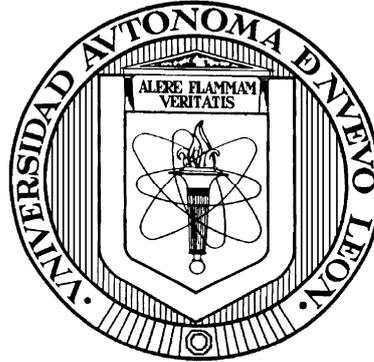


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO Y LOS
RECEPTORES NMDA EN LA ACTIVACION DEL ENDOTELIO
INTESTINAL DURANTE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION**

Por

FRANCISCO JAVIER GUZMAN DE LA GARZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Octubre del 2009

**PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO Y LOS
RECEPTORES NMDA EN LA ACTIVACION DEL ENDOTELIO
INTESTINAL DURANTE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Med. Nancy Esthela Fernández Garza
Director de Tesis

Dr. C. Paula Cordero Pérez
Co-Director de Tesis

Dr. C. Raquel Guadalupe. Ballesteros Elizondo.
Co-Director de Tesis

Dr. Med. Lourdes Garza Ocañas.
Comisión de Tesis

Dr. Med. Héctor Eloy Tamez Pérez
Comisión de Tesis

Dr. Med. Dionisio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Postgrado

**PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO Y LOS
RECEPTORES NMDA EN LA ACTIVACION DEL ENDOTELIO
INTESTINAL DURANTE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION**

Presentado por:

M.C. Dr. Francisco Javier Guzmán de la Garza

Este trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología, bajo la dirección de la Dr. Med. Nancy Esthela Fernández Garza, así como en los Departamentos de Histología, Patología y Unidad de Hígado, bajo la co-dirección de la Dr. C. Paula Cordero Pérez y la Dr. C. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Director de Tesis

Dr. Med. Nancy Esthela Fernández Garza

Co-directora

Co-directora

Dr. C. Paula Cordero Pérez

Dr. C. Raquel Guadalupe
Ballesteros Elizondo

DEDICADO A:

A mis padres:

**Sra. Laura Estela de la Garza Morales y
Lic. Francisco Javier Guzmán Sáenz;
porque me dieron el SER.**

A mi esposa:

**Dra. Martha Alejandra de la Cerda Salazar,
y a mis hijos:**

**Francisco Javier Guzmán de la Cerda,
Jesús Alejandro Guzmán de la Cerda y
Martha Alejandra Guzmán de la Cerda;
porque me dieron el motivo para SER.**

A mis suegros:

**Sra. María Josefina Salazar Pérez y
Lic. Jesús E. de la Cerda Garza
por su apoyo incondicional.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme comprender en parte lo complejo de la "Creación"

A Alejandra, por ser quien es...esposa, compañera, amiga.

Aquí, de esta forma, hago constar mi agradecimiento por el apoyo que me brindaron amigos, compañeros y maestros para concluir este proyecto; en particular:

A la Dr. Med. Nancy E. Fernández que fungió como mi Directora.

A las Dr. C. Paula Cordero Pérez y Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo por su apoyo y orientación como Co-Directoras,

A la Dr. Med. Lourdes Garza Ocañas y el Dr. Med. Héctor Eloy Tamez Pérez por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Gabriela Alarcón por su orientación en histopatología.

A la Dra. Linda E. Muñoz y al personal de la Unidad de Hígado, por su apoyo técnico, orientación y animo.

Al personal del departamento de Fisiología, por su entusiasmo en el trabajo día a día y en particular al Dr Carlos R. Camara Lemaroy

Al Sr Lorenzo Rada del departamento de Histología y al Técnico Martin García Guerrero del departamento de Patología por ayuda con la preparación de las laminillas.

Al Dr. Med. Santos Guzmán López y la Subdirección de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por el apoyo económico para la compra de los reactivos para la determinación de citocinas.

A los departamentos de Fisiología, Unidad de Hígado, Histología y Patología, por permitirme el uso de su equipo, ayuda invaluable para el desarrollo de este estudio.

A mis amigos, el M.C. Dr Luis Vázquez y al Dr. Gilberto Arévalo por... bueno pues, por ser amigos!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Panorama clínico de la isquemia-reperfusión intestinal	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.2 Isquemia-reperfusión intestinal	3
1.2.1 Cambios funcionales asociados a al hipoxia	3
1.2.2. Eventos del proceso inflamatorio	4
1.3 Participación del sistema nervioso entérico en el daño tisular asociado a procesos de isquemia-reperfusión intestinal	6
1.4 El sistema nervioso entérico.	9
1.4.1. Control del flujo sanguíneo por el sistema nervioso	10
1.4.2. Sistema nervioso entérico y glutamato	11
1.4.3. Glutamato	11
1.4.4. Receptores ionotrópicos para glutamato	12
1.4.5. Ketamina	14
1.4.6. Relación de la administración de ketamina con la lesión secundaria a IR intestinal.	15
1.5 El Endotelio	16
1.5 Activación del endotelio por el proceso inflamatorio	16
1.6 Justificación	18
1.7 Hipótesis	18
1.8 Objetivo General	19
1.8.1 Objetivos Específicos.	19
2. MATERIAL Y METODOS	20
2.1 Animales	20
2.2 Método	20
2.2.1 Diseño experimental y formación de grupos	20
2.2.2 Procedimientos quirúrgicos.	21
2.2.2.1 Laparotomía y colección de muestras.	21

2.2.2.2 Oclusión vascular e isquemia transitoria	22
2.2.3 Procedimiento de desnervación	22
2.2.4 Procedimiento de determinación de ICAM-1, ATII y P-Selectina	22
2.2.5 Preparación histológica, análisis y graduación del daño de la mucosa intestinal	23
2.2.6 Análisis estadístico	24
3. RESULTADOS	25
3.1 Caracterización del grupo control negativo (Sham)	25
3.2 Efecto de la isquemia-reperfusión intestinal en la rata.	27
3.3 Efecto de la denervación química en el intestino de la rata	29
3.4 Efecto del bloqueo de los receptores NMDA durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal	32
3.5 Efecto de la ausencia de sistema nervioso entérico durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal	35
3.6 Efecto del bloqueo NMDA sistémico y la ausencia del sistema nervioso entérico durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal	37
4. DISCUSION	39
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
6. BIBLIOGRAFIA	47
APENDICES	57
APENDICE A.- Técnicas de cuantificación de citocinas	58
APENDICE B.- Técnica histológica	70
APENDICE C.- Coloración con hematoxilina y eosina	72
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Procesos implicados en el daño celular durante la reoxigenación	5
2. Principales hormonas que influyen en la circulación del sistema digestivo.	9

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Transplantes intestinales realizados en el mundo hasta el primer trimestre del 2003.	2
2	Modelo unidireccional de interacciones intercelulares durante el proceso de inflamación intestinal.	6
3	Modelo multidireccional de interacciones célula a célula durante la inflamación intestinal.	7
4	Modelo de homeostasis intestinal.	8
5	Plexos nerviosos del sistema nervioso entérico.	10
6	La excitotoxicidad inducida por glutamato depende del incremento de Ca^{2+} intracelular.	12
7	Activación del receptor NMDA por la unión del glutamato y/o la glicina.	13
8	La ketamina bloquea el receptor NMDA para el glutamato y evita el aumento de la permeabilidad de la membrana para el Ca^{2+} .	14
9	Ileon de rata, teñido con hematoxilina y eosina, visto a 400x con microscopio óptico. Mucosa normal.	25

10	Plexo mientérico de ileon de rata, teñido con hematoxilina y eosina.	26
11	Ileon de rata, tras 30 minutos de isquemia y 60 de reperfusión teñido con hematoxilina y eosina.	27
12	Efecto de 30 min de isquemia y 60 de reperfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1.	28
13	Ileon de rata desnervado con cloruro de benzalconio, teñido con hematoxilina y eosina.	29
14	Plexo mientérico de ileon de rata desnervado con cloruro de benzalconio, teñido con hematoxilina y eosina.	30
15	Efecto de la destrucción de los plexos nerviosos del intestino con cloruro de benzalconio sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1	31
16	Lesión de la mucosa intestinal después de un período de isquemia reperfusión, efecto de la administración sistémica de ketamina	32
17	Efecto protector del bloqueo NMDA sistémico con ketamina sobre la lesión de la mucosa intestinal sometida a una agresión por isquemia reperfusión	33

- 18 Efecto de la administración de ketamina sistémica antes de un periodo de 30 min de isquemia y 60 de reperfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1. 34
- 19 Efecto de la desnervación del intestino 14 días antes de un evento de isquemia-reperfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1. 36
- 20 Efecto sobre el epitelio mucoso intestinal y los niveles séricos de antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1; de la isquemia-reperfusión intestinal en animales sin sistema nervioso entérico (DEN+IR); comparación con animales desnervados a los que se administró un antagonista NMDA (DEN+KET+IR) antes de la interrupción del flujo sanguíneo. 38

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato (Difosfato de adenosina)
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATIII	Antitrombina III
ATP	Adenosin trifosfato (Trifosfato de adenosina).
BAC	Cloruro de benzalconio
CE	Célula endotelial.
do	dosis.
DEN	Desnervado
DEN+KET	Desnervado mas ketamina
DEN+KET+IR	Desnervado mas ketamina mas isquemia reperfusión.
EROS	Especies reactivas de oxígeno.
FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
ICAM	Molécula de adhesión intercelular.
IL	Interleucina
IR	Isquemia-reperfusión
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
Pi	Pirofosfato
PBS	“Phosphate buffered saline” (amortiguador de fosfatos)

PGL	Prostaglandina
SNA	Sistema nervioso autónomo.
SNE	Sistema nervioso entérico.
SNC	Sistema nervioso central.
VCAM	Molécula de adhesión de la célula vascular

Francisco Javier Guzmán de la Garza

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO Y LOS RECEPTORES NMDA EN LA ACTIVACION DEL ENDOTELIO INTESTINAL DURANTE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION

Numero de paginas 75

Candidato para el grado de
Doctor en Medicina

Área de Estudio: Fisiopatología Médica.

Propósito y Método del Estudio:

Los eventos de isquemia-reperfusión en el intestino son inherentes a las cirugías de trasplante intestinal, también forman parte de la patología que se asocia a cirugías cardiovasculares, estados de choque e hipoperfusión. El conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de respuesta a la agresión isquémica es fundamental en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, la finalidad del estudio fue identificar el efecto de proteger a las neuronas del sistema nervioso entérico del daño por excitotoxicidad dependiente de la estimulación del receptor de glutamato NMDA. Estudiamos la repercusión histológica y la expresión sérica de mediadores proinflamatorios. El trabajo se realizó en un modelo en ratas.

Contribuciones y Conclusiones:

De los resultados de los experimentos desarrollados, se identifica el papel del sistema nervioso entérico en el daño secundario a IR, es muy posible que un proceso de excitotoxicidad se presente durante la agresión por IR, la evidencia presentada sugiere se deba a la activación de recetores NMDA para el glutamato. La protección del SNE con bloqueadores del receptor NMDA protege al intestino durante la agresión de IR, evita la activación del endotelio manifestada por el consumo de ATIII y la expresión de moléculas de adhesión como la p-Selectina.

Dr. Med. Nancy E. Fernández Garza _____
ASESOR

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Panorama Clínico de la Isquemia-reperfusión intestinal.

La palabra isquemia deriva de las palabras griegas “ishein” que significa carencia y “haima” que significa sangre. Durante la isquemia intestinal falta el aporte sanguíneo y por lo tanto, el oxígeno y los nutrientes necesarios para conservar el metabolismo y la integridad celular; al mismo tiempo, se deteriora la eliminación de productos del metabolismo como el CO₂.

La isquemia aguda puede ser producida por obstrucciones arteriales o venosas de naturaleza trombótica o embólica. En los pacientes en choque existe también isquemia, no oclusiva, en la cual la redistribución del flujo sanguíneo ocasiona el déficit de irrigación intestinal siendo la enterocolitis necrotizante una de sus complicaciones. Durante la cirugía de trasplante intestinal, la isquemia y la reperfusión (IR) son inevitables.

1.1.1 Epidemiología.

La isquemia intestinal aguda es una complicación grave de los procedimientos quirúrgicos en ancianos.¹, así como en la cirugía a corazón abierto, teniendo una baja incidencia (0.2 – 0.4%) pero una alta mortalidad (70-100%).^{2,3}

En neonatos, la enterocolitis necrotizante es la emergencia médica y quirúrgica más frecuente. Se presenta en forma esporádica, no epidémica, con una incidencia que varía de país a país del 5 al 10 % de los niños que ingresan en una unidad de cuidados intensivos neonatales; alcanzando en neonatos de bajo peso una incidencia de 30 por cada mil.⁴⁻⁶ En Monterrey N. L., en un hospital general, se reportó la enterocolitis con prevalencia del 1.5% de los nacidos vivos y del 10% de los ingresos a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.⁷

Por otro lado, el número de trasplantes intestinales va en aumento, habiéndose realizado alrededor de 1,000 en el mundo entero hasta el primer trimestre del año 2003.⁸⁻¹² (Figura 1).



Figura 1. Trasplantes intestinales realizados a nivel mundial hasta el primer trimestre del 2003

1.2 Isquemia-reperfusión intestinal

La IR en el intestino lesiona la mucosa, ocasionando pérdida de su función como barrera, permitiendo el paso de bacterias y sustancias nocivas hacia la circulación^{13,14} y favoreciendo la secreción de citocinas.¹⁵ Existe evidencia de que el intestino es el mayor productor de citocinas durante el choque hemorrágico y/o la lesión por IR.¹⁶⁻¹⁷ Particularmente se incrementan la Interleucina (IL) 6, la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α)

La lesión por isquemia-reperfusión incluye dos tipos de agresión: la hipóxica y la inflamatoria.

1.2.1 Cambios funcionales asociados a la hipoxia.

Los cambios funcionales asociados a la hipoxia incluyen: ^{18,19}

a) Disminución de la fosforilación oxidativa y la función de las bombas de membrana dependientes de Trifosfato de Adenosina (ATP).

b) Generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) durante la reperfusión.

c) Promoción de la expresión en el endotelio de genes proinflamatorios que dan origen a moléculas de adhesión de leucocitos, citocinas y agentes bioactivos como la endotelina y el tromboxano A2.^{18, 20,21}

Como consecuencia de la caída energética se inactivan las bombas ATPasa de Calcio (Ca²⁺) y se incrementa la concentración de Ca²⁺ citosólico por: a) ingreso del Ca²⁺ extracelular, b) liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y c) salida del Ca²⁺ de las mitocondrias.

El incremento del Ca^{2+} intracelular favorece el edema celular, activa proteasas citosólicas dependientes del Ca^{2+} así como a la fosfolipasa A2 y promueve la liberación de derivados del ácido araquidónico. En particular éstos participan en el proceso inflamatorio y en el daño mediado por neutrófilos.²²

Durante la isquemia, la enzima xantina deshidrogenada se isomeriza a xantina oxidasa. Ambas isoformas catalizan la transformación de xantina e hipoxantina en ácido úrico, la diferencia es que la oxidasa utiliza como aceptor de electrones el oxígeno, dando lugar a la producción de EROS. Una vez comenzada la reperfusión, la xantina y la xantina oxidasa pueden ser liberadas a la circulación general y llegar a afectar a otros órganos como el pulmón.^{18,20,21}

Al aumentar la cantidad de moléculas proinflamatorias y citocinas, la isquemia, induce un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión y favorece el establecimiento de la respuesta inflamatoria aguda mediada por polimorfonucleares y macrófagos tisulares.^{18,19}

1.2.2. Eventos del proceso inflamatorio

La inflamación consiste en eventos coordinados, que incluyen:

- a) Incremento del diámetro vascular.
- b) Aumento de la permeabilidad vascular.
- c) Inducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular; como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM1) y las moléculas de adhesión a carbohidratos P y E Selectinas.
- d) Inducción en el endotelio de la expresión de moléculas que provocan la coagulación sanguínea local.
- e) Quimiotaxis.

