



Estandarización de un modelo *ex vivo* para la evaluación de la secreción ácida en tejido gástrico de ratas Wistar

Edwin Javier Molano Molano

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Fisiología

Bogotá, Colombia

2019

Estandarización de un modelo *ex vivo* para la evaluación de la secreción ácida en tejido gástrico de ratas Wistar

Edwin Javier Molano Molano

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al
título de:

Magister en Fisiología

Director:

Claudio Gomez Alegría PhD.

Codirectora:

Luz Helena Aranzalez PhD.

Grupo de Investigación:

UNIMOL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2019

A mis padres y mis hermanos

A Alejandra, mi novia, amiga y confidente

In memoriam:

Erick Rodrigo Martínez Mojica

*“Stand your ground and fight, you know
that our cause is right...”*

Motörhead

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo. A mis padres quienes siempre me apoyaron y soportaron durante este proceso, a mis hermanos en los que siempre encontré un apoyo para abrirme las perspectivas y visualizar mejor los problemas. A Alejandra, quien más cercanamente me acompañó y se aguantó el desarrollo de este proyecto y me soportó el estrés y la ansiedad frecuentes.

Al profesor Francisco Olea a quien admiro y quien me permitió entrar en su laboratorio y me permitió abrirme camino en el campo de Fisiología experimental, a Duvan Uarquin por quien pude expandir mis horizontes académicos y personales. A todos los profesores y trabajadores de la Unidad de Lípidos y Diabetes de la Facultad de Medicina y de la Maestría en Fisiología por su apoyo y paciencia para la realización de esta tesis. A mis directores Claudio y Luz por su apadrinamiento y nivel de exigencia. Y a todos los demás profesores, trabajadores y amigos que estuvieron presentes durante mi estadía en la Universidad Nacional de Colombia y a quienes considero amigos.

Quiero agradecer especialmente a Rodrigo Martínez, quién fue un amigo y un apoyo incondicional para mi estadía en el Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Rodrigo era quien con su carisma permitía que la estancia en el laboratorio fuera agradable y nos hizo pensar que el laboratorio no era solo el lugar para resolver problemas académicos, sino un espacio donde se podía expresar libremente cualquier idea, por idiota que fuese.

Resumen

La secreción ácida gástrica es un proceso fisiológico que se puede dar tanto en condiciones basales, como por estímulos hormonales o nerviosos. Dentro de los estimulantes conocidos se encuentra el carbacol, la histamina y la dexametasona, de la que se desconoce su mecanismo de activación. Para estudiar la secreción ácida gástrica es necesario contar con un modelo para evaluar dicha secreción. El objetivo fue estandarizar un modelo *ex vivo* para evaluar la secreción ácida en tejido gástrico de ratas Wistar. Para ello se empleó fragmentos de tejido gástrico de ratas Wistar de aproximadamente 1 cm² inmersos en diferentes medios de cultivo (KRB, Krebs, DMEM), en donde se evaluó el pH del medio como un indicador de la secreción ácida gástrica. Para la secreción ácida basal se comparó el pH del medio sin tejido con medio que contenía tejido gástrico o cecal. Mientras que para la secreción ácida estimulada se empleó carbacol 100 μM (Cch 100) o dexametasona 100 μM (Dex 100). Hubo diferencias significativas entre el pH del medio sin tejido y el pH del medio con fragmentos de tejido gástrico. En los medios Krebs y DMEM es posible evaluar la secreción ácida estimulada por Cch 100. Sin embargo, no fue posible evaluar la secreción ácida estimulada por Dex 100. En conclusión, es posible evaluar el pH del medio como un indicador de la secreción ácida tanto basal como estimulada por carbacol. No obstante, se requieren más estudios para evaluar el efecto de la dexametasona sobre la secreción ácida gástrica.

Palabras clave: Secreción ácida gástrica, modelos *ex vivo*, pH, medios de cultivo, carbacol, dexametasona.

Abstract

Gastric acid secretion is a physiological process that can occur both in basal conditions, as by hormonal or nervous stimuli. Among the known stimulants are carbachol, histamine and dexamethasone, whose mechanism of activation is unknown. To study gastric acid secretion, it is necessary to have a model to evaluate this secretion. The objective was to standardize an *ex vivo* model to evaluate the acid secretion in gastric tissue of Wistar rats. For this, gastric tissue fragments from Wistar rats of approximately 1 cm² were immersed in different culture media (KRB, Krebs, DMEM), where the pH of the medium was evaluated as an indicator of gastric acid secretion. For basal acid secretion, the pH of the medium alone was compared with medium containing gastric or cecal tissue. While 100 μM carbachol (Cch 100) or 100 μM dexamethasone (Dex 100) was used for stimulated acid secretion. There were significant differences between the pH of the medium without tissue and the pH of the medium with fragments of gastric tissue. In the Krebs and DMEM media, it is possible to evaluate the acid secretion stimulated by Cch 100. However, it was not possible to evaluate the acid secretion stimulated by Dex 100. In conclusion, it is possible to evaluate the pH of the medium as an indicator of the acid secretion both basal as stimulated by carbachol. However, further studies are required to assess the effect of dexamethasone on gastric acid secretion.

Keywords: Gastric acid secretion, *ex vivo* models, pH, culture media, carbachol, dexametasone.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XI
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	3
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
1.2 Justificación	5
2. Marco teórico	7
2.1 La secreción ácida gástrica	7
2.1.1 El tejido gástrico	7
2.1.2 Fisiología de la secreción ácida gástrica	9
2.1.3 El carbacol	11
2.2 Modelos para medir la secreción ácida gástrica	12
2.2.1 Modelos <i>in vivo</i>	12
2.2.2 Modelo de órgano aislado	14
2.2.3 Modelos celulares	15
3. Metodología	19
3.1 Diseño experimental	19
3.2 Animales	19
3.2.1 Condiciones de alojamiento	19
3.2.2 Criterios de exclusión	20
3.2.3 Criterios de punto final	20
3.2.4 Destino final de los animales	20
3.3 Toma de muestras de tejido gástrico	21
3.4 Evaluación de la secreción ácida gástrica	22
3.5 Evaluación del comportamiento de diferentes medios de incubación	22
3.6 Análisis estadístico y presentación de datos	22
4. Resultados	25
4.1 Obtención del tejido gástrico de ratas Wistar	25
4.2 Secreción ácida gástrica basal	29
4.3 Secreción ácida gástrica estimulada farmacológicamente	33
5. Discusión	44

X Estandarización de un modelo ex vivo para la evaluación de la secreción ácida
en tejido gástrico de ratas Wistar

5.1	Protocolo para la obtención del tejido gástrico	44
5.2	Secreción ácida gástrica	45
5.3	Ventajas y desventajas del modelo propuesto.....	47
6.	Conclusiones y recomendaciones	49
6.1	Conclusiones.....	49
6.2	Recomendaciones.....	50
A.	Anexo: Composición medio KRB	51
B.	Anexo: Composición medio Kebs	52
	Bibliografía	55

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

GC:	Glucocorticoides
PC:	Células parietales
SGK1:	Quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1
PI3K:	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKB/AKT:	Proteína quinasa B
DEX:	Dexametasona
CCH:	Carbacol
BCECF:	2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-6-Carboxifluoresceína, Acetoximetil Ester
Hepes:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
SSF:	Solución salina fisiológica NaCl 0,9%

Introducción

La secreción ácida gástrica es una función estomacal bastante importante para el proceso de hidrólisis de las proteínas de la dieta. Esta secreción ocurre en las células parietales, localizadas en las glándulas del *fundus* gástrico. Dentro de los mecanismos necesarios para el funcionamiento de las células parietales, están los transportadores de iones de las membranas basolateral y apical, que permiten el paso de iones hacia el interior o exterior celular y en el caso de la secreción ácida, depende de un mecanismo de transporte activo en la membrana apical. La secreción ácida gástrica se da en respuesta a estímulos de tipo hormonal o nervioso donde la histamina, acetilcolina y gastrina desempeñan un papel fundamental. También se ha descrito un efecto positivo de los glucocorticoides sobre la secreción ácida gástrica, pero su mecanismo de acción no está completamente esclarecido. Nuestro interés a futuro es estudiar los mecanismos implicados en la secreción ácida gástrica mediada por glucocorticoides, para lo cual necesitamos contar con un modelo experimental apropiado.

El presente trabajo se realizó con el fin de estandarizar un modelo *ex vivo* para evaluar la secreción ácida gástrica de ratas Wistar, lo que constituye un avance en relación con los objetivos que se tienen a futuro.

1. Planteamiento del problema

La secreción gástrica es importante a nivel fisiológico porque colabora en el proceso de digestión de nutrientes que se lleva a cabo en el tubo digestivo. Esta secreción es producida por las glándulas gástricas que contienen diferentes tipos de células, entre ellas las células parietales que secretan ácido clorhídrico (ver Marco teórico).

La secreción ácida está dividida en dos tipos, basal y estimulada. Se han estudiado los mecanismos fisiológicos implicados en ambos tipos de secreción, así como también los mecanismos patológicos relacionados con el funcionamiento gástrico (Sandu et al., 2007; Rotte et al., 2009a; Rotte et al., 2010; Pasham et al., 2011). La secreción ácida basal estaría mediada por quinasas de la familia de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K). Sin embargo, los mecanismos más estudiados corresponden a la secreción estimulada, donde las hormonas gastrina e histamina, y el neurotransmisor acetilcolina, juegan un papel principal; la gastrina actúa sobre receptores para colecistoquinina tipo 2 (CCK2), la histamina sobre receptores para histamina tipo 2 (H2) y la acetilcolina sobre receptores muscarínicos tipo 3 (M3) (Cunningham, 2003; Barret et al, 2010; Hall & Guyton, 2011). Adicionalmente, y aunque menos conocido, se sabe que los glucocorticoides también estimulan la secreción ácida gástrica. En efecto, se ha descrito que son potentes inductores y que incluso se relacionan con la aparición de úlceras pépticas, al punto de existir una enfermedad denominada estrés gástrico, la cual está mediada principalmente por GCs y ha sido estudiada desde hace bastante tiempo (Pfeiffer & Stephens, 1968; Messer et al, 1983; Durham & Shapiro, 1991; Li et al., 2006). Sin embargo, aún se desconocen a cabalidad todos los mecanismos moleculares implicados en este efecto.

En cuanto a los modelos para estudiar la secreción ácida gástrica, se reportan diferentes modelos con animales vivos desde la década de los 50's (Ghosh & Schild, 1958). Dichos modelos emplean técnicas de medición de pH que varían desde la titulación del contenido gástrico, hasta la medición del pH de una sola célula parietal (ver Marco teórico).

Desafortunadamente, el uso de métodos para la medición del pH en células individuales es una técnica costosa e implica el uso de equipos sofisticados. Lo anterior abre la posibilidad al desarrollo de nuevos modelos de medición de la secreción ácida gástrica. Aunque nuestro objetivo a mediano y largo plazo es estudiar el efecto de los glucocorticoides en la secreción ácida gástrica, en el presente trabajo nos centramos en tratar de disponer de un modelo experimental para llevar a cabo dichos estudios. Con este fin quisimos indagar la posibilidad de trabajar con un modelo de tejido gástrico *ex vivo*, partiendo de la siguiente **hipótesis de trabajo**: El uso de fragmentos de tejido gástrico *ex vivo* debería permitirnos evaluar la secreción ácida gástrica basal y estimulada, mediante valoración de los cambios de pH en el medio.

Con este trabajo pretende dar respuesta a la siguiente **pregunta de investigación**:

¿Cuáles son las condiciones experimentales que nos permitirían evaluar la secreción ácida gástrica, tanto basal como estimulada, en tejido gástrico *ex vivo* proveniente de ratas Wistar?

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Estandarizar un modelo ex vivo para evaluar la secreción ácida en tejido gástrico de ratas Wistar

1.1.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo para obtener tejido gástrico de ratas Wistar.
- Determinar las condiciones experimentales para evaluar la secreción ácida basal en el tejido gástrico *ex vivo*.
- Evaluar la secreción ácida gástrica estimulada farmacológicamente en el modelo *ex vivo* establecido.

1.2 Justificación

Desde el punto de vista científico, el desarrollo de este proyecto permitirá disponer de un modelo experimental que facilite la realización de nuevos estudios enfocados en los mecanismos implicados en la secreción ácida gástrica, tanto basal como estimulada; un modelo así, nos permitiría un acercamiento a las condiciones necesarias para evaluar la respuesta tisular aguda del tejido gástrico a diferentes estímulos farmacológicos. Cualquier avance en dicho sentido, nos podría permitir identificar nuevas dianas de acción farmacológica para tratar un problema tan frecuente en la población como son los desórdenes relacionados con el funcionamiento gástrico, que incluyen patologías tan extendidas en la población humana como es la gastritis con sus diferentes presentaciones y etiologías (Weck & Brenner, 2006; Sipponen & Maaros, 2015; Muszyński et al., 2016).

Por otro lado, es un hecho conocido que existen grandes limitaciones económicas y de equipos en muchos laboratorios y grupos de investigación del país, lo que a su vez limita conseguir avances significativos en comparación con países desarrollados. Por ello, éste trabajo busca desarrollar un modelo de secreción ácida gástrica alternativo, económico y de fácil acceso y sin la necesidad de un entrenamiento extenso del personal que realice la técnica. Esto permitiría la formación de nuevos estudiantes e investigadores centrados en el funcionamiento gástrico, lo que podría llevar al descubrimiento de nuevos fármacos relacionados con la función gástrica y en una mejor calidad de vida de los pacientes.

Adicionalmente, el desarrollo de este proyecto fortalecerá el rol de la Universidad Nacional en cuanto a la formación de recurso humano a nivel de postgrado (maestría), mejorando los indicadores de la Universidad Nacional de Colombia y de la nación. Además, se fortalece el programa de maestría en Fisiología de la Facultad de Medicina y los grupos de investigación involucrados.

