

**ADAPTACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE UN BIOMODELO PARA LA
EVALUACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS QUE INHIBAN LA
ACETILCOLINESTERASA**

SANTIAGO RUIZ MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
CALI
2014**

**ADAPTACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE UN BIOMODELO PARA LA
EVALUACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS QUE INHIBAN LA
ACETILCOLINESTERASA**

SANTIAGO RUIZ MARTÍNEZ

Proyecto de grado

**Rafael Santiago Castaño, Ph.D
Profesor de tiempo completo**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CALI
2014**

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
1 INTRODUCCIÓN.....	8
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	10
3 MARCO TEÓRICO	12
4 OBJETIVOS.....	17
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5 METODOLOGÍA	18
5.1 Captura.....	18
5.1.1 Lugar.....	18
5.1.2 Hora.....	18
5.1.3 Transporte.....	18
5.2 Mantenimiento	18
5.2.1 Terrarios	18
5.2.2 Alimentación	19
5.2.3 Tiempo	19
5.3 Preparación para la disección	19
5.3.1 Fase de capacitación	19
5.3.2 Anestesia por enfriamiento	19
5.3.3 Descerebración	20
5.3.4 Retiro de la piel	20
5.4 Disección del nervio y el músculo	21
5.4.1 Procedimiento.....	21
5.4.2 Solución Ringer	22
5.5 Establecimiento del montaje experimental y del sistema de amplificación	23
5.5.1 Electroodos	23
5.5.2 Cloruración de electrodos.....	23
5.5.3 Conexiones.....	24
5.5.4 Diseño y construcción del amplificador.....	24
5.6 Registro del potencial de acción presináptico y postsináptico.....	24
5.6.1 Registro del Potencial de Acción Compuesto de Nervio Ciático (PAC).....	25

5.6.2	Registro del PACM en ausencia de fármaco (control).	25
5.6.3	Registro del PACM en presencia de Neostigmina.	26
5.7	Disposición final de los cadáveres	26
5.8	Matriz de marco lógico	26
6	RESULTADOS	28
6.1	Receptáculo Inmovilizador de ranas <i>E. johnstonei</i>	28
6.2	Registros del Potencial de Acción Compuesto de Músculo (PACM)	29
7	DISCUSIÓN	32
8	CONCLUSIONES	34
9	RECOMENDACIONES	35
10	REFERENCIAS	36
11	ANEXOS	38
11.1	Medidas anatómicas de <i>E. johnstonei</i>	38
11.2	Diseño del receptáculo inmovilizador de ranas <i>E. johnstonei</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	<i>E. johnstonei</i>	12
FIGURA 2.	<i>Rana pipiens</i>	13
FIGURA 3.	Unión neuromuscular	14
FIGURA 4.	Estructura química de neostigmina	16
FIGURA 5.	Terrario, hábitat temporal de <i>E. johnstonei</i>	19
FIGURA 6.	Sitio de punción para la descerebración	20
FIGURA 7.	Retiro de la piel durante el procedimiento de disección	20
FIGURA 8.	Representación anatómica de un anuro	21
FIGURA 9.	Nervio ciático expuesto, medial al hueso <i>illium</i> . Cintura pélvica	22
FIGURA 10.	Micromanipuladores (a), Receptáculo inmovilizador de <i>E. johnstonei</i> (b) y electrodos de estimulación (c) y de registro (d)	23
FIGURA 11.	Resumen lógico del sistema experimental empleado para el registro del potencial de acción compuesto de músculo (PACM)	24

FIGURA 12. Registro del potencial de acción compuesto en el músculo gastrocnemio (a) y estimulación eléctrica del nervio ciático (b).	25
FIGURA 13. Diseño del receptáculo inmovilizador para ranas <i>E. johnstonei</i>	28
FIGURA 14. Registro del potencial de acción compuesto de músculo gastrocnemio.....	29
FIGURA 15. PACM de rana (a). PACM registrado con el montaje experimental propuesto (b).....	29
FIGURA 16. Registro del potencial de acción compuesto de músculo gastrocnemio.....	30
FIGURA 17. Potencial de la figura 16 con un filtro paso bajo de 30 Hz.....	30
FIGURA 18. Cursos temporales de la amplitud. Control (negro) vs. Neostigmina (rojo).....	31
FIGURA 19. Medidas exteriores del receptáculo inmovilizador para ranas <i>E. johnstonei</i>	39
FIGURA 20. Medidas interiores del receptáculo inmovilizador para ranas <i>E. johnstonei</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Composición de la solución Ringer anfibio.....	22
TABLA 2. Condiciones del estimulador.....	26
TABLA 3. Matriz de marco lógico.....	26
TABLA 4. Medidas anatómicas de <i>E. johnstonei</i> utilizadas para el diseño y construcción del receptáculo inmovilizador.....	38

RESUMEN

Los anuros constituyen uno de los biomodelos más ampliamente utilizados en la investigación biomédica a lo largo de la historia. *Eleutherodactylus johnstonei*, una especie nativa de las Antillas Menores, presenta las características favorables que se buscan en un biomodelo, siendo la más importante de estas su pequeño tamaño (17-35 mm). El objetivo de este proyecto fue evaluar la utilidad de *E. johnstonei* como organismo modelo, en el estudio fisiológico y farmacológico de la unión neuromuscular, por medio del registro del potencial de acción compuesto de nervio ciático y músculo gastrocnemio. El principal interés fue evaluar la viabilidad del biomodelo en la investigación de moléculas que inhiban la acetilcolinesterasa. Para esto, fue necesario adaptar las técnicas convencionales de estudio de la unión neuromuscular, incluyendo la instrumentación necesaria, al tamaño de *E. johnstonei*. Se eligió como tratamiento experimental el fármaco Neostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa de acción intermedia. Se obtuvieron pocos datos sobre el curso temporal de la amplitud del potencial de acción compuesto de músculo, por lo cual no fue posible concluir sobre la viabilidad del biomodelo en estos estudios. Es necesario realizar ajustes a la técnica empleada, para efectuar nuevas evaluaciones del curso temporal del potencial de acción, teniendo al menos 3 réplicas por tratamiento, para determinar el tiempo en el que la amplitud del potencial de acción cae en un 50%.

Palabras clave: *Eleutherodactylus johnstonei*, unión neuromuscular, potencial de acción compuesto, acetilcolinesterasa, Neostigmina.

Throughout history, different species from the order Anura have been widely used as model organisms in biomedical research. *Eleutherodactylus johnstonei*, a species from the Lesser Antilles, shows many of the qualities and characteristics which are looked for in a model organism, being the most important of these its size (17-35 mm). The objective of this project was to evaluate the usefulness of *E. johnstonei* as a model organism, in the physiological and pharmacological research of the neuromuscular junction, by studying the compound action potential of the sciatic nerve and the gastrocnemius muscle. The main interest was to evaluate the viability of using the species in the research of molecules which inhibit acetylcholinesterase. To accomplish this objective, the conventional techniques for the study of the neuromuscular junction, including the necessary instrumentation, had to be adapted to *E. johnstonei's* size. Neostigmine, a medium-action inhibitor of acetylcholinesterase, was chosen as the experimental treatment. It was not possible to make conclusions about the usefulness of the model organism, due to

the fact that very few data were obtained in the assays. Further adjustments of the techniques must be made to evaluate the time course of the action potential, with at least 3 replicates per treatment, in order to determine the time in which its amplitude has decreased 50%.

Key words: *Eleutherodactylus johnstonei*, neuromuscular junction, compound action potential, acetylcholinesterase, Neostigmine.

1 INTRODUCCIÓN

Durante décadas, distintas especies de anuros han sido empleadas como biomodelos de experimentación en investigación biomédica. Esto se debe a que presentan una serie de características importantes que las hacen ideales para este tipo de estudios. Entre estas se encuentran: similitud con humanos, gran tolerancia fisiológica y facilidad para el mantenimiento en cautiverio (Pérez, Rojo, & Encinas, 2009).

Eleutherodactylus johnstonei Barbour 1914, es una pequeña rana terrestre, nativa de las Antillas Menores (Tárano & Fuenmayor, 2009). Presenta gran adaptabilidad, razón por la cual ha alcanzado una amplia distribución en el caribe (Kaiser, 1997). En Colombia, así como en muchos otros países, *E. johnstonei* es una especie invasora que se ha convertido en amenaza para las especies nativas (Hedges, y otros, 2010).

El objetivo de este proyecto fue, entonces, determinar la utilidad de *E. johnstonei* como biomodelo para el estudio de la fisiología y farmacología de la unión neuromuscular. Específicamente, es de interés la evaluación de principios activos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) provenientes de productos naturales.

Este grupo de fármacos resulta interesante por el amplio abanico de aplicaciones clínicas que presenta. Tal vez las más relevantes de estas sean: reversión del bloqueo neuromuscular en intervenciones quirúrgicas, diagnóstico y tratamiento de Miastenia Gravis y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Nair & Hunter, 2004).

La experimentación consistió en el registro del potencial de acción compuesto de nervio ciático y músculo gastrocnemio, en condiciones control y en presencia del fármaco Neostigmina. Para esto, se construyeron electrodos de plata/cloruro de plata que sirvieron como electrodos de estimulación y de registro. Estas 2 últimas acciones se llevaron a cabo por medio del sistema PowerLab[®] 26T (ADInstruments[®]).

Debido a que la señal obtenida era muy pequeña, por el tamaño del modelo, esta se debió amplificar para obtener una señal adecuada para el registro. Para esto, se fabricó y empleó un amplificador operacional entre el estimulador y el sistema de registro.

