentes tiempos de hipoxia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) estos resultados obtenidos en gramos de tensión se pueden observar en la figura 15, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 16 indicando que en todos los tiempos de hipoxia disminuyó significativamente el efecto contráctil inducido por Histamina (8.7 ± 0.6 , 11.7 ± 0.7 , 8.8 ± 0.3 , 10.4 ± 0.5 vs el grupo control 14.6 ± 0.6 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil fue aprox. del 32 % con respecto al control.

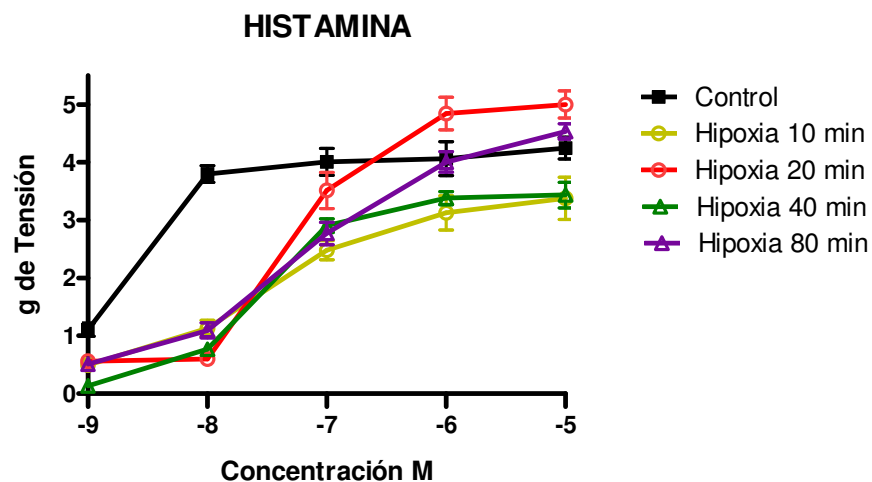


Figura 15. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia.

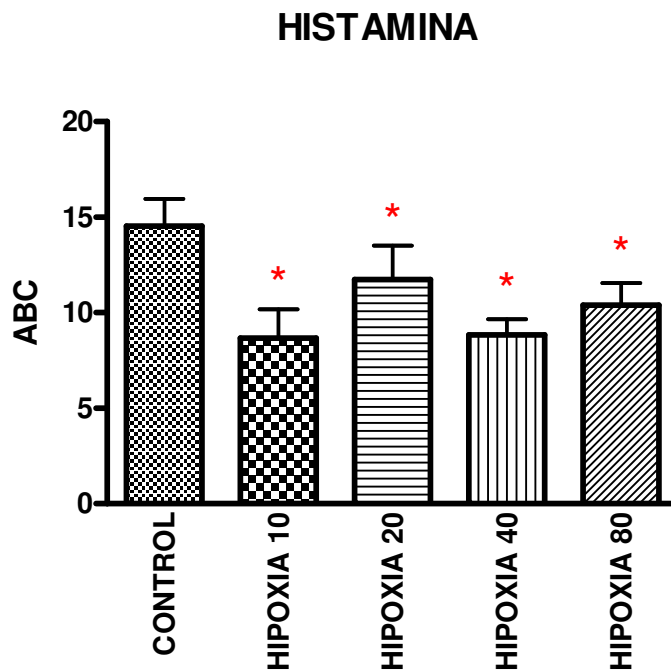


Figura 16. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con Serotonina en diferentes tiempos de hipoxia, se realizo una curva dosis respuesta no acumulativa de Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) estos resultados se obtuvieron en gramos de tensión como se pueden observar en la figura 17, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 18 indicando que solo a los 80 minutos de hipoxia hay una diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por Serotonina (9.5 ± 1.0 vs el grupo control 5.2 ± 0.9 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$).

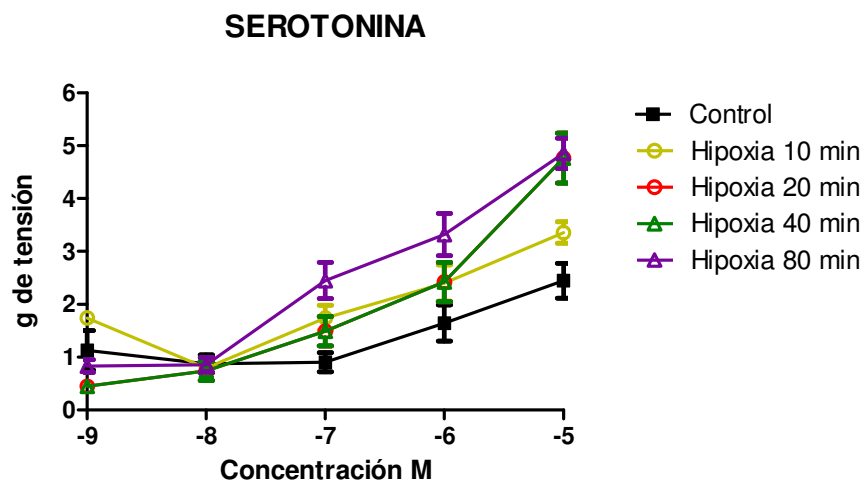


Figura 17. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia.

SEROTONINA

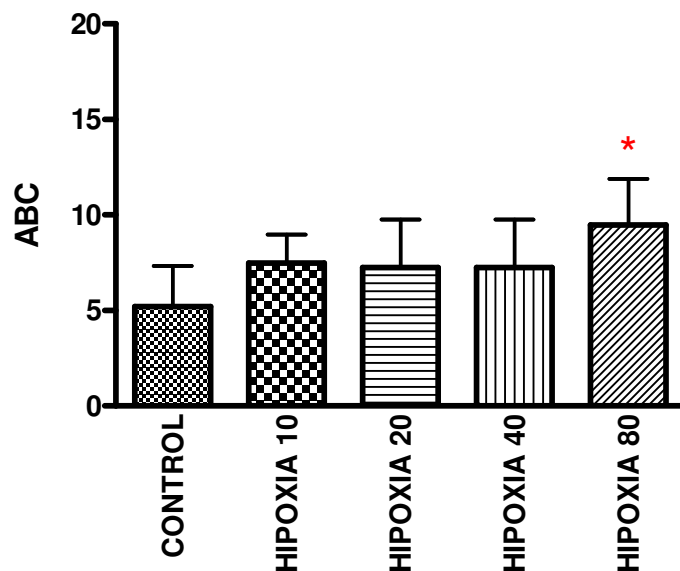


Figura 18. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con KCl en diferentes tiempos de hipoxia, se realizó una estimulación con KCl ($3.2 \times 10^{-2}M$) y estos resultados se pueden observar en la figura 19 indicando que no hay diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por KCl con respecto al grupo control (ANOVA, $P < 0.05$) en ninguno de los tiempos de hipoxia a los que fueron sometidos los tejidos.

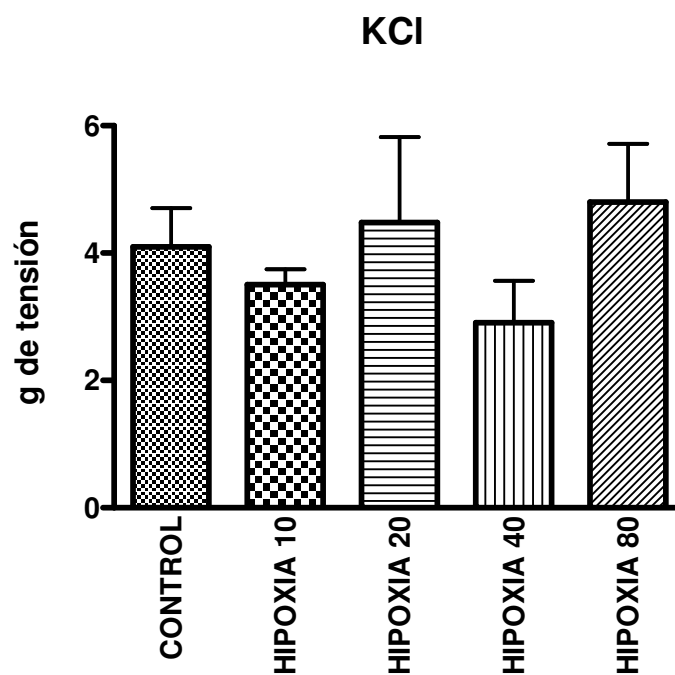


Figura 19. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por KCl ($3.2 \times 10^{-2} M$) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA)

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con BaCl₂ en diferentes tiempos de hipoxia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de BaCl₂ (1X10⁻⁵- 1X10⁻² M) estos resultados se obtuvieron en gramos de tensión como se pueden observar en la figura 20, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 21 indicando que solo a los 10, 20 y 80 minutos de hipoxia hay una diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por BaCl₂ (9.6 ± 0.5, 10.8 ± 1.4, 10.8 ± 0.7 vs el grupo control 3.4 ± 0.3, ANOVA, Dunnet P < 0.05).