2.Marco teórico

2.1 La secreción ácida gástrica

2.1.1 El tejido gástrico

El estómago es un órgano tubular ensanchado que posee una serie de capas o tunicas que son bastante específicas y que explican su funcionamiento. Desde la capa más externa hasta la más interna las tunicas son las siguientes: una capa serosa, una capa muscular externa bastante desarrollada debido a la cantidad de movimiento realizado por el órgano durante el proceso de digestión, una capa submucosa y una capa mucosa compuesta por un epitelio altamente especializado (Ross & Wojciech, 2011). En la figura 1 (panel izquierdo) se muestra un esquema de la túnica mucosa del estómago.

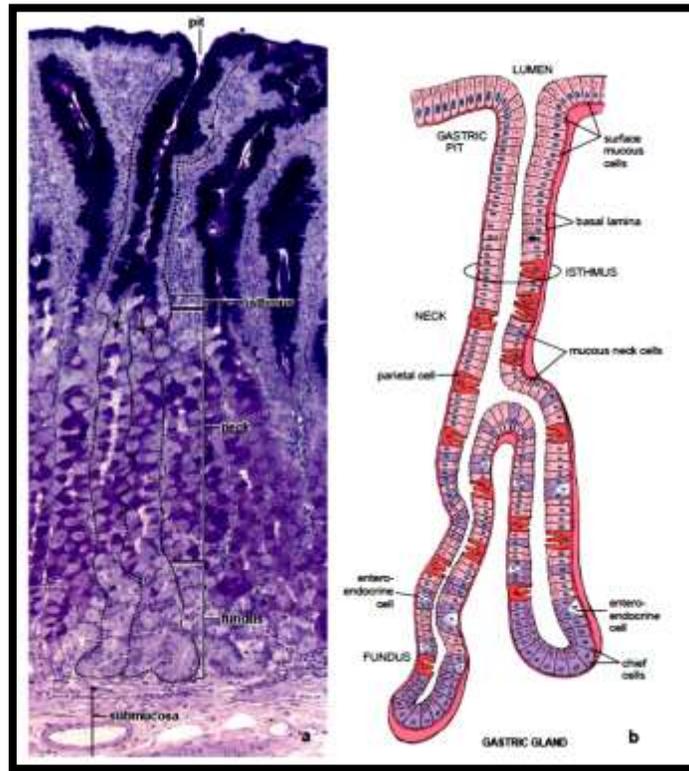


Figura 1 Corte histológico de una glándula gástrica. Tomado de: Ross & Wojciech (2011).

En la mucosa se encuentra una capa muscular limitando con la submucosa y hacia la luz del órgano se encuentran las glándulas gástricas u oxínticas, las cuales tienen forma tubular y son las encargadas de secretar ácido y sustancias necesarias para los procesos digestivos del órgano (Figura 1, panel derecho) (Barret et al., 2010; Hall & Guyton, 2011; Ross & Wojciech, 2011). Las células presentes al interior de la glándula cumplen funciones muy específicas y se catalogan de la siguiente manera: células enteroendocrinas (también llamadas ECL, secretoras de hormonas para la regulación de la glándula), células mucosas del cuello (encargadas de la secreción de moco rico en bicarbonato para la protección del epitelio de los agentes digestivos secretados en el estómago), células principales (encargadas de la producción de pepsinógeno) y células parietales (encargadas de la producción y secreción de HCl) (Ross & Wojciech, 2011).

2.1.2 Fisiología de la secreción ácida gástrica

La célula parietal desempeña un papel muy importante en la fisiología estomacal y está implicada en la fisiopatología de enfermedades estomacales como la gastritis con sus diferentes etiologías.

La secreción ácida gástrica puede ser basal o estimulada: a nivel basal existe un flujo de hidrogeniones hacia el exterior de la célula parietal, mediado por la activación de quinasas intracelulares, principalmente de la familia de las fosfatidil inositol 3 quinasas (PI3K)(Barret et al., 2010; Hall & Guyton, 2011). Por su parte, la secreción estimulada ocurre en respuesta a estímulos de tipo hormonal o nervioso. Los mecanismos de estimulación descritos en la literatura incluyen la vía colinérgica mediada por acetilcolina que estimula los receptores muscarínicos tipo 3 (M3), así como la vía histaminérgica en la cual, la histamina actúa sobre receptores para histamina tipo 2 (H2). Se determinó que la vía histaminérgica es la más potente activadora de la secreción ácida, esto debido a que *in vivo* las células parietales están en contacto con células enterocromafines liberadoras de histamina (ECL). En células parietales caninas, la principal vía de estimulación y señalización parece ser la colinérgica (Yao & Forte, 2003).

Por último, la secreción ácida gástrica también es estimulada por la gastrina, que actúa sobre los receptores para colecistoquinina tipo 2 (CCK2) de la célula parietal. Se descubrió que la gastrina puede no actuar directamente sobre las células parietales, sino a través de estimular la secreción de histamina por parte de las células ECL en la mucosa gástrica. Esta vía de comunicación gastrina-ECL ha sido estudiada para microdiálisis, observándose que la gastrina actúa sobre los receptores de colecistoquinina 2 (CCK2) para controlar la síntesis de histamina de las células ECL a través de un aumento en la expresión y actividad de la enzima histidina descarboxilasa (HDC), que transforma la histidina en histamina (Lindström et al., 2001; Mills et al., 2001)(Figura 2).

2.1.3 El carbacol

El carbacol o carbamilcolina, es un fármaco que actúa como agonista colinérgico, siendo capaz de estimular los receptores muscarínicos y nicotínicos. Posee un peso molecular de 147,198 g/mol y su fórmula estructural se muestra en la figura 3. En la literatura se encuentran numerosos usos para este fármaco, desde la inducción de miosis hasta la estimulación de la motilidad intestinal, y también se emplea como un inductor bastante efectivo de la secreción ácida gástrica, particularmente en estudios con glándulas gástricas aisladas de cerdos de guinea (Sakamoto et al, 1986; Masayoshi et al, 1990). Recientemente se ha empleado en estudios para determinar los mecanismos implicados en la secreción ácida gástrica estimulada, en donde se utiliza como control positivo para estimular la secreción ácida (Sandu et al., 2007).

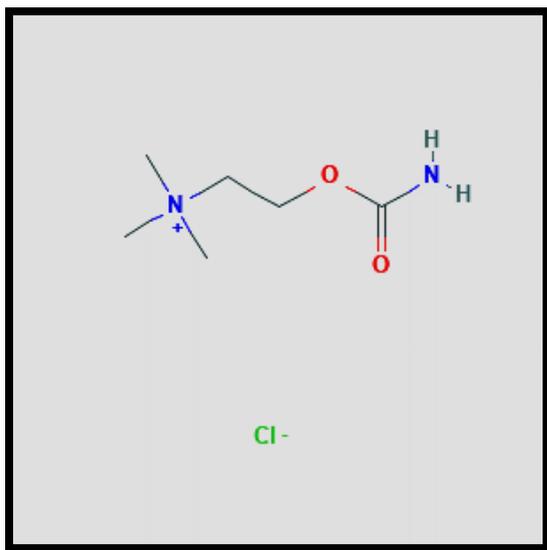


Figura 3: Estructura química del carbacol. Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Database.

2.2 Modelos para medir la secreción ácida gástrica

El primer método reportado para medir la secreción ácida gástrica fue en el siglo XIX, por un investigador de apellido Beaumont, que empleó una fístula para sacar fluidos del estómago de uno de sus pacientes para medir el pH de dichos fluidos (Ghosh et al., 2011). Desde entonces se generaron diversos modelos, algunos bastante invasivos, otros empleando sondas o endoscopios para evaluar el contenido estomacal y evaluar sus propiedades. A continuación, se describirán brevemente algunos de estos modelos.

2.2.1 Modelos *in vivo*

Los primeros modelos para la determinación de la secreción ácida gástrica se generaron a partir del estudio con pacientes humanos o con modelos animales a los cuales se les extrajo el contenido estomacal. La extracción frecuentemente era realizada en un solo momento y se evaluaba características del contenido gástrico (Ghosh et al., 2011). Pero los avances en las técnicas quirúrgicas permitieron la elaboración de modelos con animales que podían explicar fenómenos descritos en los humanos pero que por condiciones de ética no podían ser evaluados en el paciente humano (National Research Council of the National Academies, 2011).

Ghosh & Schild (1958) describieron cuidadosamente un modelo animal para evaluar continuamente la secreción ácida de una rata. En dicho modelo, la rata bajo anestesia era disectada para exponer el estómago y el esófago del animal. Posteriormente se insertaba una cánula en el esófago y otra en el fondo gástrico. Por la cánula esofágica se vertía una solución diluida de NaOH que era recolectada junto con el contenido gástrico por la cánula del fondo gástrico. La medición del pH se realizaba al titular la solución resultante de los lavados gástricos con NaOH 1N. El sistema de medición según los autores tenía una precisión de 0,1 unidades de pH y podía evaluar diversos componentes para estimular la secreción ácida, entre ellos la histamina (Ghosh & Schild, 1958). Un diagrama del procedimiento se puede observar en la figura 4.

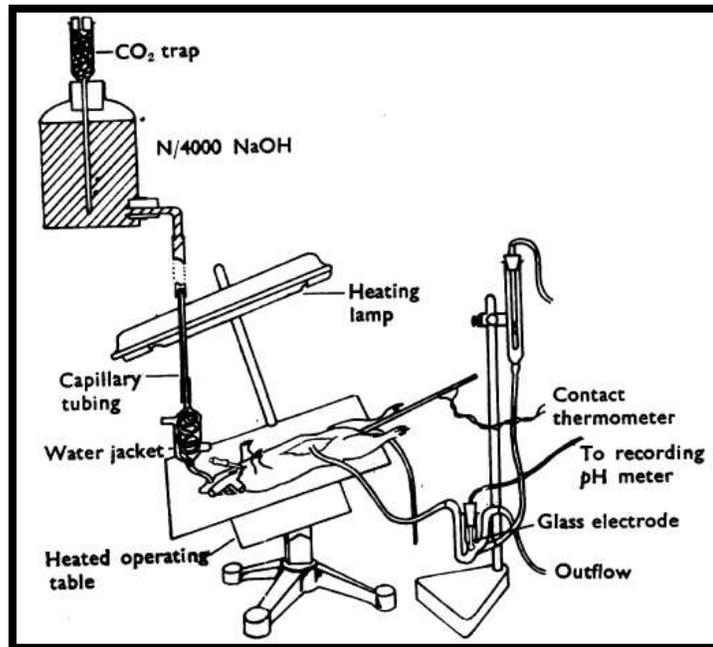


Figura 4: Procedimiento para evaluar continuamente la secreción ácida gástrica de una rata. Tomado de: Ghosh & Schild (1958)

Luego, Wiederanders et al (1960), publicaron un método para insertar una cánula desde el interior del estómago de una rata, que vertía su contenido al exterior; para garantizar que el contenido saliera, se agregaba una bomba con presión negativa en el extremo exterior, lo que permitía coleccionar los fluidos del estómago, para posteriormente titular con NaOH. El procedimiento quirúrgico se muestra en la figura 5.

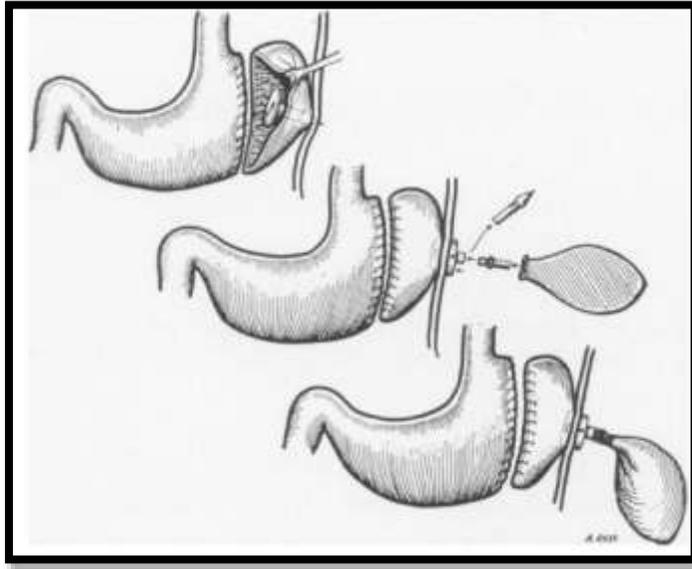


Figura 5: Procedimiento quirúrgico de inserción de una cánula al interior del estómago de una ratona. Tomado de: Wiederanders et al (1960)

En la actualidad se siguen usando procedimientos que emplean sistemas similares de obtención del contenido gástrico (Wang et al., 2019). Lo que ha cambiado es el mecanismo de medición del pH del contenido gástrico; hoy se utiliza un titulador de pH automatizado o pH-stato.

2.2.2 Modelo de órgano aislado

Otra aproximación metodológica para medir la secreción ácida gástrica, es el uso del modelo de órgano aislado. Este modelo permite el manejo de un órgano extraído del cuerpo, el cual es mantenido en una solución rica en nutrientes y gases que emula las condiciones fisiológicas en las cuales se desarrolla y funciona dicho órgano, en otras palabras, un medio de cultivo (medio externo o medio para la serosa). Para la medición de la secreción ácida gástrica, el modelo de órgano aislado, requiere el uso del estómago completo, ya que si la secreción ácida se da hacia el medio externo, sería muy difícil la cuantificación del pH del medio, debido a que este se encuentra circulando constantemente (a veces entre diferentes tratamientos).

Un ejemplo del uso de este modelo para medir la secreción ácida gástrica es proporcionado por Okuda et al (2009). El sistema emplea dos medios diferentes, uno que circula por el exterior del estómago, que le aporta los nutrientes necesarios para su normal funcionamiento (medio para la serosa), y uno para perfundir y recolectar el contenido del interior del órgano, que no poseía compuestos tamponantes del pH (medio para la mucosa). La estimulación e inhibición de la secreción ácida, se da desde el medio para la serosa, con diferentes fármacos disueltos; y la medición del pH se da también empleando un pH-stato. En la figura 6 se muestra un esquema de funcionamiento del modelo de órgano aislado.