La captura de los especímenes de *E. jonhstonei* se llevó a cabo en las zonas verdes de la Universidad Icesi, en horas de la noche, cuando su canto facilita su localización. Posteriormente, estos fueron ubicados en un terrario, el cual consistía en un recipiente de plástico con follaje fresco y adecuadas condiciones de humedad y ventilación.

El procedimiento de disección se adaptó del descrito por Oakley & Schafer (1978). Consistía en exponer el nervio ciático entre los huesos que forman el cinto pélvico, habiendo previamente retirado la piel del animal. Los electrodos de estimulación se ubicaban sosteniendo el nervio ciático, y los de registro iban en contacto con el músculo gastrocnemio.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La rana *Eleutherodactylus johnstonei*, es una especie invasora proveniente de las Antillas, ubicada en la categoría de preocupación menor de la Lista Roja de Especies Amenazadas. Ésta ha alcanzado una amplia distribución en el caribe y algunos países como Colombia, Costa Rica y Venezuela (Hedges, y otros, 2010). En este momento, representa una amenaza para las especies nativas de ranas de la ciudad de Cali, Colombia, debido a su alta tasa de reproducción y a su gran adaptabilidad, especialmente, en zonas urbanas (Kaiser, 1997).

Con este proyecto, se buscó determinar si es posible emplear a la especie *E. johnstonei* como biomodelo para estudios de la función sináptica en la unión neuromuscular. Por muchos años, el modelo de órgano aislado nervio ciático-músculo gastrocnemio, en especies de ranas de mayor tamaño, ha contribuido al conocimiento de la función de acople excitación-contracción y de la transmisión sináptica, así como al entendimiento de cómo actúan ciertas toxinas a nivel de placa neuromuscular (Shanmugam, y otros, 2008).

Se pretendió entonces, adaptar las técnicas convencionales de estudio de la unión neuromuscular a *E. johnstonei*, de modo que se pudiera contar con una herramienta de bajo costo para realizar screening básico de moléculas provenientes de productos naturales, con potencial actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa. Por lo general, la cantidad que se obtiene de estos productos es muy pequeña, por lo cual se hace necesario el establecimiento de una técnica que permita evaluar su actividad utilizando concentraciones bajas.

Una de las ventajas que ofrecen los modelos anfibios para la experimentación es la facilidad para su mantenimiento en cautiverio. Primero, requieren espacios relativamente pequeños, con elevadas condiciones de humedad y buena ventilación. Segundo, su alimentación es muy sencilla y de fácil obtención (Pérez, Rojo, & Encinas, 2009). Todo esto es especialmente cierto para *E. johnstonei* por su menor tamaño, en comparación con las especies tradicionalmente empleadas como biomodelos.

Por ser una especie invasora y de amplia distribución, su captura y utilización en estos estudios no representa un riesgo para la especie. Sumado a esto, la obtención de los especímenes se ve facilitada por el hecho de que estos se encuentran ampliamente distribuidos por toda la ciudad.

3 MARCO TEÓRICO

La familia Eleutherodactylidae, a la cual pertenece el género *Eleutherodactylus*, es la más diversa dentro de los anuros. A su vez, este género es el más grande y homogéneo dentro de los vertebrados, con más de 600 especies. Su distribución se da fundamentalmente en el continente americano (Avilán & Hoyos, 2006). Particularmente, un tercio de la fauna de ranas de Colombia corresponde a especies de este género (Lynch, 1999).



Figura 1. *E. johnstonei*. Fotografía por Sebastián Moreno.

Eleutherodactylus johnstonei Barbour 1914, es una pequeña rana terrestre, nativa de las Antillas Menores (Tárano & Fuenmayor, 2009). Debido a su gran tolerancia fisiológica y adaptabilidad, en 1997 era la rana más ampliamente distribuida en el Caribe (Kaiser, 1997). Uno de los mecanismos que le confiere tolerancia y ventajas frente a otras especies es su modo reproductivo; las ranas del género *Eleutherodactylus* depositan huevos con desarrollo directo (Urbina-Cardona & Pérez-Torres, 2002). Las hembras depositan sus huevos en sitios terrestres y, aproximadamente un mes después, una rana completamente desarrollada eclosiona (Lynch, 1999).

Esta especie ha sido introducida a países como: Colombia, Costa Rica, Guyana, Guyana Francesa, Jamaica, Panamá, Trinidad y Tobago, y Venezuela (Hedges, y otros, 2010). A nivel regional, es una de las dos especies de anuros introducidas en el Valle del Cauca, Colombia. Su dispersión en este territorio se debe principalmente al comercio de plantas ornamentales o a la venta directa de especímenes para ambientación acústica de jardines (Castro-Herrera & Vargas-Salinas, 2008).

Los individuos de esta especie tienen un tamaño nariz-cloaca de 1,7-3,5 cm (Manickchan, y otros, 2011). Las especies de anuros comúnmente utilizadas en estudios de fisiología neuromuscular son *Xenopus laevis* y *Rana pipiens* (Pérez, Rojo, & Encinas, 2009). Estas tienen un tamaño de 5-12 cm (Álvarez, Medellín, Gómez, & Oliveras, 2005) y 6-8 cm (United States Environmental Protection Agency), respectivamente.

Esta diferencia de tamaño le confiere a esta especie algunas ventajas en su utilización como biomodelo para la investigación de nuevas moléculas con actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa. Las más importantes de estas son: disminución de los costos de mantenimiento del biomodelo, y disminución de la cantidad de reactivos y analito utilizadas. Sin embargo, su tamaño también constituye la principal dificultad técnica para la realización de los ensayos.

El empleo de biomodelos animales ha generado una enorme cantidad de conocimiento en diversas áreas del saber, y ha contribuido al descubrimiento y desarrollo de nuevos tratamientos para patologías humanas. Entre los organismos más utilizados se encuentran los pertenecientes al phylum Amphibia. Estos presentan importantes características como: amplio conocimiento de su fisiología, tolerancia a grandes variaciones de las condiciones ambientales, fácil mantenimiento en cautiverio y similitud con humanos (Pérez, Rojo, & Encinas, 2009).



Figura 2. *Rana pipiens*. Fotografía por Bates Littlehales (National Geographic)

Desde hace varias décadas, la sinapsis neuromuscular y todos los mecanismos y eventos implicados en esta, han sido evaluados en diferentes biomodelos. Uno de los más utilizados es el modelo nervio ciático - músculo gastrocnemio de las especies de rana previamente mencionadas (Shanmugam, y otros, 2008). Dado que esta sinapsis es mucho más accesible que aquellas dentro del sistema nervioso central (SNC), ha sido empleada como modelo general de la función sináptica (Oakley & Schafer, 1978). Los estudios de esta sinapsis y de excitabilidad muscular permiten hacer caracterizaciones fisiológicas, biofísicas y farmacológicas (Castillo & Montes, 2012).

La unión neuromuscular es el conjunto entre una neurona motora y la fibra de músculo esquelético que esta inerva. El neurotransmisor de esta sinapsis es Acetilcolina (ACh), la cual es sintetizada en la neurona motora a partir de acetyl coenzima A y colina, y almacenada en vesículas al interior de la neurona. Cuando se presenta un potencial de acción presináptico, se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de este ion a la neurona. Como consecuencia, las vesículas que contienen ACh se unen a la membrana presináptica y liberan su contenido al espacio sináptico (Cherian, Baheti, & Iype, 2013). En la unión neuromuscular un impulso nervioso libera unos 3 millones de moléculas de ACh en la hendidura sináptica (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2008).

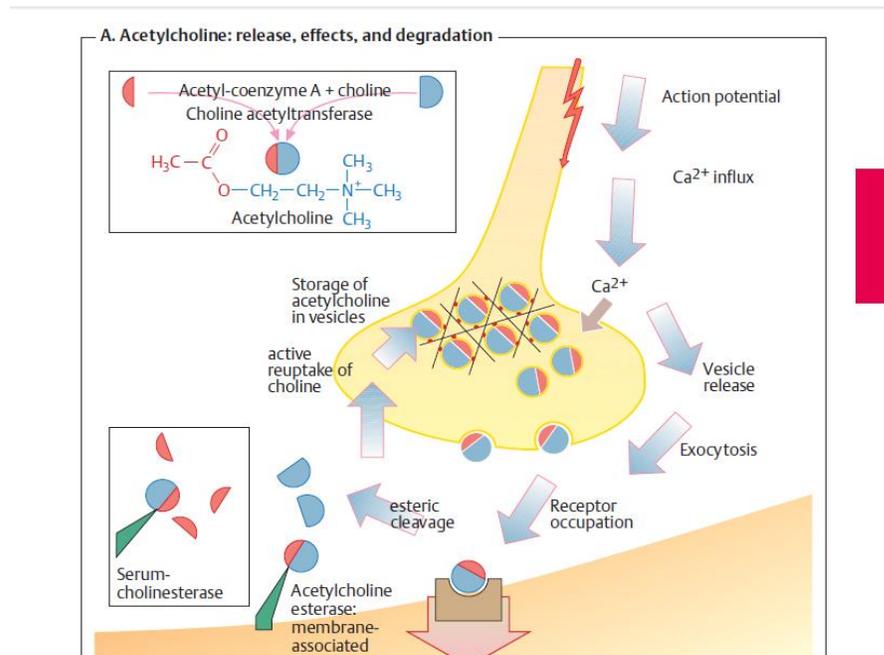


Figura 3. Unión neuromuscular (Lüllmann, Mohr, Hein, & Bieger, 2005).