Cuando se establece la respuesta inflamatoria, los macrófagos producen una serie de citocinas como son el FNT- α , IL-1, 6, 8, 12 y 18 y otros. Éstos, junto con la activación del complemento, las cininas y la degranulación de los mastocitos tisulares son responsables de la respuesta inflamatoria local. Los efectos sistémicos que son provocados por los mediadores liberados en el sitio inflamado se denominan colectivamente respuesta de fase aguda. La respuesta de fase aguda es provocada por la acción del FNT- α , IL-1 e IL-6.²³

Los mecanismos por los cuales la IR intestinal contribuye al desarrollo de una respuesta inflamatoria y daño celular aún no se conocen por completo, se han implicado una extensa lista, entre los más importantes se encuentran la alteración de la función mitocondrial, el aumento de la producción de EROS y la generación de apoptosis²⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Procesos implicados en el daño celular durante la reoxigenación.

Daño a la función mitocondrial e incremento de la producción mitocondrial de EROS
Fosforilación o conversión de xantino deshidrogenada a xantino oxidasa
Disminución del glutatión y enzimas con actividad antioxidante
Incremento de la producción de EROS
Activación de NF- κ B
Alteración del transporte iónico epitelial
Disminución de prostaciclina
Inducción de la sintetasa de oxido nítrico; incremento en la producción de especies reactivas de nitrógeno.
Aumento de la permeabilidad celular
Entrada de calcio celular y mitocondrial
Activación de cinasas y proteincinasa C
Apoptosis; necrosis
Inducción del proteínas de choque térmico

1.3 Participación del sistema nervioso entérico en el daño tisular asociado a procesos de isquemia-reperfusión intestinal

En el intestino, durante el proceso inflamatorio desencadenado por la IR, se pueden identificar dos posibles escenarios²⁵:

I) Modelo unidireccional: Las células inflamatorias juegan el rol de agresor, atacan al agente que desencadenó el proceso, el resto de las células fungen como espectadores y son lesionadas durante la inflamación. (Figura 2)

II) Modelo multidireccional: Las células no inmunes participan en la génesis y mantenimiento del proceso inflamatorio (Figura 3). En este modelo, todas las células y la matriz extracelular interactúan recíprocamente. Las interacciones son mediadas por citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión.

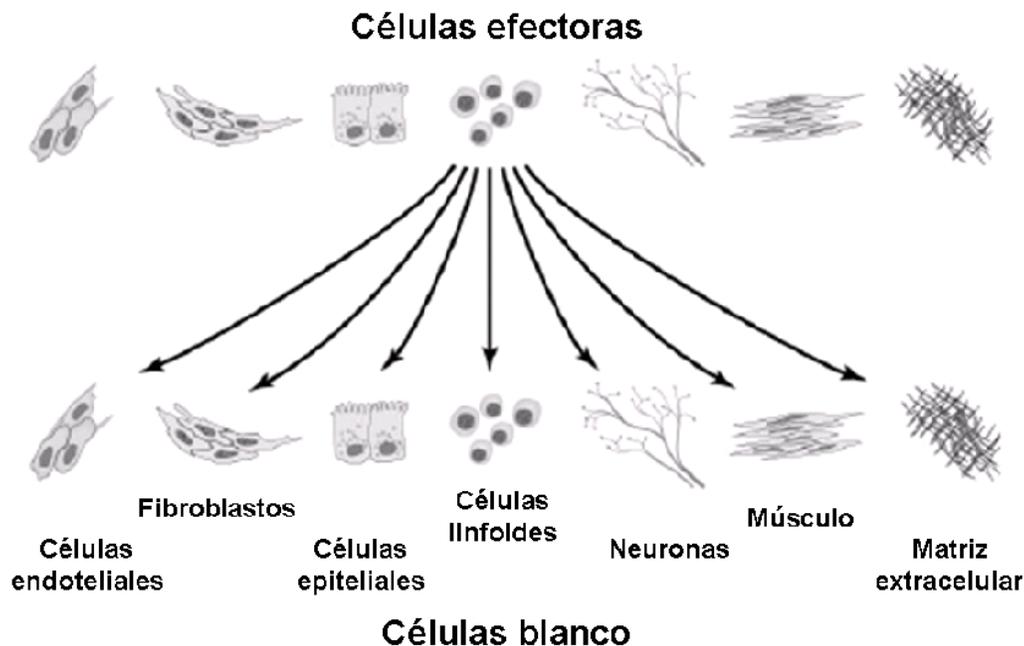


Figura 2. Modelo unidireccional de interacciones intercelulares durante el proceso de inflamación intestinal.

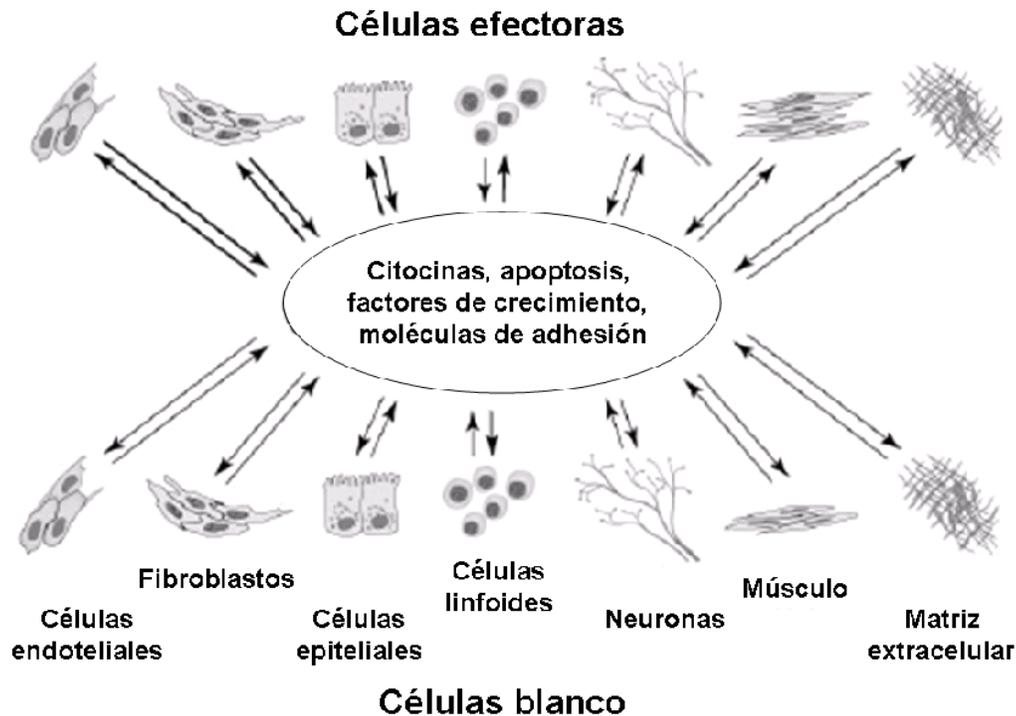


Figura 3. Modelo multidireccional de interacciones célula a célula durante la inflamación intestinal.

En el contexto del modelo multidireccional, el Sistema Nervioso Entérico (SNE) representa un elemento integrador muy eficiente, su extensa red de fibras, neuronas y los arreglos de neurotransmisores lo posibilitan para participar en intrincados mecanismos regulatorios entre mucosa y células. Puede incluso mediar la liberación de potentes moléculas que regulan la actividad inflamatoria aguda y crónica.²⁶⁻²⁹

Durante el proceso inflamatorio, el SNE favorece la dilatación de los vasos submucosos, éste es un reflejo local que nace y se ejecuta en el interior de la pared intestinal. Las respuestas intrínsecas coexisten con reflejos extrínsecos como los vasoconstrictores simpáticos y los vasodilatadores “no

simpáticos” como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina.³⁰

Además de su participación en el proceso inflamatorio, el SNE es lesionado por la IR.³¹

En el modelo de homeostasis intestinal, todos los tipos celulares interactúan entre sí (epiteliales, nerviosos, musculares, endoteliales, fibroblastos), con la matriz extracelular y con los leucocitos para alcanzar y/o mantener la homeostasis. La disfunción de uno o más de los componentes puede desencadenar o perpetuar un proceso inflamatorio patológico. En particular, el deterioro de las funciones de regulación que mantiene el SNE ^{32,33} alteraría los mecanismos que permiten al tejido responder óptimamente y mantener la homeostasis tisular ²⁵. (Figura 4)

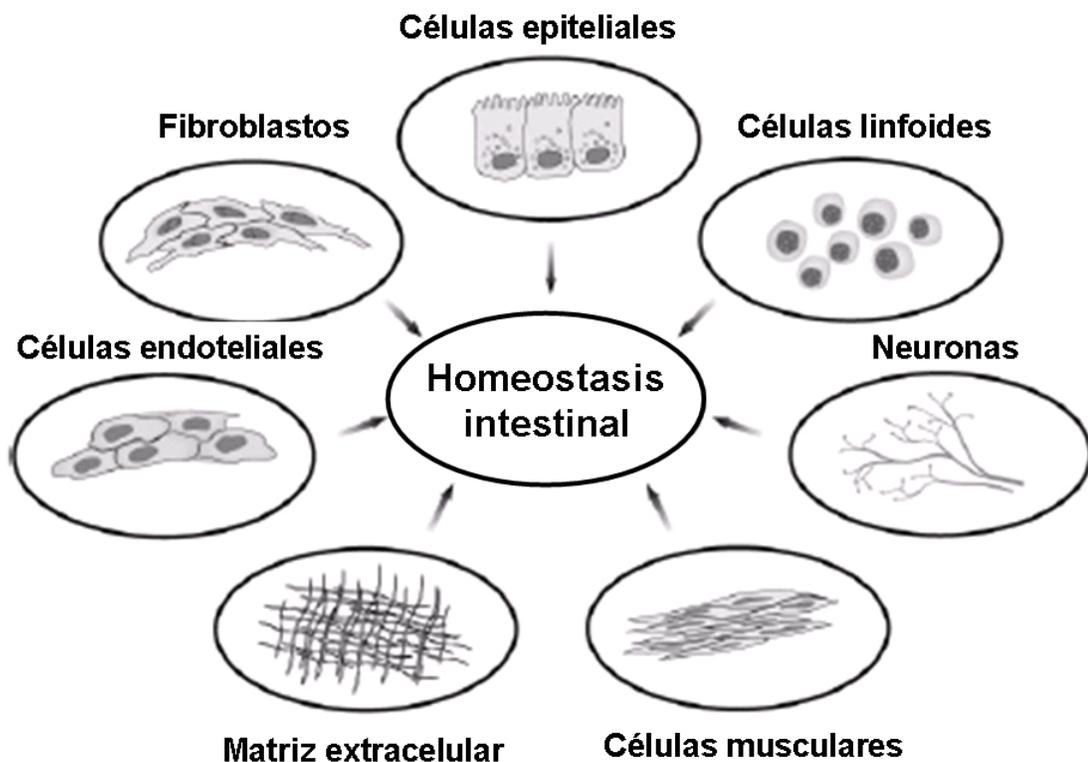


Figura 4.- Modelo de homeostasis intestinal

1.4 El Sistema Nervioso Entérico

Se ha considerado al SNE como un "cerebro intestinal", recibe aferencias autonómicas y regula la peristálsis, el flujo sanguíneo regional, la secreción y la absorción del tubo digestivo.

El SNE esta constituido por un conjunto de estructuras nerviosas que se encuentran en el aparato gastrointestinal y en los órganos anexos como el hígado y el páncreas. En el tubo digestivo, esta representado por dos plexos ganglionares localizados en la pared: el mientérico y el submucoso.

Las neuronas y las células gliales del plexo mientérico así como los vasos que las nutren comparten características funcionales con las neuronas y los vasos del SNC³⁴ regulan la peristálsis y la motilidad del tubo digestivo.

El plexo submucoso participa en la integración de reflejos locales y regula las funciones de secreción y absorción del epitelio, el flujo sanguíneo y la contracción de la muscular de la mucosa.

También hay otros plexos nerviosos, los plexos aganglionares, que se ubican en otros planos de la pared intestinal y son ramificaciones de prolongaciones nerviosas que se originan en las células de los plexos mientérico y submucoso³⁵ (Figura 5).

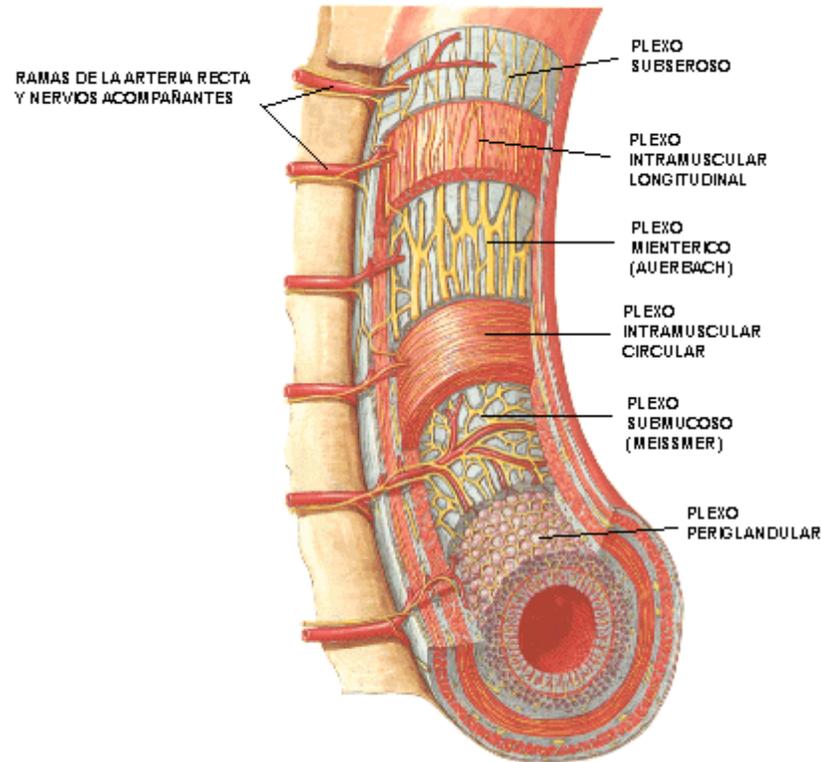


Figura 5- Plexos nerviosos del sistema nervioso entérico

1.4.1. Control del flujo sanguíneo por el sistema nervioso.

El SNE integra reflejos locales que modifican el flujo sanguíneo en las diferentes capas histológicas del intestino en respuesta a estímulos provenientes del Sistema Nervioso Central (SNC) por vía simpática o parasimpática, y del tubo digestivo: mucosa, muscular y vasos sanguíneos.³⁶⁻³⁸

La innervación simpática se distribuye en los vasos sanguíneos mesentéricos, los de las criptas y los de la submucosa incluyendo a la muscular de la mucosa.³⁷

Es posible que al lesionar al SNE, se pierda la capacidad de regular la irrigación de la pared intestinal y que a semejanza de lo que ocurre en el SNC, gran parte del daño al SNE se ocasione por la liberación de aminoácidos excitotóxicos como el glutamato.

1.4.2. Sistema nervioso entérico y Glutamato

En el SNE existen neuronas tanto en el plexo mientérico como en el submucoso que expresan receptores para el glutamato.^{39, 40} La excitotoxicidad relacionada con el glutamato se ha demostrado *in vitro* en neuronas entéricas y en preparaciones de pared intestinal.³⁹

1.4.3. Glutamato

En el SNC, el glutamato es el principal y más rápido neurotransmisor excitatorio. Ejerce sus efectos mediante la activación de receptores de membrana, reconociendo cuatro tipos de receptores, que reciben su denominación de acuerdo al tipo de agonista al que responden: los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA); los N-metil-D-aspartato (NMDA); los Kainato (estos tres son ionotropos) y los receptores metabotrópicos.^{41,42}

Durante las lesiones agudas del SNC, incluida la isquemia y el traumatismo cráneo-encefálico, el glutamato y el aspartato, se acumulan en el espacio extracelular y en la hendidura sináptica. El exceso de glutamato activa receptores postsinápticos causando una sobreactivación de los mismos cuyo efecto es la acumulación de calcio en el interior de la célula, desencadenando el fenómeno de excitotoxicidad, que contribuye a la neurodegeneración observada después de este tipo de lesiones (Figura 6).