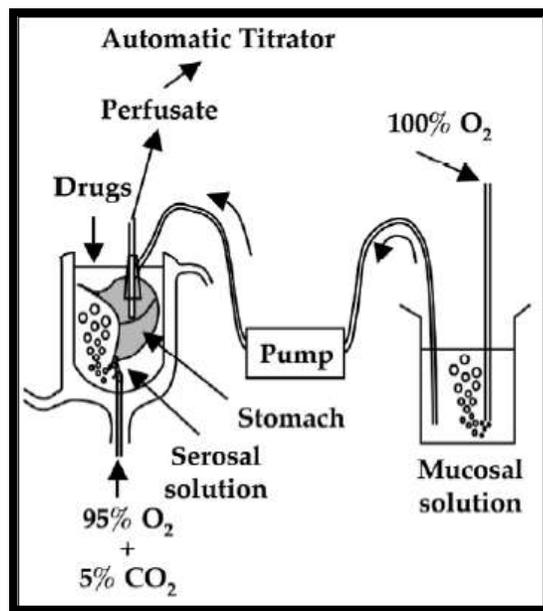


Figura 6: Modelo de órgano aislado para la medición de la secreción ácida gástrica. Tomado de: Okuda et al (2009)

2.2.3 Modelos celulares

Los modelos más recientes para medición de la producción de hidrogeniones y el cambio de pH, se basan en el uso de técnicas mucho más sensibles, que permiten determinar el pH de una sola célula mediante el uso de fluoróforos sensibles a los cambios de pH (Paradiso et al., 1989; Negulescu & Machen, 1990). Para ello es necesario desagregar la mucosa gástrica y aislar células parietales en placas de cultivo, donde se lleva a cabo la medición del pH intracelular a través del uso de estos indicadores fluorescentes (Stepan et al., 2005; Lang et al., 2007; Sandu et al., 2007; Rotte et al., 2009c; Pasham et al., 2011).

El compuesto más frecuentemente empleado para la medición del pH intracelular en este modelo es el BCECF (2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-6-Carboxifluoresceína, Acetoximetil Ester). El BCECF es empleado para medir el pH debido a que es una molécula cuya longitud de onda de emisión cambia cuando se une a diferentes iones, por lo que es empleado en un sistema que se conoce como de "radio de emisión de fluorescencia", en el cual se excita la molécula a dos diferentes longitudes de onda y se mide la señal resultante empleando un filtro en una tercera longitud de onda (Paradiso et al., 1989). BCECF es excitado a 440 nm y 490 nm y la emisión de fluorescencia resultante es medida a 530 ± 10 nm; a 440 nm emite menos luz debido a que la molécula se encuentra en su punto isobéptico (la absorbancia total de la muestra no cambia durante una reacción química o física), mientras que a 490 nm emite más luz porque es más sensible a la unión de ciertos iones (en este caso, sensible a cambios en el pH). Adicionalmente se emplean estas longitudes de onda porque la medición de los cambios en la excitación de la molécula a estas longitudes generan un rango lineal de medición del pH (Negulescu & Machen, 1990). Un ejemplo del modelo de medición del pH intracelular con BCECF se muestra en la figura 7.

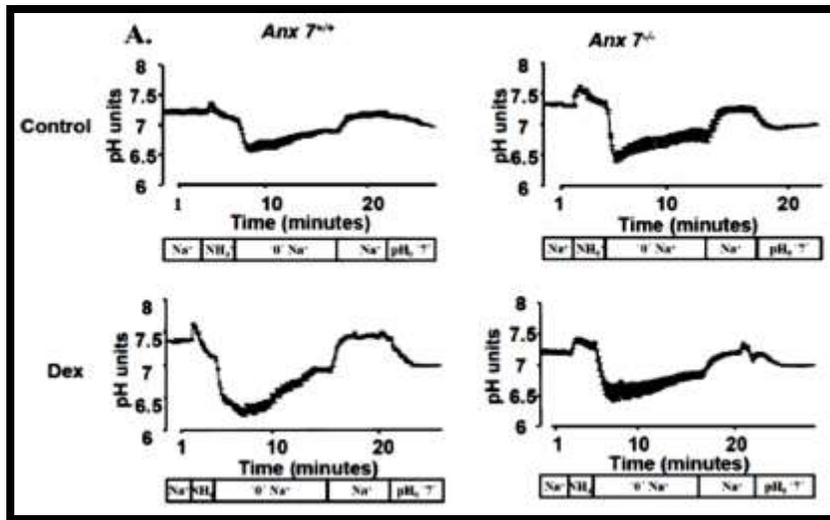


Figura 7: Diagrama de medición de la secreción ácida de una célula parietal estimulada, medida con BCECF. Tomado de: Pasham et al., (2013)

El modelo para medición de la secreción ácida con BCECF, las células son mantenidas en un medio que contenga HEPES y BCECF, para permitir el ingreso del BCECF a las células.

Luego de un breve enjuague con medio sin BCECF se realiza la excitación de la molécula a 440 y 490 nm y la medición de la fluorescencia resultante a 535 nm. Posteriormente se cambia el medio por una solución que no contenga Na^+ y se le agrega NH_4Cl , el cual carga las células alcalinizando el pH intracelular (la solución se disocia y NH_3 ingresa a las células para formar NH_4 con los iones H^+ citoplasmáticos alcalinizando el pH intracelular). Luego la solución de NH_4Cl se remueve del medio, permitiendo una recuperación del pH intracelular acidificando el pH intracelular a medida que las células parietales expulsan el NH_3 , lo cual es medido a través de la fluorescencia emitida por la célula (Lang et al., 2007; Pasham et al., 2011, 2013; Rotte, et al., 2009c; Rotte et al., 2010; Sandu et al., 2007).

3. Metodología

3.1 Diseño experimental

Como diseño metodológico se realizaron experimentos controlados, aleatorizados por bloques al azar (Brocklehurst & Hoare, 2017; Hernandez Sampieri et al., 2010). Se trabajó con tejido gástrico de ratas Wistar (Kanemasa et al., 1999), manteniendo todos los requisitos para investigación con animales de acuerdo con lo estipulado en la resolución N° 8430 de 1993, en título V, artículos 87 al 93, del Ministerio de Salud de la República de Colombia y los protocolos de bienestar animal estipulados en la guía para el manejo y uso de animales de laboratorio, del *National Research Council of the National Academies* y la Directiva Europea para el manejo de animales de laboratorio (*European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes*, 2010; *National Research Council of the National Academies*, 2011; República de Colombia, 1993).

3.2 Animales

3.2.1 Condiciones de alojamiento

Se emplearon 24 ratas Wistar Charles River® macho (Cadepond et al., 2014; Chuffa et al., 2011; Cubilla et al., 2013; Leo et al., 2004), de una edad igual o mayor a 30 días (Cummins et al., 1988; Williams et al., 2005), obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron mantenidos a lo largo del proceso experimental hasta la toma de muestras con condiciones controladas de humedad, luz, temperatura y ruidos, respetando los fotoperiodos de la especie. Para ello se empleó un cuarto especialmente acondicionado dentro del Laboratorio de Fisiología y Farmacología Veterinaria; allí se mantuvo a las ratas durante dos semanas, antes de la realización de los experimentos, con el fin de mitigar el estrés endógeno y adaptar a los animales a las condiciones del lugar.

Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* hasta el momento del experimento. Todos los procedimientos de manejo de animales se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos por el *National Research Council of the National Academies* y la legislación europea para la protección de animales usados para propósitos científicos (European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, 2010; National Research Council of the National Academies, 2011).

3.2.2 Criterios de exclusión

Animales cuya masa fluctuó en 50 g o más durante el transcurso del experimento o que mostraran signos de enfermedad infecciosa pre o posmortem, muestras gástricas contaminadas ya sea por hongos o bacterias.

3.2.3 Criterios de punto final

Animales que presentaran procesos de anorexia marcada, disminución en la capacidad de respuesta a estímulos visuales o táctiles, con marcado dolor, aumento de la frecuencia respiratoria marcado y otras sintomatologías que pudieran haberse presentado durante el proceso de experimentación que afectaran el bienestar y la calidad de vida de los individuos empleados (ojos hundidos, descarga nasal, estreñimiento, diarrea, disuria, depresión, pérdidas de movimiento) (CCAC, 1993; *National Research Council of the National Academies*, 2011).

3.2.4 Destino final de los animales

Las ratas de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificadas por desconexión de la médula espinal bajo anestesia durante el protocolo de toma de muestras establecido a continuación.

3.3 Toma de muestras de tejido gástrico

Para la toma de muestras de tejido gástrico, todos los animales fueron anestesiados con Isoflurano. Para la inducción anestésica, la concentración de Isoflurano empleada osciló entre 4 y 5%, circuito abierto con una máquina de gases anestésicos Penlon Prima®, en la cual se instaló un circuito abierto con máscara. (Galindo Zamora, 2009). Para constatar que el animal se encontraba bajo un proceso de anestesia profunda, se realizaron pruebas de dolor superficial y profundo (pellizcos con pinzas de garra en los músculos de las pantorrillas y en las almohadillas plantares), así como de reflejos (reflejo pupilar y de amenaza). Cuando los individuos daban negativo a todas las pruebas, se bajaba la concentración de isoflurano al 2% aproximadamente para mantener al animal anestesiado durante toda la cirugía.

Una vez anestesiados, los animales se colocaron en decúbito dorsal. A continuación, se realizó una incisión por la línea media abdominal de cada animal, de unos 4 cm, y se procedió a la exposición del estómago. Para la remoción estomacal se realizó una restricción con pinzas de la región cárdica y pilórica, y se procedió al corte con tijera recta.

Para el manejo del tejido gástrico se implementó el protocolo descrito por Gliddon et al (2008). Los estómagos obtenidos fueron abiertos longitudinalmente por la curvatura menor, para dejar expuesto el lumen estomacal y poder lavar el tejido. Los primeros 3 lavados se realizaron cada uno de ellos con 50 mL de solución salina fisiológica (SSF) 0,9% y Solución Krebs 1:1 atemperada 37°C; hasta que todo rastro de contenido gástrico fue eliminado. Se tuvo especial cuidado en manipular lo menos posible el epitelio gástrico para evitar dañar las glándulas presentes. A continuación, se realizó un segundo lavado en una solución de mantenimiento con 10 mL del medio seleccionado + Gentamicina 1% a 37°C (Freshney, 2011; Gliddon et al., 2008; Graham, 2002). Posteriormente se realizó un tercer lavado con la misma solución, se cambió de recipiente y se procedió a fraccionar el tejido gástrico para su uso en los tratamientos experimentales. Luego de la extracción del estómago, los animales fueron sacrificados bajo anestesia, mediante desconexión de la médula espinal en C1, usando tijeras rectas.

3.4 Evaluación de la secreción ácida gástrica

Para evaluar la secreción ácida gástrica (basal o estimulada), se midió el pH del medio de incubación como un indicador de dicha secreción. Para ello, se trabajó en placas de cultivo de 24 pozos donde cada pozo contenía 2 mL de medio de cultivo atemperado a 37° y con pH ajustado a 7,4.

En el caso de la secreción ácida basal, se utilizaron dos grupos experimentales: uno de ellos contenía tejido gástrico recién obtenido (un fragmento de 1 cm² por pozo), y un segundo grupo control con medio sin tejido.

En el caso de la secreción ácida estimulada, se agregó al medio de cultivo los fármacos respectivos (carbacol o dexametasona), como lo indican las figuras correspondientes.

Las mediciones de pH y temperatura se realizaron con un potenciómetro convencional Bante 210 (Bante Instruments©) sumergiendo el electrodo en el respectivo pozo conteniendo medio de incubación. Estas mediciones se hicieron por diferentes tiempos de incubación (0 a 120 minutos) según se indica en las correspondientes figuras.

3.5 Evaluación del comportamiento de diferentes medios de incubación

Para evaluar el comportamiento del pH de los diferentes medios de incubación en función del tiempo, se trabajó con placas de 24 pozos donde cada pozo contenía 2 mL de medio de cultivo seleccionado, atemperado a 37° y con pH ajustado a 7,4.

El pH y la temperatura del medio se midieron de la forma descrita anteriormente.

3.6 Análisis estadístico y presentación de datos

Los datos de pH obtenidos en cada experimento fueron analizados empleando el software GraphPad 6.01 (GraphPad Prism©). Los datos presentados en las gráficas o tablas, corresponden al promedio \pm desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM). En todos los experimentos se usaron 5 réplicas de cada condición experimental ($n=5$). Todos los datos obtenidos resultaron ser paramétricos, y fueron analizados aplicando

pruebas de ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los resultados con un $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Obtención del tejido gástrico de ratas Wistar

Utilizando el protocolo descrito en metodología para el proceso de inducción y mantenimiento anestésico, se observó que los animales anestesiados presentaban una excitación muy marcada al momento de ser manipulados para ponerles la mascarilla con isoflurano, este proceso de excitación tenía una duración aproximada de 10 segundos, luego de los cuales los animales perdían la conciencia y relajaban parcialmente sus extremidades. La concentración de isoflurano empleada (4-5%), permitió una sedación rápida (aproximadamente 30 segundos) de todos los animales empleados en este estudio. Además, a partir de este tiempo, se observó la pérdida de reflejos y la ausencia de respuesta al dolor en todos los animales evaluados. Estos resultados permiten concluir que el protocolo implementado para el proceso de anestesia fue exitoso. En la figura 8 se muestra un animal anestesiado con el protocolo establecido.



Figura 8: Animal anestesiado con isoflurano en decúbito lateral

Una vez anestesiados, se realizó una cirugía por la línea media abdominal de los animales. Un dato interesante del procedimiento en relación con el procedimiento implementado es que el tiempo total de la cirugía, desde la inducción anestésica hasta la remoción del estómago y posterior sacrificio del animal bajo anestesia, no superó los 5 minutos para todos los animales empleados en este estudio. La figura 9 muestra el posicionamiento de un animal para la realización del procedimiento quirúrgico.