Las moléculas de ACh se unen a su receptor específico en la membrana postsináptica, lo que induce cambios en la permeabilidad iónica de esta (Oakley & Schafer, 1978). El receptor es el receptor nicotínico de ACh (nAChR), una

estructura pentamérica que actúa como canal iónico controlado por ligando. La entrada de iones sodio despolariza la membrana postsináptica, lo que se conoce como potencial de placa terminal (ppt). Si su amplitud alcanza el umbral para la excitación, se genera un potencial de acción postsináptico que se propaga al resto de la fibra iniciando la contracción muscular, por liberación de iones calcio del retículo sarcoplásmico. La unión del neurotransmisor y su receptor dura 2 ms aproximadamente. Después de la disociación, la ACh es rápidamente hidrolizada, impidiendo su unión con otros receptores (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2008).

La ACh es rápidamente hidrolizada en el enlace éster por la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), la cual está formada por seis sitios activos, cada uno compuesto por un sitio aniónico periférico y un sitio esteárico central. Aproximadamente, el sitio activo hidroliza 10000 moléculas de ACh por segundo (Nair & Hunter, 2004). La AChE no solo hidroliza las moléculas de ACh tras su disociación, sino que también hidroliza hasta un tercio de las moléculas liberadas en el espacio sináptico antes de que alcancen su receptor (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2008). Como resultado de la hidrólisis, se produce acetato y colina. El acetato es transportado al sitio esteárico de la enzima (Nair & Hunter, 2004); la colina es transportada a la neurona presináptica, donde es acetilada por la enzima *colina acetiltransferasa* para formar una nueva molécula de ACh (Oakley & Schafer, 1978).

Los fármacos inhibidores de la AChE, o anticolinesterásicos, aumentan la cantidad de ACh disponible para unirse a los nAChR postsinápticos, y el tiempo de unión de estos. El efecto resultante es un incremento de la tensión de contracción del músculo y un aumento del ppt, el cual se hace también más prolongado (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2008).

Dentro de las aplicaciones clínicas más importantes de este grupo de fármacos se encuentran: reversión del bloqueo neuromuscular en intervenciones quirúrgicas, diagnóstico y tratamiento de Miastenia Gravis, tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, tratamiento de Glaucoma y reversión de la intoxicación con anticolinérgicos (Nair & Hunter, 2004).

Uno de estos fármacos es Neostigmina, el cual hace parte de los anticolinesterásicos de acción media. Es un compuesto de amonio cuaternario, que se une al sitio aniónico de la AChE por medio de su grupo carbamilo. El inicio de acción se presenta cerca de 1 minuto después de su administración por vía intravenosa; la duración de la acción es de 20 a 30 minutos, aproximadamente, con un pico a los 10 minutos. (Nair & Hunter, 2004)

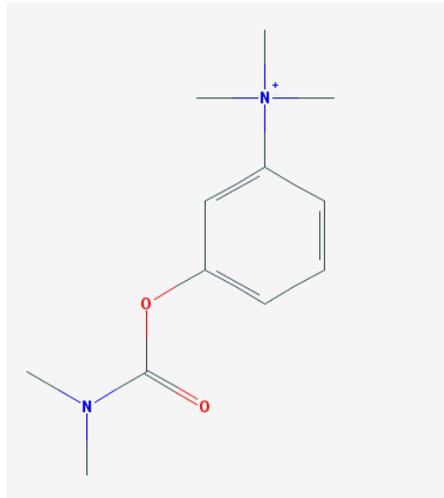


Figura 4. Estructura química de neostigmina (Pubchem).

Su principal aplicación clínica es revertir la acción de los bloqueantes musculares no despolarizantes tras una cirugía (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2008). También se emplea en el tratamiento de Miastenia Gravis (MG), un desorden autoinmune, caracterizado por debilidad muscular y mayor predisposición al cansancio. La producción de anticuerpos contra los nAChR genera una reducción en el número de estos receptores, afectando la transmisión neuromuscular (Maggi & Mantegazza, 2011). Se utiliza neostigmina pues, al inhibir la AChE, se aumenta la posibilidad de que moléculas de ACh alcancen los pocos nAChR presentes en la membrana postsináptica, potenciando así la fuerza muscular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Adaptar la técnica convencional de registro de acople excitación-contracción, empleando como biomodelo, el órgano aislado (nervio ciático-músculo gastrocnemio) de la rana *E. johnstonei*, para evaluar fármacos con actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar y establecer la técnica convencional, desde la captura de los organismos, hasta el registro de los cursos temporales del potencial de acción presináptico y postsináptico.
- Diseñar y construir los equipos e instrumentos necesarios para el registro del potencial de acción compuesto en *E. johnstonei*.
- Evaluar la actividad inhibitoria del fármaco Neostigmina sobre la enzima acetilcolinesterasa, empleando el sistema de órgano aislado compuesto por nervio ciático y músculo gastrocnemio de *E. johnstonei*.

5 METODOLOGÍA

5.1 Captura

5.1.1 Lugar

La captura de los especímenes se llevó a cabo en las zonas verdes de la Universidad Icesi, especialmente en las inmediaciones de la casa SAE y cerca de la cafetería Willy Wonka.

5.1.2 Hora

Las capturas se realizaron entre las 19:00 y las 21:00 horas, pues el canto de las ranas facilitaba su localización.

5.1.3 Transporte

Los anuros fueron capturados manualmente. Una vez capturados, se depositaron en bolsas Ziploc® o cajas plásticas con agua, mientras eran transportados al terrario que constituiría su hábitat temporal durante el transcurso del proyecto.

5.2 Mantenimiento

5.2.1 Terrarios

Los especímenes de *E. jonhstonei* fueron ubicados en un terrario, en el laboratorio de investigaciones biomédicas de la Universidad Icesi. Este consistía en un recipiente de plástico, que contenía tierra y follaje fresco, así como un recipiente con agua (Fig. 5). Para mantener las condiciones de humedad adecuadas, el terrario se rociaba constantemente con agua.

Cada 2 semanas, los terrarios eran sometidos a mantenimiento. Este procedimiento incluía: cambio del follaje y la tierra, y lavado del recipiente con abundante agua y jabón.



Figura 5. Terrario, hábitat temporal de *E. johnstonei*.

5.2.2 Alimentación

La alimentación de los especímenes se llevó a cabo diariamente. Esta consistió en insectos pequeños que fueron atrapados por medio de una jama, en zonas verdes de la Universidad Icesi.

5.2.3 Tiempo

Los especímenes se mantenían por 2-3 días en los terrarios, desde que eran capturados hasta que eran utilizados en los ensayos. De esta forma se aseguró que no se presentara reproducción e igualmente se disminuyó la posibilidad de que los especímenes contrajeran enfermedades que pudieran afectar los resultados de los ensayos.

5.3 Preparación para la disección

5.3.1 Fase de capacitación

Todos los procedimientos descritos, tanto anterior como posteriormente, fueron llevados a cabo por el titular del proyecto. Por esta razón, fue necesaria una fase previa de capacitación por parte de un experto, especialmente para el procedimiento de disección.

5.3.2 Anestesia por enfriamiento

Para el procedimiento de disección del nervio ciático, los especímenes debieron ser anestesiados por enfriamiento. Los anfibios son poiquiloterms por lo cual, al disminuir su temperatura corporal, se logra su inmovilización (Ross & Ross, 2008). Los individuos fueron introducidos a una nevera, a una temperatura entre 2 y 3 °C, por un tiempo de 5 a 10 minutos. De esta forma, se logra la disminución del metabolismo del animal.

5.3.3 Descerebración

El método más empleado para la inmovilización de ranas es la técnica de descerebración o *pithing*. Se utilizó el procedimiento de descerebración sencillo, que consiste en destrucción del cerebro solamente, dejando intacta la médula espinal y sus reflejos (Oakley & Schafer, 1978).

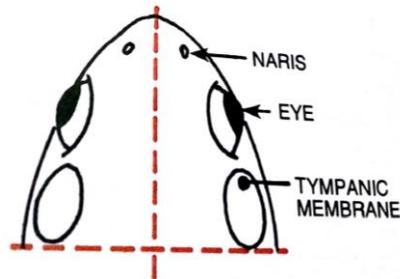


Figura 6. Sitio de punción para la descerebración (Oakley & Schafer, 1978).

La punción se realiza en el foramen magno, el cual se ubica trazando 2 líneas imaginarias, como se muestra en la figura 6; el foramen magno se encuentra en la intersección de las líneas. De esta forma, se elimina cualquier sensación de dolor en la rana (Oakley & Schafer, 1978).

5.3.4 Retiro de la piel

Para iniciar el procedimiento de disección, se debe retirar la piel de la rana; puede retirarse toda la piel o solo la de las extremidades inferiores y el abdomen. Se inicia con un corte transversal por debajo de las extremidades superiores. A continuación, con la ayuda de pinzas, se hala la piel desde las extremidades inferiores, con lo cual esta se retira en un solo movimiento.



Figura 7. Retiro de la piel durante el procedimiento de disección. Fotografía por Sebastián Moreno.

5.4 Disección del nervio y el músculo

5.4.1 Procedimiento

El procedimiento de disección se realizó de acuerdo al método descrito por Oakley & Schafer (1978), adaptándolo al tamaño de *E. johnstonei*.