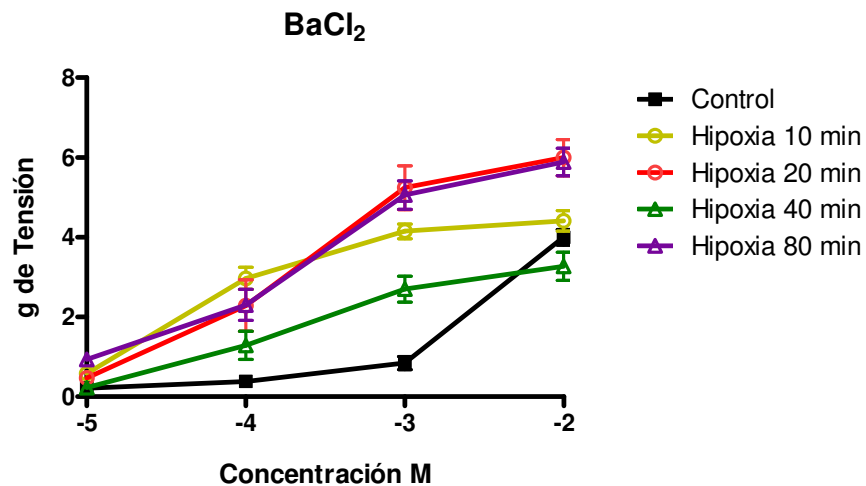


Figura 20. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de BaCl₂ (1x10⁻⁵-1x10⁻² M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia.

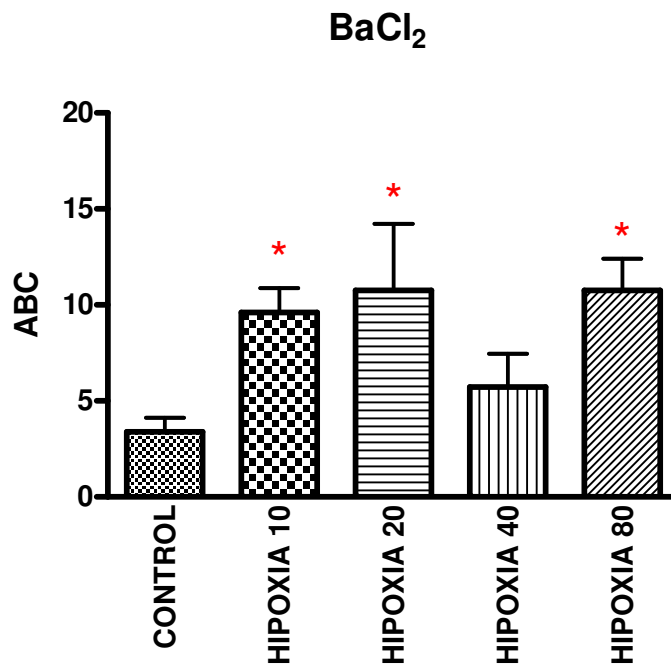


Figura 21. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por BaCl₂ (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de hipoxia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

8.2. RESPUESTA CONTRÁCTIL DEL ÍLEON DE COBAYO SOMETIDO A DIFERENTES TIEMPOS DE ISQUEMIA

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo un estímulo eléctrico en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una estimulación eléctrica a 14 volts en los segmentos de íleon de cobayo y estos resultados se pueden observar en la figura 22, los cuales indican que no hay diferencia significativa en la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica con respecto al grupo control (ANOVA , $P < 0.05$), en ninguno de los tiempos de isquemia a los que fueron sometidos los tejidos.

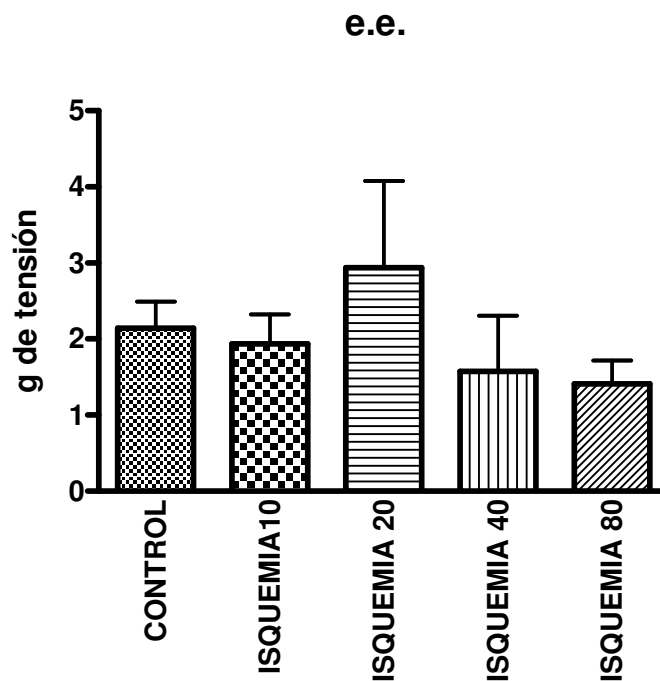


Figura 22. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por Estimulo Eléctrico (14 volts.) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con ACh en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) estos resultados obtenidos en gramos de tensión se pueden observar en la figura 23, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 24 indicando que solo a los 10, 40 y 80 minutos de isquemia disminuyó significativamente el efecto contráctil inducido por ACh (9.6 ± 0.9 , 9.0 ± 1.0 , 4.0 ± 0.4 , vs el grupo control 13.6 ± 1.2 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil fue aprox. del 45% con respecto al control.

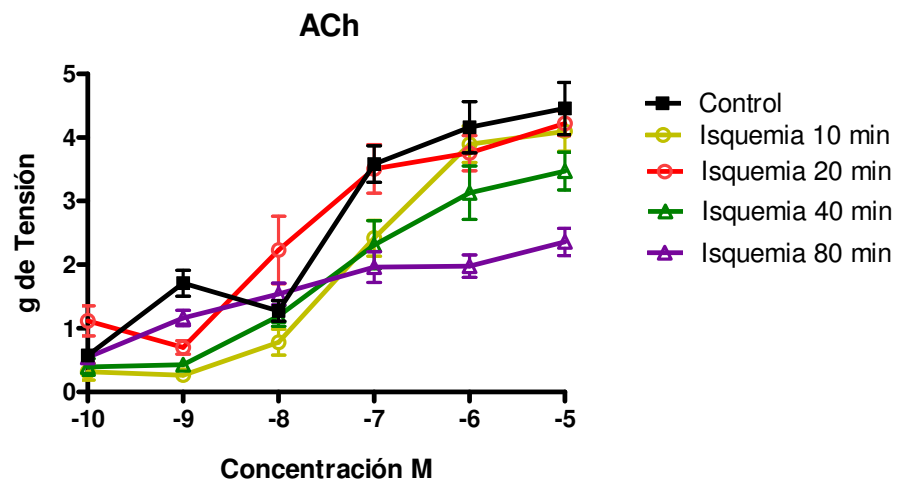


Figura 23. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia.