Figura 9: Posicionamiento del animal para el procedimiento quirúrgico. La línea media del animal se resalta en color negro en la figura.

Posteriormente se procedió a la apertura del estómago por la curvatura menor. En este procedimiento se observó que todos los animales poseían una distensión estomacal marcada producto de la ingesta de alimento, por lo que la remoción del contenido gástrico fue un proceso bastante delicado. La distensión era más evidente hacia la región cárdica del estómago, la cual era fácilmente diferenciable de las otras regiones estomacales por su color blancuzco, apreciable desde el exterior del estómago. En la figura 10 se muestra un estómago obtenido de uno de los animales empleados en este trabajo (Figura 10A).

En la misma figura se muestra también un diagrama de las diferentes regiones anatómicas gástricas de importancia para este trabajo (Figura 10B).

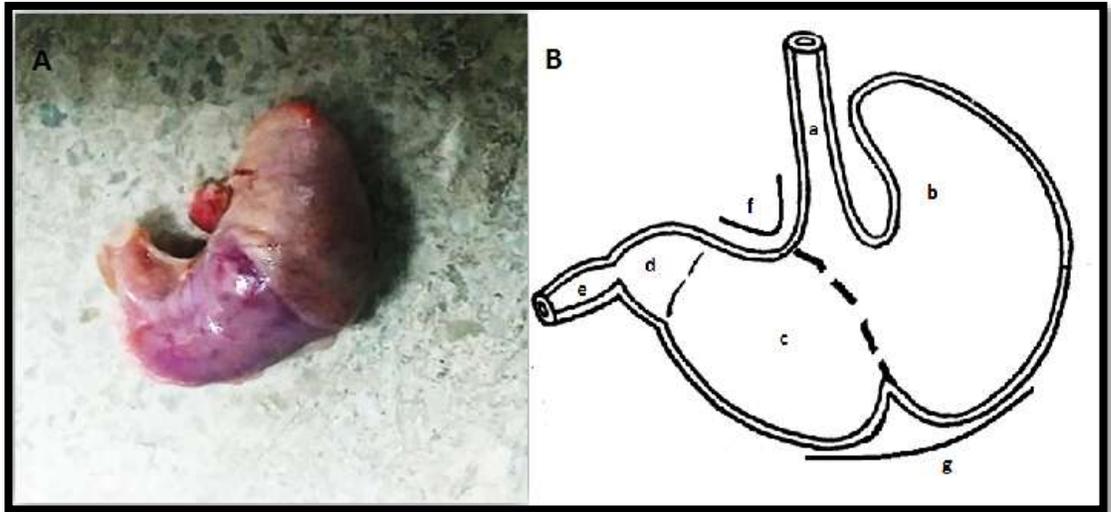


Figura 10: Imagen representativa de uno de los estómagos aislados de una rata Wistar. A. Imagen tomada de uno de los ejemplares obtenidos. B. Esquema de las partes del estómago de la rata en donde las letras representan diferentes porciones gástricas: a. Esófago, b. Región cárdica, c. Región fúndica, d. Región pilórica, e. Duodeno, f. Curvatura menor, g. Curvatura mayor. Imagen modificada de Florida Center for Instructional Technology (2019)

En cuanto a los procedimientos de lavado del estómago, inicialmente el protocolo contempló el lavado de la mucosa gástrica mediante presión de líquido utilizando una jeringa de 10 mL para eliminar los residuos de comida, pero este procedimiento generó daños en la mucosa gástrica evidenciados a través de marcas visibles en el tejido. Debido a esto, fue necesario agregar el líquido suave y cuidadosamente sobre el tejido, lo cual permitió que el fluido arrastrara todos los residuos de alimento de los pliegues gástricos. Esto se logró siempre después del segundo lavado. La figura 11 muestra un estómago lavado y listo para su procesamiento y posterior uso en los experimentos.



Figura 11: Estómago de una rata Wistar abierto longitudinalmente por la curvatura menor. Las partes del estómago se indican a continuación. a. Región cárdica, b. Región fúndica, c. Región pilórica.

El último paso consistió en la fragmentación del tejido gástrico con una tijera. Para ello fue necesaria la remoción de las regiones cárdica y pilórica, así como los dos esfínteres presentes en el estómago (cardias y píloro), dejando solo la región fúndica para su posterior procesamiento. De cada estómago se logró obtener un máximo de seis fragmentos de tejido (región fúndica) cada uno con un área aproximada de 1cm^2 ($1\text{cm} \times 1\text{cm}$) aproximadamente. La figura 12 muestra la porción fúndica de uno de los estómagos obtenidos (Figura 12A), y en la figura 12B se observa los seis fragmentos provenientes del estómago de un solo animal.

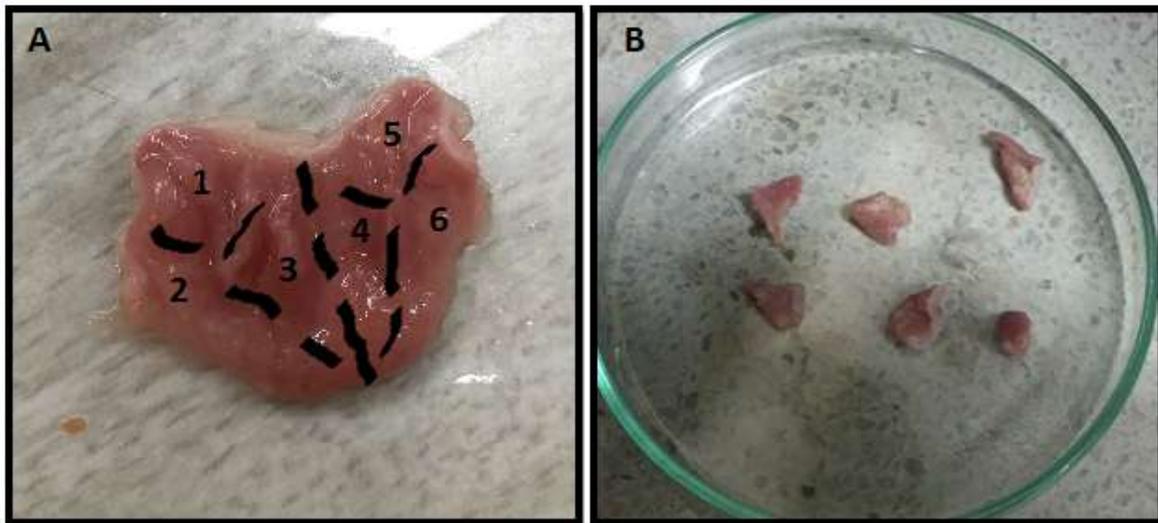


Figura 12: Región fúndica del estómago de una rata Wistar antes y después de fraccionar. A. Se indican los puntos de corte y los fragmentos resultantes para la fragmentación del tejido gástrico. B. Fragmentos de tejido gástrico en solución Krebs + Getamicina 10%.

Es importante señalar que, con el fin de fragmentos de tamaño homogéneo, se intentó usar un punzón de biopsia de piel. Sin embargo, el punzón dañó el epitelio al momento del corte, así que no fue posible homogenizar el tamaño de los fragmentos de tejido gástrico.

4.2 Secreción ácida gástrica basal

Para evaluar la secreción ácida gástrica basal se trabajó con placas de 24 pozos con 2 mL de medio Krebs en cada pozo. A un grupo de pozos se les colocó tejido gástrico (Estómago) y se evaluó el pH del medio en comparación con un grupo de pozos sin tejido (Control). Luego de lo cual se midió el pH del medio en ausencia de cualquier estímulo. Los resultados se muestran en la figura 13.

Se observa que en presencia de tejido gástrico (Estómago), el pH del medio fue aproximadamente menor que en el control sin tejido (Control) a todos los tiempos evaluados. Esta disminución fue estadísticamente significativa y el cambio de pH fluctuó entre 0,3 y 0,4 unidades de pH (Tabla 1). Dado que existía la posibilidad de que tal efecto fuese debido a una acidificación propia del metabolismo tisular y celular, se decidió comparar con un tejido diferente al gástrico como segundo control. Para esto se utilizó tejido cecal (Ciego), obtenido y procesado de igual manera que el tejido gástrico.

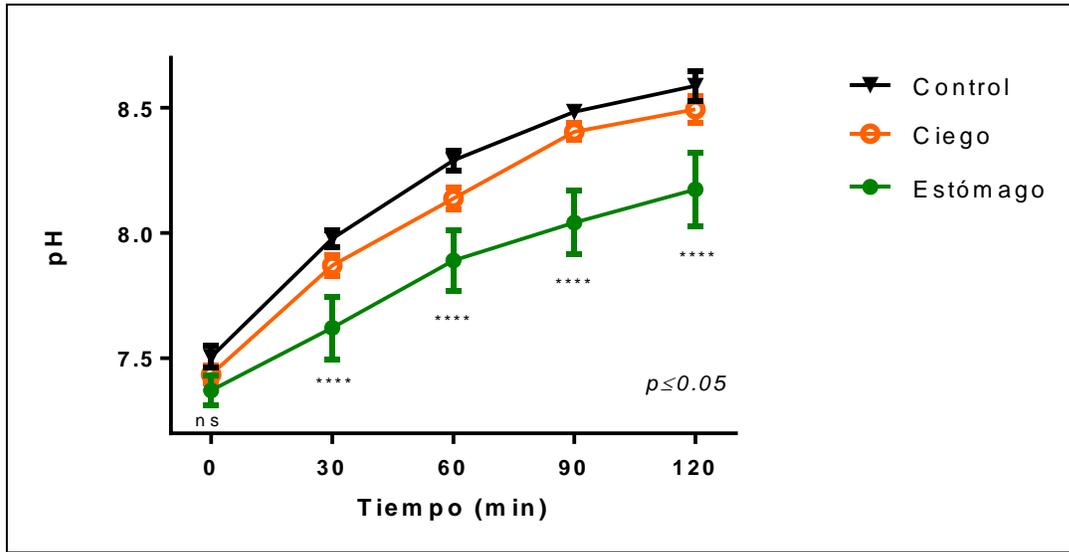


Figura 13: Secreción ácida gástrica basal. Se midió el pH a diferentes tiempos de incubación. Fragmentos de aproximadamente 1cm² de tejido gástrico (Estómago) o de ciego (Ciego) fueron colocados en una placa de 24 pozos y fueron incubados en 2 mL de medio Krebs por 0-120 minutos, después de lo cual se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Cada dato corresponde al promedio \pm desviación estándar (SD) de 5 réplicas ($n=5$). La comparación de los datos del grupo Control vs el grupo con tejido gástrico (Estómago), se realizó a través de una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. **** $p \leq 0,0001$; ns, no significativo.

En la figura 13 se observa que efectivamente el ciego produjo una disminución en el pH del medio, pero esta disminución no fue tan marcada como en el tejido gástrico. De hecho, la disminución fluctuó alrededor de 0,1 unidades de pH en la mayoría de los tiempos y, salvo para el tiempo 60 minutos, el análisis estadístico reveló que las diferencias no fueron significativas respecto al control (Tabla 1).

Esto nos permite concluir que la acidificación (descenso en el pH) observada en presencia de tejido gástrico se debe a la secreción ácida gástrica basal del tejido y no al efecto del metabolismo tisular, ya que al compararlo con otro tejido que no posee bombas de protones (Ciego), no se observó el mismo efecto.

Tabla 1: pH del medio como indicador de la secreción ácida gástrica basal

Tiempo (minutos)	pH			p ^a	p ^b	p ^c
	Control	Estómago	Ciego			
0	7,506 ± 0,044	7,372 ± 0,058	7,436 ± 0,036	0,0994	0,6096	0,6794
30	7,978 ± 0,034	7,622 ± 0,125	7,870 ± 0,042	< 0,0001	0,2369	0,0004
60	8,290 ± 0,040	7,890 ± 0,119	8,138 ± 0,042	< 0,0001	0,0497	0,0004
90	8,484 ± 0,024	8,042 ± 0,128	8,404 ± 0,034	< 0,0001	0,4954	< 0,0001
120	8,588 ± 0,058	8,174 ± 0,148	8,494 ± 0,052	< 0,0001	0,3520	< 0,0001

Se presenta el promedio y la desviación estándar (SD) de 5 réplicas ($n=5$). Los datos provienen del experimento mostrado en la figura 15 y fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Control vs Estómago.

^b: probabilidad estadística para la comparación Control vs Ciego.

^c: probabilidad estadística para la comparación Estómago vs Ciego.

Un hecho interesante de estos resultados fue observar que el pH del medio de incubación (medio Krebs) se hacía más alcalino a medida que transcurría el tiempo de incubación del experimento, lo cual se observa tanto en presencia como en ausencia de tejido (Figura 13).

Debido a esto, se decidió evaluar el comportamiento de este y otros medios de cultivo en ausencia de tejido, para ver si dicho patrón de alcalinización se mantenía. Se evaluaron tres medios de cultivo: Krebs, KRB y DMEM. Para ello se utilizaron placas de 24 pozos conteniendo 2 mL del respectivo medio en cada pozo, y se evaluó el pH en función del tiempo. Los resultados se presentan en la figura 14 y en la tabla 2.