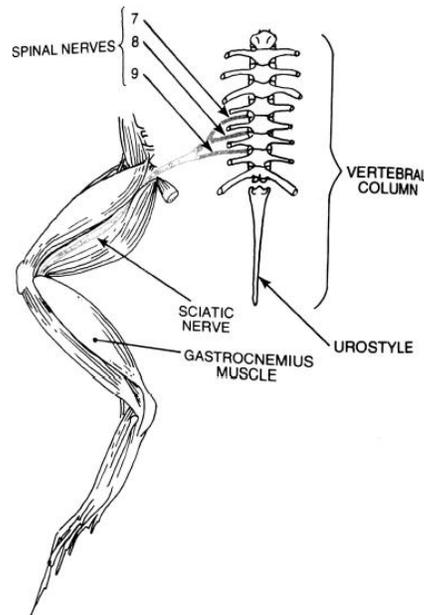


Figura 8. Representación anatómica de un anuro.

Una vez retirada la piel, se procede a exponer el nervio ciático. Primero, se deben realizar unos cortes en la región sacra del animal, de tal forma que se pueda sostener la punta del urostilo con pinzas. El *urostilo* es una delgada barra ósea, de naturaleza hipocordal, que se articula con la novena vértebra (vértebra sacra) (Parker & Haswell, 1987). A continuación, sosteniendo el urostilo, se procede a realizar cortes ascendentes del tejido que lo recubre, para posteriormente levantarlo con las pinzas.

En este momento, el nervio ciático queda expuesto a ambos lados de la línea media del individuo, medial al *Ilium*. Este hueso constituye la parte más larga de la cintura pélvica, compuesta además por el *ischium* y el *pubis* (Avilán & Hoyos, 2006). Cuidadosamente, se corta el urostilo con tijeras y se retira. Por último, se corta y retira el *Ilium* en ambos lados para facilitar la entrada de los electrodos.



Figura 9. Nervio ciático expuesto, medial al hueso *illium*. Cintura pélvica.
Fotografía por Sebastián Moreno.

Se determinó que este era el procedimiento más adecuado pues minimizaba el riesgo de lesionar el nervio y, por ende, afectar los resultados de los registros electrofisiológicos.

5.4.2 Solución Ringer

A lo largo de todo el procedimiento, se debe emplear solución Ringer anfibio. Esta es una solución isotónica, compuesta principalmente por sales de cloro (Oakley & Schafer, 1978). La solución Ringer permite mantener el tejido de la rana humedecido, preservando su funcionamiento por largo tiempo. La respiración pulmocutánea hace que las ranas *E. johnstonei* deban permanecer húmedas (Urbina-Cardona & Pérez-Torres, 2002).

Tabla 1. Composición de la solución Ringer anfibio (Oakley & Schafer, 1978).

Componente	Cantidad (mL)
NaCl (1,0 M)	112
KCl (0,1 M)	32
CaCl ₂ (0,1 M)	27
Na ₂ HPO ₄ (0,1 M)	20
Tris Buffer (0,05 M)	40
H ₂ O	c.s.p. 1000

5.5 Establecimiento del montaje experimental y del sistema de amplificación

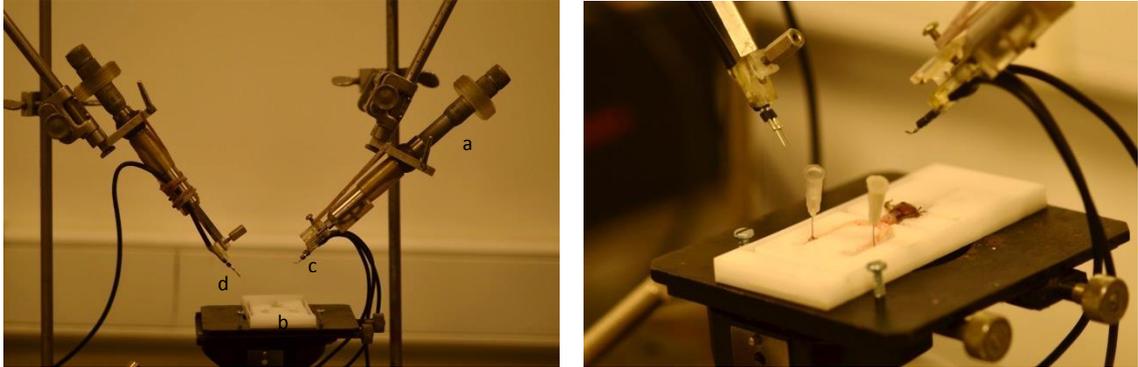


Figura 10. Micromanipuladores (a), Receptáculo inmovilizador de *E. johnstonei* (b) y electrodos de estimulación (c) y de registro (d). Fotografías por Sebastián Moreno.

5.5.1 Electrodo

Se utilizaron 2 electrodos ipsilaterales para realizar los registros: un electrodo de estimulación y uno de registro. Cada uno consistía en 2 alambres de plata/cloruro de plata, acoplados a un cable BNC. Cada electrodo tenía una longitud de aproximadamente 10-14 mm.

Los electrodos de estimulación se doblaban en forma de gancho (fig. 12b), de tal manera que el nervio ciático quedase sostenido por los alambres. Por otro lado, los electrodos de registro no se doblaban y se disponían en contacto directo con el músculo gastrocnemio (fig.12a).

5.5.2 Cloruración de electrodos.

Los electrodos de plata son polarizables; pueden ser cubiertos por una capa de iones negativos que impiden el paso de la corriente eléctrica. Esto afecta los registros porque induce un *drift* en la línea de base a medida que cambia la resistencia de los electrodos. Tratar los electrodos de plata con cloruro de plata los hace no despolarizables (Oakley & Schafer, 1978).

La cloruración de los electrodos de plata se realizó por medio de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10%; las puntas de los electrodos se ponían en contacto con la solución por 30 minutos. Los electrodos y un alambre de plata se conectaban a una pila de 1,5 V, generando un circuito. De esta forma, los electrodos, conectados al polo positivo, constituían el ánodo hacia el cual se dirigían los iones Cl^- , provenientes del NaClO. La cloruración se evidencia por la formación de una capa gris a negra sobre el electrodo.

5.5.3 Conexiones

Los electrodos de registro se conectaban a los inputs 1 y 2 del amplificador operacional (AO). Luego, por medio de cables BNC-BNC, los outputs 1 y 2 del AO se conectaban a los inputs 1 y 2 del PowerLab, respectivamente.

5.5.4 Diseño y construcción del amplificador.

Para la construcción del amplificador, se utilizó un circuito integrado, denominado INA118P. La ganancia se gradúa por medio de unas resistencias. Las resistencias empleadas fueron 1; 1,2 y 1,8 K Ω , obteniéndose ganancias de 29, 43 y 50, respectivamente. Se trabajó con una ganancia de 50, puesto que facilitaba más la visualización y el análisis de los datos recogidos.

5.6 Registro del potencial de acción presináptico y postsináptico

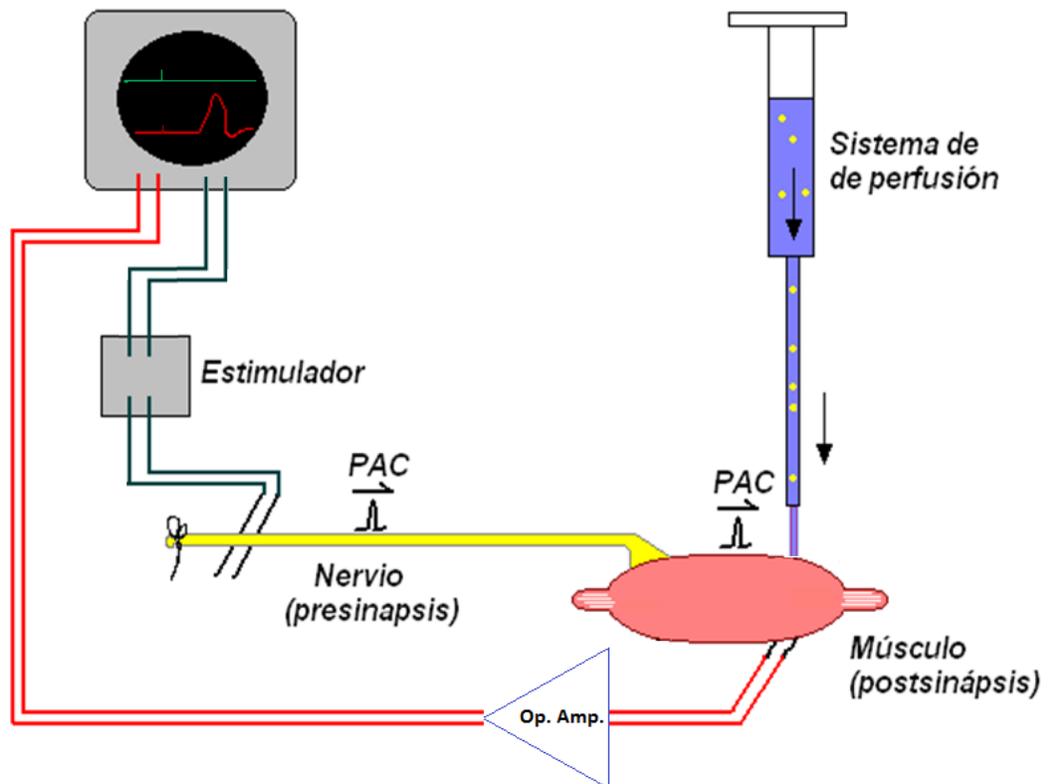


Figura 11. Resumen lógico del sistema experimental empleado para el registro del potencial de acción compuesto de músculo (PACM).