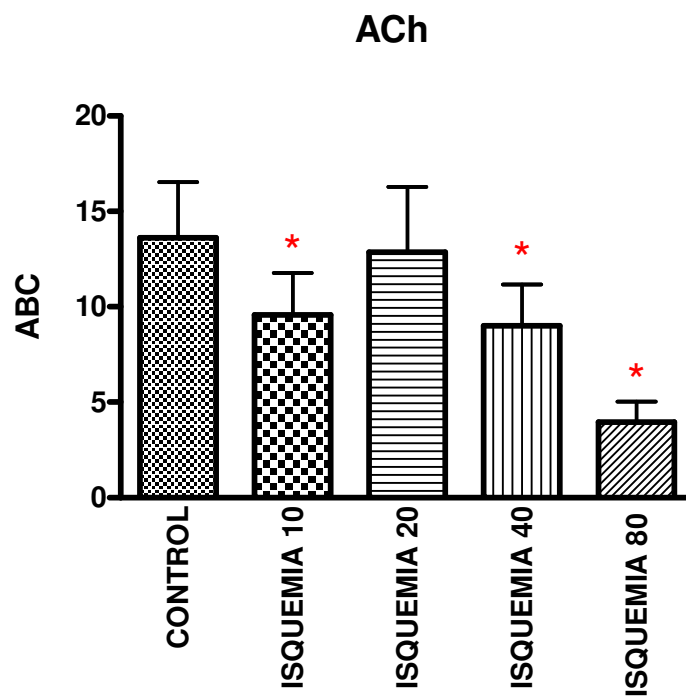


Figura 24. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por ACh (1×10^{-10} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con Histamina en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) estos resultados obtenidos en gramos de tensión se pueden observar en la figura 25, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 26 indicando que todos los tiempos de isquemia disminuyeron significativamente el efecto contráctil inducido por Histamina (8.9 ± 0.6 , 11.1 ± 0.7 , 8.3 ± 0.9 , 4.8 ± 0.6 vs el grupo control 14.6 ± 0.6 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil fue aprox. del 42 % con respecto al control.

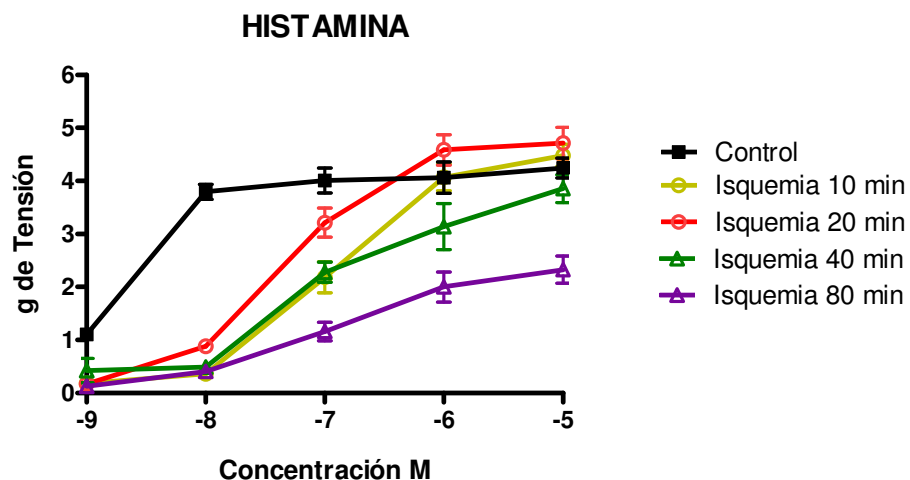


Figura 25. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia.

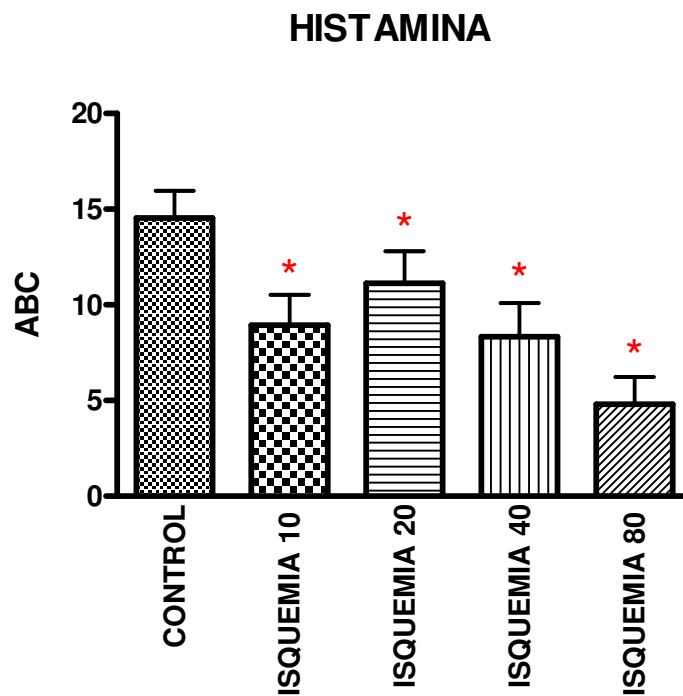


Figura 26. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Histamina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con Serotonina en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) estos resultados se obtuvieron en gramos de tensión como se pueden observar en la figura 27, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 28 indicando que a los 20 minutos de isquemia hay una diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por Serotonina (8.8 ± 0.70 vs el grupo control 5.2 ± 0.9 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$).

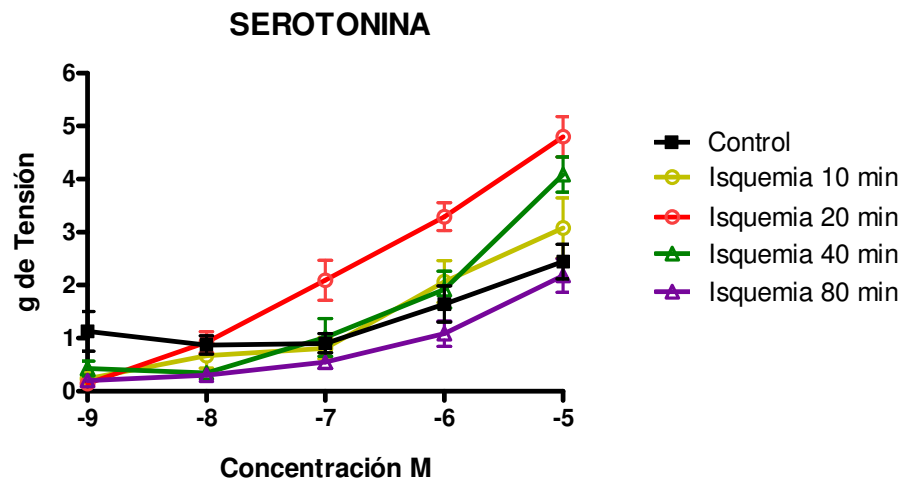


Figura 27. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia.

SEROTONINA

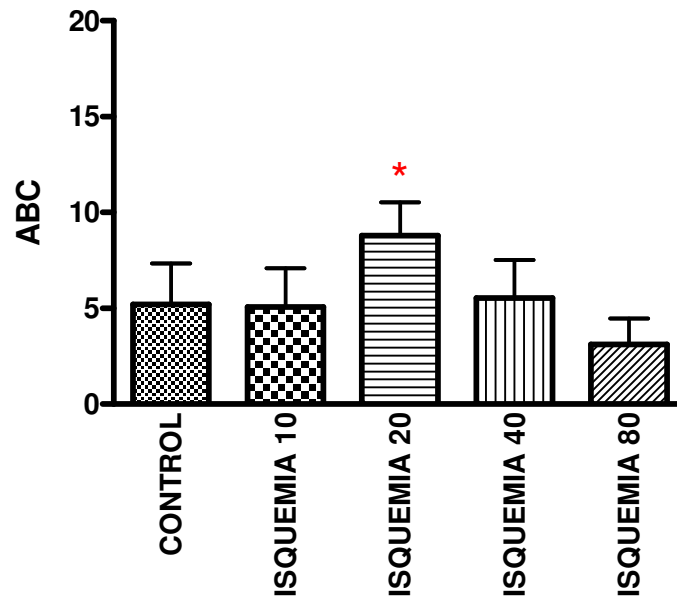


Figura 28. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por Serotonina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con KCl en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una estimulación con KCl ($3.2 \times 10^{-2}M$) y estos resultados se pueden observar en la figura 29 indicando que a los 80 minutos de isquemia hay una disminución significativa en el efecto contráctil inducido por KCl (2.0 ± 0.2 vs el grupo control 4.1 ± 0.2 ANOVA, Dunnet $P < 0.05$). La disminución del efecto contráctil es de aprox. del 57% con respecto al control.