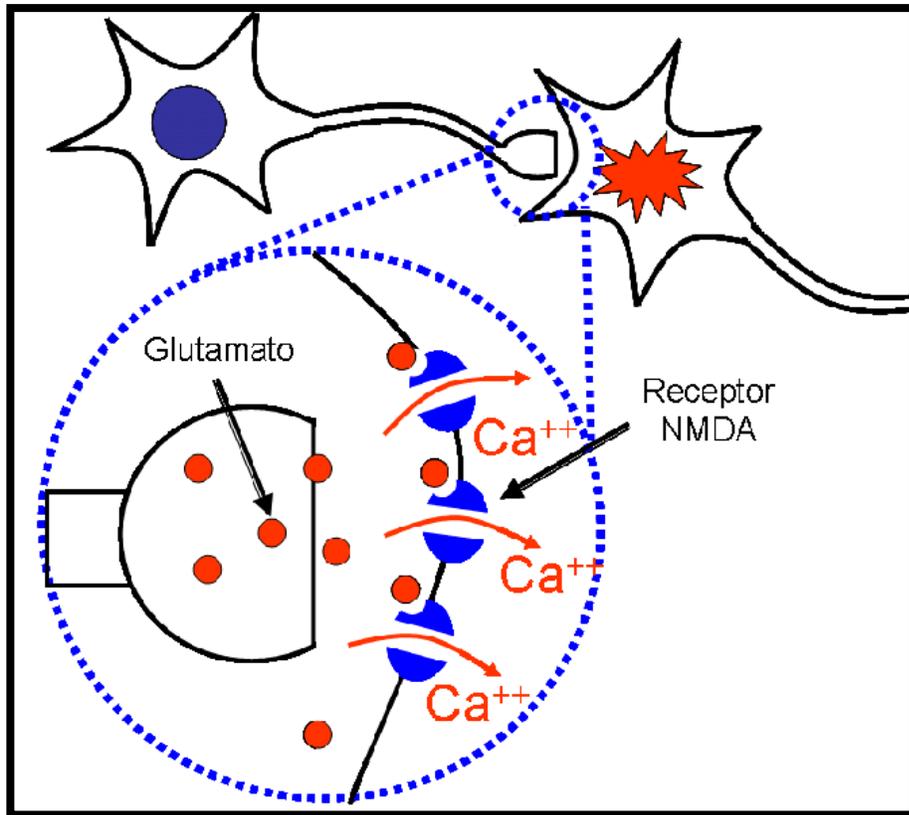


Figura 6. Excitotoxicidad inducida por glutamato que provoca un incremento del Ca^{2+} intracelular.

1.4.4. Receptores ionotrópicos para glutamato

Los receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, Kainato y NMDA) son complejos macromoleculares que contienen tres dominios transmembranales denominados M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana, el dominio M2, que le proporciona la selectividad iónica al canal. Los receptores AMPA median la transmisión de baja frecuencia y están implicados en la potenciación y la depresión a largo plazo, que se consideran el equivalente de la memoria a nivel celular.⁴¹

Del receptor kainato se han clonado cinco subunidades.⁴¹ y pueden también ejercer efecto de carácter metabotrópico o funcionar como canales, dependiendo de la combinación de las subunidades que los constituyan.

El receptor NMDA (Figura 7) tiene una estructura heteromérica con dos tipos de subunidad, la denominada subunidad NR1 y una de cuatro subunidades NR2 (NR2-A-NR2D). Los receptores NMDA se unen a canales catiónicos permeables al K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . En el SNC, la estimulación de los receptores de NMDA es responsable del incremento del calcio intracelular y de iniciar la cascada de eventos durante la lesión isquémica que dependen del calcio y que conducen a los procesos que llevan al daño celular irreversible y a la muerte celular.^{41, 43}

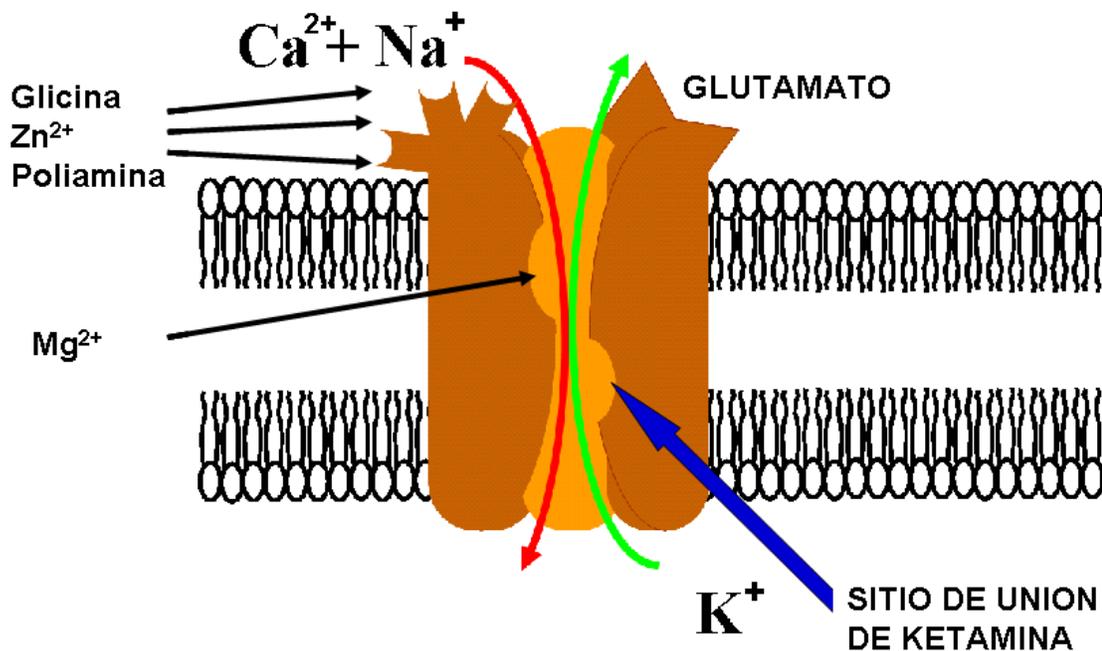


Figura 7. Activación del receptor NMDA por la unión del glutamato y la glicina.

El receptor NMDA puede ser modulado por antagonistas competitivos de la glicina y/o del glutamato y por bloqueadores del canal como la ketamina.⁴¹ (Figura 8).

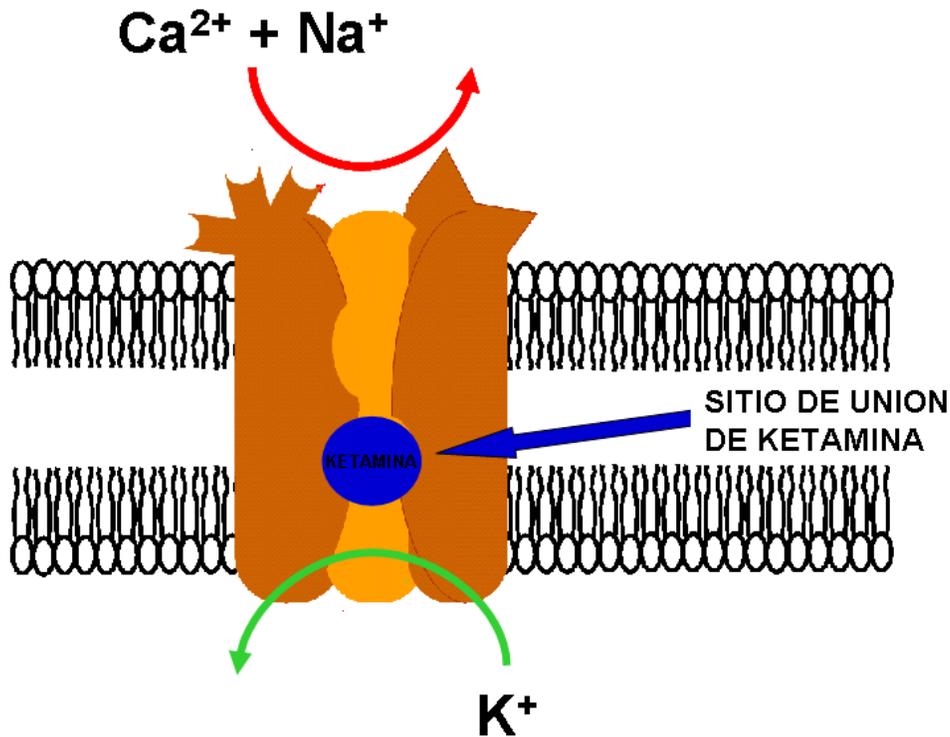


Figura 8. La ketamina bloquea el receptor NMDA para el glutamato y evita el aumento de la permeabilidad de la membrana para el Ca^{2+} .

1.4.5. Ketamina

La ketamina es un derivado de la fenciclidina, fue sintetizada en 1962 por Stevens. La molécula de ketamina es la (R,S)-2-(O-clorofenil)-2-metilaminociclohexanona, posee un peso molecular de 238 dalton y un pKa de 7.5, es soluble en agua y posee también una gran liposolubilidad (10 veces la del tiopental)⁴⁴.

El producto comercial (Ketalar) es una solución de pH 3.5., contiene una mezcla racémica al 50% de los dos isómeros ópticos o enantiómeros que existen. El carbono número 2 de su estructura química es un centro de rotación quiral en el anillo de la ciclohexanona que hace posible la existencia de dos enantiómeros denominados S(+) ketamina (1-ketamina, isómero levógiro) y R(-) ketamina (d-ketamina, isómero dextrógiro)⁴⁴.

La ketamina se fija a proteínas plasmáticas en un 12-27%. Es metabolizada por los sistemas enzimáticos hepáticos, principalmente por la vía del citocromo P-450, siendo la ruta principal la N-demetilación⁴⁴.

En ratas la vida media es de 30 minutos y el tiempo anestésico de inmovilización es de 60 a 90 minutos⁴⁵.

1.4.6 . Relación de la administración de ketamina con la lesión secundaria a IR intestinal.

En estudios previos hemos documentado *in vivo*, que la anestesia con ketamina disminuye el grado de lesión mucosa secundario a un evento agudo de IR⁴⁶ en ratas y protege contra las alteraciones del tránsito intestinal que se observan a largo plazo. Intuimos que esto es debido a la protección del SNE de daño por excitotoxicidad asociada a glutamato, desconociendo como se comporta el endotelio en este contexto.

1.5 El endotelio

De acuerdo con el modelo multidireccional del proceso inflamatorio en el intestino, que describimos previamente, el SNE y las células endoteliales (CE) ocupan un importante lugar en perpetuar la inflamación.²⁵

Las CE son capaces de detectar estímulos físicos y/o químicos relacionados con el estrés mecánico, el flujo sanguíneo, la presión arterial, la distensión y sustancias liberadas por las células sanguíneas o los tejidos. Las CE tienen un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular a la cual contribuye mediante la liberación de múltiples sustancias activas.⁴⁷

1.5 Activación del endotelio por el proceso inflamatorio.

Las propiedades de las CE varían entre los diversos órganos del cuerpo y entre los diferentes tipos y tamaños de vasos sanguíneos. El desequilibrio en la liberación de moléculas endoteliales, cuando las CE se exponen a mediadores inflamatorios, se denomina: activación de células endoteliales⁴⁸

Las características más importantes que adquiere la célula endotelial en su estado activado son: a) propiedades procoagulantes, b) propiedades proadhesivas, c) pérdida de la función de barrera, y d) apoptosis de la célula endotelial.⁴⁹

Entre las moléculas que se expresan en el endotelio activado se encuentran el ICAM-1 y el VCAM-1; las moléculas de adhesión a carbohidratos

P y E Selectinas. Algunas de estas moléculas como la P Selectina aparecen en el endotelio minutos después de su activación.⁴⁸

Así entonces, el endotelio ejerce un papel central en la regulación de la hemostasia, aporta importantes elementos de los sistemas de coagulación, trombosis y fibrinólisis del organismo y participa en la regulación de la fibrinólisis.^{47,49,50}

Por lo anterior, es de suma importancia entender la participación del SNE en la activación del endotelio de los vasos intestinales durante la agresión por IR, como la que sufren algunos pacientes con complicaciones hemodinámicas o quirúrgicas, así como en los sometidos a trasplante intestinal.

1.7 Justificación

El proceso de IR es en la actualidad un problema en los pacientes sometidos a trasplantes. El conocimiento de los mecanismos celulares que median el proceso de daño celular y funcional y la comprensión del papel que juega el sistema nervioso entérico, sus neurotransmisores y el endotelio, permitirá en un futuro mejorar el tratamiento de los pacientes sometidos a trasplante intestinal así como de los que padecen procesos isquémicos del tubo digestivo.

1.8 Hipótesis

El bloqueo de los receptores NMDA en las neuronas entéricas modula la activación endotelial y repercute en la lesión mucosa secundaria a isquemia-reperfusión intestinal

1.9 Objetivo General

Demostrar que el bloqueo de la estimulación del sistema nervioso entérico, mediante los receptores NMDA para el glutamato, modifica la activación del endotelio secundaria a lesión por isquemia-reperfusión en el tubo digestivo.

1.9.1 Objetivos Específicos

1. Determinar el grado de lesión mucosa y relacionarlo con la concentración de mediadores pro-inflamatorios en animales sometidos a isquemia intestinal transitoria en los cuales se administra un bloqueador de NMDA.
2. Determinar el grado de lesión mucosa y relacionarlo con la concentración de mediadores pro-inflamatorios; comparando lo que ocurre en animales con SNE intacto y animales sin SNE, después de ocasionar isquemia intestinal transitoria.
3. Determinar el grado de lesión mucosa y relacionarlo con la concentración de mediadores pro-inflamatorios; comparando lo que ocurre en animales con SNE intacto y animales sin SNE en los cuales se administró un bloqueador de NMDA, con animales que no reciben bloqueador NMDA después de ocasionar isquemia intestinal transitoria.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Animales

Se utilizaron 50 ratas Wistar de 250 ± 50 gramos, proporcionadas por el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Mantenidas en condiciones estables de iluminación y temperatura antes de los experimentos, todas las ratas tuvieron un período de habituación al laboratorio de 7 días, antes de entrar en el protocolo experimental y se mantuvieron con disposición de alimento y agua a libre demanda.

2.2 Método

2.2.1 Diseño experimental y formación de grupos

Se formaron 10 grupos experimentales, cada uno con 5 ratas, se denominaron como sigue:

Grupos control:

- Control negativo (Sham)
- Control positivo (IR intestinal).
- Desnervado (DEN). Desnervación química del intestino 14 días antes de realizar mediciones y biopsias.

Grupos experimentales:

- Ketamina + IR. Administración de ketamina antes de provocar isquemia intestinal transitoria. Este grupo estuvo formado por 5 subgrupos según la dosis de ketamina utilizada:
 1. KET 100: ketamina 100 mg/kg/do.
 2. KET 50: ketamina 50 mg/kg/do.
 3. KET 25: ketamina 25 mg/kg/do.
 4. KET 12.5: ketamina 12.5 mg/kg/do.
 5. KET 6.25: ketamina 6.25 mg/kg/do.

- Desnervado + IR (DEN+IR) Desnervación del intestino 14 días antes de provocar isquemia intestinal transitoria y tomar muestras.

- Desnervado + ketamina + IR (DEN+KET+IR) Desnervación del intestino 14 días antes de administrar ketamina, provocar isquemia intestinal transitoria y tomar muestras.

2.2.2 Procedimientos quirúrgicos.

2.2.2.1 Laparotomía y toma de muestras.

La rata se mantuvo en ayuno durante 12 hrs, posteriormente se anestesió con pentobarbital (50 mg/kg/do) administrado por vía intraperitoneal, se sujetó en la mesa quirúrgica y se le realizó laparotomía media; se localizaron el yeyuno y el ileon y se identificaron la vena porta y la arteria mesentérica superior. Dependiendo del grupo de asignación se llevo a cabo el procedimiento experimental y al terminar se tomó una muestra de sangre de la aorta para la cuantificación de citocinas y un segmento de ileon para el análisis histológico.

2.2.2.2 Oclusión vascular e isquemia transitoria

Tras practicar laparotomía, como se describe en el apartado 2.2.2.1, se ligó el ciego para bloquear la circulación colateral. Para provocar isquemia, se localizaron la arteria mesentérica superior y la vena mesentérica superior antes de su unión a la porta, se ocluyeron con pinzas vasculares, comprobando visualmente la ausencia de pulso en los vasos y el cambio a coloración marrón del intestino. Después de un periodo de isquemia de 30 minutos se quitaron las pinzas y se después de un periodo de reperfusión de 60 minutos se tomaron las muestras de sangre y tejido intestinal.