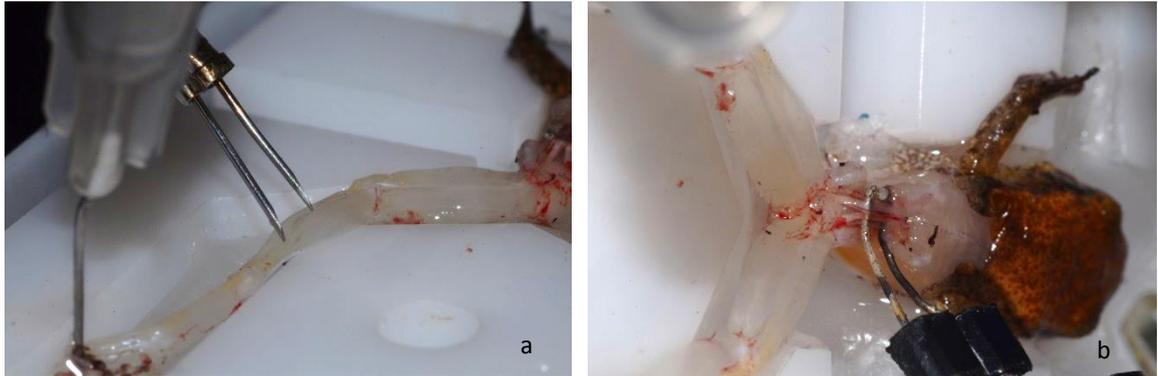


Figura 12. Registro del potencial de acción compuesto en el músculo gastrocnemio (a) y estimulación eléctrica del nervio ciático (b). Fotografías por Sebastián Moreno.

5.6.1 Registro del Potencial de Acción Compuesto de Nervio Ciático (PAC)

Debido al tamaño tan pequeño del biomodelo, no fue posible registrar el PAC. El espacio disponible a nivel del cinto pélvico, no era suficiente para estimular y registrar el PAC simultáneamente; los electrodos eran muy grandes.

Se consideró la opción de registrar el PAC a la altura del fémur, retirando el tejido muscular adyacente. Sin embargo, este procedimiento hubiera representado un riesgo muy alto de lesionar el nervio, imposibilitando así la generación de un potencial excitatorio postsináptico (PEPS).

Por esta razón, se decidió no realizar el registro del PAC, y enfocar esfuerzos en la obtención de registros del PACM.

5.6.2 Registro del PACM en ausencia de fármaco (control).

Los ensayos control se realizaron empleando solución Ringer anfibio durante la disección y en el receptáculo inmovilizador.

Para la estimulación y el registro se utilizó el sistema PowerLab[®] 26T (ADInstruments[®]). La visualización se llevó a cabo en el software LabChart 7. Se trabajó con un estímulo tipo pulso continuo con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones del estimulador.

Característica	Valor
Retraso	200 ms
Frecuencia	0,2 Hz-1 Hz
Duración	1 ms
Línea de base	0 V

5.6.3 Registro del PACM en presencia de Neostigmina.

Los ensayos con fármaco se realizaron empleando Prostigmine® ampollas (Neostigmina 0,5 mg/mL). El fármaco se aplicaba a la preparación en el receptáculo inmovilizador, inmediatamente después de finalizado el procedimiento de disección. 1 minuto después (tiempo de inicio de acción de Neostigmina) se iniciaba el registro del potencial de acción.

5.7 Disposición final de los cadáveres

Una vez finalizados los ensayos, los cadáveres se depositaron en un contenedor de cadáveres, debidamente rotulado, el cual se almacenó en el congelador, a una temperatura de -20 °C. Posteriormente, se solicitó la intervención de salud ocupacional. Ellos fueron los encargados de la disposición final de los cadáveres, la cual realizaron de acuerdo al procedimiento para descarte de residuos anatómicos patológicos.

5.8 Matriz de marco lógico

Tabla 3. Matriz de marco lógico.

Objetivo General	Objetivos específicos	Actividad	Indicador	Supuestos
Adaptar la técnica convencional de registro de acople excitación-contracción, al biomodelo	Adaptar y establecer la técnica, desde la captura de los organismos, hasta el registro de los cursos temporales del potencial de	Revisión bibliográfica	Bibliografía fundamental para el desarrollo del proyecto, encontrada	Acceso a bases de datos. Información disponible.
		Obtención de permisos para la realización de las	Permisos obtenidos	

(nervio-músculo) de la rana <i>E. johnstonei</i> , para evaluar fármacos con actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa.	acción presináptico y postsináptico.	actividades planeadas, por parte del comité de ética y la autoridad ambiental competente		
		Captura y mantenimiento de los organismos	Redacción de procedimientos operativos estandarizados (POE)	Se cuenta con los permisos de Comité de Ética y la autoridad ambiental competente.
		Disección del órgano de estudio (nervio ciático y músculo gastrocnemio)	Redacción de procedimientos operativos estandarizados (POE)	Se obtienen los individuos para el estudio.
		Establecimiento del montaje experimental y del sistema de amplificación, así como patronamiento del sistema	Funcionalidad del sistema de amplificación y registro, verificada	
		Registro de los cursos temporales del potencial de acción presináptico y postsináptico	Registros satisfactorios del acople excitación-contracción, obtenidos	Individuos de estudio sanos.
	Evaluar la actividad inhibitoria del fármaco Edrofonio sobre la enzima acetilcolinesterasa, empleando el sistema de órgano aislado compuesto por nervio ciático y músculo sartorio de <i>E. johnstonei</i> .	Registro de los cursos temporales del potencial de acción presináptico y postsináptico, en dependencia de la dosis del fármaco aplicada	Registros satisfactorios del acople excitación-contracción, obtenidos Comparación de los resultados con aquellos obtenidos por otros autores empleando otros biomodelos.	Sistema de amplificación funcional Disponibilidad del fármaco.

6 RESULTADOS

6.1 Receptáculo Inmovilizador de ranas *E. johnstonei*

Se diseñó y construyó - empleando el software SolidWorks Explorer 2013® (Dassault Systèmes SolidWorks Corp.) - un receptáculo específico para realizar los ensayos electrofisiológicos propuestos en *E. johnstonei*. Para esto, se realizaron mediciones anatómicas a once (11) individuos, que permitieron determinar las medidas que llevaría el receptáculo. Se calculó el valor promedio de cada medida, así como su desviación estándar.

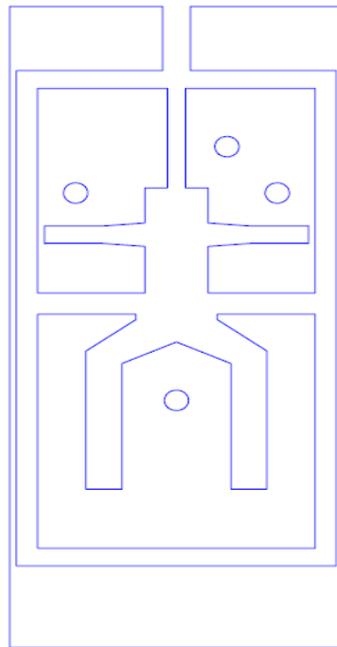


Figura 13. Diseño del receptáculo inmovilizador para ranas *E. johnstonei*.

El receptáculo, fabricado en acrílico, cuenta con una cavidad central en la cual se posiciona el individuo para realizar los ensayos. Se le dio una profundidad de 3mm a esta cavidad, de modo tal que la parte superior del animal quedase por fuera de la cavidad y fuese accesible. La profundidad se calculó a partir de los datos recogidos de la medición anatómica de la altura de seis (6) individuos de *E. johnstonei*.

En la parte periférica, el receptáculo tiene un canal de 4mm de ancho y 3 mm de profundidad, diseñado para que las soluciones empleadas durante los ensayos tuvieran un conducto de salida.

6.2 Registros del Potencial de Acción Compuesto de Músculo (PACM)

Se realizaron varios ensayos control (solución Ringer anfibio) donde se buscaba establecer el tiempo de caída del PACM, evaluando su curso temporal, así como determinar la amplitud y duración de las respuestas, para posteriormente compararlas con aquellas obtenidas en los ensayos con fármaco.

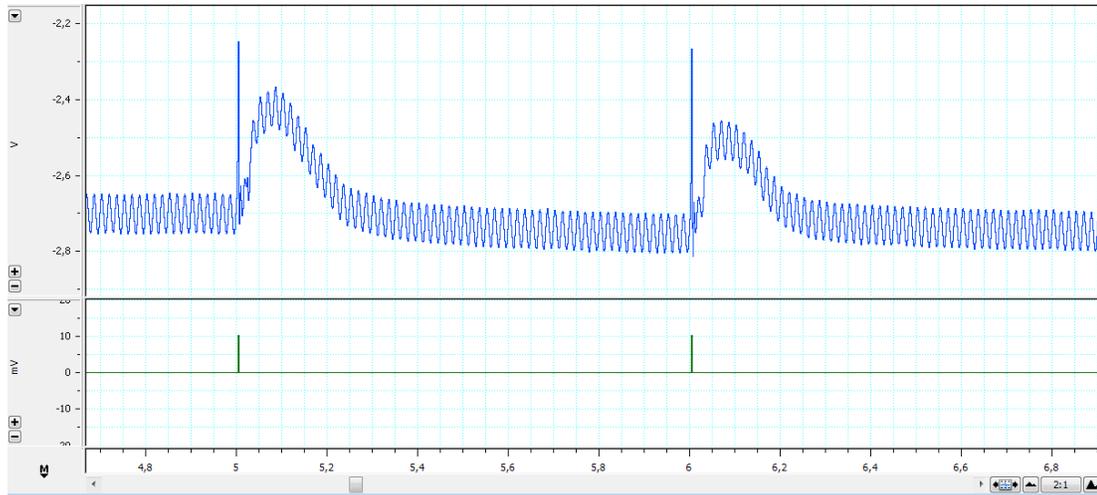


Figura 14. Registro del potencial de acción compuesto de músculo gastrocnemio. Estímulo 1 V

Algunas respuestas se muestran en las figuras 14, 15 y 16. Como se puede observar, las respuestas son mucho mayores que aquellas reportadas en la literatura (Fig. 15). La duración del potencial de placa motora es aproximadamente 10 ms; su amplitud es 110 mV (Caputo, 2011). Sin embargo, presentan una fase despolarizante, una repolarizante pero no una hiperpolarizante, como se espera para un PACM.