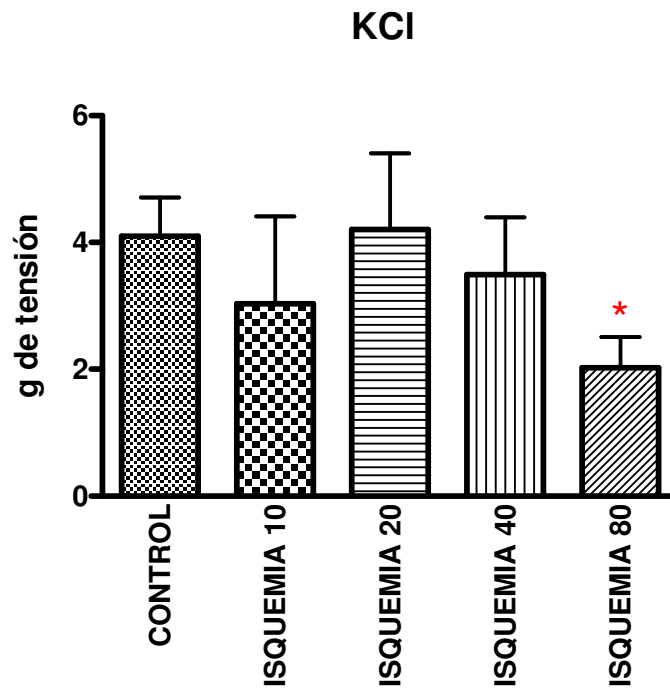


Figura 29. Gramos de tensión de la respuesta contráctil inducida por KCl ($3.2 \times 10^{-2} M$) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

Con el objeto de evaluar la respuesta contráctil del tejido bajo una estimulación química con BaCl_2 en diferentes tiempos de isquemia, se realizó una curva dosis respuesta no acumulativa de BaCl_2 (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M) estos resultados se obtuvieron en gramos de tensión como se pueden observar en la figura 30, posteriormente estos datos fueron procesados como ABC como se observa en el figura 31 indicando que solo a los 10, 20 y 40 minutos de isquemia hay una diferencia significativa en el efecto contráctil inducido por BaCl_2 (7.0 ± 0.6 , 11.7 ± 1.0 , 8.4 ± 1.1 vs el grupo control 3.4 ± 0.3 , ANOVA, Dunnet $P < 0.05$).

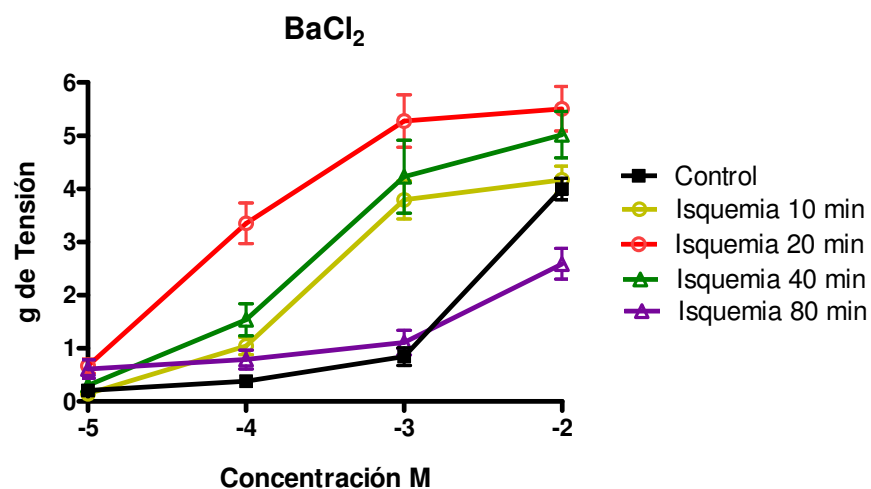


Figura 30. Curva dosis respuesta en gramos de tensión de BaCl_2 (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia.

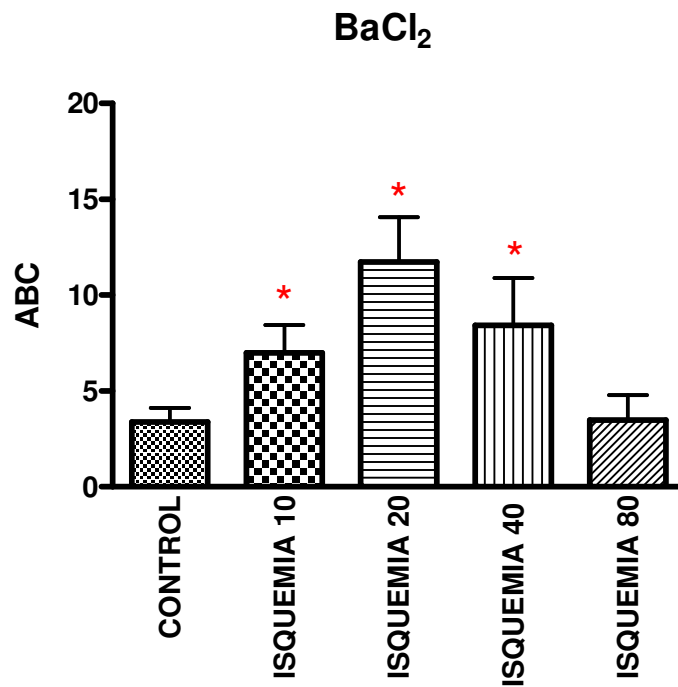


Figura 31. Área Bajo la Curva de la respuesta contráctil inducida por BaCl₂ (1×10^{-5} - 1×10^{-2} M) en íleon de cobayo sometido a 10, 20, 40 y 80 min. de isquemia. Cada barra representa la media \pm error estándar de 6 preparaciones. * Muestra diferencia significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$, ANOVA, seguido por una prueba de Dunnett).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) ó Accidente Vascular Cerebral (AVC) se define como un síndrome clínico caracterizado por el rápido desarrollo de síntomas y/o signos correspondientes usualmente a afección neurológica focal, sin otra causa aparente que el origen vascular (OMS).

La enfermedad vascular cerebral (EVC) constituye la tercera causa de muerte en países industrializados, y es considerada como la primera causa de invalidez a nivel mundial. Según la estadística de mortalidad en México, la enfermedad vascular cerebral forma parte de las diez primeras causas de mortalidad. En EUA se considera que aproximadamente 500,000 a 700,000 casos nuevos aparecen en un año y cuyo costo de atención asciende a 30 billones de dólares en ese país¹.

Se han desarrollado una variedad de métodos para estudiar la fisiopatología y el tratamiento del infarto cerebral, los cuales se basan principalmente en estudios detallados con modelos animales. Éstos modelos presentan un amplio conocimiento de los mecanismos moleculares que resultan en un daño durante y después de la isquemia cerebral^{41,81}. La información que se obtiene de la experimentación en animales, proporciona una posibilidad de manipulación farmacológica para reducir la muerte, el daño tisular y la disfunción neuronal. Muchos de estos modelos animales han mostrado la existencia de un gran número de compuestos con mecanismos de acción diferentes que reducen el daño tisular después de la isquemia⁸².