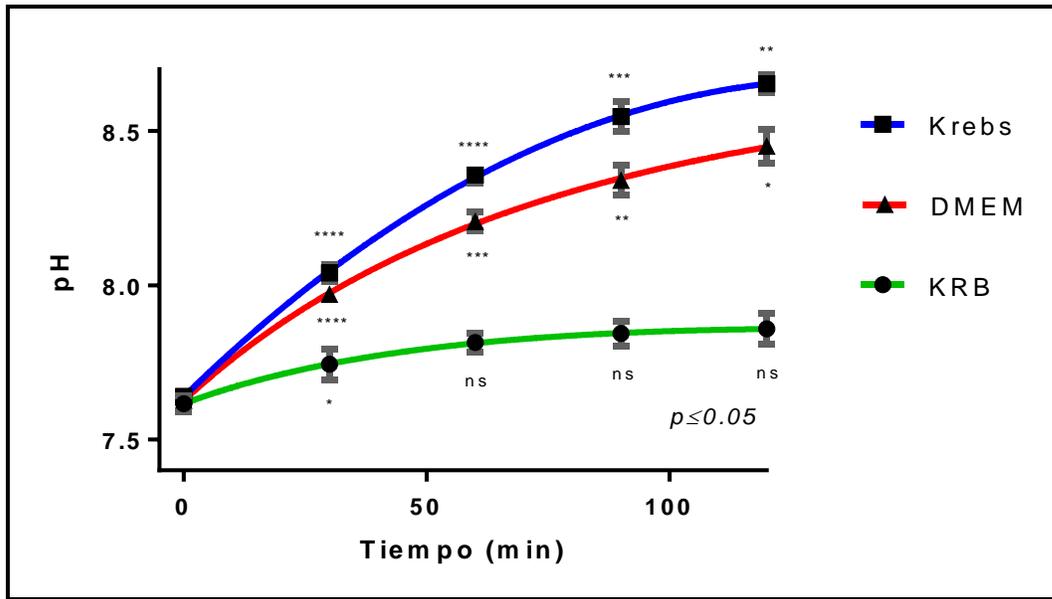


Figura 14: Comportamiento de distintos medios de incubación en función del tiempo. Se evaluaron de tres medios de cultivo en ausencia de tejido (KREBS, KRB y DMEM) en placas de 24 pozos conteniendo 2 mL de medio por pozo. El pH del medio se midió a los tiempos indicados usando un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Se representa el promedio y la SD de tres experimentos, cada uno de ellos por quintuplicado ($n=3$). El análisis estadístico comparó el pH en cada tiempo con respecto al tiempo anterior, empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Turkey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; ns, no significativo.

En todos los medios analizados se observó la misma tendencia a la alcalinización en función del tiempo, pero en los medios Krebs y DMEM la tendencia fue mayor. De hecho, para los medios Krebs y DMEM el pH aumentó en 1,01 y 0,82 unidades de pH a 120 minutos de incubación respectivamente, mientras que en KRB el pH aumentó 0,24 unidades de pH durante el mismo periodo de incubación (Tabla 2).

El análisis estadístico de los datos reveló que los cambios de pH fueron significativamente diferentes respecto al tiempo anterior en los medios Krebs y DMEM; en KRB el cambio fue significativo solo a los 30 minutos (Figura 14 y tabla 2). Se puede concluir que el medio KRB tiene mejor capacidad tamponante que los medios Krebs y DMEM.

Tabla 2: Cambio de pH vs tiempo en los diferentes medios de cultivo.

Tiempo (minutos)	pH			p ^a	p ^b	p ^c
	KRB	Krebs	DMEM			
0	7,616 ±	7.642 ±	7,626 ±	0,1716	0,7187	0,5157
	0,028	0,037	0,035			
30	7,744 ±	8,037 ±	7,971 ±	<	< 0,0001	<
	0,051	0,046	0,037			
60	7,814 ±	8,358 ±	8,206 ±	<	< 0,0001	<
	0,031	0,043	0,031			
90	7,843 ±	8,544 ±	8,340 ±	<	< 0,0001	<
	0,039	0,054	0,047			
120	7,858 ±	8,651 ±	8,450 ±	<	< 0,0001	<
	0,049	0,041	0,056			

Se presenta el promedio y la desviación estándar (SD) de 3 experimentos, cada uno de ellos con 5 repeticiones ($n=3$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Turkey.

^a: probabilidad estadística para la comparación Krebs vs KRB.

^b: probabilidad estadística para la comparación DMEM vs KRB.

^c: probabilidad estadística para la comparación Krebs vs DMEM

4.3 Secreción ácida gástrica estimulada farmacológicamente

A continuación, se procedió a evaluar la secreción ácida estimulada, para lo cual, se trabajó en placas de 24 pozos que contenían tejido gástrico en 2 mL de medio (KRB) por pozo. Un grupo de pozos se trató con carbacol 100 μ M (Cch 100) y el otro con SSF 0,9% (Vehículo). Se evaluó el pH del medio a diferentes tiempos de incubación (0-90 minutos). Los resultados se muestran en la figura 15.

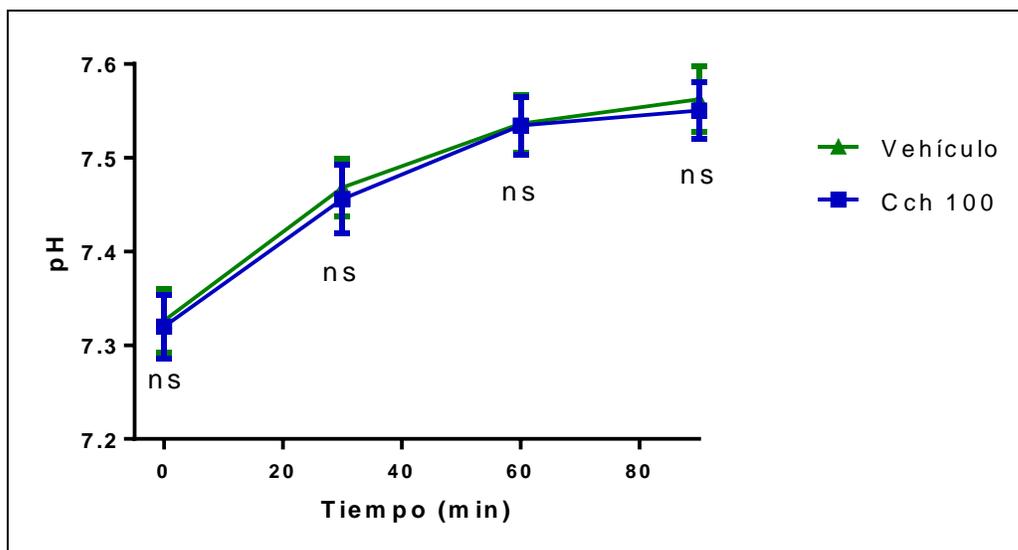


Figura 15: Efecto del carbacol sobre la secreción ácida gástrica en medio KRB. Fragmentos de aproximadamente 1cm² de tejido gástrico fueron colocados en una placa de 24 pozos y fueron incubados en 2 mL de medio KRB. Un grupo de pozos fue tratado con carbacol 100µM (Cch 100) y el otro grupo fue tratado con SSF (Vehículo) por diferentes tiempos, después de lo cual se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Se representa el promedio y la SD de 5 réplicas (*n*=5). La comparación entre el grupo Cch 100 y vehículo se realizó empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. ns, no significativo.

En primer lugar, se confirmó lo observado previamente, en cuanto a que existe una alcalinización del medio a medida que transcurre el tiempo, lo cual se observa tanto en el control sin estimular (Vehículo) como en el grupo estimulado con carbacol (Cch 100). Por otro lado, se observó que el pH del medio no disminuyó significativamente en respuesta al estímulo con carbacol (Cch 100). Esto es válido para cada uno de los periodos de tiempo evaluados. Todos los valores de pH y los respectivos resultados de los análisis estadísticos se presentan también en la tabla 3.

Tabla 3: Secreción ácida gástrica estimulada en el medio KRB

Tiempo (minutos)	pH		p ^a
	Vehículo	Cch 100	
0	7,326 ± 0,034	7,320 ± 0,034	0,9448
30	7,468 ± 0,031	7,456 ± 0,036	0,8005
60	7,536 ± 0,030	7,534 ± 0,030	0,9936
90	7,562 ± 0,031	7,550 ± 0,030	0,8005

Se muestra el promedio y la desviación estándar (SD) de las 5 ($n=5$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Vehículo vs Cch 100 μ M.

Este resultado sorprendente, se podría interpretar como la incapacidad del carbacol para estimular la secreción ácida gástrica bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, también existía la posibilidad de que el carbacol si estuviese estimulando la secreción ácida del tejido gástrico, pero que esta no haya sido observada debido a la mejor capacidad tamponante del medio KRB en el que se realizó este experimento. Con el fin de indagar acerca de estas diferentes posibilidades, se decidió realizar estos experimentos en un medio que fuera más sensible a los cambios de pH que el KRB. Para ello a continuación evaluamos la respuesta a la estimulación con carbacol en medio DMEM. Los resultados se presentan en la figura 16.

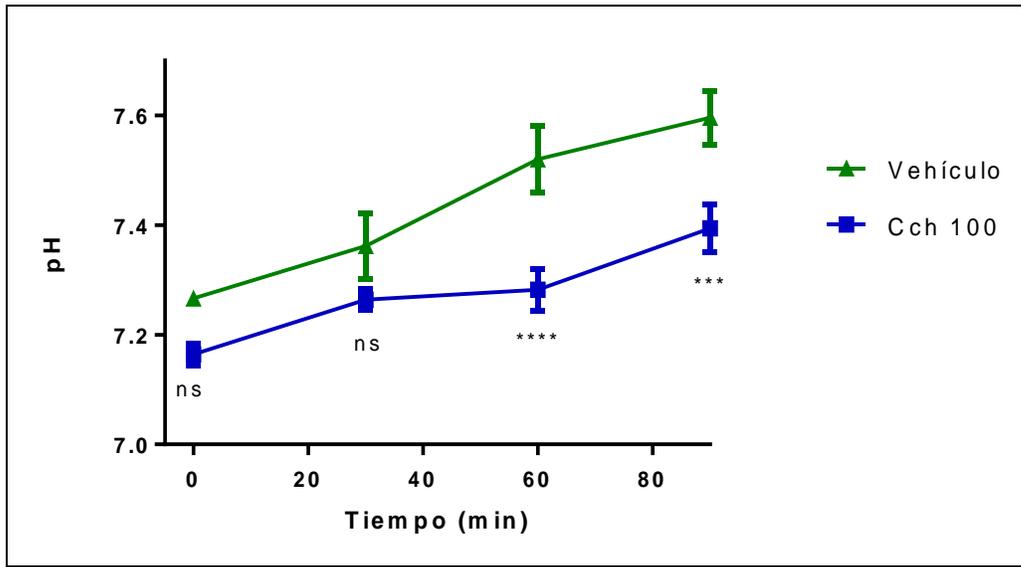


Figura 16: Efecto del carbacol sobre la secreción ácida gástrica en medio DMEM. Fragmentos de aproximadamente 1cm² de tejido gástrico fueron colocados en una placa de 24 pozos y fueron incubados en 2 mL de medio DMEM. Un grupo de pozos fue tratado con carbacol 100µM (Cch 100) y el otro grupo fue tratado con SSF (Vehículo) por diferentes tiempos, después de lo cual se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Se representa el promedio y el error estándar de la media (SEM) de 5 réplicas ($n=5$). La comparación entre el grupo Cch 100 y vehículo se realizó empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. *** $p\leq 0,001$; **** $p\leq 0,0001$; ns, no significativo.

Por un lado, nuevamente se confirma el efecto de alcalinización del medio a medida que transcurre el tiempo, tanto en el grupo control (Vehículo) como en el grupo estimulado con carbacol (Cch 100). Adicionalmente, se observa que el tratamiento con carbacol disminuyó el pH del medio, pero las diferencias solo fueron significativamente diferentes del control, a 60 y 90 minutos de tratamiento, con disminuciones en el pH 0,23 y de 0,2 unidades de pH respectivamente, como se indica en la tabla 4. Estas disminuciones significativas en el pH del medio, evidencian que el carbacol efectivamente estimuló la secreción ácida gástrica en nuestro modelo experimental *ex vivo*, y que la falta de efecto del carbacol en el medio KRB se debió a la mejor capacidad tamponante de este medio. Los valores de pH y los respectivos resultados de los análisis estadísticos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Secreción ácida gástrica estimulada en el medio DMEM

Tiempo (minutos)	pH		Δ pH	p ^a
	Vehículo	Cch 100	Cch 100 - Vehículo	
0	7,266 ± 0,027	7,164 ± 0,044	-0,102	0,0750
30	7,362 ± 0,134	7,264 ± 0,043	-0,098	0,0894
60	7,520 ± 0,134	7,282 ± 0,085	-0,238	< 0,0001
90	7,596 ± 0,110	7,394 ± 0,099	-0,202	0,0003

Se muestra el promedio y la desviación estándar (SD) de 5 repeticiones ($n=5$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Vehículo vs Cch 100.

Para confirmar aún más el punto anterior, se decidió evaluar el efecto del carbacol sobre la secreción ácida gástrica en el medio Krebs, que fue el medio que presentó la mayor sensibilidad a los cambios de pH, de acuerdo a lo visto previamente (Figura 14). Este medio Krebs, se usa frecuentemente para la realización de experimentos de órgano aislado con diferentes tejidos animales. Los resultados se presentan en la figura 17.

