

8. Materiales y Métodos.

8.1. Tipo de estudio.

Experimental, transversal, prospectivo, comparativo.

8.2. Criterios de inclusión.

Ratas macho de la cepa Wistar, sanas con un peso de 220 ± 20 g al inicio del estudio.

8.3. Criterios de exclusión.

Ratas que no estén dentro del rango de peso o hayan sido sometidas a algún tipo de medicamento, por lo que pueden alterar el resultado.

8.4 Criterios de eliminación.

No se utilizarán células que presenten un tipo de patrón de actividad eléctrica silente.

8.5. Cálculo del tamaño de la muestra.

Para que este estudio sea válido se realizó cada condición por triplicado, usando un aproximado de 15 ratas. Se aplicó un muestreo por conveniencia, ya que se empezó a trabajar con las ratas dentro de un mismo intervalo de peso antes de aplicar las restricciones calóricas.

8.6. Descripción del procedimiento.

Para conocer la actividad eléctrica de los hepatocitos, registramos la corriente iónica total a través de la membrana de hepatocitos en rebanadas de hígado, mediante la técnica de fijación

de voltaje en la modalidad de célula completa (Hamill et al., 1981). Después de la decapitación de la rata se tomó el lóbulo lateral izquierdo y se realizaron cortes delgados con una navaja tipo Gillette. Las rebanadas se dejaron incubando en un baño con Colagenasa Tipo 1 (Sigma) al 0.02% en solución Krebs (solución fisiológica) por 1 h. Después de un periodo de estabilización de aproximadamente una hora las rebanadas se colocaron en una cámara de registro, la cual se montó sobre la platina de un Microscopio Olympus BX51WI, equipado con luz infrarroja y objetivo de inmersión en agua, colocado sobre una mesa anti vibratoria para electrofisiología (TMC, MA01960, EUA). Las pipetas de registro fueron elaboradas con un estirador horizontal (Sutter instruments Co. Modelo P-97), con una resistencia entre 3 y 6 M Ω cuando estaban llenos con alguna de las soluciones intracelulares. Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador PC-One PatchClamp (Cornestone, Dagan). Los datos se enviaron a un digitalizador Digidata 1440A (Axon CNS, Molecular Devices), capturados y analizados mediante el programa Clampex (Versión 10.2.0.12, MSD Analytical Technologies). Las soluciones utilizadas para este protocolo se describen en los anexos. Para estudiar las diferentes corrientes que participan en la dinámica electrofisiológica se bloquearon los canales de Na⁺ y K⁺.

Las rebanadas de hígado en la cámara de registro fueron perfundidas continuamente con la solución fisiológica control o experimental, de acuerdo al objetivo de cada experimento. Igualmente, la pipeta estaba llena con una solución interna según el objetivo de cada experimento.

Los registros en los grupos experimentales se realizaron con las respectivas restricciones calóricas de ayunos de 24 y 48 h; en un tercer grupo de estudio las ratas fueron realimentadas durante 2 h después de estos mismos periodos de ayuno.

Los experimentos se enfocaron en identificar la naturaleza de los iones más permeables a través de la membrana del hepatocito, y si su actividad tiene un aumento o disminución al aplicar cambios en condición alimenticia. Además de intentar observar si los iones que son permeables cambian de acuerdo a las distintas condiciones. Por ejemplo, si el Na⁺ es más permeable cuando existe un ayuno que cuando hay una realimentación o viceversa; al igual con los demás iones.

8.8. Aspectos éticos.

Los animales serán tratados de acuerdo con las normas éticas estipuladas en los reglamentos respectivos del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM y conforme a los estándares éticos internacionales (Anexo 2).

el objetivo de cada experimento.

el objetivo de cada experimento.