Con éste propósito un grupo de investigadores desarrolló el modelo de íleon aislado de cobayo *“in situ”* como una herramienta farmacológica para el estudio de la

isquemia. Sin embargo, en éste modelo no se puede establecer la diferencia entre el daño neuronal producido por hipoxia e isquemia.

Por este motivo, en este trabajo reportamos el uso de un modelo de íleon aislado de cobayo *“in vitro”*, desarrollado por nuestro grupo de trabajo, con la finalidad de aplicar la experiencia previa en un modelo reproducible, económico y que permite utilizar menos animales de laboratorio.

Nuestros resultados indican que el proceso de hipoxia produce una alteración en la respuesta contráctil del íleon de cobayo. Esta alteración provoca una disminución en la respuesta inducida por estimulación eléctrica (Figura 12), ya que la estimulación eléctrica, durante la sinapsis, provoca que los segmentos intactos de íleon liberen varios neurotransmisores, principalmente ACh, la cual actúa sobre receptores M_3 activando receptores acoplados a proteína G_q . Estos eventos elevan la concentración intracelular de calcio activando la cinasa de miosina de cadena corta, fosforilándola y activando la miosina II, provocando la contracción³⁴. La disminución que observamos en la respuesta contráctil, podría deberse a una reducida liberación de neurotransmisores, o a una reducción en la fuerza de respuesta del músculo para provocar la liberación de neurotransmisores⁸³. Para el proceso de isquemia la respuesta inducida por la estimulación eléctrica, no se alteró.

Además, nuestros resultados muestran que durante el proceso de hipoxia y de isquemia, se producen alteraciones en la respuesta contráctil del tejido a los diversos estímulos químicos, (Figuras 14 y 24) las cuales parecen ser tiempo dependientes. Se ha observado que tanto la hipoxia como la isquemia, producen los primeros efectos de deterioro en neuronas entéricas, estos datos nos indican que la privación de glucosa u oxígeno, provocan una disminución en la liberación espontánea de ACh en preparaciones

del plexo mientérico de íleon aislado de cobayo, mientras que la combinación de ambas, (isquemia), causan un incremento en la liberación de ACh como resultado de una elevación en los niveles de calcio intracelular¹³, lo anterior explicaría porque en la isquemia no se observan alteraciones en los tejidos.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que los procesos de hipoxia e isquemia producen alteraciones en la respuesta contráctil inducida por Histamina, provocando una disminución en la susceptibilidad del tejido a esta sustancia (Figuras 16 y 26). La histamina ejerce sus acciones biológicas al unirse con receptores H₁ que están en endotelio, células de músculo liso y terminaciones nerviosas, desencadenando un incremento en la hidrólisis de fosfoinositol y también en la concentración de calcio intracelular, produciendo la activación de la MCLK, fosforilando la miosina, la cual forma el emparejamiento con las cadenas de actina, para producir la contracción⁷², esto nos sugiere una alteración en la función motora del músculo o en su capacidad para liberar al neurotransmisor

En nuestros resultados sobre la respuesta contráctil inducida por Serotonina, parece ser que no existen alteraciones a cortos de tiempos de hipoxia, solamente a 80 min. se observa un ligero incremento en la respuesta contráctil, éste incremento podría deberse a que con la aplicación exógena de serotonina, la cual además de ser un neurotransmisor en el SNC; se encuentra en altas concentraciones en células enterocromafines en el tracto gastrointestinal, controlando varios reflejos fisiológicos, patológicos y farmacológicos, y estimula la liberación de ACh en la mayoría de los segmentos intactos de tejido (Figuras 18) bajo condiciones de hipoxia. Para el proceso isquémico no se observaron alteraciones en la respuesta contráctil del tejido (Figura 28). Como ya se mencionó, además de ser un importante neurotransmisor en el SNC; la liberación de ésta produce varios reflejos, a través de sus receptores, de los cuales se

conocen aproximadamente 14 subtipos que están localizados en neuronas aferentes primarias intrínsecas y extrínsecas, en ganglios, en membranas axonales, nervios terminales, células enterocromafines, enterocitos y células del sistema inmune⁸⁴. Los receptores 5-HT₃ y 5-HT₄ median los reflejos de motilidad y secreción; y se encuentran expresados por distintas neuronas en el tacto gastrointestinal⁷⁴.

Los receptores 5-HT₄ están acoplados a una proteína G_s para activar la adenilato ciclasa (AC) provocando un incremento en el AMP_c intracelular. En el tracto gastrointestinal estos receptores están localizados en neuronas del plexo mientérico, músculo liso y células secretoras⁸⁴.

Los resultados sugieren, que la hipoxia produce cambios en la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas, e indican que existe un daño más severo en las neuronas entéricas que en los receptores específicos, vías de señalización intracelular, y en el mecanismo de contracción muscular, lo que se refleja en la disminución en la respuesta contráctil a la estimulación eléctrica, a la administración de ACh e Histamina. Los efectos inhibitorios parecen ser en su mayoría más funcionales que estructurales. En este sentido, podemos inferir que el descenso en la respuesta a la estimulación eléctrica es un indicador importante de daño funcional neuronal debido a la forma en que actúa la estimulación eléctrica en este modelo experimental. La disminución en la respuesta a estimulación neurogénica puede ser cuantificada, por lo que se podría utilizar como un parámetro de medida para evaluar el grado de daño de diferentes tratamientos con el objeto de reducir el daño neuronal producido por la hipoxia⁶⁴.

Nuestros resultados muestran que en caso de la estimulación inducida por KCl, el cual induce la despolarización de la membrana, permitiendo la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L, generando así un incremento en la concentración de

este ion en el interior de la célula, y por consiguiente, la generación de la contracción; no se observan alteraciones en la respuesta contráctil del tejido en el proceso de hipoxia (Figura 19). Este resultado sugiere que el daño que pudiera haber causado la falta de oxígeno y después una reoxigenación, no afecta los mecanismos fisiológicos contráctiles del músculo liso. En la estimulación para la isquemia a 80 min se observa una disminución en la susceptibilidad del tejido (Figura 29), lo cual sugiere que antes de este tiempo el músculo mantiene controlados los mecanismos electromecánicos en donde el proceso de isquemia *in vitro* (ausencia de oxígeno y glucosa) y una posterior reperfusión podrían estar disminuyendo la capacidad del músculo para generar una fuerza de contracción.

Nuestros resultados por estimulación con KCl, bajo las condiciones de isquemia *in vitro* parecen concordar con los obtenidos por estimulación con KCl sobre el íleon de cobayo bajo condiciones de isquemia *in situ* y reperfusión *in vitro*⁶⁴.