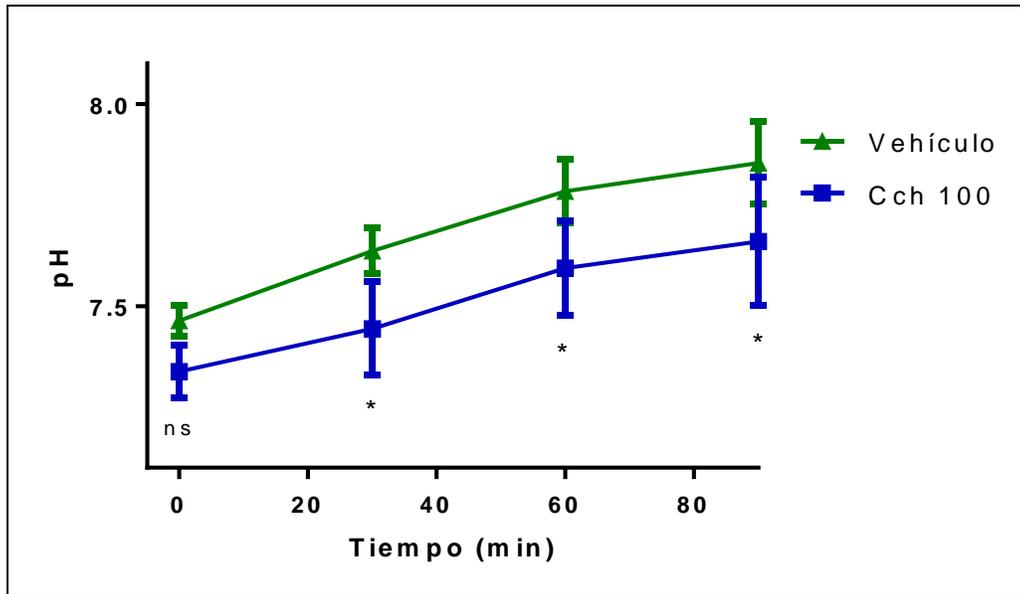


Figura 17: Efecto del carbacol sobre la secreción ácida gástrica en medio Krebs. Fragmentos de aproximadamente 1cm² de tejido gástrico fueron colocados en una placa de 24 pozos y fueron incubados en 2 mL de medio Krebs. Un grupo de pozos fue tratado con carbacol 100µM (Cch 100) y el otro grupo fue tratado con SSF (Vehículo) por diferentes tiempos, después de lo cual se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Se representa el promedio y la SD de 5 réplicas ($n=5$). La comparación entre el grupo Cch 100 y vehículo se realizó empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. * $p\leq 0,05$; ns, no significativo.

Se observa que el tratamiento con carbacol 100 µM indujo una caída en el pH del medio (Krebs) con respecto al control sin carbacol. Esta disminución fue significativa a 30, 60 y 90 minutos y representó caídas de aproximadamente 0,2 unidades de pH (Tabla 5). Este resultado evidencia un efecto activo del carbacol sobre la secreción ácida gástrica.

Tabla 5: Secreción ácida gástrica estimulada en el medio Krebs

Tiempo (minutos)	pH		Δ pH	p ^a
	Vehículo	Cch 100 μ M	Cch 100 - Vehículo	
0	7,464 \pm 0,084g	7,338 \pm 0,066	-0,126	0,1701
30	7,636 \pm 0,127	7,444 \pm 0,115	-0,192	0,0246
60	7,784 \pm 0,175	7,594 \pm 0,117	-0,19	0,0262
90	7,854 \pm 0,227	7,660 \pm 0,159	-0,194	0,0230

Se muestra el promedio y la desviación estándar (SD) de 5 repeticiones ($n=5$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Vehículo vs Cch 100 μ M.

Los resultados anteriores en su conjunto, nos permiten concluir que el carbacol efectivamente estimuló la secreción ácida gástrica y que para observar dicho efecto se debe trabajar con tejido gástrico incubado en medio Krebs o DMEM. Además, nuestros resultados evidencian que nuestro modelo de tejido gástrico *ex vivo* es funcional para evaluar la secreción ácida gástrica estimulada por carbacol.

Un hecho sorprendente al estudiar el efecto del carbacol, que no fue mencionado en las figuras anteriores (Figuras 16 y 17), tanto en el medio DMEM como Krebs, fue la observación de que la disminución en el pH se observó incluso a tiempo 0 de tratamiento con carbacol. Una posible explicación a esta observación es que el carbacol fuese una molécula de naturaleza ácida que por sí sola reduciría el pH del medio. A pesar de que esto es difícil debido a la naturaleza química de la molécula de carbacol (Figura 3), se decidió investigar este punto a través de un experimento en donde se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de carbacol sobre el pH del medio (Krebs) a través del tiempo, esto en ausencia de cualquier tejido. Los resultados de dicho experimento se presentan en la figura 18.

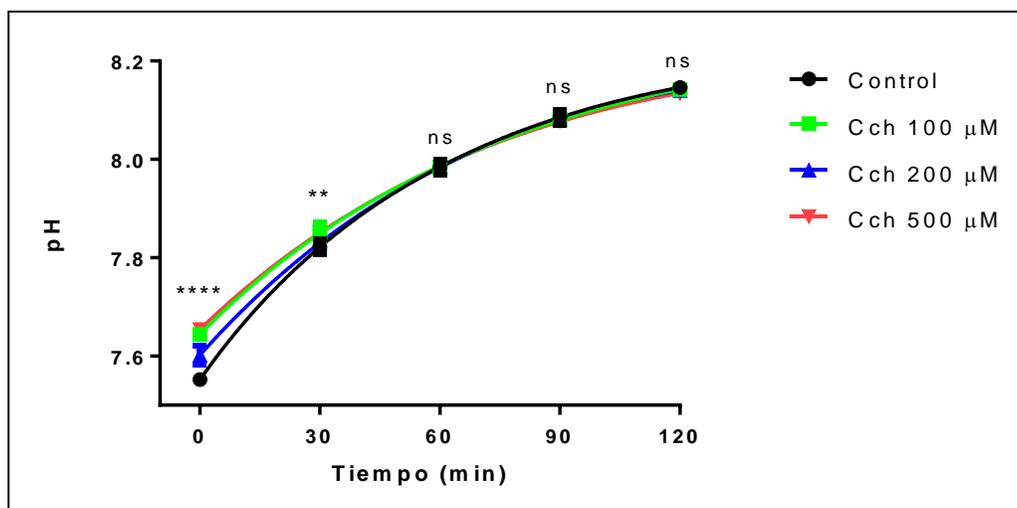


Figura 18: Efecto del carbacol sobre el pH del medio. Placas de 24 pozos conteniendo 2 mL de medio Krebs y diferentes concentraciones de carbacol: 0μM (Control), 100μM (Cch 100μM), 200μM (Cch 200μM) y 500μM (Cch 500μM), fueron incubadas a 37°C durante 0-120 minutos. Se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©) a distintos tiempos. Se representa el promedio y la SD de 5 réplicas ($n=5$). El análisis estadístico se realizó empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Solo se muestran los resultados de la comparación entre el grupo Cch 100 y el control. ** $p\leq 0,01$; **** $p\leq 0,0001$; ns, no significativo.

Se observó que, el carbacol mostró tener un efecto alcalinizante del medio, aumentando el pH significativamente a tiempos 0 y 30 minutos, a tiempos mayores no se observaron diferencias con respecto al control. Los valores de pH y los respectivos resultados de los análisis estadísticos se presentan en la tabla 6. Este resultado nos permite concluir que los efectos observados con carbacol, a tiempo 0, no se deben a una acidificación del medio por el fármaco, sino al hecho del que el fármaco estimula la secreción ácida de manera muy rápida.

Tabla 6: Efecto del carbacol en el pH del medio

Tiempo (minutos)	pH				p ^a	p ^b	p ^c
	Control	Cch 100 μM	Cch 200 μM	Cch 500 μM			
0	7,552 ± 0,013	7,644 ± 0,011	7,602 ± 0,019	7,654 ± 0,013	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
30	7,822 ± 0,015	7,850 ± 0,022	7,830 ± 0,019	7,852 ± 0,013	0,0018	0,6130	0,0008
60	7,984 ± 0,015	7,984 ± 0,011	7,984 ± 0,009	7,984 ± 0,005	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999
90	8,086 ± 0,015	8,082 ± 0,008	8,082 ± 0,008	8,078 ± 0,004	0,9209	0,9209	0,6130
120	8,146 ± 0,005	8,142 ± 0,004	8,140 ± 0,007	8,134 ± 0,005	0,9209	0,7856	0,2976

Se presenta el promedio y la desviación estándar (SD) de un experimento con 5 repeticiones ($n=5$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Control vs Cch 100 μM.

^b: probabilidad estadística para la comparación Control vs Cch 200 μM.

^c: probabilidad estadística para la comparación Control vs Cch 500 μM.

Habiendo establecido que en nuestro modelo experimental *ex vivo* si es posible valorar la secreción ácida gástrica, tanto basal como estimulada con carbacol, se decidió estudiar si nuestro modelo nos permitiría evaluar el efecto de los glucocorticoides sobre la secreción ácida gástrica. Para lo cual se analizó el efecto de la dexametasona 100 μM (Dex 100) en placas de 24 pozos con fragmentos de estómago que fueron colocados en 2 mL de medio Krebs cada uno y fueron tratados con carbacol 100 μM como control positivo (Cch 100). Como control negativo se empleó tejido gástrico tratado con un vehículo que fue SSF 0,9% (Vehículo). Los resultados se presentan en la figura 19.

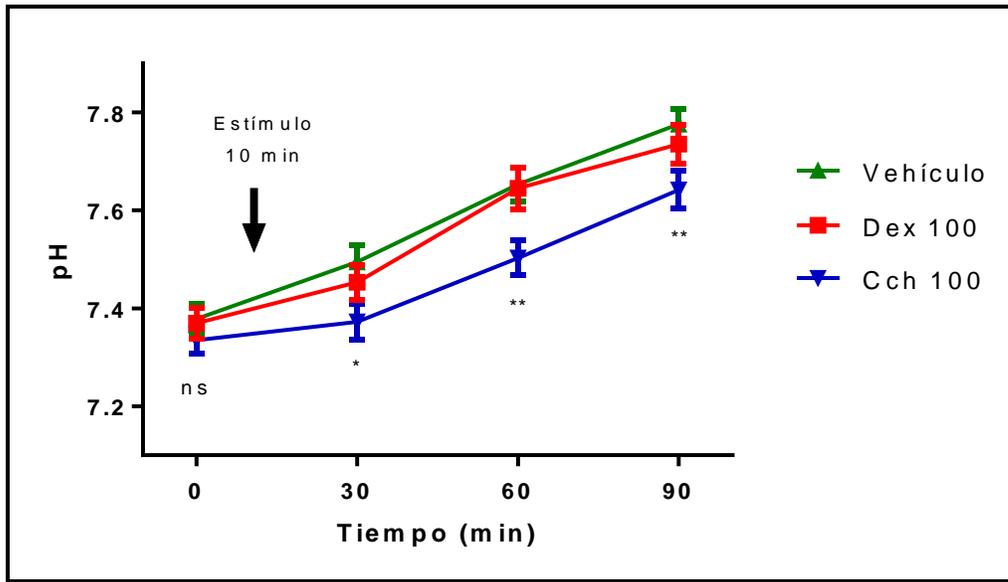


Figura 19: Efecto de la dexametasona sobre la secreción ácida gástrica en medio Krebs. Fragmentos de aproximadamente 1cm^2 de tejido gástrico fueron colocados en una placa de 24 pozos y fueron incubados en 2 mL de medio Krebs. Un grupo de pozos fue tratado con dexametasona $100\ \mu\text{M}$, otro grupo fue tratado con carbacol $100\ \mu\text{M}$ (Cch 100) y el último grupo fue tratado con SSF (Vehículo) por diferentes tiempos, después de lo cual se midió el pH del medio con un potenciómetro Bante 210 (Bante Instruments©). Se representa el promedio y la SD de 5 réplicas ($n=5$). La comparación entre los grupos experimentales se realizó empleando una ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. En la figura solo se muestran los resultados de la comparación Cch 100 y vehículo. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; ns, no significativo.

En primer lugar, se observó que el efecto del carbacol, en este caso usado como control positivo, reprodujo los efectos sobre la secreción ácida descritos previamente. En efecto a 30, 60 y 90 minutos de tratamiento, redujo significativamente el pH del medio en 0,12, 0,15 y 0,13 unidades de pH respectivamente, comparado con el vehículo (Figura 19 y tabla 7).

Tabla 7: Efecto del tratamiento con carbacol y dexametasona sobre el pH del medio

Tiempo (minutos)	pH			Δ pH		p ^a	p ^b
	Vehículo	Cch 100 μM	Dex 100 μM	Cch 100μM - Vehículo	Dex 100μM - Vehículo		
0	7,379 ± 0,135	7,335 ± 0,122	7,370 ± 0,143	-0,044	-0,009	0,6300	0,9949
30	7,495 ± 0,152	7,373 ± 0,162	7,453 ± 0,158	-0,122	-0,042	0,0158	0,6621
60	7,653 ± 0,154	7,503 ± 0,157	7,645 ± 0,188	-0,15	-0,008	0,0020	0,9957
90	7,776 ± 0,140	7,642 ± 0,172	7,735 ± 0,175	-0,134	-0,041	0,0069	0,6700

Se presenta el promedio y la desviación estándar (SD) de 4 experimentos, cada uno de ellos con 5 repeticiones ($n=4$). Los datos fueron analizados empleando un test ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

^a: probabilidad estadística para la comparación Vehículo vs Cch 100 μM.

^b: probabilidad estadística para la comparación Vehículo vs Dex 100 μM.

Por su parte, al evaluar el efecto de dexametasona 100 μM, este fármaco no tuvo efectos significativos sobre el pH del medio respecto al control (Vehículo). Aun así, es interesante observar que a tiempos 30 y 90 minutos, dexametasona presentó una tendencia a reducir el pH del medio en 0,042 y 0,041 unidades de pH respectivamente (Tabla7).

Los resultados obtenidos hasta aquí, en su conjunto, nos permiten concluir que el modelo experimental *ex vivo* propuesto, nos permite evaluar la secreción ácida gástrica, tanto basal, como estimulada por carbacol. Sin embargo, no fue posible aplicar este modelo para evaluar el efecto de la dexametasona sobre la secreción ácida gástrica.

5. Discusión

El presente estudio se planteó con el fin de poder disponer de un modelo experimental que nos permita estudiar los mecanismos implicados en la secreción ácida gástrica en respuesta a glucocorticoides. Para ello se decidió implementar un modelo *ex vivo* para medir la secreción ácida gástrica. El uso de modelos animales *ex vivo* es una herramienta bastante útil para estudiar ciertos fenómenos fisiológicos, mientras se cumplan los requisitos éticos para investigación con animales (CCAC, 1993; European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, 2010; Freshney, 2011). Bajo este precepto, el trabajo aquí presentado se ajusta a los estándares éticos y a los protocolos vigentes para el mantenimiento y manejo de animales de laboratorio.