2.2.3 Procedimiento de desnervación

Se realizó la laparotomía como se describe en el apartado 2.2.2.1, después de lo cual se colocó el intestino sobre gasas humedecidas con solución de cloruro de benzalconio (BAC) al 0.081% durante 30 minutos, al finalizar se irrigó suavemente con solución salina al 0.9% y se regresó el intestino a la cavidad abdominal.

A los 14 días de la aplicación del cloruro de benzalconio; se anestesió con pentobarbital (50 mg/kg/do) intraperitoneal y/o 50 mg/kg/do de ketamina, que fue la dosis que provocó menos daño histológico, se realizó una laparotomía y se llevó a cabo el procedimiento de isquemia transitoria según el grupo; al final se tomaron las muestras de sangre y de tejido intestinal.

2.2.4 Procedimiento de determinación de de ICAM-1, ATIII y P-Selectina

El suero de la muestra de sangre tomada durante las diferentes fases del estudio se congeló a -70°C , doce horas antes del ensayo se colocaron a -20°C

y posteriormente a temperatura ambiente. Al descongelarse y alcanzar la temperatura ambiente se realizaron los ensayos, constituidos por pruebas de ELISA tipo sándwich de fase sólida.

- Para cuantificar la fracción soluble de la Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM), se utilizó el paquete Quantikine rat sICAM-1 de R&D Systems, Inc. (Apéndice A).
- Para cuantificar la fracción soluble de la molécula de adhesión leucocitaria P-selectina (sP-Selectina), conocida también como CD62P, GMP-140 y/o LECAM-3, se utilizó el paquete Quantikine mouse sP-Selectin de R&D Systems, Inc. (Apéndice A).
- Para cuantificar Antitrombina III (ATIII), en suero de rata, se utilizó el paquete Rat AntiThrombin III ELISA Quantitacion Kit, de GenWay Biotech, Inc. (Apéndice A).

2.2.5 Preparación histológica, análisis y graduación del daño de la mucosa intestinal.

Las muestras de tejido intestinal fueron procesadas mediante técnica histológica y teñidas con hematoxilina y eosina. (Apéndice B, C)

La lesión de la mucosa se evaluó, al observar los cortes histológicos bajo microscopía de luz, de acuerdo a la clasificación de Chiu⁵¹:

0. Vellosidad intestinal normal.
1. Desarrollo de espacio subepitelial (espacio de Gruenhagen) en la punta de la vellosidad junto con congestión capilar.
2. Extensión del espacio subepitelial y desprendimiento de la capa epitelial.
3. Desprendimiento masivo del epitelio.
4. Vellosidades desnudas con capilares expuestos.
5. Desintegración de vellosidades y lámina propia, hemorragia y ulceración.

2.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados y analizados mediante el paquete estadístico SPSS VII, para comparar las variables se utilizaron pruebas ANOVA de un factor, las diferencias entre los grupos se contrastaron con pruebas de Tukey; y se consideró significativa una $p < 0.05$

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Caracterización del grupo control (Sham)

Los animales del grupo Sham, constituyeron el grupo control negativo, no se les provocó isquemia, no se les aplicó BAC ni ketamina. La morfología de la mucosa fue normal correspondiendo a un puntaje de 0 en la clasificación de Chiu. (Figura 9) y en las células del plexo mientérico no se identificaron alteraciones (Figura 10).

Los niveles séricos de ATIII fueron de 102.7 ± 23.4 ng/mL; los niveles séricos de p-Selectina soluble fueron de 0.39 ± 0.36 ng/mL; el nivel sérico de ICAM-1 soluble se cuantificó en 197 ± 38.87 pg/mL (Figura 12).

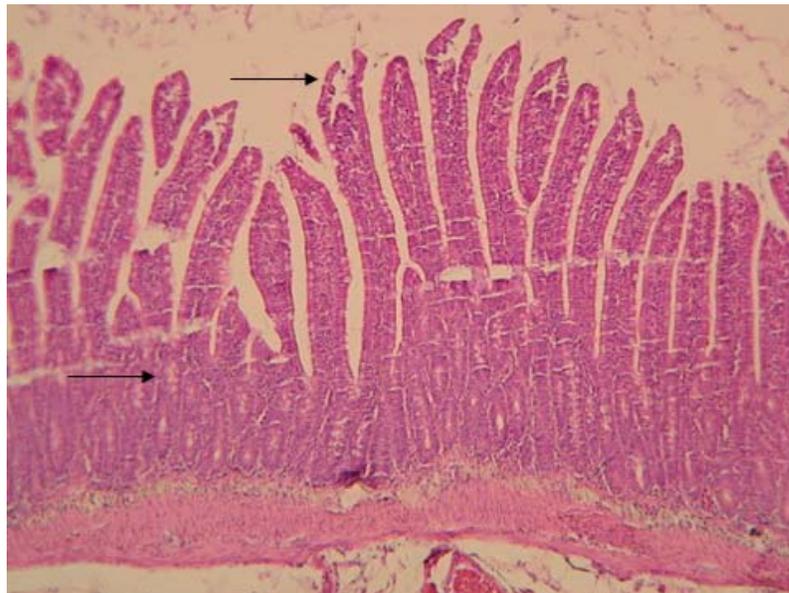


Figura 9. Ileon de rata, teñido con hematoxilina y eosina, visto a 400x con microscopio óptico. Mucosa normal, Flecha: artefactos del cortado

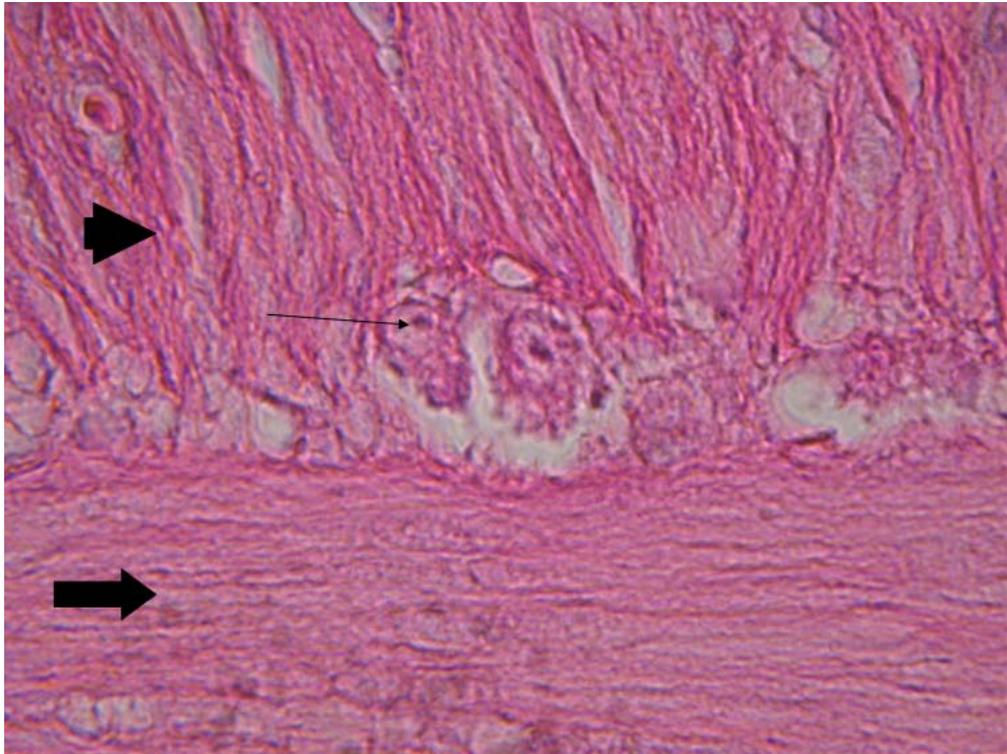


Figura 10. Plexo mientérico de ileon de rata, teñido con hematoxilina y eosina, visto a 4000x (400x en microscopio óptico + 10 aumentos al fotografiar). Flecha delgada: nucleolo de células normales, flecha gruesa: capa muscular longitudinal, punta de flecha: capa muscular circular.

3.2 Efecto de la isquemia-reperfusión intestinal en la rata.

Al estudiar animales anestesiados con pentobarbital y sometidos a una agresión por IR, se identificó un severo daño y destrucción de la mucosa intestinal. Alcanzando en la escala de Chiu un puntaje de 3.4 ± 0.55 (Figura 11).

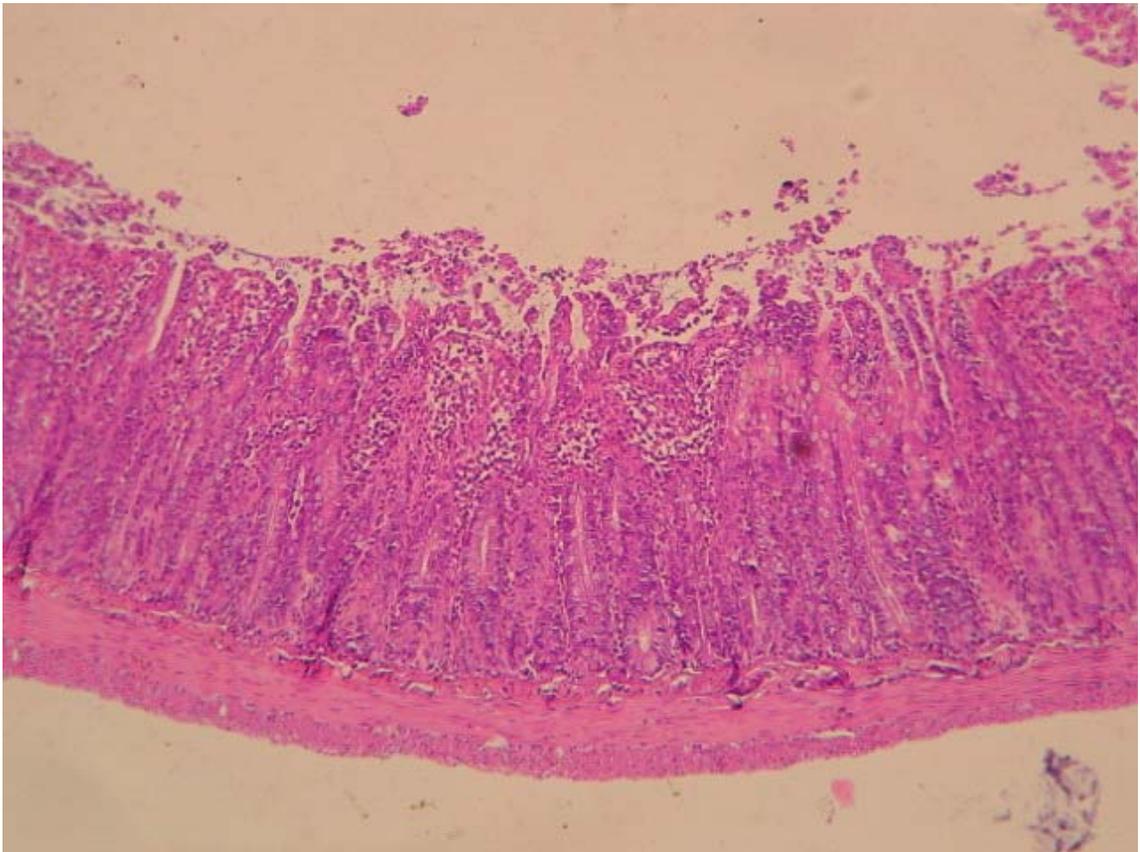


Figura 11. Ileon de rata, después de 30 minutos de isquemia y 60 de reperfusión. Teñido con hematoxilina y eosina, visto a 400x con microscopio óptico. La mucosa muestra desprendimiento masivo del epitelio, desintegración de vellosidades y hemorragia.

En el grupo IR, la ATIII en suero, se encontró en 18.2 ± 16.9 ng/mL, los niveles séricos de p-Selectina soluble en 2.24 ± 0.98 ng/mL y el nivel sérico de ICAM-1 soluble en 486.64 ± 38.2 pg/mL.

Comparando los resultados del grupo IR con el grupo Sham, se encontró una diferencia significativa en el puntaje de lesión ($p=0.001$), en los niveles de ATIII ($p<0.05$), también el nivel de ICAM-1 se encontró elevado en comparación con el grupo Sham $p<0.05$. (figura 12)

En resumen, la agresión por IR intestinal, provoca lesión en la mucosa intestinal, consumo de ATIII y aumento de la expresión de p-Selectina y de ICAM

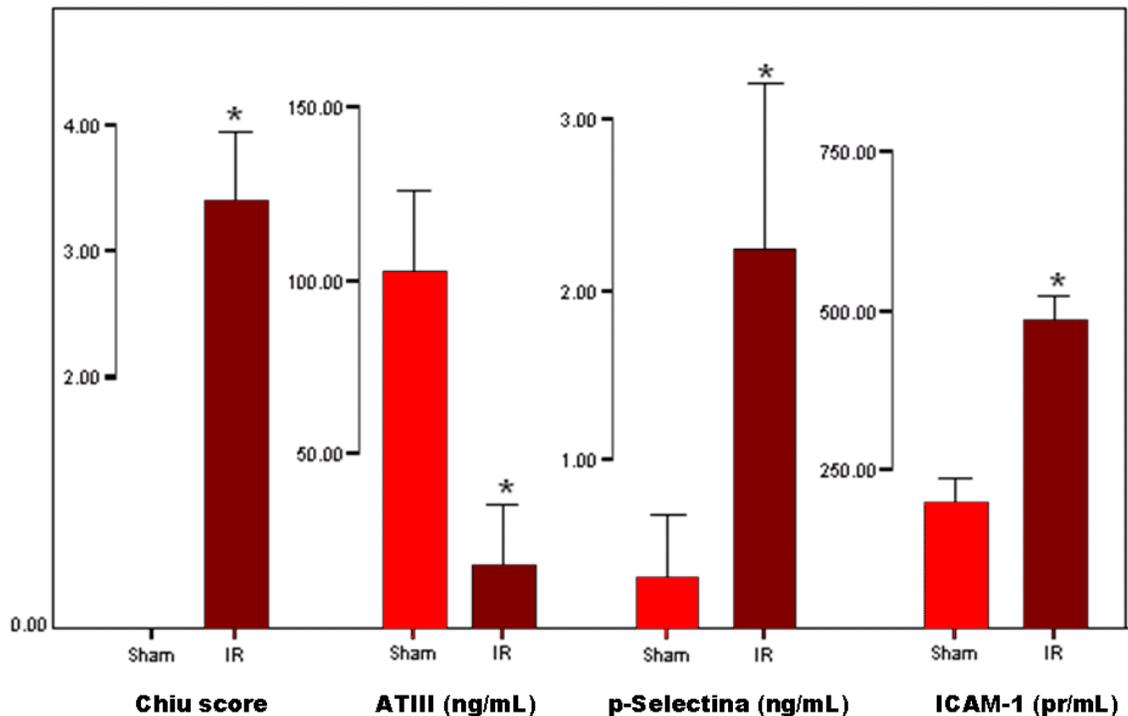


Figura 12. Efecto de 30 min de isquemia y 60 min de perfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de Antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1; * = $p < 0.05$.

3.3 Efecto de la denervación química en el intestino de la rata.

La aplicación de BAC sobre la serosa intestinal ocasiona la destrucción de los plexos mientérico y submucoso. La observación, con microscopio de preparaciones de mucosa intestinal proveniente de animales tratados con BAC (grupo DEN) se caracterizó por aplanamiento y ensanchamiento de las vellosidades, infiltrado mononuclear (Figura 13), las células del plexo mientérico mostraron reducción del citoplasma, núcleo picnótico, pérdida de nucleolo (Figura 14). Al aplicar la escala de Chiu ⁵¹ se obtuvo un puntaje de 0.2 ± 0.45 . No se identificó diferencia significativa con respecto de animales del grupo Sham (Figura 15).