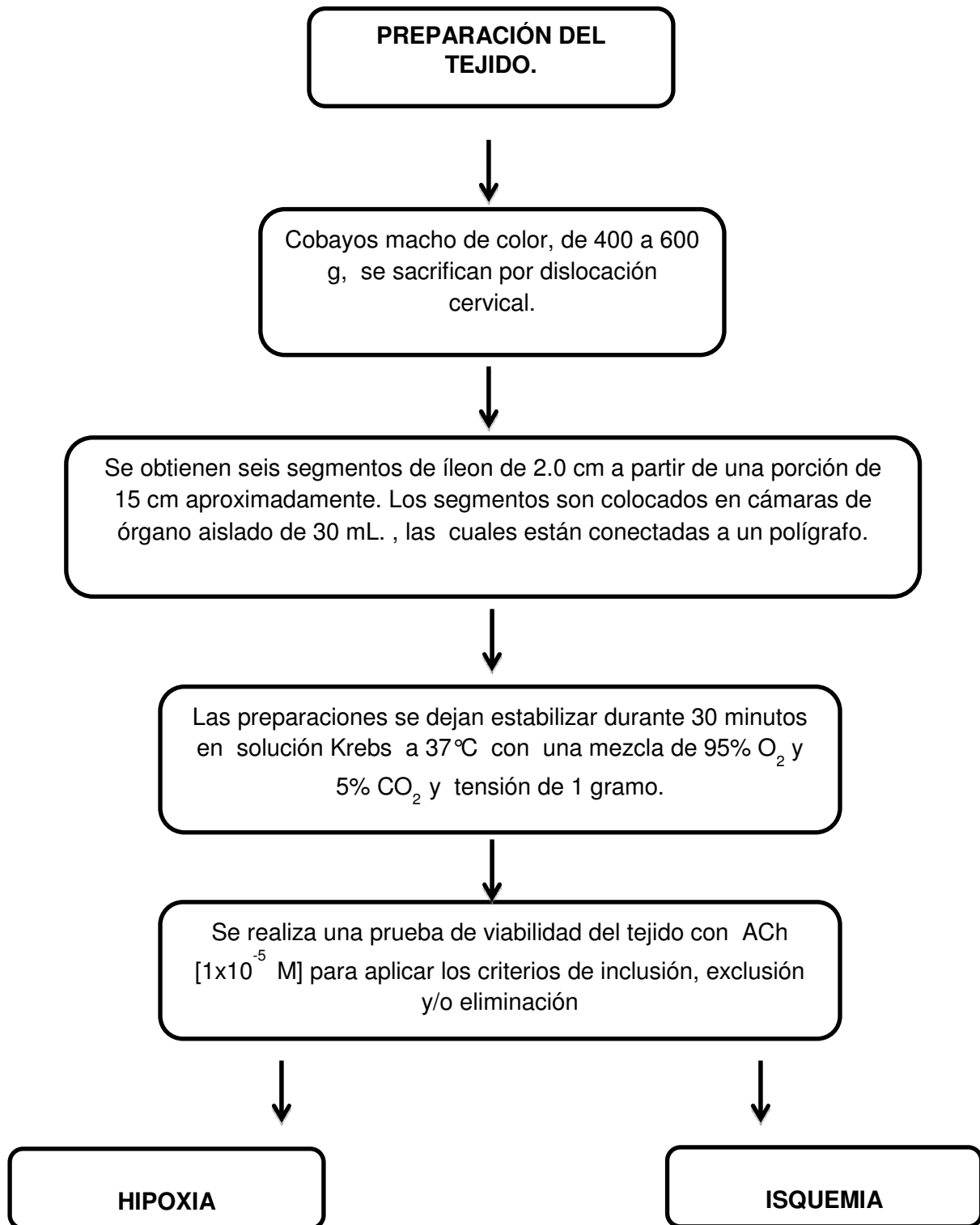
Nuestros resultados indican que la hipoxia y la isquemia producen alteraciones sobre la respuesta contráctil del íleon aislado de cobayo inducidas por BaCl₂. Estas alteraciones parecen aumentar la sensibilidad del tejido por los iones Ca²⁺, al incrementar la respuesta contráctil del tejido (Figuras 21 y 31). El Ba²⁺ estimula directamente el mecanismo contráctil de forma muy similar al del ión Ca²⁺, por lo tanto la fase de contracción/relajación en el músculo liso, depende, del incremento y caída de la concentración interna del Ca²⁺. Así, una vez que el Ca²⁺ extracelular penetra en el interior de la célula, se une a una proteína reguladora intracelular: la Calmodulina, dando origen al compuesto Ca²⁺ /Calmodulina, que activa a la quinasa de las cadenas ligeras de la miosina mediante fosforilación, lo que permite la activación de la miosina-ATPasa y la contracción.

Algunos autores sugieren que los procesos de hipoxia e isquemia aumentan la sensibilidad de los iones de Ca^{2+} , induciendo un aumento en la contracción. Por esta razón la administración de BaCl_2 , el Ba^{2+} , actuaría como el Ca^{2+} , produciendo una mayor contracción en los tejidos sometidos a hipoxia e isquemia⁸⁵.