5.1 Protocolo para la obtención del tejido gástrico

El procedimiento inicial de este trabajo implicó establecer un protocolo para obtener el tejido gástrico, lo cual significó implementar procedimientos de inducción y mantenimiento anestésico, así como procedimientos quirúrgicos para obtener el estómago del animal y los fragmentos de tejido gástrico derivados de la porción fúndica del mismo. En cuanto al protocolo de inducción y mantenimiento anestésico, el uso de isofluorano para la inducción anestésica, aunque no está recomendado por algunos autores debido a la marcada excitación que puede generar en los animales (Galindo Zamora, 2009), es aún utilizado por ser un procedimiento que no genera dolor al animal y el grado de invasividad es bajo en comparación con otras técnicas de inducción anestésica (Fish et al, 2008; National Research Council of the National Academies, 2011). En nuestro caso si observamos procesos de excitación marcada en todos los animales empleados, pero la excitación desapareció a los 10 segundos de iniciado el procedimiento y finalmente el proceso anestésico fue muy rápido en todos los animales (menor o igual a 30 segundos).

Lo ideal en nuestro estudio hubiese sido trabajar con glándulas gástricas aisladas, o con cultivos primarios de células parietales (células encargadas de la secreción ácida en dichas glándulas). De hecho, en un principio intentamos obtener epitelio del *fundus* gástrico para de allí aislar glándulas gástricas por desagregación mecánica, pero este procedimiento requiere un alto grado de entrenamiento (Paradiso et al., 1989; Sandu et al., 2007; Rotte

et al., 2009b, 2009a; Rotte et al., 2010; Pasham et al., 2013) y todos nuestros intentos fueron infructuosos porque el tejido gástrico se deterioraba y la integridad de las glándulas se veía bastante comprometida, lo que se evidenció a través de microscopio óptico, razón por la cual se descartó dicha posibilidad. En cuanto a la posibilidad de trabajar con cultivos primarios de células parietales, es una opción que tiene sus inconvenientes debido a que las células parietales en cultivo pierden su polaridad al no ser estimuladas continuamente y por ende, pierden la capacidad de generar canalículos apicales necesarios para la secreción ácida (Terano et al., 1982; Okada & Ueda, 1984; Chew et al, 1989; Paradiso et al., 1989; Graham, 2002; Gliddon et al., 2008; Schumacher et al., 2015).

En cuanto al procedimiento de obtención de glándulas gástricas, además de las dificultades recién mencionadas, tiene el inconveniente de que se requieren muchos animales para implementar y estandarizar dichos protocolos y dado que el estudio debe mantener estándares altos de bioética, el principio de reducción del número de animales empleados en el protocolo de desagregación mecánica de las glándulas gástricas no sería posible (European Parliament, 2010; National Research Council of the National Academies, 2011). Utilizando este procedimiento logramos obtener tejido gástrico viable y funcionalmente activo en términos de la secreción ácida.

5.2 Secreción ácida gástrica

Utilizando el tejido gástrico obtenido siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se evaluó la secreción ácida gástrica en un modelo *ex vivo*. Primero se evaluó la capacidad del tejido *ex vivo* en términos de la secreción basal, encontrando que efectivamente se logró medir dicha secreción en un medio de cultivo Krebs. De hecho, en este medio observamos una acidificación del medio conteniendo tejido gástrico de 0,3-0,4 unidades de pH comparado con el medio control.

Inicialmente se decidió utilizar medio Krebs, porque es un medio que provee los requerimientos necesarios al tejido gástrico para su adecuado funcionamiento, ya que posee todos los componentes esenciales para la secreción de hidrogeniones, incluyendo iones como K^+ , Cl^- o gases como CO_2 (Barret et al., 2010; Hall & Guyton, 2011).

Estos experimentos nos permitieron observar que el medio se alcalinizaba con el tiempo, tanto en presencia o ausencia de tejido, lo cual afectaría nuestras mediciones. Por ello se

decidió evaluar también el efecto del medio, como una variable importante para el desarrollo de nuestro modelo. Otros medios evaluados fueron el medio DMEM y el medio KRB. Los resultados mostraron que los medios Krebs y DMEM fueron los más sensibles en términos de las variaciones de pH en función del tiempo, mientras que KRB mostró la mejor capacidad tamponante, con menores variaciones del pH en función del tiempo. Aunque KRB posee las mismas sales que los medios Krebs y DMEM, la versión empleada para el experimento contiene HEPES, mientras que DMEM y Krebs carecen de este componente.

El HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfónico) es un buffer ampliamente empleado en medios de cultivo, y su principal característica es mantener el pH del medio independientemente de las concentraciones de CO₂ del medio (Baicu & Taylor, 2002).

En cuanto a la secreción ácida estimulada se empleó un fármaco que ha sido ampliamente descrito para estimular los receptores muscarínicos de las células parietales, el carbacol (Sakamoto et al., 1986; Masayoshi et al., 1990; Sandu et al., 2007). La dosis de carbacol reportada en la literatura para estimular la secreción ácida gástrica varía desde 0,1 µM en un estudio con glándulas gástricas aisladas (Masayoshi et al., 1990), hasta 100 µM en un estudio con células parietales aisladas (Sandu et al., 2007). En nuestro estudio se empleó a una concentración de 100 µM. Bajo estas condiciones en nuestro modelo *ex vivo*, se observó secreción ácida del tejido gástrico en los medios Krebs y DMEM, mientras que en el medio KRB no se observó secreción ácida estimulada por carbacol. Estos resultados concuerdan con lo discutido previamente acerca de la capacidad tamponante del medio KRB y nos permiten proponer un modelo de secreción *ex vivo* utilizando los medios Krebs o DMEM.

Otro fármaco empleado en nuestro modelo *ex vivo* para estimular la secreción ácida gástrica fue la dexametasona, que en modelos celulares ha sido un potente estimulador de la secreción ácida gástrica, evaluado principalmente a través de indicadores fluorescentes de pH (Sandu et al., 2007; Rotte et al., 2009c; Pasham et al., 2013). Sin embargo, en nuestro modelo *ex vivo* no fue posible observar dicho efecto estimulador.

Una posible explicación a este resultado es que se emplearon tiempos de estimulación muy cortos (0-90 minutos), en comparación a los mayores tiempos de estimulación descritos en la literatura (Días). Sin embargo, con nuestro modelo experimental, aumentar

los tiempos de incubación no es posible sin la utilización de una incubadora de CO₂, que nos permita evaluar los efectos de la dexametasona en periodos de tiempo más largos. Esto se contempla a futuro. Otra posibilidad podría ser que la sensibilidad de los métodos de medición de pH sea diferente.

5.3 Ventajas y desventajas del modelo propuesto

Uno de los problemas encontrados en nuestro modelo experimental propuesto fue el observar alcalinización del medio a lo largo del tiempo. Esto se debe a que los medios empleados poseen entre sus componentes al menos un sistema tampón ácido carbónico/bicarbonato, que toma CO₂ del ambiente para convertirlo lentamente en ácido carbónico (ninguno de los medios empleados posee anhidrasa carbónica) y así mantener el pH del medio alrededor de 7,4 que es el pH fisiológico de la sangre (Barret et al., 2010; Freshney, 2011; Hall & Guyton, 2011; Arora, 2013). La pérdida de CO₂ del medio determina el rango de tiempo máximo para el funcionamiento del modelo, debido a que alcaliniza el pH del medio y los tejidos animales salvo alguna especialización, no sobreviven muy bien inmersos en un medio con pH alcalino (Barret et al., 2010; Hall & Guyton, 2011; Arora, 2013). La primera solución planteada para la pérdida de CO₂ fue el uso de una incubadora de CO₂, pero en los laboratorios donde se realizó el proyecto no fue posible disponer de ella por emplearse para cultivos celulares y las mediciones constantes de pH en nuestro modelo afectarían la esterilidad de los demás cultivos celulares. Una segunda opción fue el uso de CO₂ para burbujear cada uno de los pozos, pero esto implicaría el uso de mangueras liberando el gas, que alterarían el volumen final de cada pozo y podrían mezclar los contenidos los pozos cercanos. Así, decidió burbujear CO₂ a los medios antes de iniciar el experimento, y evaluar los rangos de tiempo en los cuales el sistema es funcional. Bajo las condiciones experimentales presentadas, esto representa una clara limitación de nuestro modelo *ex vivo*. A su vez, esta limitación representa un estímulo para continuar refinando nuestro modelo experimental.

El modelo *ex vivo* presentado aquí, posee ciertas desventajas comparado con los modelos de órgano aislado. Por ejemplo, el modelo de baño de órganos es capaz de mantener el pH del medio estable, lo que lleva a una mayor viabilidad del tejido y a mediciones por tiempos más prolongados (Masuda et al., 2000; Keshavarz et al., 2007; Okuda et al., 2009; Yaşar et al., 2015). Sin embargo, nuestro modelo *ex vivo* tiene ventajas sobre el modelo de órgano aislado como la facilidad para el montaje dado que no requiere de sensores

complicados ni bombas peristálticas para mantener el tejido vivo. Esto es útil a la hora de evaluar los efectos agudos de fármacos sobre la secreción ácida gástrica.

Otra ventaja de nuestro modelo, radica en el bajo número de animales utilizados. En efecto, en todo este trabajo se utilizaron tan solo 24 animales, por su parte, el modelo de órgano aislado requiere del uso de un estómago completo para cada medición de la secreción ácida. Mientras que nuestro modelo *ex vivo* permite la evaluación de seis mediciones de secreción ácida a partir de un solo estómago, lo que se traduce en mejoras en cuanto al número de animales utilizados y en optimización en el uso del tejido (European Parliament, 2010; National Research Council of the National Academies, 2011).

En términos de manejo del tejido gástrico, nuestro modelo experimental posee ventajas en comparación con los modelos de medición que incluyen cánulas o cirugías complicadas. En efecto, la complejidad de los procedimientos quirúrgicos empleados en los otros modelos es mayor, requiriendo tiempos de hasta 30 minutos por animal (Ghosh & Schild, 1958; Wiederanders et al., 1960; Fordtran & Walsh, 1973; Wallmark et al., 1985; Sandvik et al., 1987; Takahashi et al., 1999; Wang et al., 2019). Mientras que en nuestro modelo el tiempo de obtención y procesamiento del tejido gástrico no superó los 10 minutos por animal.

En comparación con los métodos que emplean la titulación, ya sea manual o por medio de un pH-stato, los potenciómetros convencionales poseen una sensibilidad bastante buena, ya que usualmente poseen un rango de error de 0,01 unidades de pH (Bante Instruments, 2019). El problema que poseen los pH-statos se da al trabajar con concentraciones variables de CO₂, ya que esta variación puede afectar la sensibilidad del aparato y evitar una titulación continua de la solución problema (Ficara et al., 2003).

Es muy difícil comparar la sensibilidad del método propuesto aquí con la de un fluoróforo como el BCECF. En el caso del fluoróforo, se puede detectar el pH de una sola célula aislada del tejido (Rotte et al., 2009; Rotte et al., 2009b; Pasham et al., 2011; Pasham et al., 2013); mientras que el modelo *ex vivo* aquí propuesto, genera una medición basada en el número de células y glándulas presentes en cada uno de los fragmentos de tejido empleados.

En conclusión, con este trabajo se ha logrado establecer un modelo *ex vivo* para evaluar la secreción ácida gástrica, tanto basal como estimulada por carbacol. Se requieren más estudios para aplicar este modelo a la evaluación de diferentes fármacos y sustancias.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Se estableció un protocolo para la obtención de tejido gástrico de ratas Wistar, siguiendo las directrices internacionales para el manejo de animales de laboratorio y con los protocolos quirúrgicos adecuados.
- Se estandarizó un modelo para evaluar *ex vivo* la secreción ácida en tejido gástrico de ratas Wistar.
- Se determinaron las condiciones experimentales necesarias para evaluar la secreción ácida gástrica basal en el modelo *ex vivo*
- Se determinaron las condiciones experimentales necesarias para evaluar la secreción ácida gástrica estimulada con carbacol en el modelo *ex vivo*.
- Se observaron diferencias en el comportamiento de los diferentes medios de cultivo utilizados para evaluar la secreción ácida gástrica. Los medios que mejor se comportaron Krebs y DMEM.
- La estimulación con dexametasona no tuvo efectos significativos sobre la secreción ácida gástrica bajo las condiciones ensayadas en nuestro modelo *ex vivo*.
- El modelo propuesto debería ser útil para estudiar la respuesta aguda de la secreción ácida gástrica (máximo 120 minutos).

6.2 Recomendaciones

- Continuar con la evaluación del modelo, analizando su respuesta frente a una batería de fármacos u hormonas que tengan efecto conocido sobre la secreción ácida, ya sea un efecto estimulador (histamina, gastrina), como inhibidor (ranitidina, omeprazol).
- Continuar el estudio sobre el efecto de la dexametasona, en especial a través de intervenciones farmacológicas *in vivo* y evaluar los resultados para confirmar o descartar con el modelo establecido.
- Emplear una incubadora de CO₂, para mantener las condiciones del medio estables y lograr una mejor medición de la secreción ácida.
- Aislar las glándulas gástricas para evitar reacciones metabólicas tisulares (“ruido de fondo”) que puedan alterar la medición de la secreción ácida gástrica.
- Intentar establecer un modelo de medición de la secreción ácida gástrica a partir de un cultivo primario 3D de células parietales.

