

CAPÍTULO V.
MATERIAL Y MÉTODOS

V.I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS.

Para la realización de esta Tesis de Licenciatura se han utilizado las arterias coronarias procedentes de perros sanos proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los perros se mantuvieron en un periodo de cuarentena y el día del sacrificio se anestesiaron con pentobarbital sódico (IM 1mL/2kg). Se realizó un corte intercostal y se extrajo el corazón. Las preparaciones se sumergieron inmediatamente en una solución de Krebs-Henseleit a 4 °C con la siguiente composición: NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM y glucosa 11 mM. Se separaron las arterias descendentes (0.5 – 1.5 mm de diámetro interno). Posteriormente, se eliminaron cuidadosamente el tejido conectivo y la grasa que rodeaban las arterias, para después cortar los vasos en anillos de 2-3 mm de longitud.

V.II. FÁRMACOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS

Se utilizaron los siguientes fármacos: hidrocloreuro de L-fenilefrina, cloruro de acetilcolina y ácido ascórbico. Todos ellos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (Missouri, USA). El complejo serotonina-sulfato de creatinina octahidratado fue obtenido de RBI (Massachusetts, USA). La quercetina dihidratada fue proporcionada por el Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España).

La quercetina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO), la fenilefrina y la serotonina en una solución de ácido ascórbico (10^{-4} M) y los restantes fármacos en agua desionizada.

V.III. TÉCNICAS EMPLEADAS

V.III.1. Registro de contractilidad

Los anillos arteriales se montaron en cámaras de doble pared (copas de Allhin) con una temperatura regulada a 37 °C, que contenían un volumen fijo de 5 ml de solución de Krebs-Henseleit (Fig. 5.1), burbujeada con mezcla carbógena (95% O₂ y 5% CO₂). Los anillos se montaron entre dos alambres de acero inoxidable con forma de L (0.2 mm de diámetro), uno de los cuales se fijaba a la copa y el otro a un transductor isométrico (GRASS Instruments, modelo FT03), acoplado a un amplificador (GRASS, modelo 7DAHJK). La fuerza contráctil se registró mediante un convertidor analógico-digital (ADInstruments, modelo PowerLab/800) y se almacenó en un ordenador (Alaska Pentium 4) empleando un paquete de software LabView (versión 6.0 National Instruments).

A los anillos se les aplicó una tensión basal de 1.0 g. En experimentos previos se había determinado que estos valores de tensión eran los óptimos para obtener la máxima respuesta contráctil a 40 mM de KCl. En estas condiciones, las preparaciones se dejaron estabilizar por un periodo de 30 minutos, durante el cual se reajustó la tensión basal para mantener los valores antes mencionados.