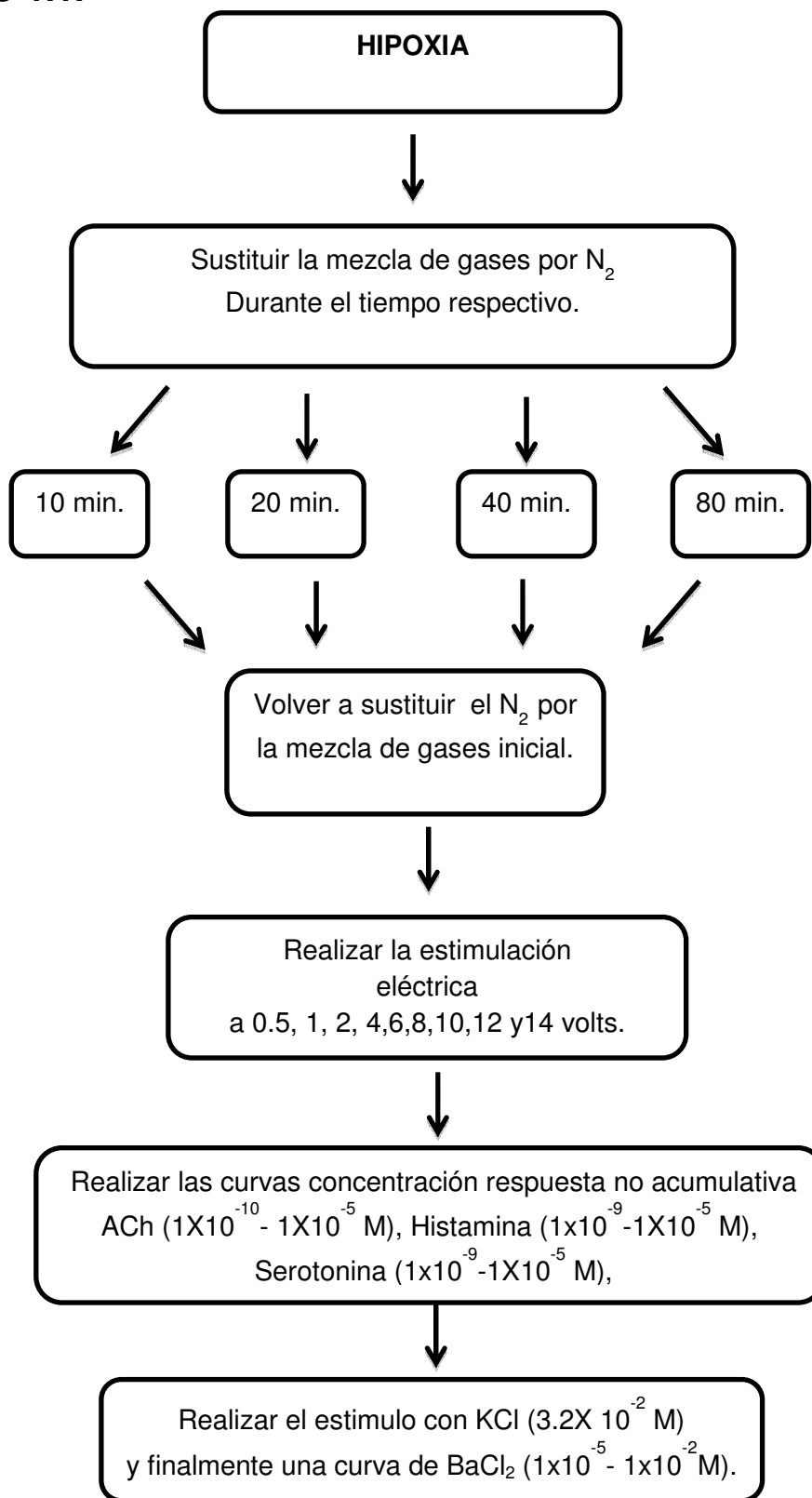
X. CONCLUSIONES

1. La hipoxia produce alteraciones en la respuesta contráctil del íleon de cobayo inducidas por ACh, Histamina y BaCl_2 . Éste proceso disminuye la susceptibilidad del tejido a la ACh y a la Histamina. Estas alteraciones son mayores con ACh e Histamina, por el contrario, la susceptibilidad se ve incrementada para BaCl_2 .
2. La hipoxia también produjo una disminución en la respuesta contráctil del tejido inducida por estimulación eléctrica. Estos resultados sugieren que la hipoxia induce un daño neuronal en el íleon aislado de cobayo.
3. Por otro lado, la isquemia produjo alteraciones en la respuesta contráctil del tejido inducidas por ACh, Histamina, BaCl_2 y KCl. Éste proceso disminuye la susceptibilidad del tejido a la ACh e Histamina de una manera tiempo-dependiente y en la misma proporción; mientras que incrementa la susceptibilidad del tejido al BaCl_2 .
4. Finalmente se concluye que la hipótesis propuesta no se cumplió, ya que además no se pudo establecer el tiempo al cual se produce un daño neuronal en los tejidos sometidos a ambas condiciones experimentales. Sin embargo, la isquemia no alteró la respuesta contráctil del tejido inducida por Estimulación Eléctrica. Sugiriendo que éste proceso no induce daño neuronal en el íleon aislado de cobayo. Se sugiere que para poder obtener resultados más precisos se aumenten los periodos de tiempo en ambos procesos.

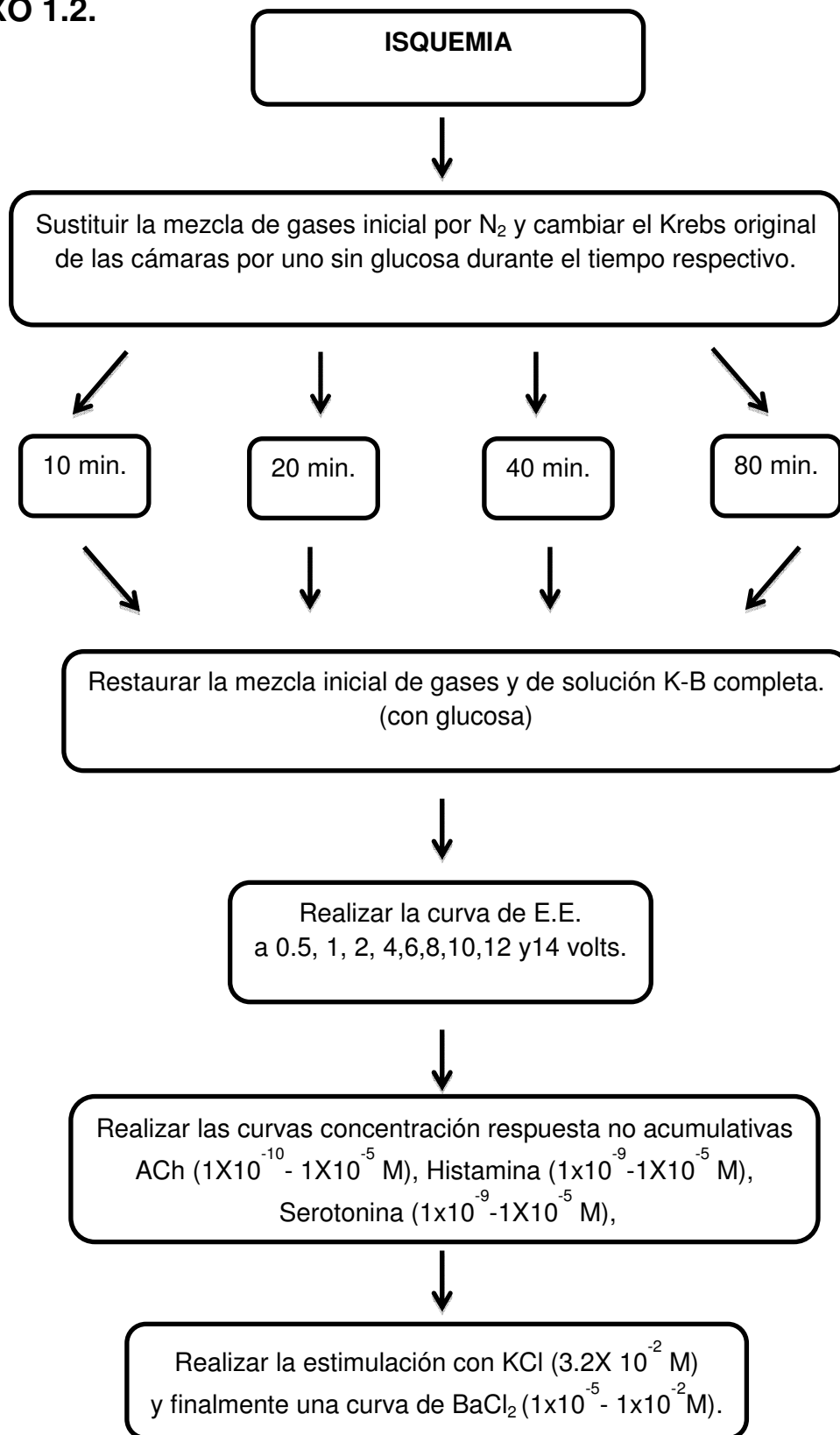
ANEXO 1 (Resumen del método)



ANEXO 1.1.



ANEXO 1.2.



X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miranda Q. J. A. Enfermedades cerebrovasculares. Editorial Oriente. Instituto Cubano del libro. La Habana, Cuba. 2004.
2. Díez-Tejedor E. Nomenclatura de las enfermedades cerebrovasculares. Rev. Ecuat. Neurol. Vol.10 No. 3 en <http://www.medicosecuador.com>. 2001.
3. Robbins S.L., Kumar V. y Cotran R.S. Patología Humana. El Sistema Nervioso Central McGraw-Hill 6a edición 2000; 30:1353-1357.
4. Sweeney M.I., Yager J.Y., Walz W. y Juurlink H.J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. Can. J. Physiol. Pharmacol 1995; 73:1525-1535.
5. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (Walz W. ed) Human Press Totowa, NJ 1999; 1:3-32.
6. Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T.M. Principles of neural science 3rd ed. Elsevier Science Publishing Co. NY. 1991.
7. Weinberger J. Contemporary diagnosis and management of stroke. 2nd ed. Handbooks in Health Care Co., Newtown Pennsylvania, USA. 2000.
8. Corvera-Bernardelli J., Corvera-Behar G. y Martín-Armendáriz L. Enfermedad Vascular Cerebral in Programa de Actualización Continua para Médicos Generales Parte B Libro 2. Intersistemas S.A. de C.V. México en <http://www.drscope.com/pac/mg/b2>. 1999
9. Arauz A., Murillo L.M. y Bonnin E. Neuroprotección en isquemia cerebral aguda. Estado actual e importancia clínica de la cascada isquémica. Rev. Ecuat. Neurol. Vol.11 No.3 in <http://www.medicosecuador.com>. 2002
10. Daube J.R., Reagan T.J., Sandok B.A. y Westmoreland B.F. Medical neurosciences. The vascular system. 2a ed. Little, Brown and Company. 1986; 11:229-242.
11. Sharp F.R., Ran R., Lu A., Tang Y., Strauss K.I., Glass T., Ardizzone T. y Bernaudin M. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. NeuroRx 2004; 1:1:26-35.
12. Lee J.M., Zipfel G.J. y Choi D.W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature 399 (Supp.) A7-A14. 1999.
13. Larson LE, Martins HR. Early effects of glucose and oxygen deprivation on the spontaneous acetylcholine release from the myenteric plexus of the guinea pig ileum. 1981

-
14. Sweeney M.I. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: window of opportunity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21:207-217.
 15. Dirnagl U., Iadecola C. y Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends. Neurosci.* 1999; 22:391-397.
 16. Lipton E. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999; 79:1431-1568.
 17. Muñoz T.A. Participación de los canales de potasio sensibles al ATP en procesos de preconditionamiento isquémico en neuronas de hipocampo de ratón. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México. 2001.
 18. Riepe M.W. y Ludolph A.C. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol. Cell. Biochem.* 1997; 174:249-254.
 19. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2004; 1:36-45.
 20. Hansen A. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev.* 1985; 65:101-148.
 21. Blank WF, Kirshner HS. The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1996; 113-124
 22. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxia-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-182.
 23. Castillo J, Devalos A, Naveiro J, Noya M. Neuroexcitatory amino acids and their relationship to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke 1996; 27: 1060-1065.
 24. Castillo J, Davalos A, Noya M. Progression of ischemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349: 79-83.
 25. Peruche, B. y Krieglstein, J. Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 1993; 17, 21-70.
 26. Rodríguez M. L., Galvizu S.R., Álvarez G.E. Neuromodulación farmacológica en la enfermedad cerebrovascular. Temas actualizados. *Rev. Cubana Med*, 2002; 41(2).
 27. Castillo, J., & Rodriguez, I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischemia: Molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovascular Diseases*, 17(Suppl. 1), 2004; 7-18.