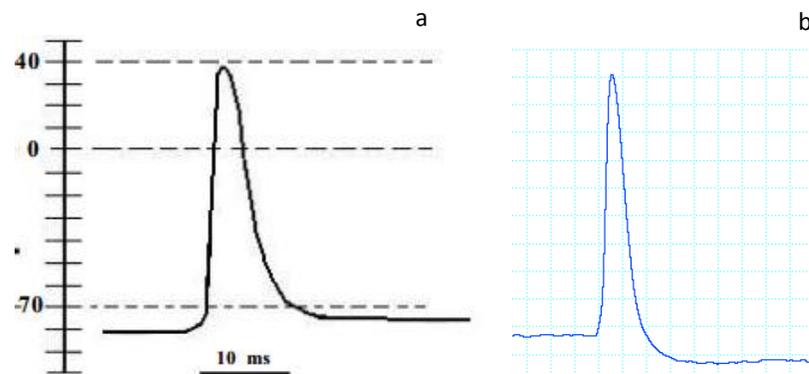


Figura 15. PACM de rana (Caputo, 2011) (a). PACM registrado con el montaje experimental propuesto (b).

En la figura 17 se presenta la misma respuesta de la figura 16, pero utilizando un filtro de paso bajo de 30 Hz. Este filtro, que corresponde a una función del sistema PowerLab[®], se emplea para atenuar la señal a altas frecuencias, como los artefactos que se producen por la estimulación eléctrica. Al comparar ambas figuras, es posible observar la ausencia del artefacto en la segunda. Se recomienda elegir el filtro que permita la mejor visualización de lo que se desea presentar.

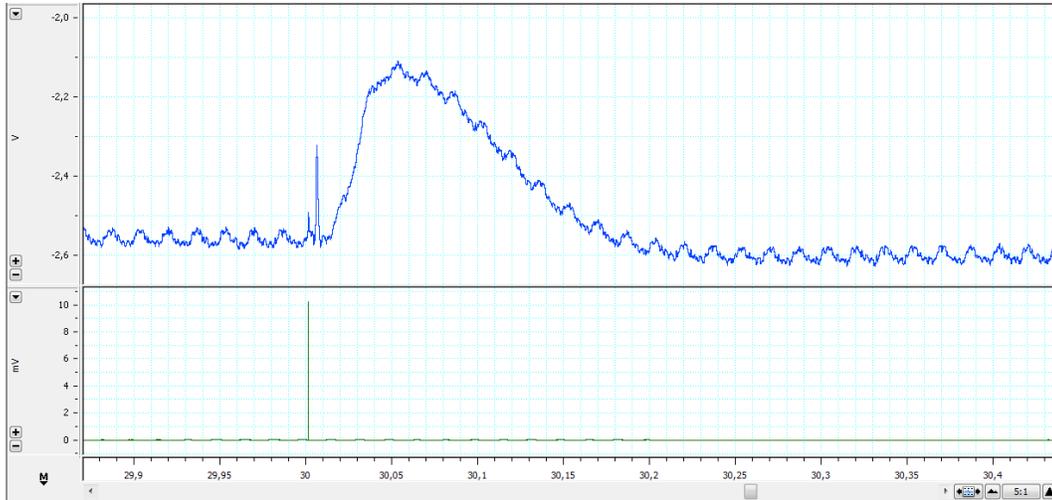


Figura 16. Registro del potencial de acción compuesto de músculo gastrocnemio. Estímulo 0,8 V.

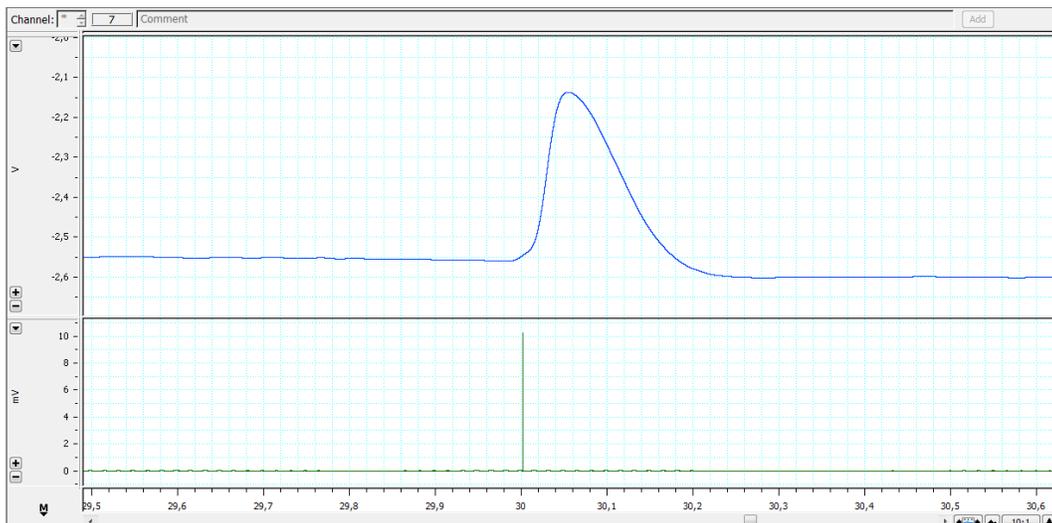


Figura 17. Potencial de la figura 16 con un filtro paso bajo de 30 Hz.

Por último, se realizaron ensayos en presencia del fármaco Neostigmina, donde se evaluó el curso temporal del PACM. Estos resultados se compararon con aquellos de los ensayos control (Fig. 18). Los datos corresponden a los cursos temporales de 2 ensayos control y 2 ensayos con fármaco. La concentración de Neostigmina empleada fue 0,01 mg/mL. La intensidad del estímulo, 1 V, se estableció de acuerdo a los resultados de la curva de reclutamiento de fibra muscular, presentados por Angulo (2013).

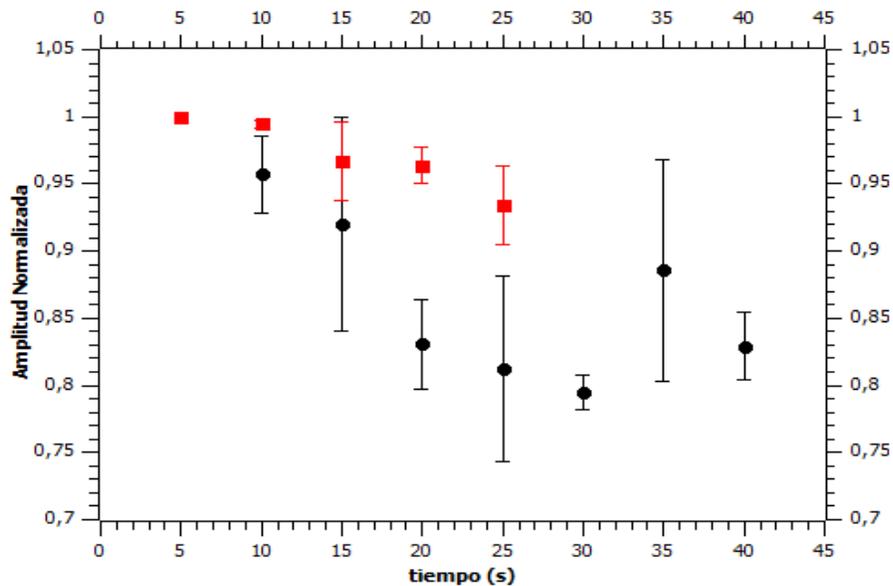


Figura 18. Cursos temporales de la amplitud. Control (negro) vs. Neostigmina (rojo).

A pesar de la tendencia que se observa en la gráfica, según la cual la amplitud del PACM en los ensayos control cae más rápido que en los ensayos con fármaco, la poca cantidad de datos y de réplicas impide que se pueda realizar alguna afirmación sobre los resultados. Por un lado, los datos de la gráfica no permiten determinar el tiempo en el que la amplitud del PACM ha caído en un 50% (t_{50}), siendo este el parámetro que se buscaba medir. Por otro lado, la cantidad de datos de los ensayos con fármaco es menor que la de los ensayos control. Resulta entonces necesario realizar los ensayos nuevamente, teniendo al menos 3 réplicas por tratamiento, y buscando obtener información suficiente para determinar el t_{50} de la amplitud del PACM, en condiciones control y con fármaco.

7 DISCUSIÓN

Como se mencionó en la sección de resultados, se obtuvieron respuestas con una amplitud muy grande. Esto hizo que no se tuviera certeza de la naturaleza de tales señales. La literatura reporta amplitudes de 110 mV para el PACM (Caputo, 2011). Sin embargo, en algunos registros control se obtuvieron respuestas hasta de 500 mV.