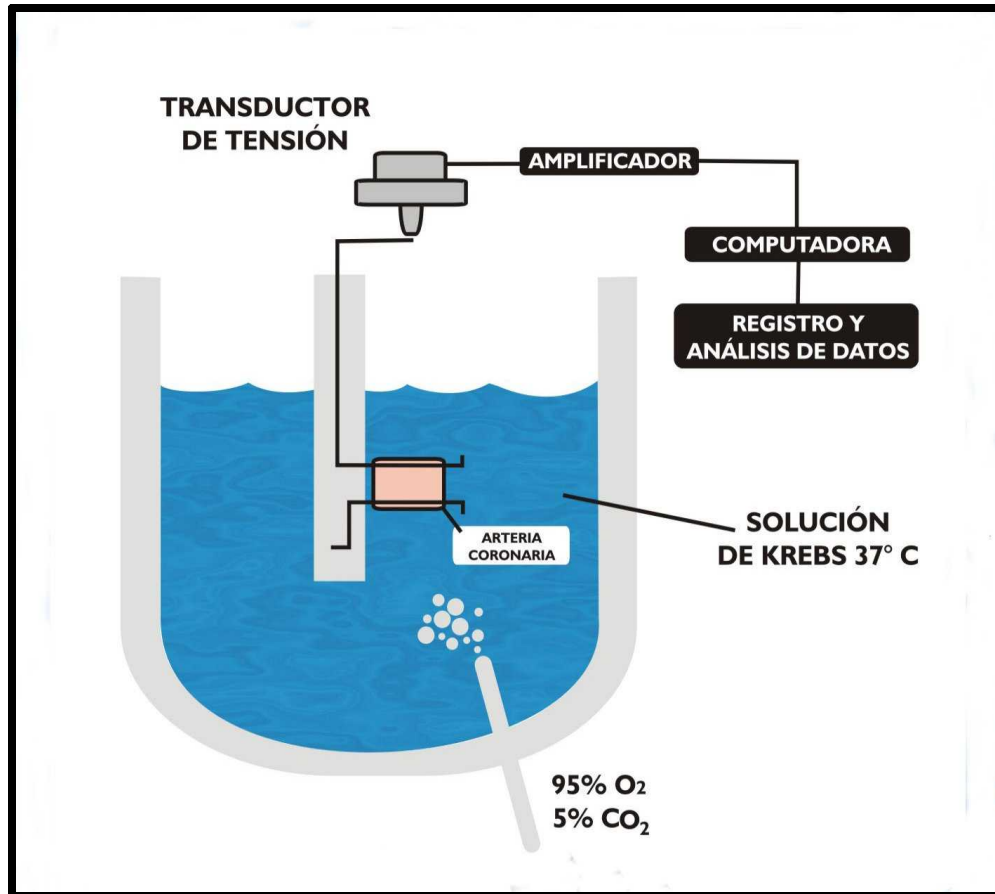


Fig. 5.1 Sistema del registro de contractilidad de arterias (Elaboración propia).

V.IV. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

V.IV.1. Eliminación del endotelio

Se realizaron experimentos en anillos con y sin endotelio para comparar su efecto sobre la acción de la quercetina, la fenilefrina y el KCl. La eliminación del endotelio se realizó mecánicamente, haciendo pasar un alambre de acero (0.8 mm) por la luz del anillo y frotando (con un movimiento de rotación) la pared interna del vaso. La ausencia del

endotelio se comprobó observando la incapacidad de la ACh (10^{-7} M) para relajar los anillos precontraídos con KCl (40 mM).

V.IV.2. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina

Este grupo de experimentos se llevó a cabo con la finalidad de conocer la magnitud del efecto contráctil de la fenilefrina en anillos arteriales y seleccionar la concentración más adecuada para la precontracción en los protocolos siguientes. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos (durante el cual la tensión basal del anillo vascular correspondiente no presentó cambios), se realizaron curvas concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones acumulativas de fenilefrina (10^{-6} – 10^{-3} M) al medio.

V.IV.3. Curvas concentración-respuesta a KCl

Este grupo de experimentos se llevó a cabo para determinar el efecto contráctil máximo del KCl y la concentración más adecuada para la precontracción de los anillos en los protocolos siguientes. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, se realizaron curvas concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones acumulativas de KCl (10 – 80 mM) al medio.

V.IV.4. Curvas concentración-respuesta a quercetina

Este grupo de experimentos se realizó con la finalidad de caracterizar el efecto vasodilatador de la quercetina en anillos arteriales con y sin endotelio. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, los anillos fueron precontraídos con KCl 40 mM,

serotonina 10^{-5} M o fenilefrina 10^{-5} M hasta alcanzar un valor estable. En estas condiciones, se realizaron curvas concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones acumulativas de quercetina (10^{-8} – 10^{-4} M) al medio.

V.IV.5. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina

Este grupo de experimentos se realizaron en anillos vasculares con endotelio para conocer el efecto de la quercetina en la vasodilatación inducida por NO endógeno. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, se llevaron a cabo diversos protocolos experimentales, tal como se describe a continuación.

V.IV.5.1. Curvas concentración-respuesta control

Este grupo de experimentos se considera grupo control. Tras el periodo de estabilización, se indujo la respuesta contráctil al KCl (40 mM). En estas condiciones, se realizó la curva concentración-respuesta mediante la administración de concentraciones acumulativas de ACh (10^{-8} M – 3×10^{-6} M) al medio.

V.IV.5.2. Curvas concentración-respuesta en presencia de quercetina

Estos experimentos se realizaron con la finalidad de compararlos con el grupo control y determinar el efecto de la quercetina sobre la vasodilatación inducida por NO endógeno. Después de inducir la respuesta contráctil al KCl (40 mM), se añadió quercetina (10^{-6} M) y se dejó estabilizar 15 minutos. Posteriormente, se realizaron las curvas

concentración-respuesta acumulativas a ACh (10^{-8} M – 3×10^{-6} M) según el protocolo anteriormente descrito.

V.V. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) para un determinado número (n) de anillos arteriales de distintos animales. Las curvas concentración-respuesta para la quercetina, la acetilcolina, la fenilefrina y el KCl se ajustaron, mediante un programa de análisis de datos, a la ecuación de Michaelis-Menten.

El efecto máximo relajante (E_{\max}) que se expresa como porcentaje de la respuesta contráctil inicial o como gramos fuerza (g_f) y la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50 % del E_{\max} (CE_{50}) fueron calculados a partir del ajuste de las curvas concentración-respuesta para cada experimento.

Para el tratamiento estadístico se utilizó el paquete informático Origin versión 7.0. Los resultados experimentales se contrastaron comparando las medias de E_{\max} y de CE_{50} mediante el test de t-student para datos no pareados. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias en las que la p fue menor de 0.05.