-
28. Hossmann K. A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2006; Vol. 26, Nos. 7/8, October/November.
 29. Kwakkel G., van Peppen R., Wagenaar R.C., et al: Effects of augmented exercise therapy time after stroke: a meta-analysis. *Stroke* 2004; 35:2529-2539.
 30. Marmont MG Poulter NR Primary prevention of stroke *Lancet* 1992; 339:589-594.
 31. Hachinski V. Thrombolysis and neuroprotection in acute stroke. 2000, Syllabi-on CD-Rom. *American Academy of Neurology*.
 32. Green AR, Odergren T and Ashwood T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24 : 402-408
 33. Lomas AE, Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea pig distal colon. *Cell Tissue Res* 2000; 302:59-7
 34. Gerthoffer WT. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: 849-853.
 35. Costa M, Brookes SJ & Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. 2000; *Gut* 47 Suppl 4, iv15-19; discussion iv26.
 36. Furness, J.B. Bornstein, J.C. Kunze, W.A.A. y Clerc, N. The enteric nervous system and its intrinsic connections. In : textbook of Gastroenterology. eds. Yamada, T., Alpers, D.H., Laine, L., Owyang, C. y Powell DW. 1999; 11-35, Philadelphia, PA: Lippincott, Williams y Wilkins.
 37. Kimball, B.B. y Mullholland, M.W. Neuroligands evoke calcium signaling in cultured myenteric neurons. *Surgery*, 1995; 118, 162-169.
 38. Kirchgessner, A.L., Liu, M.T. y Alcántara. Excitotoxicity in the enteric nervous system. *J. Neurosci*. 1997; 17, 8804-8816.
 39. Liu, M.T., Rothstein, J.D. Gershon, M.D. y Kirchgessner, A.L. Glutamatergic enteric neurons. *J. Neurosci*. 1997; 17, 4764-4784.
 40. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust NZ J Surg* 1998; 68: 554-561.
 41. Small DL. Morley P and Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: 185-207.

-
42. Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X and Feuerstein GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and Inos in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 2000; 10:95-112.
 43. Mallick IA, Yang W, Winslet MC and Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci.* 2004; 49: 1359-1377
 44. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32: 723-727
 45. Haward TR, Brooks DL, Flynn TC, Seeger JM. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. *J vas Surg* 1993; 18: 459-467
 46. Halliwell B, Zhao K, Whiterman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000; 33: 819-830.
 47. Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2001; 99: 114-119
 48. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J. Med.* 1985; 312: 159-163.
 49. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemia rat intestine. *Am J Physiol* 1988; 254: G768-G774.
 50. Andrew FJ, Malcontenti C, O'Brien PE. Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci.* 1992; 37: 1356-1361.
 51. Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, y cols. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-636.
 52. Zimmerman BJ, Granger DN. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 337-342.
 53. Chang KL, Zhang XH, Fung PWC, Guo WH, Tam PKH. Role of nitric oxide in intestinal ischemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999; 86: 1427-1432.
 54. Furness JB y Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 1980; 5, 1-20.
 55. Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003; 52, 1-30.

-
56. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81, 87-96.
 57. Hansen, M.B. The enteric nervous system I. Organization and classification. *Pharmacol. Toxicol.*, 2003a; 92, 105-113.
 58. Galligan JJ. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14, 611-623.
 59. Wood JD. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007; 13, 1313-1332.
 60. Kandel ERS, S. A. Signalling at the Nerve-Muscle Synapse: Directly Gated Transmission. In *Principles of Neuroscience*. 2000
 61. Ruhl A, Nasser Y & Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 2004; 1, 44-49.
 62. Costa M, Brookes SJH, Steele PA, Gibbins I, Burcher E and Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1996; 75: 949-967.
 63. Goyal, R.K. y Hirano, I. The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334, 1106-1115
 64. Rodríguez R, Ventura-Martinez R, Santiago-Mejia J, Avila-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.
 65. Cooke, H.J. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 915, 77-80.
 66. Kunze, W.A. y Furness, J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61, 117-142.
 67. Skadhauge, E., Hansen. M.B., Grondahl. M.L., Thorboll, j.E. Unmack, M.A. y McEwan, G. Interplay of neuronal and epithelial control of intestinal secretion. *Falk symposium 112. Neurogastroenterology. From basic to the clinics.* Eds. Krammer y M. V. Singer. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000; 158-162.
 68. Hansen, M.B. y Skadhauge, E. Signal Transduction pathways for serotonin as an intestinal secretagogue. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1997; 118, 283-290.
 69. Hansen, M.B. The enteric nervous system III. A target for Pharmacological treatment. *Pharmacol. Toxicol.* 2003c; 93, 1-13.

-
70. Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanism of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auto Nerv Sys.*2000; 81:97-103
 71. Ehler FJ, Ostrom SR, Sawyer GW. Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sci.* 1997; 61: 1729-1740.
 72. Rang HP, Dale M. *Pharmacology* Churchill Livingstone Elsevier, 6th edition, Edimburgo. 2007
 73. Hoyer, D. y Martin, G. 5-HT Receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology.* 1997; 36, 419-428.
 74. Glatzle, J., Sternini, C., Robin, C., Zittel, T.T., Wong, H.C., Reeve, Jr. Y Raybould, H.E. Expression of 5-HT₃ receptors in rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2002; 123, 217-226.
 75. Gershon, M.D. Importance of serotonergic mechanisms in gastrointestinal motility and sensation. In: *Irritable bowel syndrome.* Eds: M. Camileri and R.C. Spiller W.B. Saunders, Elsevier Sciences Limited, Edinburgh, 2002; 95-116.
 76. Pacher, P., Ungravi, Z., Kecskemetti, V., Friedmann, T. y Furst, S. Serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and citalopram relax intestinal smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 79, 580-584.
 77. Mita M, Yanagihara H, Hishimuna 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.
 78. Hansen, T.R., Dineen, D.X. y Petrak, R. Mechanism of action of barium ion on aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1984; 246, C235-C241.
 79. Abalo R, Pascua D, Goicoechea C, Martin MI. Blockade by pertussis toxin of the opioid effect on guinea pig ileum. Contractility and electrophysiological neuronal recording. *Neurosc Lett.* 2000; 291: 131-134.
 80. Maske R, Orlandi B, Dowdle EB. Contractile response of guinea pig ileum tin high frequency electrical field stimulation. *Eur J Pharmacol.*1980; 67: 47-52.
 81. Onteniente B, Rasika S, Benchoua A, Guegan C. Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 2003; 27: 33-72.

-
82. Read SJ, Hirano T, Davis SM, Donnan GA. Limiting neurological damage after stroke: a review of pharmacological treatment options. *Drugs y Aging* 1999; 114: 11-39.
 83. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev.* 1979; 59: 606-718.
 84. Sanford-Goodman L., Brunton L., Chabner B., Knollmann B., Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. New York : McGraw-Hill Medical, 12th ed. 2011.
 85. Kentish JC. The effects of inorganic phosphate and creatinine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol* 1986; 370: 585-604.