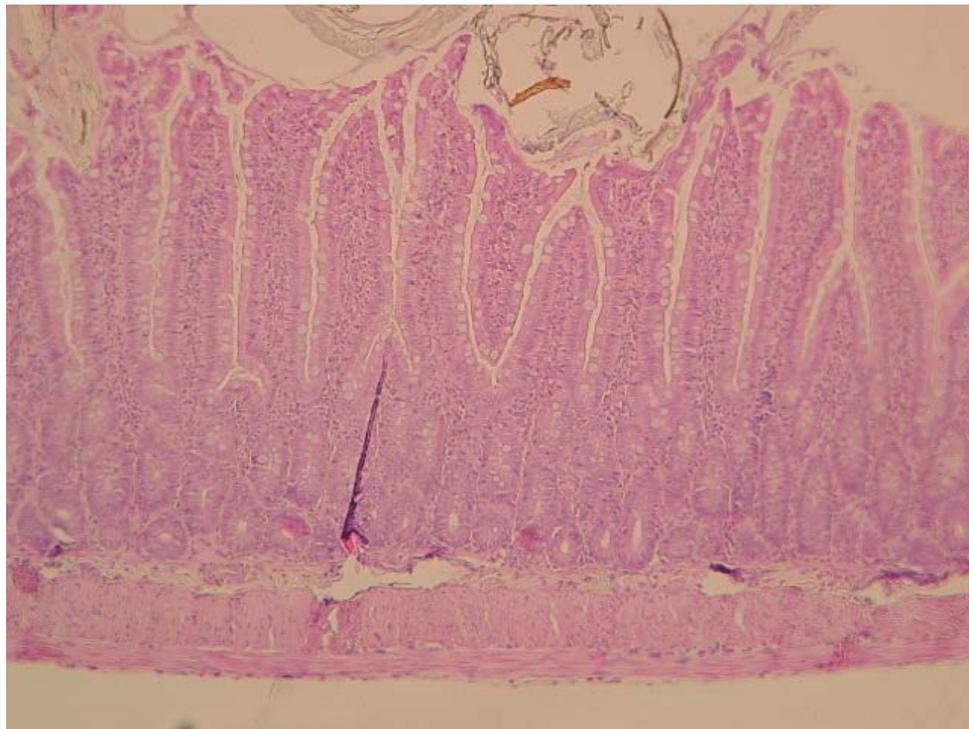


Figura 13. Ileon de rata desnervado con cloruro de benzalconio, teñido con hematoxilina y eosina, visto a 400x con microscopio óptico. Nótese el engrosamiento y la disminución de la altura de las vellosidades

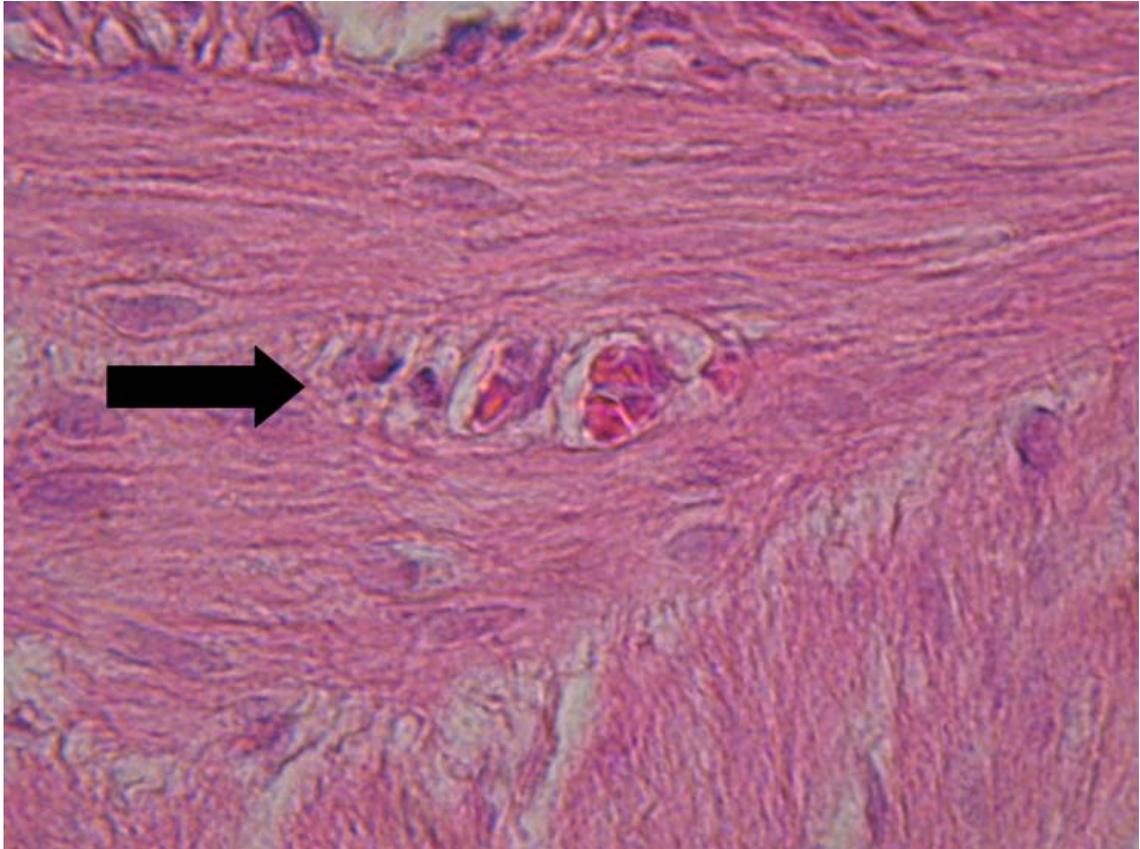


Figura 14. Plexo mientérico de ileon de rata desnervado con cloruro de benzalconio, teñido con hematoxilina y eosina, visto a 4000x (400x con microscopio óptico + 10 aumentos al fotografiar). Flecha gruesa: necrosis de células ganglionares, nótese ausencia de nucleolos definidos y la contracción del citoplasma

En el grupo DEN, después de la instrumentación como en el grupo sham la ATIII en suero, se encontró en 84.8 ± 34.74 ng/mL; los niveles séricos de p-Selectina soluble en 0.28 ± 0.16 ng/mL y el nivel sérico de ICAM-1 soluble en 676.8 ± 188.36 pg/mL

Comparando los resultados del grupo DEN con el grupo Sham, no se documentan diferencias significativas en el puntaje de lesión, en los niveles de ATIII y p-Selectina. Sin embargo el nivel de ICAM-1 se encontró elevado en comparación con el grupo Sham (Figura 15)

En resumen, la destrucción de los plexos entéricos con BAC no provocó lesión de la mucosa, los niveles séricos de ATIII ni de p-Selectina se observaron normales, y encontramos elevación del ICAM-1.

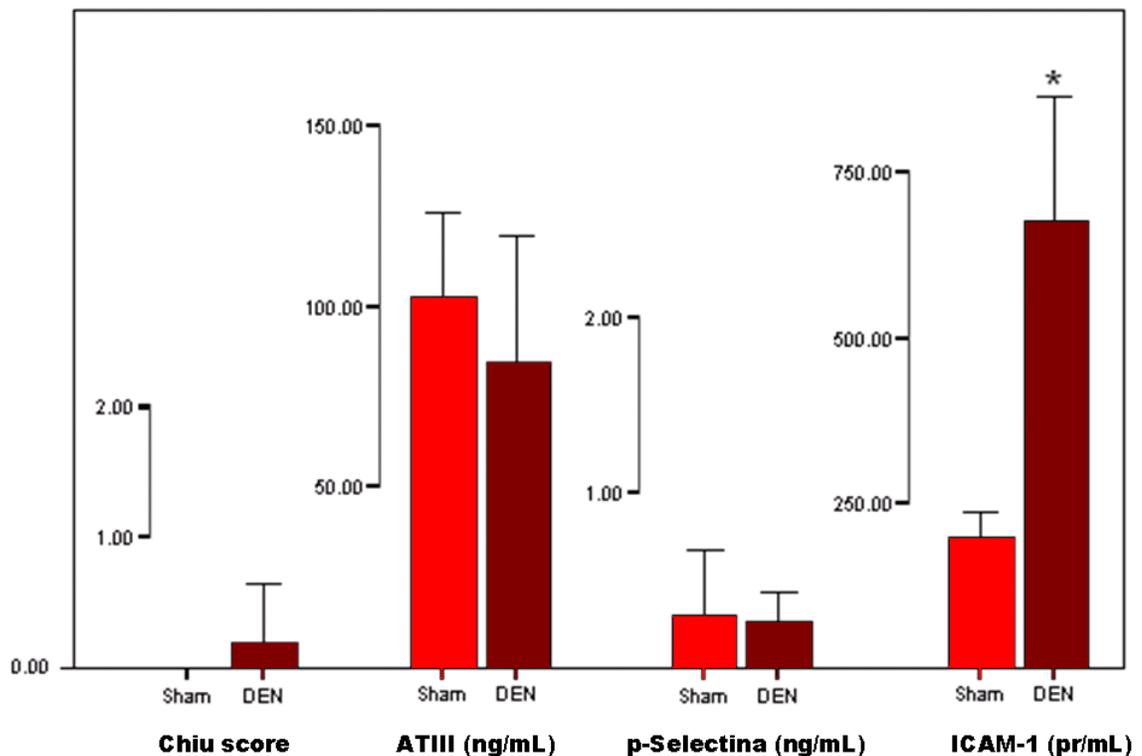


Figura 15. Efecto de la destrucción de los plexos nerviosos del intestino con cloruro de benzalconio sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de Antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1, * = $p < 0.05$.

3.4 Efecto del bloqueo de los receptores NMDA durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal

El bloqueo de los receptores NMDA sistémicos con la administración de ketamina intraperitoneal antes de la agresión con IR disminuyó el daño a la mucosa intestinal. El mayor grado de protección se observó con las dosis más altas de ketamina. No existió diferencia significativa entre los animales que recibieron 100 mg/kg de ketamina como único anestésico y los que recibieron 50 mg/kg de pentobarbital + 50 mg/kg de ketamina. Conforme disminuyó la dosis de ketamina, aumentó el puntaje de la lesión mucosa con la escala de Chiu⁵¹ (Figura 16).

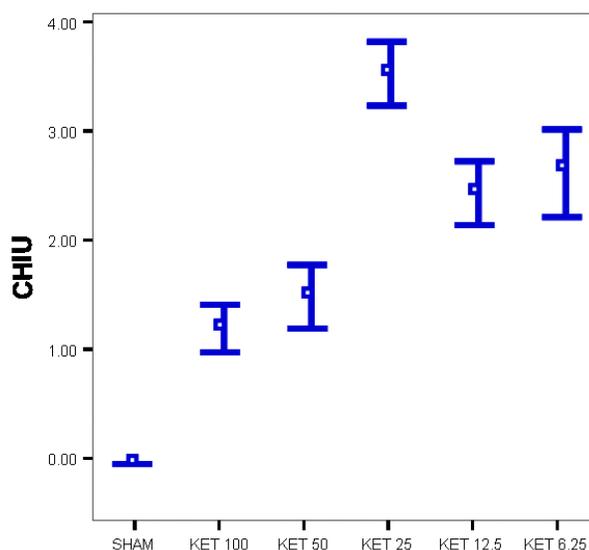


Figura 16. Lesión de la mucosa intestinal después de IR. Efecto de la administración sistémica de ketamina. SHAM: pentobarbital 50 mg/kg/do sin IR; KET 100: Ketamina 100 mg/kg/do; KET 50: pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 50 mg/kg/do; KET 25: pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 25 mg/kg/do; KET 12.5: pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 12.5 mg/kg/do; KET 6.25: pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 6.25 mg/kg/do.

Se seleccionó el grupo KET 50 (pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 50 mg/kg/do) para compararlo con los grupos SHAM e IR. El tratamiento con ketamina a 50 mg/kg/do antes de la agresión por IR protegió a la mucosa intestinal de manera significativa (Figura 17) de la lesión (Chiu: 1.4 ± 0.55 , $p=0.01$).

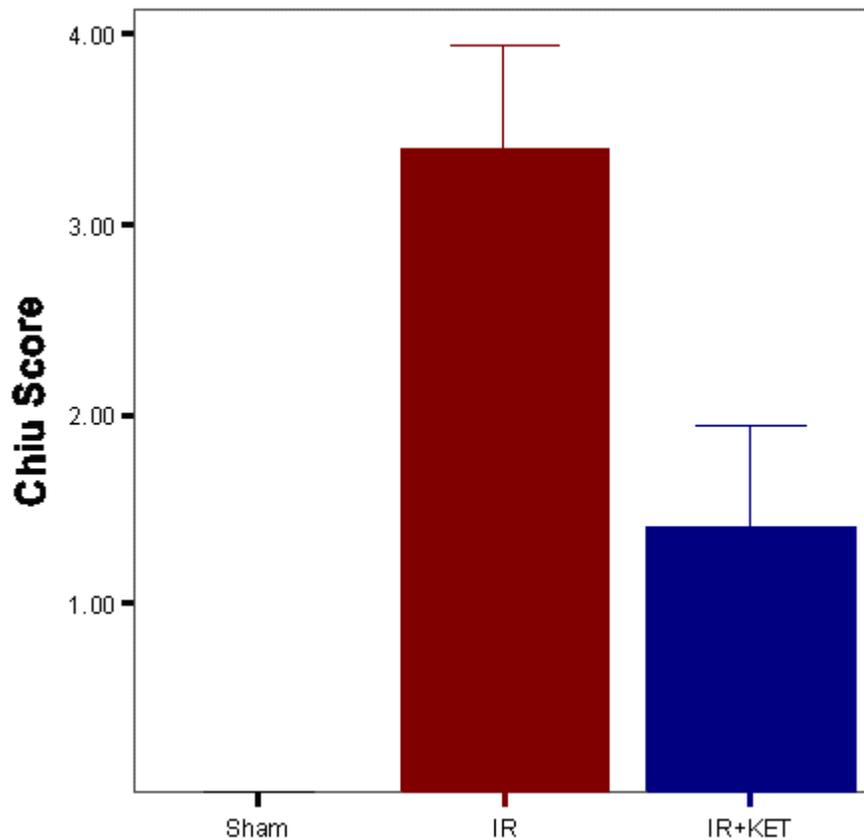


Figura 17. Efecto protector del bloqueo NMDA sistémico con ketamina sobre la lesión de la mucosa intestinal sometida a una agresión por isquemia reperfusion. ($p=0.01$, IR vs IR+KET). SHAM: pentobarbital 50 mg/kg/do sin IR; IR+KET: pentobarbital 50 mg/kg/do + ketamina 50 mg/kg/do con 30 min. de isquemia y 60 min. de reperfusion; IR: pentobarbital 50 mg/kg/do con 30 min. de isquemia y 60 min. de reperfusion.

El bloqueo sistémico de los receptores NMDA con ketamina antes de la IR intestinal, mantuvo la concentración sérica de ATIII (evitando su consumo) por arriba del nivel observado en los animales sometidos a IR y evitó el incremento significativo de p-Selectina (0.34 ± 0.19 ng/mL); no se identificaron diferencias en los niveles de ICAM-1 (Figura 18).