Una posible explicación es que efectivamente se trata del PACM y que la amplitud se debe a la temperatura del músculo. Se sabe que esta última aumenta la amplitud del PACM por varios mecanismos: primero, facilita la conductancia de los canales iónicos; segundo, aumenta la concentración de ACh en el botón sináptico; tercero, disminuye la hidrólisis de ACh; cuarto, aumenta la sensibilidad del nAChR a ACh (Camacho, 2005).

Debido al procedimiento de anestesia empleado, la temperatura del músculo durante los registros pudo estar entre 0 y 12 °C. Aun cuando el procedimiento de disección tomaba aproximadamente 10 minutos, la baja temperatura del laboratorio no permitía que el músculo recuperara la suya rápidamente. A la temperatura a la que se encontraba el músculo, se conoce que la amplitud y duración del PACM aumenta en anfibios de zona tropical como *E. johnstonei* (Caputo, 2011). La temperatura ideal para llevar a cabo la experimentación es 18-20 °C. Podría resultar conveniente darle a la preparación más tiempo para que recupere su temperatura, manteniéndola irrigada con solución Ringer anfibio. Por lo tanto, se recomienda realizar la descerebración y, después de 5-10 minutos, iniciar la disección.

La amplitud del PACM depende de la cantidad de fibras musculares activadas (González-Hidalgo, 2002). Probablemente, el estímulo empleado en los diferentes ensayos era un estímulo submaximal, por lo cual la respuesta que se obtuvo corresponde a la activación de algunas fibras musculares y no de todas. Esto podría explicar la variabilidad tan grande que se presentó en los registros.

Por otro lado, la duración de los PACM también fue mayor de lo que se esperaba. La literatura reporta que la duración de un PACM es de aproximadamente 10 ms (Caputo, 2011). Sin embargo, en los ensayos control se obtuvieron duraciones de 10 a 50 veces mayores.

En los ensayos con Neostigmina tampoco hubo una respuesta constante. En uno de estos, la duración del PACM fue de 400-800 ms. En otro, los resultados fueron más cercanos a lo esperado, con duraciones de 30-75 ms. Estos últimos podrían estar relacionados con la acción farmacológica de Neostigmina, donde se espera

un aumento tanto en la amplitud como en la duración del PACM. No obstante, como los resultados de los ensayos control presentan duraciones mayores que los ensayos con fármaco, no es posible asegurar que estos últimos sean consecuencia de la inhibición de la AChE.

A pesar de estos resultados, al normalizar los datos y evaluar los cursos temporales de la amplitud, se observa una tendencia inicial según la cual la caída de la amplitud del PACM es más lenta cuando el músculo se encuentra en un medio con Neostigmina. No obstante, estos resultados son apenas resultados preliminares que deben ser confirmados por medio de nuevos ensayos, con una mayor cantidad de réplicas.

Resulta fundamental mencionar la importancia de la inmovilización del animal durante los registros, especialmente de la extremidad que se va a utilizar. Una contracción muy fuerte puede ocasionar que los electrodos de registro se muevan y pierdan el contacto con la fibra muscular. También puede darse la pérdida de contacto de los electrodos de estimulación y el nervio de estudio. Ambos escenarios afectan enormemente los resultados de los registros (González-Hidalgo, 2002). Durante los ensayos, este fue un problema recurrente, que contribuyó a la falta de datos en los registros de los cursos temporales y, posiblemente, a la variabilidad de los resultados obtenidos.

8 CONCLUSIONES

1. Se establecieron metodologías eficientes para la captura y mantenimiento de las ranas *E. johnstonei*. Estas metodologías suponen un bajo costo para los investigadores y resultan fácilmente reproducibles.
2. El procedimiento de disección del nervio ciático propuesto resulta adecuado, pues permite llevar a cabo los ensayos propuestos, a la vez que disminuye el riesgo de lesionar el nervio.
3. Se diseñó y construyó un receptáculo inmovilizador específico para ranas *E. johnstonei*. Con este se logró un mejor flujo de las soluciones empleadas en los ensayos, así como un movimiento más restringido del biomodelo durante las contracciones.
4. Los resultados obtenidos no permiten hacer conclusiones sobre la utilidad de *E. johnstonei* como biomodelo experimental en estudios farmacológicos de la unión neuromuscular.
5. Resulta necesario realizar ajustes a la técnica empleada que contribuyan a la estandarización y validación del método.
6. La dosis utilizada en los ensayos de curso temporal de la amplitud del potencial de acción compuesto de músculo fue insuficiente para determinar el t_{50} .
7. Como se esperaba, el tamaño de *E. johnstonei* representa la mayor dificultad técnica a la hora de realizar los ensayos. Entre otros, dificulta la colocación de los electrodos, su inmovilización y el procedimiento de disección. No obstante, estas dificultades pueden superarse, resultando posible la explotación de las ventajas que el biomodelo también supone.

9 RECOMENDACIONES

1. Inmovilizar al máximo la extremidad de estudio para evitar que los electrodos de estimulación y registro pierdan el contacto con nervio y músculo, como consecuencia de las contracciones fuertes del músculo.
2. Puede resultar conveniente registrar la fuerza de contracción muscular mediante un transductor de tensión, a la vez que se registra el potencial de acción compuesto postsináptico por medio del montaje experimental establecido. Las dos mediciones proporcionan información complementaria sobre el fenómeno de acople excitación-contracción, contribuyendo así a un mayor entendimiento de la acción de una molécula determinada sobre la unión neuromuscular y la acetilcolinesterasa.
3. Realizar ensayos de dosis respuesta para determinar la dosis más adecuada, que permita determinar la ventana experimental de la preparación, así como el t_{50} de la amplitud del potencial de acción compuesto de músculo.

10 REFERENCIAS

- Álvarez, J., Medellín, R., Gómez, H., & Oliveras, A. (2005). *Xenopus laevis* (Daudin, 1802). En J. Álvarez, R. Medellín, H. Gómez, & A. Oliveras, *Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales*. México D.F.
- Angulo, L. (2013). *Implementación de la técnica de órgano aislado nervio ciático y músculo gastrocnemius como herramienta para la evaluación de plantas medicinales sobre la sinapsis neuromuscular*. Cali: Tesis de pregrado.
- Avilán, P., & Hoyos, J. (2006). Osteología de *Eleutherodactylus bogotensis* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) del Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia*, 89-109.
- Camacho, L. (2005). Evaluación de la placa motora por métodos electrofisiológicos. En A. C. Neurología, *Guía 7: Neurofisiología* (págs. 237-250). Asociación Colombiana de Neurología.
- Caputo, C. (2011). *Compendio histórico de fisiología muscular*. Venezuela: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- Castillo, C. P., & Montes, V. (2012). *Establecimiento de un sistema (sustentable) para la medición de la función excitable en músculo de la rana Eleutherodactylus johnstonei*. Cali.
- Castro-Herrera, F., & Vargas-Salinas, F. (2008). Anfibios y reptiles en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 251-277.
- Cherian, A., Baheti, N. N., & Iype, T. (2013). Electrophysiological study in neuromuscular junction disorders. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 34-41.
- González-Hidalgo, M. (2002). *Estudio de fibra aislada con estimulación eléctrica axonal en el músculo orbicular de los párpados: técnica y resultados diagnósticos en la miastenia gravis ocular*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Hedges, B., Ibéné, B., Koenig, S., La Marca, E., Ibáñez, R., & Hardy, J. (2010). *The IUCN Red List of Threatened Species 2012.2*. Obtenido de *Eleutherodactylus johnstonei*: <http://www.iucnredlist.org/details/56684/0>
- Kaiser, H. (1997). Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation*, 1391-1407.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., & Bieger, D. (2005). *Color atlas of pharmacology*. Stuttgart: Thieme.
- Lynch, J. D. (1999). Ranas pequeñas, la geometría de la evolución, y la especiación en los Andes colombianos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 143-159.

- Maggi, L., & Mantegazza, R. (2011). Treatment of Myasthenia Gravis. *Clinical Drug Investigation*, 691-701.
- Manickchan, S., Starr, C., Ramjohn, C., Mahabir, S., Mahabir, K., & Mohammed, R. (2011). The distribution of the frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Amphibia: Eleutherodactylidae) in Trinidad, West Indies. *Living World, J. Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*, 46-49.
- Nair, N. P., & Hunter, J. M. (2004). Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*.
- National Geographic. (s.f.). *National Geographic*. Obtenido de Northern Leopard Frog: <http://animals.nationalgeographic.com/animals/amphibians/northern-leopard-frog/>
- Oakley, B., & Schafer, R. (1978). *Experimental Neurobiology: a Laboratory Manual*. Ann Arbor: The University of Michigan Press.
- Parker, T. J., & Haswell, W. (1987). *Zoología. Cordados*. Barcelona: Reverte.
- Pérez, M., Rojo, C., & Encinas, M. T. (2009). Modelos animales en anfibios. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 315-323.
- Pubchem . (s.f.). *NCBI*. Obtenido de Neostigmine: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=8246>
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2008). *Rang & Dale Farmacología*. Barcelona: Elsevier.
- Ross, L., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Shanmugam, A., Bhuvanewari, T., Nazeer, R. A., Sambasivam, S., Vairamani, S., Ravindrana, S., . . . Devanathan, G. (2008). Pharmacological Properties of the Venom of a Marine Gastropod *Babylonia spirata* (L.). *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 222-229.
- Tárano, Z., & Fuenmayor, E. (2009). Calling Patterns in Male Responses to Conspecific Playbacks in the Johnstone's Whistling Frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Ethology*, 747-757.
- United States Environmental Protection Agency. (s.f.). *Species profile*. Obtenido de Northern Leopard Frog: http://www.epa.gov/housatonic/thesite/restofriver/reports/final_era/B%20-%20Focus%20Species%20Profiles/EcoRiskProfile_leopard_frog.pdf
- Urbina-Cardona, J. N., & Pérez-Torres, J. (2002). Dinámica y preferencias de microhábitat en dos especies del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) de Bosque Andino. En C. Jaramillo, C. Castaño-Urbe, F. A. Hincapié, J. V. Rodríguez, & C. Durán, *Libro del Congreso Mundial de Páramos* (págs. 278-288).