A. Anexo: Composición medio KRB

KRB		
Solución madre (ajustar a pH 7.4) 1L		
NaCl	0,748	Gramos
KCl	0,0385	Gramos
KH ₂ PO ₄	0,0178	Gramos
CaCl ₂ (H ₂ O)	0,0547	Gramos
MgSO ₄ (H ₂ O)	0,0322	Gramos
Hepes	2,38	Gramos
Glucosa	1,08	Gramos
NaHCO ₃	0,126	Gramos

B. Anexo: Composición medio Krebs

Krebs	
Solución madre (ajustar a pH 7.4) 1L	
NaCl	34,78 Gramos
KCl	3,5 Gramos
KH ₂ PO ₄	1,63 Gramos
CaCl ₂ (H ₂ O)	1,602 Gramos
MgSO ₄ (H ₂ O)	2,95 Gramos
EDTA	0,111 Gramos
Ácido ascórbico	1,056 Gramos
Glucosa	1,98 Gramos
NaHCO ₃	2,1 Gramos
Carbógeno x 15 min	

Bibliografía

- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3(175), 1–29. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Bante Instruments. (2019). Bante 210. In *Bante Benchtop pH meter*. Retrieved from <http://www.bante-china.com/enproductsview/925.html>
- Barret, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. L. (2010). *Ganong's Review of a Medical Physiology* (23rd ed.). Mc Graw Hill.
- Brocklehurst, P., & Hoare, Z. (2017). How to design a randomized controlled trial. *British Dental Journal*, 222(9), 721–726. <https://doi.org/DOI: 10.1038/sj.bdj.2017.411>
- Cadepond, F., Ulmann, A., & Ru, B. E. E. (2014). *RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of Action and Clinical Uses*. 486(June), 129–156. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.48.1.129>
- CCAC. (1993). Guide to the Care and Use of Experimental Animals. In *©Canadian Council on Animal Care* (Vol. 1).
- Chew, C. S., Ljungstrom, M., Smolka, A., & Brown, M. R. (1989). Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 256(1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1989.256.1.g254>
- Chuffa, L. G. a, Seiva, F. R. F., Fávoro, W. J., Teixeira, G. R., Amorim, J. P. a, Mendes, L. O., ... Martinez, F. E. (2011). Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 9(April 2016), 108. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-108>
- Cubilla, M. A., Bermúdez, V., Marquioni Ramella, M. D., Bachor, T. P., & Suburo, A. M. (2013). Mifepristone, a blocker of glucocorticoid receptors, promotes photoreceptor death. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(1), 313–322. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10014>

- Cummins, A. G., Steele, T. W., Labrooy, J. T., & Shearman, D. J. C. (1988). Maturation of the rat small intestine at weaning: Changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut*, 29(12), 1672–1679. <https://doi.org/10.1136/gut.29.12.1672>
- Cunningham, J. G. (2003). Textbook of Veterinary Physiology. In *The Veterinary Journal* (Vol. 165). [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00181-8)
- Durham, R. M., & Shapiro, M. J. (1991). Stress gastritis revisited. *The Surgical Clinics of North America*, 71(4), 791–810. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)45486-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)45486-1)
- European Parliament. (2010). Directive 2010/63/EU - On the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, 33–79. <https://doi.org/32010L0063>
- Ficara, E., Rozzi, A., & Cortelezzi, P. (2003). Theory of pH-stat titration. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1), 28–37. <https://doi.org/10.1002/bit.10541>
- Fish, R., Danneman, P., Brown, M., & Karas, A. (2008). Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. In *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373898-1.X5001-3>
- Florida Center for Instructional Technology. (2019). ClipArt ETC-Rat stomach. Retrieved July 14, 2019, from https://etc.usf.edu/clipart/48200/48269/48269_rat_stomach.htm
- Fordtran, J. S., & Walsh, J. H. (1973). Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating. Results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(3), 645–657. <https://doi.org/10.1172/JCI107226>
- Freshney, R. I. (2011). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Galindo Zamora, V. (2009). *Guía práctica de anestesia en pequeños animales* (First Edit; Laboratorios Chalver, Ed.).
- Ghosh, M. N., & Schild, H. (1958). Continuous recording of the acid gastric secretion in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 13, 54–61.
- Ghosh, T., Lewis, D. I., Axon, A. T. R., & Everett, S. M. (2011). Review article: Methods of measuring gastric acid secretion. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(7), 768–781. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04573.x>
- Gliddon, B. L., Nguyen, N. V, Gunn, P. a, Gleeson, P. a, & van Driel, I. R. (2008). Isolation, culture and adenoviral transduction of parietal cells from mouse gastric mucosa.

- Biomedical Materials (Bristol, England)*, 3(3), 034117. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034117>
- Graham, J. (2002). Purification of Parietal and Chief Cells from the Gastric Mucosa. *The Scientific World JOURNAL*, 2, 1650–1653. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.853>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. In *Physiology* (12 Edition). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hernandez Sampieri, R., Fernandez Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2010). Metodología de La Investigación. Quinta Edición. *Metodología de La Investigación*, 76–88. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kanemasa, H., Ozawa, H., Konishi, H., Ito, T., Nishi, M., Mitsufuji, S., ... Kawata, M. (1999). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity in gastric mucosa of normal and adrenalectomized rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 44(10), 2081–2087. <https://doi.org/10.1023/A:1026686705421>
- Keshavarz, M., Afshin, S., & Djahanguiri, B. (2007). Effects of washout following indomethacin administration on electrical field stimulation-induced isolated rat gastric fundus strip contractions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(9), 1456–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04860.x>
- Lang, P. A., Schniepp, R., Kirchoff, P., Socrates, T., Sidani, S. M., & Geibel, J. P. (2007). PI3 kinase dependent stimulation of gastric acid secretion by dexamethasone. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(5), 527–534. <https://doi.org/10.1159/000107536>
- Leo, J. C. L., Guo, C., Woon, C. T., Aw, S. E. N. G., & Lin, V. C. L. (2004). *Glucocorticoid and Mineralocorticoid Cross-Talk with Progesterone Receptor to Induce Focal Adhesion and Growth Inhibition in Breast Cancer Cells*. 145(1314), 1314–1321. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0732>
- Li, Y. M., Lu, G. M., Zou, X. P., Li, Z. S., Peng, G. Y., & Fang, D. C. (2006). Dynamic functional and ultrastructural changes of gastric parietal cells induced by water immersion-restraint stress in rats. *World Journal Of Gastroenterology*, 12(21), 3368–3372.
- Lindström, E., Chen, D., Norlén, P., Andersson, K., & Håkanson, R. (2001). Control of gastric acid secretion: the gastrin-ECL cell-parietal cell axis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 128(3), 505–514. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00331-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00331-7)
- Masayoshi, K., Tatsuya, H., Arata, I., Eizo, K., & Nishio, H. (1990). Carbachol-induced potentiation and inhibition of acid secretion by guinea pig gastric gland. *European Journal of Pharmacology*, 178(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)94793-W](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)94793-W)

- Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., ... Kangawa, K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 905–908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3568>
- Messer, J., Reitman, D., Sacks, H., Smith, H., & Chalmers, T. (1983). Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. *New England Journal of Medicine*, 309, 21–24.
- Mills, J. C., Syder, a J., Hong, C. V, Guruge, J. L., Raaii, F., & Gordon, J. I. (2001). A molecular profile of the mouse gastric parietal cell with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13687–13692. <https://doi.org/10.1073/pnas.231332398>
- Muszyński, J., Ziólkowski, B., Kotarski, P., Niegowski, A., Górnicka, B., Bogdańska, M., ... Siemińska, J. (2016). Gastritis – facts and doubts. *Gastroenterology Review*, 4(4), 286–295. <https://doi.org/10.5114/pg.2016.57793>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (n.d.). Carbastat, CID=2551. Retrieved June 14, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbastat>
- National Research Council of the National Academies. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Eighth Edi, Vol. 46). https://doi.org/10.1163/1573-3912_islam_DUM_3825
- Negulescu, P. A., & Machen, T. E. (1990). Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods in Enzymology*, 192(1989), 38–81.
- Okada, Y., & Ueda, S. (1984). Electrical membrane responses to secretagogues in parietal cells of the rat gastric mucosa in culture. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015366>
- Okuda, S., Honda, M., Ito, Y., Aihara, E., Kato, S., Mitsufuji, S., ... Takeuchi, K. (2009). Phosphodiesterase isozymes involved in regulating acid secretion in the isolated mouse stomach. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 7, 183–190.
- Paradiso, A. M., Townsley, M. C., Wenzl, E., & Machen, T. E. (1989). Regulation of intracellular pH in resting and in stimulated parietal cells. *The American Journal of Physiology*, 257(3 Pt 1), C554-61. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.257.3.C554>
- Pasham, V., Rotte, A., Bhandaru, M., Eichenmüller, M., Henning, F., Mack, A., ... Lang, F. (2011). Regulation of gastric acid secretion by the serum and glucocorticoid inducible

- kinase isoform SGK3. *J Gastroenterol*, 305–317. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0348-8>
- Pasham, V., Rotte, A., Mia, S., Alesutan, I., Chatterjee, S., Hosseinzadeh, Z., ... Lang, F. (2013). Annexin 7 in the regulation of gastric acid secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(6), 1643–1654. <https://doi.org/10.1159/000356600>
- Pfeiffer, C. ., & Stephens, R. . (1968). Ultrastructural Changes of the Parietal Cell in the Ferret Gastric Mucosa Induced by Pylorus Ligation and Glucocorticoid Administration. *J Ultrastructure Research*, 12, 524–537.
- Republica de Colombia. (1993). Resolucion 8430 de 1993 - 1. *Republica de Colombia Ministerio de Salud, 1993*, 1–12. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2011). *Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology* (6th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Rotte, A., Bhandaru, M., Ackermann, T., Boini, K. M., & Lang, F. (2009). *Role of PDK1 in Regulation of Gastric Acid Secretion*. 133–142.
- Rotte, A., Mack, A. F., Bhandaru, M., Daniela, S., Beier, N., Scholz, W., ... Lang, F. (2009a). APC Sensitive Gastric Acid Secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 133–142.
- Rotte, A., Mack, A. F., Bhandaru, M., Daniela, S., Beier, N., Scholz, W., ... Lang, F. (2009b). *Cellular Physiology and Biochemistry Pioglitazone Induced Gastric Acid Secretion*. 133–142.
- Rotte, A., Mack, A. F., Bhandaru, M., Daniela, S., Beier, N., Scholz, W., ... Lang, F. (2009c). Pioglitazone Induced Gastric Acid Secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 193–200.
- Rotte, A., Pasham, V., Eichenmüller, M., Yang, W., Qadri, S. M., Bhandaru, M., & Lang, F. (2010). Regulation of basal gastric acid secretion by the glycogen synthase kinase GSK3. *Journal of Gastroenterology*, 45(10), 1022–1032. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0260-2>
- Sakamoto, C., Matozaki, T., Nagao, M., & Baba, S. (1986). Difference in effects of pirenzepine and atropine on carbachol-induced pepsinogen secretion from isolated gastric glands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136(1), 193–199. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90894-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90894-6)
- Sandu, C., Artunc, F., Grahammer, F., Rotte, A., Boini, K. M., Friedrich, B., ... Lang, F. (2007). Role of the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1 in glucocorticoid

- stimulation of gastric acid secretion. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 455(3), 493–503. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0305-4>
- Sandvik, A. K., Waldum, H. L., Kleveland, P. M., & Sjøgen, B. S. (1987). Gastrin produces an immediate and dose-dependent histamine release preceding acid secretion in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22(7), 803–808. <https://doi.org/10.3109/00365528708991918>
- Schubert, M. L. (2008). Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24, 659–664. <https://doi.org/10.1097/00001574-200311000-00002>
- Schumacher, M. A., Aihara, E., Feng, R., Engevik, A., Shroyer, N. F., Ottemann, K. M., ... Zavros, Y. (2015). The use of murine-derived fundic organoids in studies of gastric physiology. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283028>
- Sipponen, P., & Maaros, H.-I. (2015). Chronic gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(6), 657–667. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1019918>
- Stepan, V., Ramamoorthy, S., Nitsche, H., Zavros, Y., Merchant, J. L., & Todisco, A. (2005). Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15700–15708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413037200>
- Takahashi, N., Okumura, T., Yamada, H., & Kohgo, Y. (1999). Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(3), 623–627. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9994>
- Terano, A., Ivey, K. J., Stachura, J., Sekhon, S., Hosojima, H., McKenzie, W. N., ... Wyche, J. H. (1982). Cell Culture of Rat Gastric Fundic Mucosa. *Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(82\)80141-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80141-8)
- Wallmark, B., Larsson, H., & Humble, L. (1985). The relationship between gastric acid secretion and gastric H⁺,K⁺-ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(25), 13681–13684.
- Wang, C., Han, X., Sun, X., Guo, F., Luan, X., & Xu, L. (2019). Orexin-A signaling in the paraventricular nucleus promote gastric acid secretion and gastric motility through the activation neuropeptide Y Y 1 receptors and modulated by the hypothalamic lateral area. *Neuropeptides*, 74(January), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.01.005>
- Weck, M. N., & Brenner, H. (2006). Prevalence of chronic atrophic gastritis in different parts of the world. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15(6), 1083–1094.

- <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0931>
- Wiederanders, R. E., Classen, K. L., Gobbel, J., & Doyle, M. (1960). The Effect of Cortisone Acetate on Gastric Secretion. *Annals of Surgery*, 119 128.
- Williams, R. E., Lenz, E. M., Lowden, J. S., Rantalainen, M., & Wilson, I. D. (2005). The metabonomics of aging and development in the rat: An investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using ¹H NMR and HPLC-TOF MS. *Molecular BioSystems*, 1(2), 166–175. <https://doi.org/10.1039/b500852b>
- Yao, X., & Forte, J. G. (2003). Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annual Review of Physiology*, 65, 103–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.072302.114200>
- Yaşar, N. F., Polat, E., Duman, M., Dağdelen, M., Günal, M. Y., Uzun, O., ... Yol, S. (2015). In vitro effects of rabeprazole on human pylorus tone. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 21(2), 217–221. <https://doi.org/10.5056/jnm14126>