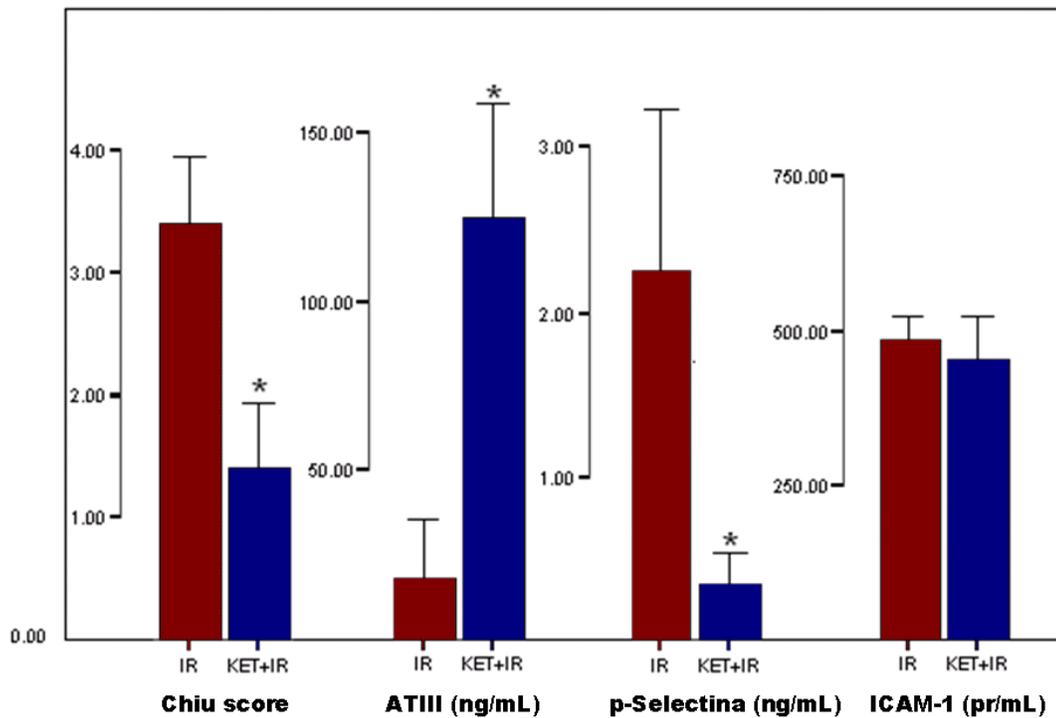


Figura 18. Efecto de la administración de ketamina sistémica antes de un periodo de 30 min de isquemia y 60 de reperfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de Antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM. IR+KET: tratado con ketamina 50 mg/kg/do sometido isquemia-reperfusión; IR: sometido a isquemia-reperfusión. * = $p < 0.05$

3.5 Efecto de la ausencia de sistema nervioso entérico durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal

Los animales del grupo DEN+IR, fueron sometidos al protocolo de denervación con BAC 14 días antes de ligar la arteria mesentérica y la vena porta para provocar isquemia y posterior reperfusión. En este grupo, el puntaje de lesión en la escala de Chiu alcanzó 3 ± 1 , no difiere significativamente del grupo IR, tampoco los niveles de ATIII (40.7 ± 26.57 ng/mL), p-Selectina (1.24 ± 0.61 ng/mL) e ICAM-1.

En resumen, el resultado de desnervar el intestino antes de someterlo a una agresión por IR permite una lesión de la mucosa y la alteración de los marcadores séricos, indistinguible de las provocadas por la IR solamente (Figura 19).

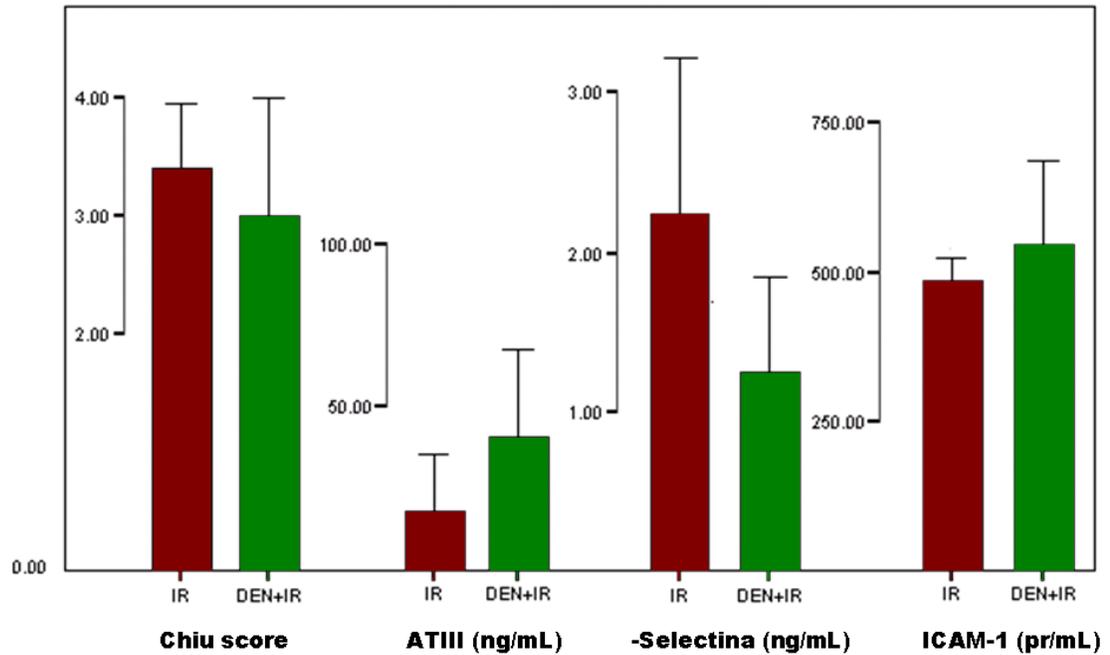


Figura 19. Efecto de la desnervación del intestino 14 días antes de un evento de isquemia-reperfusión intestinal sobre la histología de la mucosa intestinal y los niveles séricos de Antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1. DEN+IR: desnervado, sometido a 30 min de isquemia y 60 min. de reperfusión; IR: sometido a 30 min. de isquemia y 60 min. de reperfusión

3.6 Efecto del bloqueo NMDA sistémico y la ausencia del sistema nervioso entérico durante la lesión aguda por isquemia-reperfusión intestinal

La aplicación de BAC en la serosa del intestino provocó destrucción del sistema nervioso entérico y eliminó el efecto protector del bloqueo NMDA sistémico con ketamina observado en los experimentos previos.

A cinco ratas (grupo DEN+KET+IR) se les desnervó el intestino con aplicación de BAC en la serosa 14 días antes de administrar ketamina y de interrumpir la irrigación arterial y venosa.

En el grupo DEN+KET+IR el puntaje de lesión mucosa (Chiu) fue de 2.6 ± 0.55 , semejante al del grupo DEN+IR el cual no recibió ketamina antes de la IR. La concentración de ATIII de 34.45 ± 26.9 ng/mL y la de ICAM-1 también fueron semejantes en ambos grupos. El nivel sérico de p-Selectina de 0.57 ± 0.262 ng/mL, mostró una tendencia a ser menor que el del grupo sin ketamina ($p=0.054$) (Figura 20).

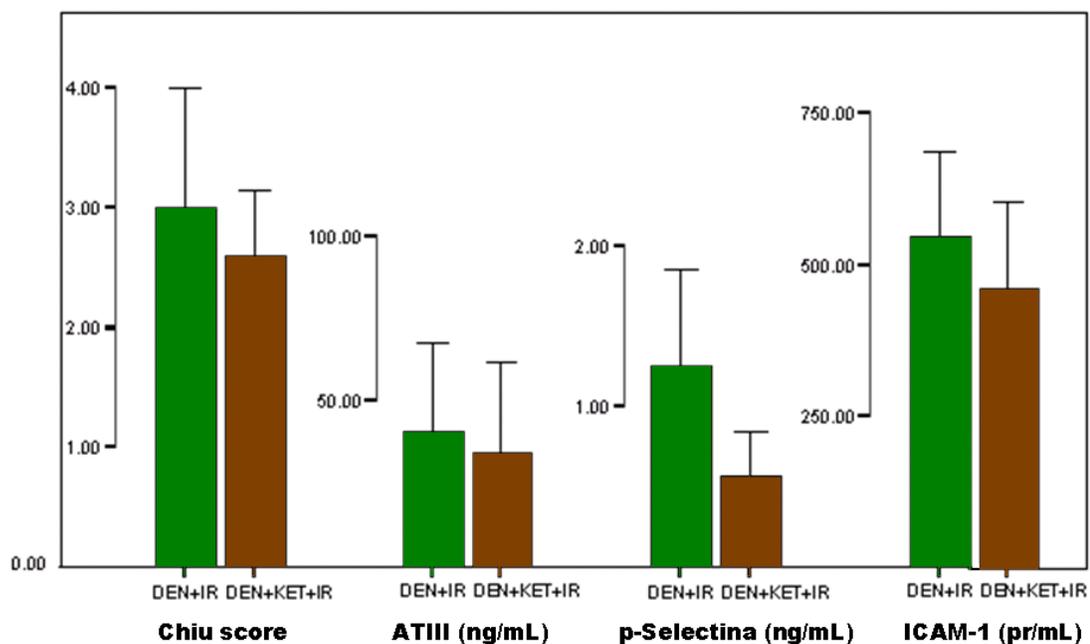


Figura 20. Efecto sobre la histología del epitelio mucoso intestinal y los niveles séricos de Antitrombina III (ATIII), p-Selectina e ICAM-1; de la isquemia-reperfusión intestinal en animales sin sistema nervioso entérico (DEN+IR); comparación con animales desnervados a los que se administró un antagonista NMDA (DEN+KET+IR) antes de la interrupción del flujo sanguíneo.

CAPITULO 4

DISCUSION

La distribución de la microvasculatura en la pared del intestino con circuitos en paralelo, permite la irrigación de la capa muscular y la mucosa. En condiciones de estrés, se deriva la irrigación de la muscular hacia la mucosa y en ésta se modifica por separado la destinada a las criptas o la de las vellosidades.⁵²

Entre los mecanismos de control de la homeostasis intestinal, el SNE junto con el sistema endocrino, participan en la regulación del flujo sanguíneo local,^{40,53,54} de la secreción, la absorción y la motilidad.^{55,56}

Algunas neuronas entéricas utilizan como neurotransmisor el glutamato.⁵⁷ Durante una agresión por hipoxia, la falla del transporte activo primario ocasiona despolarización e incremento de las concentraciones de Ca^{2+} , así como el aumento de la liberación de glutamato.⁵⁸ Al igual que en el SNC en el SNE el aumento de la liberación de glutamato y en particular su acción sobre los receptores NMDA, incrementa aún más la cantidad de Ca^{2+} intracelular, resultando en excitotoxicidad mediada por glutamato³⁹ y muerte neuronal.

Un periodo de IR, como las situaciones que siguen a un trasplante intestinal, en realidad corresponden a una doble agresión sobre el injerto. La primera es la isquemia que ocasiona hipoxia, ésta y los mecanismos celulares

desencadenados por ella favorecen el daño celular durante la segunda agresión: la reoxigenación. Todas las células de la pared intestinal sufren la lesión por estos mecanismos: la mucosa, la muscular y el SNE.⁵⁹

Durante la reperfusión se incrementa la expresión de la sintasa de óxido nítrico. Los altos niveles de óxido nítrico alteran el tono vascular^{60,61} afectando el flujo y provocando vasoconstricción progresiva⁶² y mayor hipoxia. Por lo que durante, la reperfusión, la regulación y moderación de aporte sanguíneo es fundamental para evitar el daño celular.

Con la IR también se lesionan las neuronas entéricas, su daño altera el control reflejo del tono vascular.⁶³ También en los procesos que cursan con inflamación intestinal, estas células pueden liberar citocinas^{64,65} como la IL-1 β e IL-8, contribuyendo al proceso inflamatorio.

El exceso de glutamato secundario a la IR favorece la activación del receptor NMDA, el cual es capaz de inducir expresión de IL-1 β en células nerviosas⁶⁶ y modular el daño a las células nerviosas *in vitro*.⁶⁷

Con anterioridad hemos documentado que en el intestino el bloqueo de los receptores NMDA para el glutamato con el tratamiento con ketamina, suministrado antes del evento de IR, es capaz de reducir el daño a la mucosa intestinal de manera significativa y también de evitar el deterioro de la función motora.⁴⁶ Se conoce que la administración de glutamato induce una respuesta inflamatoria en el intestino y favorece la transcripción de factores proinflamatorios como el FNT- α .⁶⁸ En este estudio descubrimos que el efecto protector de la ketamina es dosis-dependiente.

Es importante tomar en cuenta que el SNE puede interactuar con el sistema inmune del intestino, modificando la permeabilidad del epitelio e incluso la respuesta inflamatoria.⁶⁹

En este estudio identificamos la disminución del consumo de ATIII y el incremento de p-Selectina en los animales que recibieron ketamina antes del episodio de IR.

La IR intestinal genera un estado procoagulante,⁷⁰ en algunos estudios, cuando se administra ATIII exógena se observa disminución del daño.^{71,72} La ATIII se produce en el endotelio y principalmente en el hígado, pero se consume a nivel endotelial al unirse a la heparina e inhibir prácticamente todos los factores de coagulación.^{47,70} El menor consumo de ATIII indica disminución de los procesos procoagulantes.

En el endotelio y en las plaquetas, la p-Selectina se expresa como parte de la activación endotelial. El bloqueo de la p-Selectina también ha mostrado proteger a la mucosa intestinal del daño secundario a IR y concentraciones elevadas de p-Selectina aparecen después de la IR.^{73, 74} La disminución de los niveles de p-Selectina nos indican menor adhesividad endotelial y plaquetaria y por consecuencia disminución de los procesos procoagulantes.

La ausencia de modificación del ICAM-1, se puede explicar por que su expresión se ha reportado más lenta, incluso tarda horas⁴⁸.

En otro contexto, los animales tratados con BAC, mostraron los cambios reportados en la literatura cuando se ocasiona la denervación de los plexos entéricos⁷⁵⁻⁷⁸ : ensanchamiento de las vellosidades, adelgazamiento de la capa muscular, e incluso infiltración por mononucleares.⁷⁷ Sin embargo, al comparar los animales desnervados con los controles, no se diferenciaron en cuanto al índice de lesión mucosa de Chiu. Tampoco se identificaron diferencias significativas en las concentraciones de ATIII y p-Selectina con respecto a animales normales.

En los animales desnervados, la elevación de la concentración de ICAM-1 y la infiltración con mononucleares se interpreta, como evidencia de un proceso inflamatorio crónico desencadenado por la denervación catorce días antes de la medición.

Así, la ausencia de SNE no genera un estado pro-coagulante ni un proceso inflamatorio agudo persistente. Tampoco ocasiona lesión epitelial.

Cuando los animales sin SNE son sometidos al protocolo de IR, identificamos lesión mucosa y niveles séricos de ATIII, p-Selectina e ICAM-1 semejantes a los de animales a los que no se desnervó y se les sometió a IR. Es decir los intestinos desnervados y con SNE se comportan igual ante la agresión por hipoxia-reoxigenación.

Nuestros resultados sugieren que la integridad del SNE no es esencial para que se genere el daño a la mucosa o las modificaciones a los niveles séricos de ATIII, p-Selectina o ICAM que siguen a la IR. Sin embargo aún no podemos confirmar que el SNE en general o el plexo mientérico o el submucoso en particular no tengan un papel patogénico en las múltiples alteraciones inducidas por la IR en el intestino.

En contraste con el efecto de la premedicación con ketamina en ratas con SNE intacto, los animales desnervados tratados también con ketamina y sometidos a IR mostraron un severo daño en la histología de la mucosa, depleción de ATIII e incremento de la p-Selectina.

Estos resultados sugieren que al evitar la destrucción del SNE, se conservan la regulación del flujo sanguíneo y del proceso inflamatorio durante la reperfusión, disminuyendo así la lesión provocada por la reoxigenación e hiperflujo.

La conservación de la integridad de la mucosa gastrointestinal depende del establecimiento rápido de mecanismos protectores. Las neuronas sensoriales, en respuesta a insultos sobre el intestino detonan reflejos autónomos que comprenden modificaciones en el flujo gastrointestinal, la secreción y la motilidad así como modificaciones de la función inmune.⁷⁹ Se explica así, el por que la respuesta del endotelio difiere ante la agresión por IR si se protege o no la integridad del SNE.

Esto se traduce en que la destrucción del SNE con BAC evita que el tratamiento con ketamina proteja a las neuronas encargadas de controlar las respuestas reflejas que a su vez protegen al intestino de las lesiones secundarias a IR.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Con los resultados de los experimentos desarrollados se rechaza la hipótesis nula y acepta que el SNE participa en la activación del endotelio intestinal durante la isquemia intestinal transitoria. Se concluye que:

A. La IR intestinal (30-60 min):

- Provoca lesión en la mucosa intestinal.
- Aumenta la concentración sérica de p-Selectina e ICAM-1
- Incrementa el consumo de ATIII

B. La denervación intestinal:

- No afecta significativamente la morfología de la mucosa intestinal.
- No evita el daño a la mucosa intestinal por IR
- No evita el incremento de p-Selectina ni el consumo de ATIII por IR.

C. El tratamiento con Ketamina antes del evento de IR:

- Protege la mucosa intestinal
- Evita el incremento de p-Selectina
- Evita el consumo de ATIII
- El efecto sobre la mucosa intestinal es dependiente de la dosis.

D. El tratamiento con ketamina (50 mg/kg/dosis) en ratas desnervadas antes de un evento de IR:

- Anula los efectos protectores de la ketamina sobre la mucosa intestinal y las concentraciones de p-Selectina y ATIII.

E. El efecto protector del bloqueo NMDA con ketamina, requiere la integridad del SNE.

Durante el evento de IR es muy probable que el proceso de excitotoxicidad se presente, la evidencia documentada sugiere, a través de la activación de receptores NMDA

La protección del SNE con bloqueadores del receptor NMDA protege al intestino durante la agresión de IR, evita la activación del endotelio, en particular disminuye el consumo de ATIII y la elevación de p-Selectina.

PERSPECTIVAS

El conocimiento que poseemos actualmente sobre la fisiopatología de la IR y sus lesiones asociadas, presenta muchas lagunas. La información derivada de esta tesis, podrá ser complementada estudiando entre otros rubros:

- a) La respuesta al tratamiento con ketamina de la oclusión arterial vs la oclusión venosa.
- b) La influencia del tiempo de isquemia sobre el efecto protector de la ketamina.
- c) La influencia del tiempo de reperfusión sobre el efecto protector de la ketamina.
- d) La identificación del tipo de neuronas entéricas que sobreviven con el tratamiento con ketamina.
- e) La sinergia de otros mecanismos de protección como el pre-acondicionamiento isquémico, los inhibidores de xantina-oxidasa o anticoagulantes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acosta-Merida MA, Marchena-Gomez J, Cruz-Benavides F, Hernandez-Navarro J, Roque-Castellano C, Rodriguez-Mendez A, et al. Predictive factors of massive intestinal necrosis in acute mesenteric ischemia. *Cir Esp*. 2007 Mar;81(3):144-9.
- 2.- Schutz A, Eichinger W, Breuer M, Gansera B, Kemkes BM. Acute mesenteric ischemia after open heart surgery. *Angiology*. 1998 Apr;49(4):267-73.
- 3.- Venkateswaran RV, Charman SC, Goddard M, Large SR. Lethal mesenteric ischaemia after cardiopulmonary bypass: A common complication? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002 Oct;22(4):534-8.
- 4.- Gibbs K, Lin J, Holzman IR. Necrotising enterocolitis: The state of the science. *Indian J Pediatr*. 2007 Jan;74(1):67-72.
- 5.- Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Feb;196(2):147.
- 6.- Pokorny WJ, Garcia-Prats JA, Barry YN. Necrotizing enterocolitis: Incidence, operative care, and outcome. *J Pediatr Surg*. 1986 Dec;21(12):1149-54.
- 7.- Ugalde JH, Covarrubias S. Morbimortalidad neonatal por enterocolitis necrosante. estudio de 3 años en un Hospital Regional. Monterrey, N.L. México. 2007 Memorias XIV Congreso Nacional de Neonatología, Monterrey, N.L. Report No: 109.
- 8.- Kirkman RL. Small bowel transplantation. *Transplantation*. 1984 May;37(5):429-33.

- 9.- Starzl TE, Rowe MI, Todo S, Jaffe R, Tzakis A, Hoffman AL, et al. Transplantation of multiple abdominal viscera. JAMA. 1989 Mar 10;261(10):1449-57.
- 10.- Grant D, Wall W, Zhong R, Mimeault R, Sutherland F, Ghent C, et al. Experimental clinical intestinal transplantation: Initial experience of a canadian centre. Transplant Proc. 1990 Dec;22(6):2497-8.
- 11.- Grant D, Wall W, Mimeault R, Zhong R, Ghent C, Garcia B, et al. Successful small-bowel/liver transplantation. Lancet. 1990 Jan 27;335(8683):181-4.
- 12.- Registro internacional de trasplantes de intestino 2003 [consultado Marzo 2007]. Disponible en: <http://www.intestinaltransplant.org/>
- 13.- Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med. 1993 Sep;21(9):1376-86.
- 14.- Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. Acta Cir Bras. 2005 Jul-Aug;20(4):336-43.
- 15.- Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. Shock. 1994 Feb;1(2):141-5.
- 16.- Rocourt DV, Mehta VB, Wu D, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases neutrophil-endothelial cell interactions. J Surg Res. 2007 Aug;141(2):262-6.
- 17.- El-Assal ON, Radulescu A, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor preserves mesenteric microcirculatory blood flow and protects against intestinal injury in rats subjected to hemorrhagic shock and resuscitation. Surgery. 2007 Aug;142(2):234-42.

- 18.- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G15-26.
- 19.- Ramirez P, Marín JM, Piñero A, Chávez-Cartaya R, Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: Isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp.* 2000;67(3):281-91.
- 20.- Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: Role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology.* 2002;36(3):562-72.
- 21.- Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: A review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg.* 2003;20:383-96.
- 22.- Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 1993 Oct;218(4):444,53; discussion 453-4.
- 23.- Regueiro JR, López C. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmune.* Madrid: Médica Panamericana; 2002.
- 24.- Chuanyu, Li; Jackson, RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002, 282: C227-C241
- 25.- Fiocchi C. Intestinal inflammation: A complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol.* 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36) 1997, G769-G775
- 26.- Collins SM. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: Implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology.* 1996 Dec;111(6):1683-99.

- 27.- Collins SM, Hurst SM, Main C, Stanley E, Khan I, Blennerhassett P, et al. Effect of inflammation of enteric nerves. cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;664:415-24
- 28.- Khan WI, Collins SM. Gut motor function: Immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2006 Mar;143(3):389-97.
- 29.- Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Apr;16 Suppl 1:133-6.
- 30.- Sharkey KA, Kroese AB. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: Neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec.* 2001 Jan 1;262(1):79-90.
- 31.- Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 2009 Aug;118(2):261-70
- 32.- Gershon, M.D. The enteric nervous system: A second brain. *Hosp Pract.* 1999 Jul 15; 34 (7): 31-42
- 33.- Berardi C, Camarero M. Tubo digestivo. Motilidad En: Best & Taylor, Bases Fisiológicas de la Practica Médica. Editores: Dvorkin M, Cardinali DP. 13ª Ed Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003. Cap 31 p 509-522
- 34.- Sternini, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Annu Rev Physiol.* 1998;50:81-93
- 35.- Yeyunoileon En: Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía Humana. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1983. p. 1607-1621

- 36.- Gallavan RH,Jr, Chou CC. Possible mechanisms for the initiation and maintenance of postprandial intestinal hyperemia. Am J Physiol. 1985 Sep;249(3 Pt 1):G301-8.
- 37.-Vanner S, Surprenant A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. Am J Physiol. 1996 Aug;271(2 Pt 1):G223-30.
- 38.- Brunsten AM, Jacob S, Bardhan KD, Grundy D. Mesenteric afferent nerves are sensitive to vascular perfusion in a novel preparation of rat ileum *in vitro*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Sep;283(3):G656-65.
- 39.- Kirchgessner AL, Liu MT, Alcantara F. Excitotoxicity in the enteric nervous system. J Neurosci.1997; 17: (22) 8804-8816.
- 40.- Tong Q, Kirchgessner AL. Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Nov;285(5):G992-G1003.
- 41.- Chen PE, Wyllie DJ. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. Br J Pharmacol. 2006 Apr;147(8):839-53.
- 42.- Transmisión sináptica y de unión En: Ganong WF, editor. Fisiología Médica, 20° ed. México: El Manual Moderno; 2006. p. 79-110.
- 43.- McFeeters RL, Oswald RE. Emerging structural explanations of ionotropic glutamate receptor function. FASEB J. 2004 Mar;18(3):428-38.
- 44.- Arcusa MJ. Estudio de toxicidad aguda S(+)-ketamina y Rs-ketamina administrada por vía subaracnoidea en conejos. Comparación con lidocaína. Tesis doctoral, Valencia: Universidad de Valencia; 2005

- 45.- Williams ML, Mager DE, Parenteau H, Gudi G, Tracy TS, Mulheran M, Wainer IW. Effects of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004;32(8):786-793
- 46.- Cámara CR, Guzmán FJ, Barrera EA, Cabello AJ, Garcia A, Fernández NE, Caballero E, Ancer J. Ketamine anesthesia reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Sep 7;14(33):5192-6.
- 47.- Badimon L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: Nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:17-26.
- 48.- Parslow TG. *Inmunología básica y clínica*. 10th ed. México: Manual Moderno; 2002.
- 49.- Tomicic V, Guerrero J. Endotelio y sepsis. *Med Intensiva*. 2005;29(3):142-50.
- 50.- Grabowski EF, Lam FP. Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions. *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):123-8.
- 51.- Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970 Oct;101(4):478-83.
- 52.- Narváez-Sánchez R, Chuairé L, Sánchez MG, Bonilla J. Circulación intestinal: Su organización, control y papel en el paciente crítico. *Colomb Med* 2004; 35: 231-224
- 53.-Vanner S. Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(2):G380-7.
- 54.- Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*. 2004 Feb;72(2):143-64

- 55.- Holzer P, Schicho R, Holzer-Petsche U, Lippe IT. The gut as a neurological organ. *Wien Klin Wochenschr.* 2001 Sep 17;113(17-18):647-60.
- 56.- Finke U, Seifert J. Differential effects of gastrointestinal hormones on the blood flow of the alimentary tract of the dog. *Res Exp Med (Berl).* 1986;186(2):151-65
- 57.- Milusheva EA, Kuneva VI, Itzev DE, Kortežova NI, Sperlagh B, Mizhorkova ZN. Glutamate stimulation of acetylcholine release from myenteric plexus is mediated by endogenous nitric oxide. *Brain Res Bull.* 2005 Aug 15;66(3):229-34.
- 58.- Giuliani D, Giaroni C, Zanetti E, Canciani L, Borroni P, Lecchini S, Frigo G. Involvement of glutamate receptors of the NMDA type in the modulation of acetylcholine and glutamate overflow from the guinea pig ileum during *in vitro* hypoxia and hypoglycaemia. *Neurochem Int.* 2006 Feb;48(3):191-200
- 59.- Lindeström LM, Ekblad E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci.* 2004 Aug;49(7-8):1212-22
- 60.- Durakbasa CU, Dagli TE, Mouni H, Haklar G, Bilsel AS, Yuksel M, Aktan AO. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998 Dec;59(6):379-83
- 61.- Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Hamada Y, Hioki K, Taniyama K. Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Oct;287(1):403-7.
- 62.- Fruchterman TM, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Selective microvascular endothelial cell dysfunction in the small intestine following resuscitated hemorrhagic shock. *Shock.* 1998 Dec;10(6):417-22.

- 63.- Reed DE, Vanner SJ. Long vasodilator reflexes projecting through the myenteric plexus in guinea-pig ileum. *J Physiol*. 2003 Dec 15;553(Pt 3):911-24
- 64.- Tixier E, Galmiche JP, Neunlist M. Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal chemokines production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 2;344(2):554-61.
- 65.- Tixier E, Lalanne F, Just I, Galmiche JP, Neunlist M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell Microbiol*. 2005 Dec;7(12):1798-810.
- 66.- Kitaoka Y, Munemasa Y, Nakazawa T, Ueno S. NMDA-induced interleukin-1beta expression is mediated by nuclear factor-kappa B p65 in the retina. *Brain Res*. 2007 Apr 20;1142:247-55.
- 67.- Radesäter AC, Johansson S, Oberg C, Luthman J. The vitamin-E analog trolox and the NMDA antagonist MK-801 protect pyramidal neurons in hippocampal slice cultures from IL-1beta-induced neurodegeneration. *Neurotox Res*. 2003;5(6):433-42.
- 68.- Xu L, Sun J, Lu R, Ji Q, Xu JG. Effect of glutamate on inflammatory responses of intestine and brain after focal cerebral ischemia. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 7;11(5):733-6.
- 69.- Ben-Horin S, Chowers Y. Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology, and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Aug;8(4):490-5.
- 70.- Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Declerck PJ, Maas AM, van Gulik TM. Enhancement of endogenous fibrinolysis does not reduce local fibrin deposition, but modulates inflammation upon intestinal ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2004 Mar;91(3):497-505

- 71.- Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Maas AM, Roossink EH, van Gulik TM. Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med.* 2004 Jun;32(6):1375-83.
- 72.- Ozden A, Tetik C, Bilgihan A, Calli N, Bostanci B, Yis O, Düzcan E. Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med (Berl).* 1999 Mar;198(5):237-46.
- 73.- Hayward R, Lefer AM. Acute mesenteric ischemia and reperfusion: protective effects of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Shock.* 1999 Sep;12(3):201-7.
- 74.- Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6 Pt 2):H2476-81.
- 75.- Buttow NC, Santin M, Macedo LC, Neres Teixeira AC, Novakowski GC, Bolonheis Armelin TR, Assmann K. Study of the myenteric and submucous plexuses after BAC treatment in the intestine of rats. *Biocell.* 2004 Aug;28(2):135-42.
- 76.- Deniz M, Kiliç M, Hatipoğlu ES. Morphological alterations in small intestine of rats with myenteric plexus denervation. *Eur Surg Res.* 2004 May-Jun;36(3):152-8.
- 77.- Hadzijahic N, Renehan WE, Ma CK, Zhang X, Fogel R. Myenteric plexus destruction alters morphology of rat intestine. *Gastroenterology.* 1993 Oct;105(4):1017-28.
- 78.- Sencan A, Mir E, Karaca I, Akçora B, Sencan A, Ozer E. Effects of intrinsic denervation on intestinal morphology in rats with short-bowel syndrome. *Pediatr Surg Int.* 2000;16(8):554-8.

79.- Holzer P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Dec;7(6):563-9. Epub 2007 Oct 2993

APENDICES

APENDICE A

TECNICAS DE CUANTIFICACION DE CITOCINAS

APENDICE A

TECNICAS DE CUANTIFICACION DE CITOCINAS

Técnica de cuantificación de ICAM en suero de rata.

Se separó el suero de la sangre colectada durante las diferentes fases del estudio y se congeló a - 70°C, 12 hrs antes del ensayo se colocaron a - 20 °C y posteriormente a temperatura ambiente.

Para cuantificar la fracción soluble de la Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM), se utilizó una prueba de ELISA tipo sándwich de fase sólida (Quantikine rat Sicam-1 R&D Systems, Inc.), específica para la cuantificación de ICAM-1 en suero de rata. El ensayo utilizó un anticuerpo monoclonal específico para la fracción soluble de ICAM-1 (sICAM-1) de rata, fijado en pocillos de una microplaca. Los estándares, los controles y las muestras fueron agregados a los pocillos y el sICAM presente se unió al anticuerpo del pocillo, después de lavar y descartar otras sustancias se agregó un anticuerpo policlonal específico para el sICAM-1 de rata y unido a una enzima. Después de lavar y remover los reactivos no unidos a la placa, se agregó la solución sustrato y la reacción enzimática generó un tinte azul que cambia a amarillo cuando se agrega solución “stop” . La medición de la intensidad del el color fue proporcional a la cantidad de sICAM-1 de rata unido en el paso inicial. Los valores se obtienen de interpolar la absorbancia en una curva de estándares. El kit tiene un rango de detección de 1.2-4.1 pg/mL

Componentes del Kit

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.- Microplaca para sICAM de Rata | Microplaca de poliestireno de 96 hoyos con anticuerpo específico para sICAM de rata. |
| 2.- Conjugado de sICAM de rata. | Conteniendo anticuerpo policlonal específico para Sicam de rata marcado con peroxidasa. |
| 3.- Diluyente para el conjugado. | |
| 4.- Estándar de sICAM de rata. | |
| 5.- Control de sICAM de rata. | |
| 6.- Diluyente para el ensayo. | |
| 7.- Diluyente calibrador. | |
| 9.- Amortiguador para lavado. | |
| 10.- Reactivo para teñir A. | Peroxido de hidrógeno. |
| 11.- Reactivo para teñir B | Cromógeno (tetrametilbenzidina) |
| 12.- Solución "stop" | Solución de ácido hidroclicóricó. |
| 13.- Cubre placas. | |

Procedimiento

Las muestras de sangre se dejan coagular a temperatura ambiente por 2 horas. Se centrifugaron a 1000 x g por 30 minutos y separar el suero para congelarlo a temperatura menor de 20 grados centígrados. Las muestras se diluyeron 50 veces antes de utilizarse.

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente antes de ser utilizados:

1.- Preparación del control de sICAM de rata:

Se reconstituyó con agua destilada.

2.- Preparación del conjugado de sICAM:

El conjugado de sICAM de rata se agregó al diluyente del conjugado y se protegió de la luz.

3.- Preparación del amortiguador para lavado:

Se preparó agregando a los 25 mL del concentrado, 600 mL de agua destilada para obtener 625 mL de Amortiguador para Lavado.

4.- Preparación del Diluyente Calibrador:

Se diluyó el concentrado con 60 mL de agua destilada para preparar 80 mL de Diluyente Calibrador.

5.- Preparación de la Solución Sustrato:

Los reactivos para teñir A y B se mezclaron 1:1 15 minutos antes de utilizarlos. Se protegieron de la luz

6.- Preparación del Estándar de sICAM de rata:

Se reconstituyó con 0.5 mL del Diluyente Calibrador.

7.- Dilución del estándar:

Se prepararon 8 tubos; 6 con 200 μ L de Diluyente Calibrador cada uno y dos más.

Para diluir el estándar se agregaron al primer tubo 200 μ L del estándar de sICAM y se mezcló gentilmente. Luego se tomaron 200 μ L del tubo 1 y se mezcló en el tubo 2 y así sucesivamente. En un tubo más, el estándar sin diluir

servió como la concentración más alta y en otro tubo el diluyente calibrador como el estándar 0 pg/mL

Se especifico la siguiente concentración de cada tubo

Tubo-1	1000 pg/mL
Tubo-2	500 pg/mL
Tubo-3	250 pg/mL
Tubo-4	125 pg/mL
Tubo-5	62.5 pg/mL
Tubo-6	31.2 pg/mL
Tubo-7	2000 pg/mL
Tubo-8	0 pg/mL

La curva de calibración (estándares) se prepararon simultáneamente con los sueros problema de acuerdo al siguiente esquema:

<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 50 μL del diluyente para el ensayo
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 50 μL de Estándar, control, o muestra según sea el caso
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre y se dejó incubar por 2 hrs. a temperatura Ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Lavado por 5 veces
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 μL de sICAM de rata
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre y se dejó incubar por 2 hrs. a temperatura Ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Lavado por 5 veces
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 μL de solución sustrato
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre, protege de la luz y se dejó incubar por 30 min. a temperatura ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 μL de Solución Stop
<ul style="list-style-type: none">• Se leyeron a a 450 nm durante los siguientes 30 minutos de la aplicación de la "Solución Stop"

Técnica de cuantificación de p-Selectina en suero de rata.

Se separó el suero de la sangre colectada durante las diferentes fases del estudio y se congeló a - 70°C, 12 hrs antes del ensayo se colocaron a - 20 °C y posteriormente a temperatura ambiente.

Para cuantificar la fracción soluble de la molécula de adhesión leucocitaria P-selectina (sP-Selectina), conocida también como: CD62P, GMP-140 y/o LECAM-3, se utilizó una prueba de ELISA tipo sándwich de fase sólida (Quantikine mouse sP-Selectin R&D Systems, Inc.), específica para la cuantificación de sP-Selectina de ratón y/o de rata. El ensayo utilizó un anticuerpo monoclonal específico para la fracción soluble de p-Selectina de ratón y/o de rata fijado en pocillos de una microplaca. Los estándares, los controles y las muestras fueron agregados a los pocillos y la sP-Selectina presente se unió al anticuerpo del pocillo, después de lavar y descartar otras sustancias se agregó un anticuerpo policlonal específico para la sP-Selectina unido a una enzima. Después de lavar y remover los reactivos no unidos a la placa, se agregó la solución sustrato y la reacción enzimática generó un tinte azul que cambió a amarillo cuando se agregó la solución “stop”. La medición de la intensidad del el color es proporcional a la cantidad de sP-Selectina de rata unida en el paso inicial. Los valores se obtuvieron de interpolar la absorbancia en una curva de estándares. El kit tiene un rango de detección de 0.007-0.018 ng/mL

Componentes del Kit

- | | |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.- Microplaca para sP-Selectina de ratón | Microplaca de poliestireno de 96 hoyos con anticuerpo específico para sP-Selectina de ratón. |
| 2.- Conjugado de sP-Selectina de ratón | Conteniendo anticuerpo policlonal específico para sP-Selectina de ratón y/o de rata marcado con peroxidasa. |
| 3.- Diluyente para el conjugado. | |
| 4.- Estándar de sP-Selectina de ratón. | |
| 5.- Control de sP-Selectina de ratón. | |
| 6.- Diluyente para el ensayo. | |
| 7.- Diluyente calibrador. | |
| 9.- Amortiguador para lavado. | |
| 10.- Reactivo para teñir A. | Peroxido de hidrógeno. |
| 11.- Reactivo para teñir B | Cromógeno (tetrametilbenzidina) |
| 12.- Solución "stop" | Solución de ácido hidroclicórico. |
| 13.- Cubre placas. | |

Procedimiento

Las muestras de sangre se dejan coagular a temperatura ambiente por 2 horas. Se centrifugaron a 1000 x g por 30 minutos y separar el suero para congelarlo a temperatura menor de 20 grados centígrados. Las muestras como fueron de suero de rata no se diluyeron antes de utilizarse.

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente antes de ser utilizados:

- 1.- Preparación del control de sP-Selectina de ratón:

Se reconstituyó con agua destilada.

2.- Preparación del conjugado de sP-Selectina de ratón:

El conjugado de sP-Selectina de ratón se agregó al diluyente del conjugado y se protegió de la luz.

3.- Preparación del amortiguador para lavado:

Se preparó agregando a los 25 mL del concentrado, 600 mL de agua destilada para obtener 625 mL de Amortiguador para Lavado.

4.- Preparación del Diluyente Calibrador:

Se diluyó el concentrado con 60 mL de agua destilada para preparar 80 mL de Diluyente Calibrador.

5.- Preparación de la Solución Sustrato:

Los reactivos para teñir A y B se mezclaron 1:1 15 minutos antes de utilizarlos. Se protegieron de la luz

6.- Preparación del Estándar de sP-Selectina de ratón:

Se reconstituyó con 0.5 mL del Diluyente Calibrador.

7.- Dilución del estándar:

Se prepararon 8 tubos; 6 con 200µL de Diluyente Calibrador cada uno y dos más.

Para diluir el estándar se agregaron al primer tubo 200 µL del estándar de sP-Selectina y se mezcló gentilmente. Luego se tomaron 200 µL del tubo 1 y se mezcló en el tubo 2 y así sucesivamente. En un tubo más, el estándar sin diluir sirvió como la concentración más alta y en otro tubo el diluyente calibrador como el estándar 0 pg/mL

Se especifico la siguiente concentración de cada tubo

Tubo-1	20	ng/mL
Tubo-2	10	ng/mL
Tubo-3	5	ng/mL
Tubo-4	2.5	ng/mL
Tubo-5	1.25	ng/mL
Tubo-6	0.62	ng/mL
Tubo-7	0.31	ng/mL
Tubo-8	0	ng/mL

La curva de calibración (estándares) se prepararon simultáneamente con los sueros problema de acuerdo al siguiente esquema:

<ul style="list-style-type: none"> • Se agregaron 50 μL del diluyente para el ensayo
<ul style="list-style-type: none"> • Se agregaron 50 μL de Estándar, control, o muestra según sea el caso
<ul style="list-style-type: none"> • Se cubre y se dejó incubar por 2 hrs. a temperatura Ambiente
<ul style="list-style-type: none"> • Lavado por 5 veces
<ul style="list-style-type: none"> • Se agregaron 100 μL de sP-Selectina de ratón
<ul style="list-style-type: none"> • Se cubre y se dejó incubar por 2 hrs. a temperatura Ambiente
<ul style="list-style-type: none"> • Lavado por 5 veces
<ul style="list-style-type: none"> • Se agregaron 100 μL de solución sustrato
<ul style="list-style-type: none"> • Se cubre, protege de la luz y se dejó incubar por 30 min. a temperatura ambiente
<ul style="list-style-type: none"> • Se agregaron 100 μL de Solución Stop
<ul style="list-style-type: none"> • Se leyeron a a 450 nm durante los siguientes 30 minutos de la aplicación de la "Solución Stop"

Técnica de cuantificación de Antitrombina III en suero de rata.

Se separó el suero de la sangre colectada durante las diferentes fases del estudio y se congeló a - 70°C, 12 hrs antes del ensayo se colocaron a - 20 °C y posteriormente a temperatura ambiente.

Para cuantificar Antitrombina III (ATIII), en suero de rata, se utilizó una prueba de ELISA tipo sándwich de fase sólida (Rat AntiThrombin III ELISA Quantitacion Kit, GenWay Biotech, Inc.), específica para la cuantificación de ATIII de rata. El ensayo utilizó un anticuerpo monoclonal específico para ATIII de rata fijado en pocillos de una microplaca. Los estándares, los controles y las muestras fueron agregados a los pocillos y la ATIII presente se unió al anticuerpo del pocillo, después de lavar y descartar otras sustancias se agregó un anticuerpo policlonal específico para la ATIII unido a la enzima peroxidasa de rábano. Después de lavar y remover los reactivos no unidos a la placa, se agregó la solución sustrato y la reacción enzimática generó un tinte azul que cambió a amarillo cuando se agregó la solución “stop”. La medición de la intensidad del el color es proporcional a la cantidad de ATIII de rata unida en el paso inicial. Los valores se obtuvieron de interpolar la absorbancia en una curva de estándares.

Componentes del Kit

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. - Diluyente concentrado. | 50 mL de amortiguador “PBS” concentrado. |
| 2.- Amortiguador para lavado. | |
| 3.- Conjugado de enzima-anticuerpo | Anticuerpo anti-ATIII de rata
Conjugado con peroxidasa. |
| 4.-Solución sustrato-cromógeno | 3,3',5,5'tetrametibenzidina y
peroxido de hidrogeno en
amortiguador de acido citrico
a pH 3.3 |

- | | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.- Solución "stop" | Solución de ácido sulfúrico. |
| 6.- Microplaca para Antitrombina III de rata | Microplaca de poliestireno de 96 hoyos con anticuerpo específico para ATIII de rata. |
| 7.- Calibrador de Antitrombina III de rata. | |

Procedimiento

Las muestras de sangre se dejan coagular a temperatura ambiente por 2 horas. Se centrifugaron a 1000 x g por 30 minutos y se separó el suero para congelarlo a temperatura menor de 20 grados centígrados. Las muestras se diluyeron antes de utilizarse 1:10 000.

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente antes de ser utilizados:

1.- Preparación del diluyente:

Se diluyó 1:5 con agua destilada.

2.- Preparación del amortiguador para lavado:

Se preparó diluyendo el concentrado 1:20 con agua destilada.

3.- Preparación del conjugado enzima-anticuerpo:

Se agrega 100 μ L del conjugado a 10 mL de diluyente.

4.- Preparación del estándar de Antitrombina III de rata:

Se reconstituyó con 1.0 mL de agua destilada a el Calibrador de ATIII de rata, se obtiene una concentración de 1.2 μ g/mL de ATIII de rata.

5.- Dilución del estándar:

Se prepararon 6 tubos con 250 μ L de diluyente. Para diluir el estándar se agregaron al primer tubo 180 μ L del estándar de ATIII y 110 μ L de diluyente, se

mezcló gentilmente. Luego se tomaron 250µL del tubo 1 y se mezcló en el tubo 2 y así sucesivamente.

Se especifico la siguiente concentración de cada tubo

Tubo-1	400	ng/mL
Tubo-2	200	ng/mL
Tubo-3	100	ng/mL
Tubo-4	50	ng/mL
Tubo-5	25	ng/mL
Tubo-6	12.5	ng/mL

La curva de calibración (estándares) se prepararon simultáneamente con los sueros problema de acuerdo al siguiente esquema:

<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 µL del diluyente para el ensayo a cada hoyo.
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 µL de estándar, control, o muestra según sea el caso a cada hoyo.
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre y se dejó incubar por 1 hrs. a temperatura ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Lavado por 3 veces
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 µL de conjugado enzima-anticuerpo previamente diluido
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre y se dejó incubar por 30 min. a temperatura ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Lavado por 3 veces
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 µL de solución sustrato
<ul style="list-style-type: none">• Se cubre, protege de la luz y se dejó incubar por 10 min. a temperatura ambiente
<ul style="list-style-type: none">• Se agregaron 100 µL de Solución Stop
<ul style="list-style-type: none">• Se leyeron a a 450 nm durante los siguientes 30 minutos de la aplicación de la "Solución Stop"

APENDICE B

TECNICA HISTOLOGICA

APENDICE B

TECNICA HISTOLOGICA

Las muestras se colocarán en el procesador de tejidos automático: Histokinette, donde se llevara a cabo la deshidratación, la aclaración y la preinclusión de las porciones intestinales en estudio, siguiendo la siguiente secuencia:

0.- Formol al 10% (si el material esta sin fijar)	2 hrs. mínimo.
1.- Alcohol etílico al 60%	60 minutos.
2.- Alcohol etílico al 70%	60 minutos.
3.- Alcohol etílico al 80%	60 minutos.
4.- Alcohol etílico al 96%	60 minutos.
5.- Alcohol etílico al 96%	60 minutos.
6.- Alcohol etílico al Absoluto (100%)	60 minutos.
7.- Alcohol etílico al Absoluto (100%)	60 minutos.
8.- Etanol – Xilol (1:1)	60 minutos.
9.- Xilol	60 minutos.
10.- Xilol	60 minutos.
11.- Parafina líquida a 56°C (1° baño)	60 minutos.
12.- Parafina líquida a 56°C (2° baño)	60 minutos.

Posteriormente se incluyen en bloques de parafina y se cortan en un Micrótopo Rotatorio tipo Minot en cortes de 5 micrómetros de espesor los cuales se montan en portaobjetos y se teñirán con hematoxilina y eosina.

APENDICE C

TINCION CON HEMATOXILINA Y EOSINA

APENDICE C

COLORACION CON HEMATOXILINA Y EOSINA

1.- Xilol	5 min
2.- Etanol-Xilol	5 min.
3.- Etanol absoluto	2 min.
4.- Alcohol 96%	2 min.
5.- Agua destilada	enjuague lento.
6.- Hematoxilina de Gill	2 min.
7.- Agua de la llave (2 lavados)	enjuague lento.
8.- Alcohol acido	1 inmersión rápida.
9.- Agua de la llave (2 lavados)	enjuague lento.
10.- Agua amoniacal	2 inmersiones rápidas.
11.- Agua de la llave (2 lavados)	enjuague lento.
12.- Agua destilada	enjuague lento.
13.- Eosina	6 inmersiones.
14.- Alcohol 96%	enjuague breve.
15.- Alcohol 96%	1 min.
16.- Etanol absoluto (2 cambios)	2 min.
17.- Etanol-Xilol	3 min.
18.- Xilol	2 min.
19.- Xilol	3 min.
20.- Montaje (resina sintética o Entellan).	

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Francisco Javier Guzmán de la Garza

Candidato para el Grado de

Doctor en Medicina

Tesis: PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO ENTERICO Y LOS RECEPTORES NMDA EN LA ACTIVACION DEL ENDOTELIO INTESTINAL DURANTE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 22 de Noviembre de 1970, hijo del Lic. Francisco Javier Guzmán Sáenz y la Sra. Laura Estela de la Garza Morales.

Educación:

- Medico Cirujano y Partero, egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León 1988 - 1994
- Maestría en Ciencias con Especialidad en Fisiología, egresado de la Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1995-1998
- Especialidad en Pediatría en el Hospital Infantil de Monterrey, avalado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1998 - 2001

Experiencia Profesional:

- Profesor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, de la UANL desde el 2002.
- Profesor de Cátedra del Departamento de Ciencias Básicas Médicas del ITESM desde 2001
- Médico Pediatra, Clínica Cuauhtémoc y Famosa, S.A. de C.V. en Monterrey, N.L. desde el 2002.

Organizaciones Profesionales:

- Colegio de Pediatría del Estado de Nuevo León, A.C.
- Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.