11 ANEXOS

11.1 Medidas anatómicas de *E. johnstonei*

Tabla 4. Medidas anatómicas de *E. johnstonei* utilizadas para el diseño y construcción del receptáculo inmovilizador.

PARTE	ESPECIMEN											PROMEDIO	DESVIACIÓN STD	MÁXIMO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
Nariz-cola	2	2,18	2,5	2,46	2,32	2,62	2,81	2,07	2,13	2,26	2	2,30	0,27	2,81
Ancho cabeza	0,77	0,82	0,91	0,88	0,84	0,93	1,01	0,75	0,8	0,85	0,91	0,86	0,08	1,01
Ancho cuerpo	0,61	0,78	0,82	0,75	0,74	0,8	1,08	0,65	0,68	0,8	0,87	0,78	0,13	1,08
Ext. Superior	1,15	1,15	1,36	1,18	1,22	1,33	1,76	1,09	1,12	1,38	1,38	1,28	0,19	1,76
Ancho ext. Superior	N.A	0,18	0,17	0,17	0,17	N.A	0,23	0,13	0,16	0,17	0,21	0,18	0,03	0,23
Hombro-codo	0,42	0,43	0,44	0,39	0,41	0,45	0,61	0,31	0,39	0,42	0,42	0,43	0,07	0,61
Codo-mano	0,46	0,41	0,42	0,47	0,54	0,52	0,64	0,43	0,42	0,43	0,46	0,47	0,07	0,64
Mano	0,43	0,42	0,53	0,52	0,51	0,47	0,72	0,44	0,54	0,53	0,6	0,52	0,09	0,72
Ext. Inferior	2,96	3,14	3,06	3	2,85	3,24	3,74	2,61	3,11	3,08	3,16	3,09	0,28	3,74
Largo fémur	0,91	0,91	0,84	0,82	0,79	0,92	1,15	0,78	0,82	0,97	0,93	0,89	0,11	1,15
Ancho fémur	0,33	0,36	0,43	0,3	0,37	0,4	0,49	0,34	0,33	0,39	0,4	0,38	0,05	0,49
Largo gastrocnemio	0,97	1,01	0,96	0,99	0,93	1,07	1,27	0,95	0,92	1	1,02	1,01	0,10	1,27
Ancho gastrocnemio	0,22	0,31	0,3	0,32	0,33	0,35	0,39	0,25	0,29	0,33	0,3	0,31	0,05	0,39
Pie	1,32	1,35	1,35	1,51	1,27	1,46	1,78	1,29	1,35	1,46	1,53	1,42	0,15	1,78

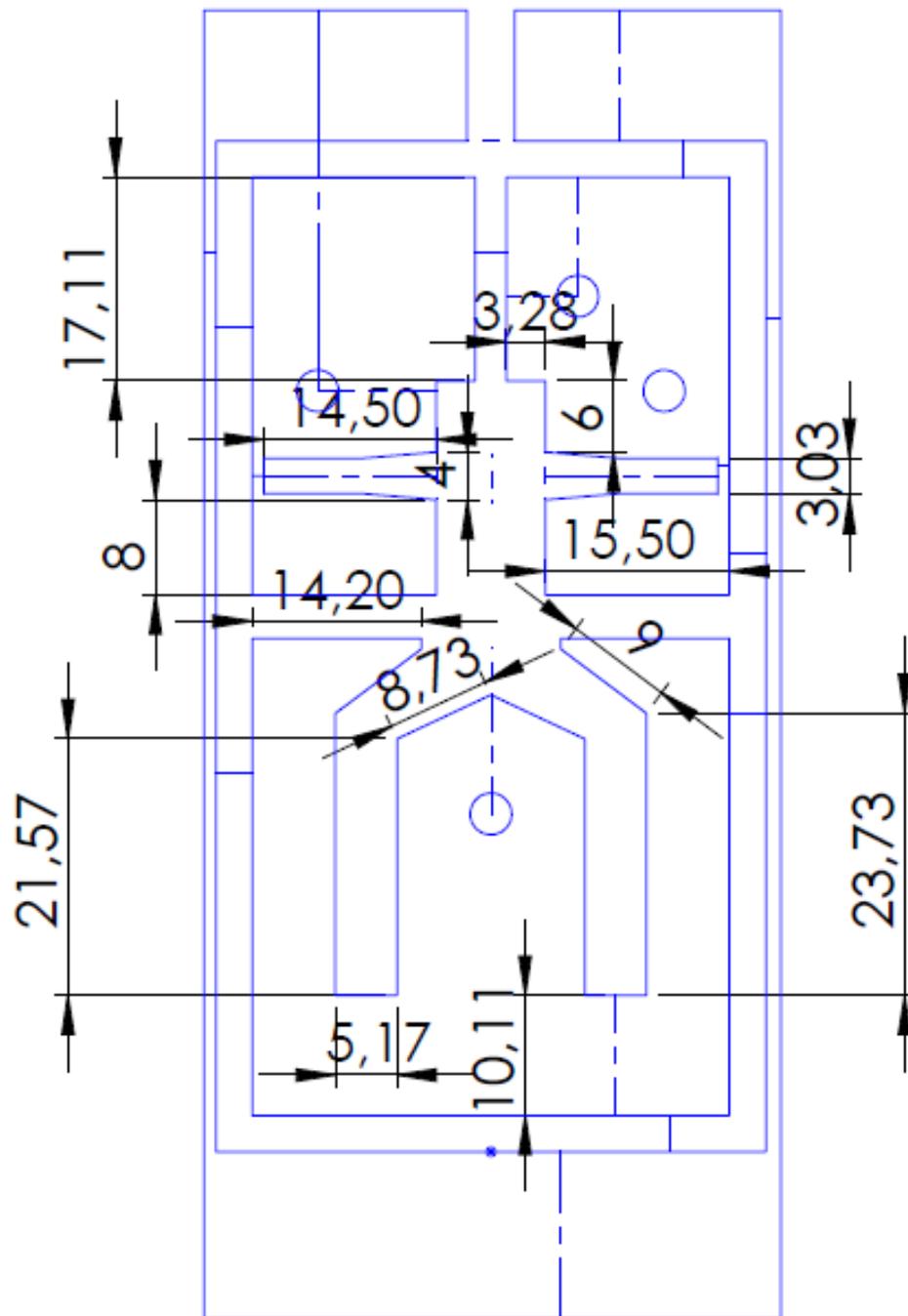


Figura 20. Medidas interiores del receptáculo inmovilizador para ranas *E. johnstonei*.

Santiago de Cali, Febrero 25 de 2013
CIECUAE-008/2013

Dr. Rafael Santiago Castaño, B.Sc, M.Sc., & Ph.D
Investigador principal - Universidad Icesi
Cali

Asunto: Aprobación de proyectos con ranas - *Eleutherodactylus johnstonei*

El día 8 de Febrero del presente año, los miembros del CIECUAE de la Universidad Icesi, se reunieron, revisaron y aprobaron los siguientes proyectos de investigación, dando cumplimiento a la Ley 84 de 1989 y a la resolución de Rectoría N° 847 (9 de julio de 2012):

- **Nombre del proyecto 1:** *"Adaptación y establecimiento de un sistema de transducción para medir el curso temporal de sístoles ventriculares en Biomodelo de corazón de *Eleutherodactylus johnstonei*.*
- **Nombre del proyecto 2:** *"Estudio de la sensibilidad de fármacos antiarrítmicos en el Potencial de Acción Monofásico (PAM) ventricular de *Eleutherodactylus johnstonei*."*
- **Nombre del proyecto 3:** *"Estudio de polimorfismo de la proteína hepática metalotioneína en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei*."*

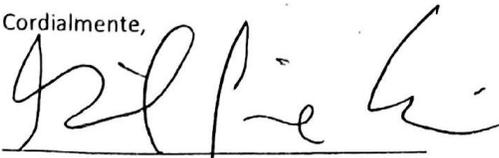
Nota: *Los órganos, restos frescos y carcasas de las ranas sacrificadas en los proyectos 1 y 2 serán empleados en los proyectos 3, 4, 5 y 6 para optimizar el uso de estas ranas.*

- **Nombre del proyecto 4:** *"Establecimiento de un sistema de órgano aislado para registro de acople presináptico y postsináptico, empleando nervio ciático y músculo sartorio de *Eleutherodactylus johnstonei*."*
- **Nombre del proyecto 5:** *Evaluación de la presencia de alcaloides en la rana *Eleutherodactylus johnstonei*.*
- **Nombre del proyecto 6:** *Morfología ovárica y desarrollo de los oocitos de *Eleutherodactylus johnstonei**

Con esta aprobación, el investigador debe solicitar los permisos de uso de fauna silvestre antes las entidades de control ambiental, ya sea CVC, DAGMA y/o Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo sostenible.

La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,



Gabriel Jaime Echeverri, M.D
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi