

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE REGISTRO DE CIRCULACIÓN  
INTRAVITAL EN ÓRGANOS DE *Eleutherodactylus johnstonei***

**DIANA PAOLA CALDERÓN CADENA**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACEUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2015**

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE REGISTRO DE CIRCULACIÓN  
INTRAVITAL EN ÓRGANOS DE *Eleutherodactylus johnstonei***

**DIANA PAOLA CALDERÓN CADENA**

**PROYECTO DE GRADO**

**TUTOR  
SANTIAGO CASTAÑO Ph.D.**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE QUIMICA FARMACEUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2015**

## Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	3
Contenido.....	3
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUCCION .....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
2.1. Definición del problema.....	11
2.2. Justificación.....	11
3. MARCO TEORICO .....	12
3.1. Circulación de la sangre.....	12
3.2. Microcirculación.....	13
3.2.1. Regulación del flujo microcirculatorio.....	14
3.2.2. Patologías.....	15
3.3. Microscopia intravital.....	16
3.4. Biomodelo.....	17
3.4.1. El hígado de la rana.....	18
3.5. El Verapamilo.....	19
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo General.....	21
4.2. Objetivos Específicos.....	21
5. METODOLOGIA .....	22
5.1. Requerimientos legales para experimentación con animales.....	22
5.2. Adaptación del montaje para registro de Imagen en Campo Oscuro....	22
5.3. Captura, mantenimiento de ranas.....	23

5.4.	Disección de la rana.....	23
5.5.	Registros de video y experimentos.....	23
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
6.1.	Montaje para registro.....	25
6.2.	Metodología de análisis.....	27
6.3.	Efecto del Verapamilo.....	31
6.3.1.	Experimentos control.....	31
6.3.2.	Experimentos con Verapamilo y curva de dosis respuesta.....	32
7.	Conclusiones.....	37
8.	RECOMENDACIONES.....	38
9.	BIBLIOGRAFIA.....	39
	ANEXOS 1 .....	42
	POE: Captura y mantenimiento en cautiverio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	
	ANEXO 2.....	43
	POE: Sacrificio y disección de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la circulación de la sangre.....	12
<b>Figura 2.</b> Esquema de la microcirculación sanguínea.....	14
<b>Figura 3.</b> Sidestream Dark Field Imaging.....	17
<b>Figura 4.</b> Imagen de microcirculación generada por SDF de imágenes en la mucosa sublingual (5x).....	17
<b>Figura 5.</b> <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> (Victor Valley Collage, s.f.) .....	18
<b>Figura 6.</b> Ubicación del hígado en la anatomía de la rana .....	18
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la molécula de clorhidrato de Verapamilo .....	19
<b>Figura 8.</b> Cámara que se utilizó dentro del montaje para grabar .....	25
<b>Figura 9.</b> Receptáculo para la rana. ....	26
<b>Figura 10.</b> Montaje para microscopia intravital.....	27
<b>Figura 11.</b> Pantalla del Virtual Dub.....	28
<b>Figura 12.</b> Secuencia de imágenes.....	29
<b>Figura 13.</b> Estandarización.. ....	30
<b>Figura 14.</b> Cuadro de resultados.....	30
<b>Figura 15.</b> Archivo final. La imagen muestra cómo se deben guardar los datos obtenidos del análisis y como se presentan en Excel.....	31
<b>Figura 16.</b> Fracción de cambio de diámetro en arteriolas hepáticas de rana <i>E. johnstonei</i> . ....	32
<b>Figura 17.</b> Cursos temporales de la fracción de cambio de diámetro de arteriolas de <i>E. johnstonei</i> expuestas a diferentes concentraciones de Verapamilo en solución Ringer.. ....	33
<b>Figura 18.</b> Fotogramas de arteriolas registradas tanto en su condición inicial (solo Ringer) y bajo el efecto de Verapamilo a 0,95 $\mu\text{M}$ . ....	34

**Figura 19.** Normalización de la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) en función de la concentración de Verapamilo.....35

## RESUMEN

La microscopía intravital permite registrar la dinámica de la sangre y la actividad endotelial asociada a cambios en arteriolas, vaso y vénulas que irrigan tejidos en órganos vivos. Existen equipos como el Sidestream Dark Field Imaging (SDF) que permite realizar ese tipo de registros, de los cuales se puede obtener información para estudios diagnósticos de patologías y de la efectividad de los tratamientos que se estén aplicando.

Teniendo en cuenta la importancia de realizar este tipo de observaciones, durante el desarrollo de este proyecto se estableció un sistema de campo oscuro capaz de obtener resultados visuales similares a los que proporciona el SDF. Tomando como modelo para registro y comparación el hígado de la rana *Eleutherodactylus Johnstonei*.

Dada su importancia, el análisis de este tipo de registros de microcirculación en lugares como la Fundación Valle de Lili es realizado por personas, quienes observan cada fotograma en un computador, lo que resulta dispendioso y requiere de un largo tiempo para obtener resultados. Por esta razón se desarrolló una metodología semiautomatizada con ayuda de un software libre con el ImageJ capaz de medir el diámetro de las arteriolas, vasos y vénulas en menor tiempo, permitiendo observar y calcular los cambios que se producen en un espacio de tiempo determinado.

Con el fin de verificar que tanto el montaje como la metodología son adecuados para realizar análisis en microscopía intravital, se evaluó el efecto del Verapamilo sobre los capilares que irrigan el hígado de la rana, ya que se conoce que este fármaco actúa directamente sobre ellos, relajando el músculo liso produciendo una dilatación vascular visible. En dicho análisis se obtuvo como resultado que la dosis efectiva 50% de este fármaco en ranas, tiene un valor de  $6,38534e-01 (+/- 8,10729e-03)$   $\mu\text{M}$ , valor cercano al de otro estudio realizado en ratas.

**Palabras clave:** Diámetro arteriolar, Diámetro venular, *Eleutherodactylus Johnstonei*, microcirculación, Verapamilo,

## ABSTRACT

The intravital microscopy allows recording the dynamics of blood and endothelial activity associated with changes in arterioles and venules vessel supplying tissues in living bodies. There are equipments like Sidestream Dark Field Imaging (SDF) which allows such records, which you can get information for both diagnostic pathology and the effectiveness of treatments being applied.

Given the importance of these observations during the development of this project darkfield system is able to achieve similar visual results to those obtained through the SDF was established. Modeled for registration and comparison liver frog *Eleutherodactylus johnstonei*.

Given its importance, the analysis of such records microcirculation in places like Valley Foundation Lili is done by people who watch each frame into a computer, which is consuming and requires a long time to get results. For this reason a semi-automated methodology was developed using free software with ImageJ capable of measuring the diameter of arterioles, venules vessels and in less time, allowing to observe and calculate the changes that occur in a space of time.

In order to verify that both the assembly and the method are suitable for testing in intravital microscopy, the effect of Verapamil on the capillaries that supply the liver Frog was evaluated since it is known that the drug acts directly on them, relaxing the smooth muscle producing a visible vascular dilation. This analysis was obtained as a result that the effective dose 50% of this drug in frogs, is worth  $6,38534e-01 (+/- 8,10729e-03)$   $\mu\text{M}$ , close to that of another study in rats value.

**Keywords:** Arteriolar diameter, Venular diámetro, *Eleutherodactylus johnstonei*, microcirculation, Verapamil.

## 1. INTRODUCCION

El sistema circulatorio que se encuentra conformado por el corazón y una serie de vasos (venas y arterias), cumple funciones vitales en los seres humanos, entre ellas el transporte de sangre en todo el cuerpo y a través de esta se conduce a las células el oxígeno y los nutrientes, además de remover de ellas los productos de desecho de los procesos metabólicos y el anhídrido carbónico. Los vasos sanguíneos salen desde el corazón como arterias, las cuales disminuyen su diámetro a medida que se ramifican y se van adentrando en los tejidos y órganos, hasta formar los capilares que son las estructuras más pequeñas de este sistema y los que permiten realizar las funciones de intercambio, constituyendo así una red microcirculatoria.

Las arteriolas y vénulas con sus estructuras de músculo liso regulan el flujo de la sangre total en el tejido en el que se encuentran. Este control del flujo se realiza por factores extrínsecos y locales, un ejemplo de los primeros son los nervios u hormonas, en el caso de los segundos como hormonas o componentes producidos en el endotelio, todo lo anterior permite realizar vasodilatación o vasoconstricción.

La técnica de microscopía intravital en biomodelos animales (especialmente murinos) se emplea para estudiar los cambios en la microcirculación asociados al diámetro vascular, al flujo sanguíneo en procesos de diferentes patologías, como: hipertensión, aterosclerosis coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, daño a órganos diana, entre otros. Por otro lado esta técnica ha servido para evaluar la acción de fármacos dirigidos a músculo liso de endotelio y a la fisiología de flujo capilares.

La técnica consta de un sistema de iluminación en longitudes de onda que son absorbidos por los pigmentos transportadores de oxígeno de los eritrocitos en los capilares del tejido, pero como no son absorbidas por otras células, entonces se genera un contraste de células oscuras (eritrocitos) sobre un fondo claro (tejido y capilares). Por este efecto de contraste es que se le denomina Imágenes de Campo Oscuro o del inglés Dark Field Imaging. Estas imágenes son video-registradas y procesadas para sus análisis posteriores.

Aunque ya se están realizando estudios en humanos con ayuda de equipos como el Sidestream Dark Field Imaging (SDF), la obtención de resultados requiere mucho tiempo ya que el análisis de los diferentes parámetros dentro de las imágenes y videos se debe hacer de manera manual. Por lo anterior en este proyecto se busca establecer un sistema de registro y cuantificación sistematizado de flujo sanguíneo en tejidos y órganos tomando como modelo de estudio la rana *Eleutherodactylus Johnstonei*.

Con el propósito de aportar al desarrollo y adaptación de técnicas de microscopia intravital de campo oscuro, en este trabajo se expone una propuesta experimental en la que se emplea la microscopía intravital con contraste de campo oscuro.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1. Definición del problema**

En la Fundación Valle del Lili los registros de microcirculación mediante técnica de videoregistro SDF son analizados visualmente y sirven específicamente para registrar y medir tanto el flujo en capilares como los cambios en diámetros arteriolares y venulares de los pacientes enfermos. Estos parámetros de la microcirculación pueden servir como sistema diagnóstico en algunas patologías.

Sin embargo el análisis visual es dispendioso en tiempo porque depende de un observador analizando el video fotograma a fotograma frente a la pantalla de un computador.

### **2.2. Justificación**

Desarrollar metodologías automatizadas o semiautomatizadas que permitan medir o estimar parámetros diagnósticos de microscopía intravital, reduciría el tiempo de análisis y permitiría diagnósticos más rápidos que a su vez permitirían aumentar el número de pacientes diagnosticados mediante esta técnica.

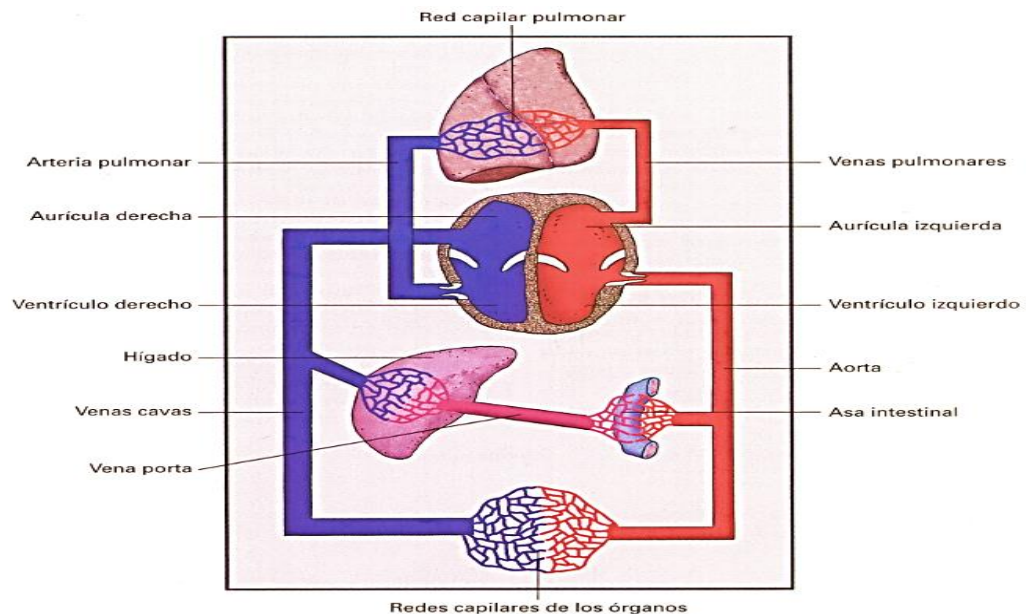
Para aportar a la solución del problema planteado se sugiere desarrollar modelos de microscopía intravital que permitan desarrollar, adaptar o afinar las metodologías dirigidas a la automatización del análisis de imágenes.

En este trabajo se establece un sistema de microscopía intravital, proponiendo como biomodelo-espécimen, el hígado de una rana viva pero en estado vegetativo. La rana propuesta es una plaga que fue introducida desde las Antillas. La escogencia de este biomodelo radica en los bajos costos dado que son organismos de fácil consecución dada su condición de “plaga” y porque ya se han empleado biomodelos de ranas en diversos trabajos de fisiología y farmacología mostrando mecanismos similares y conservados genéticamente. El pequeño tamaño de la rana (2 cm de longitud) permite “reducir” el experimento ahorrando consumibles si por ejemplo se compara con biomodelos murinos.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. Circulación de la sangre

El ser humano, está conformado por varios sistemas, entre ellos el circulatorio el cual es una vía cerrada que trasporta la sangre que llega a todas las células del cuerpo para que ellas reciban sus nutrientes y luego esta retorna hasta el punto de partida. Está constituido por el corazón como órgano central, y los vasos como sistema de conducción, estos últimos pueden ser sanguíneos o linfáticos, como se observa en el esquema general de la figura 1. (García-Porrero and Hurlé, 2005)



**Figura 1.** Esquema general de la circulación de la sangre. (García-Porrero and Hurlé, 2005)

El corazón es una bomba muscular que cumple dos funciones principalmente: a) crea la presión suficiente para que la sangre circule y, b) distribuye la sangre entre el organismo y los pulmones. La distribución se realiza a través de los vasos sanguíneos que son de tres tipos: arterias, venas y capilares. Cada uno de estos cumple diferentes funciones, como las arterias que llevan la sangre del corazón a todas las partes del cuerpo; por su parte los capilares son el lugar donde se realiza el intercambio de nutrientes, gases y productos metabólicos entre la sangre y las células; finalmente están las venas que son las que conducen la sangre desde los capilares al corazón. El intercambio de moléculas en los capilares produce el líquido intersticial, una parte de este líquido retorna a los capilares y pasa a las venas; la otra parte forma la linfa, que es recogida por los vasos linfáticos, que son los que

terminan drenando en el sistema venoso y así todo el medio líquido retorna al corazón. (García-Porrero and Hurlé, 2005)

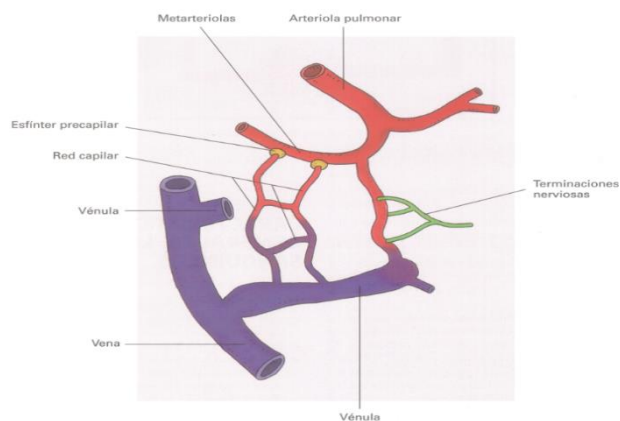
El aparato circulatorio cumple varias funciones importantes, como consecuencia del transporte de sangre, entre estas están:

- a) Lleva a las células el oxígeno y los nutrientes, y remueve de ellas los productos del metabolismo y el anhídrido carbónico.
- b) Produce y renueva el líquido intersticial, regulando su composición.
- c) Transporta hormonas que son los mensajeros de las células del cuerpo.
- d) Contribuye a la defensa del organismo mediante el transporte de los glóbulos blancos y las inmunoglobulinas de la sangre.
- e) Regula la temperatura corporal mediante ajustes circulatorios del flujo en los vasos de la piel. (García-Porrero and Hurlé, 2005)

### **3.2. Microcirculación**

La sangre al salir del corazón entra en una red de arterias que disminuyen gradualmente en diámetro interior, y que se ramifican formando unas arterias más pequeñas conocidas como arteriolas, que a su vez se dividen para formar los capilares, los cuales son los vasos sanguíneos más pequeños. Los capilares presentan una estructura que permite el intercambio de sustancias (agua, nutrientes y gases) desde la sangre hacia los tejidos y recoge los productos de desecho de estos. (Hendry et al., 2012).

El conjunto de capilares constituyen la red microcirculatoria, que tiene como función principal asegurar el transporte de oxígeno que supla las necesidades de cada célula dentro de un tejido. Esta red además regula el volumen de los compartimientos corporales y afecta sensiblemente el balance hidrosalino. Los nutrientes se mueven en las dos direcciones mediante su difusión, mientras que el volumen de los compartimientos depende del proceso de filtración. (Dvorkin et al., 2010)



**Figura 2.** Esquema de la microcirculación sanguínea. (García-Porrero and Hurlé, 2005)

La red1 microcirculatoria está constituida por una serie de vasos sanguíneos que permiten conectar las venas con las arterias. Inicialmente las arteriolas, irrigan el lecho capilar, por medio de las arteriolas terminales; este lecho constituye la porción central y más pequeña de la microcirculación, la sangre proveniente de estos capilares es recogida por las vénulas poscapilares que junto con las arteriolas terminales están involucradas en la regulación de la perfusión capilar. Este esquema se puede observar en la figura 2. (Dvorkin et al., 2010)

### 3.2.1. Regulación del flujo microcirculatorio

El control del flujo de sangre ha sido un tema de interés central para los fisiólogos desde finales del siglo XIX. El flujo de sangre total a un órgano está regulado por la microcirculación y esta varía de acuerdo a las necesidades metabólicas, pero es relativamente insensible a la presión arterial (Secomb, 2008). Este fenómeno es muy importante, debido a que la regulación del flujo microcirculatorio permite “ahorrar” gasto cardiaco (Dvorkin et al., 2010). La cantidad de sangre que llega a las células está regulada por factores extrínsecos o locales, que son los que controlan el diámetro de los vasos provocando vasoconstricción o vasodilatación. La mayoría de las arterias (excepto la aorta) y las venas presentan un control extrínseco, por el contrario, la microcirculación está regulada por factores extrínsecos y locales. (García-Porrero and Hurlé, 2005).

Los factores extrínsecos son nerviosos y hormonales. El sistema nervioso vegetativo regula el calibre de los vasos. Algunas hormonas como la noradrenalina y la vasopresina son vasoconstrictores; otros como el péptido natriurético auricular (PNA) genera un efecto contrario, es decir de vasodilatación (García-Porrero and Hurlé, 2005).

El control local del flujo sanguíneo asegura la coincidencia de la perfusión de acuerdo a la mayor o menor demanda de oxígeno en el espacio, logrando con ello

el aporte eficiente de oxígeno (Secomb, 2008). Además puede ser el resultado del metabolismo celular, hormonas locales y sustancias producidas por el endotelio. Por ejemplo, el dióxido de carbono, el ácido láctico, y los iones de K, son vasodilatadores, que generan un incremento del flujo al tejido. La hipoxia local genera relajación de la fibra lisa. Hormonas como la histamina, serotonina y prostaglandinas que son liberadas en un proceso inflamatorio generan vasodilatación. Las células endoteliales producen un vasodilatador importante, el óxido nítrico (influencia tónica vasodilatadora continua), y una sustancia vasoconstrictora, la endotelina (liberada cuando existe una lesión del endotelio, evitando el sangrado) (García-Porrero and Hurlé, 2005).

### 3.2.2. Patologías

Existen diferentes enfermedades que pueden afectar la microcirculación, en este espacio se hace referencia a la más común. La hipertensión que es una elevación crónica de la presión arterial, es un problema cardiovascular muy común, que afecta a más del 20% de la población adulta del mundo occidental; esta además incrementa el riesgo de otras enfermedades cardiovasculares graves. Casi el 90% de los casos, se desconoce su origen, solo el 10% restante es resultado de algunas formas de enfermedades renales, algunos trastornos neurológicos, tiroideos o paratiroides, o incluso hábitos dietéticos exagerados (Mohrman, 2007). Un tratamiento para esta enfermedad, es la utilización de fármacos que ayudan a disminuir la presión arterial como el metoprolol, este es un fármaco cardioselectivo, el cual inhibe la estimulación de adrenorreceptores  $\beta_1$ , como los que se encuentran en el corazón (Katzung, 2007).

Existen gran cantidad de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la enfermedad aterosclerótica coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, y daño a órganos diana, mucho trabajo ha sido realizado para poder comprender mejor su etiología. Los mecanismos exactos que se asocian, por ejemplo a la hipertensión no son claros, pero teniendo en cuenta que esta patología está asociada al disfuncionamiento endotelial vascular (vasoconstricción y vasodilatación) hasta el momento se ha podido establecer que modificaciones de la microcirculación provocan una disminución del diámetro de la luz en los vasos, lo que lleva al cierre de arteriolas y su posterior desaparición, disminuyendo así la cantidad de capilares y arteriolas, lo que implica menor irrigación a los tejidos además de que produce resistencia periférica elevada. (SIIC, 2003) Por esta razón se busca comprender mejor estos mecanismo etiopatogénicos, a través del estudio de la microcirculación, ya que aquí es donde se produce el papel principal del árbol vascular, como es, el suministro de oxígeno y otros sustratos esenciales a las células, y la eliminación de sus residuos metabólicos producto; todo esto puede permitir un mayor desarrollo de medicamentos o intervenciones no farmacológicas que deben aplicarse a la población. (Strain et al., 2012)

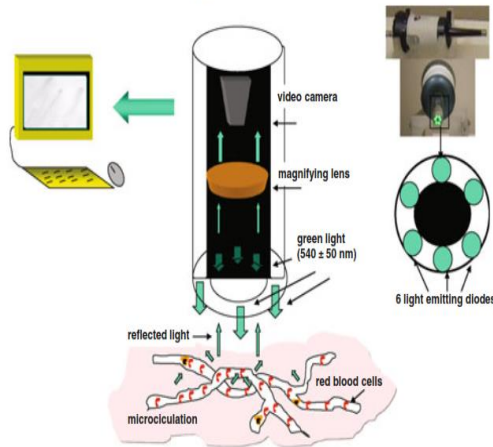
### 3.3. Microscopia intravital

Es importante conocer en tiempo real la arquitectura de la microcirculación y el flujo sanguíneo, ya que ofrece información relevante sobre el diámetro de los vasos, la densidad del capilar funcional, y el tipo de flujo sanguíneo, esto para poder evaluar la perfusión tisular. Actualmente existen técnicas que permiten obtener este tipo de información, como lo son la espectrofotometría de absorción, fluorescencia, fosforescencia, flujometría con láser Doppler y videomicroscopia intravital, que presentaban aplicabilidad en animales mas no en humanos, debido a la utilización de sustancias fluorescentes que generaban toxicidad y al tamaño de algunos equipos (Dvorkin et al., 2010).

La visualización y cuantificación de los cambios en la microcirculación se ha propuesto como una herramienta potencial en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, tales como sepsis, la enfermedad de células falciformes, úlceras crónicas, la diabetes mellitus y la hipertensión. En cada una de estas enfermedades, varias características de la microcirculación tales como la estructura de los capilares y la calidad del flujo de sangre en los capilares cambian con el tiempo, las cuales se pueden evaluar (Demir et al., 2012). Para realizar este tipo de estudios recientemente se ha introducido, validado y aplicado clínicamente, un nuevo método para la observación de la microcirculación en pacientes que se llama "*Orthogonal Polarization Spectral Imaging*" (OPS imaging), y genera imágenes de alto contraste sin el uso de sustancias fluorescentes (Dvorkin et al., 2010). El OPS de imágenes y el de corriente lateral de campo oscuro (SDF) de imágenes se ha utilizado ampliamente en el campo de la investigación clínica de la microcirculación. OPS y sistema mejorado SDF son ambas técnicas de imagen no invasivas y se han utilizado para realizar un seguimiento de los cambios en la microcirculación en las superficies mucosas. La mayoría de los estudios han utilizado las superficies sublinguales de la cavidad oral (figura4) (Demir et al., 2012).

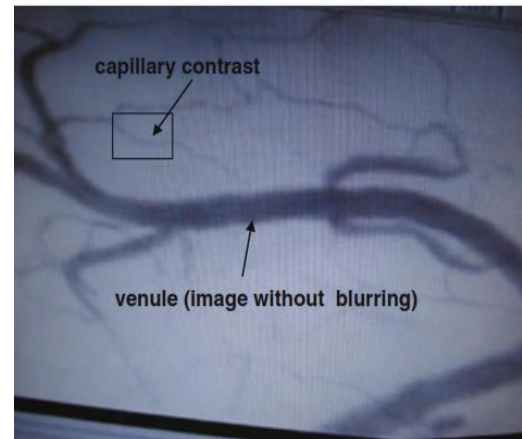
En este caso se va a utilizar SDF (*Sidestream Dark Field Imaging*) (figura 3), que posee una sonda está compuesto por seis LEDs y que en la parte central tiene una acamara de video. Este utilizan la luz polarizada verde con longitud de onda de 530 nm que es absorbida por la hemoglobina y muestra glóbulos rojos como estructuras negras que fluyen rodeadas de blanco/gris de fondo (figura 4) (Treu et al., 2011), característica se va a ser aprovechada para generar un contraste y poder identificarlos y cuantificarlos por medio del software ImageJ en el biomodelo.

### MICROSCAN – SDF (Sidestream Dark-Field Imaging)



**Figura 3.** Sidestream Dark Field Imaging (SDF) (Treu et al., 2011)

### SDF imaging (x5)



**Figura 4.** Imagen de microcirculación generada por SDF de imágenes en la mucosa sublingual (5x) (Treu et al., 2011)

### 3.4. Biomodelo

El biomodelo a utilizar especie *Eleutherodactylus Johnstonei* (figura 5), conocida como rana coquí por el canto que produce cuya intensidad puede ocasionar molestia en áreas urbanas. Es una especie propia de las Antillas menores que ingresó a nuestro país al parecer en medio de cargamentos provenientes de estas islas. En un comienzo esta especie únicamente se encontraba en la ciudad de Cali y era asociada a las plantas de los jardines; sin embargo, hay registros recientes de su presencia en zonas rurales, cerca al Km 18, en la vía Cali-Buenaventura. Esto indica el potencial que tiene la rana coquí para invadir zonas rurales y, posiblemente, competir fuertemente con especies nativas, por los recursos disponibles, tales como alimento, espacio físico y acústico, y pueden ser vehículos de graves enfermedades transmisibles a otras especies. (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007)



**Figura 5.** *Eleutherodactylus johnstonei* (Victor Valley Collage, s.f.)

### 3.4.1. El hígado de la rana

El hígado es un órgano de la rana que presenta gran extensión, está compuesto por dos lóbulos, ubicados en la parte lateral derecha e izquierda y este último a su vez se divide parcialmente, como se puede observar en la figura 6. Este órgano cumple funciones importantes dentro de dos sistemas, uno de ellos el digestivo donde segrega bilis constantemente hacia vesícula biliar y además de manera directa por el conducto biliar. Este también es importante en el sistema circulatorio, donde este cumple la función de destrucción de eritrocitos junto con el bazo, por lo que es irrigado por la vena abdominal anterior que al entrar en este órgano se una a la vena porta hepática y el parénquima hepático es irrigado por diferentes vasos. (Maneyro, Camargo, & da Rosa, 2014)

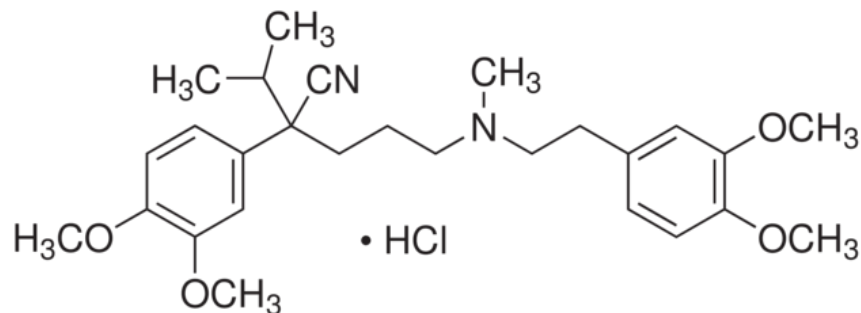


**Figura 6.** Ubicación del hígado en la anatomía de la rana

Un dato adicional a tener en cuenta es que el hígado junto con la glándula adrenal y el bazo, son especiales ya que en estos puntos se encuentran capilares que no están en contacto directo con las células somáticas. En este punto los capilares se encuentran separados de los tejidos por espacios tisulares llenos de plasma sanguíneo, que ha sido exudado por las paredes de los capilares, tanto el oxígeno como los nutrientes que se transportan en la sangre deben pasar a través de este los espacios llenos de líquido, esto se produce como consecuencia de la presión ejercida por los impulsos cardiacos y por la presión osmótica de la sangre. (Parker & Haswell, 1997)

### 3.5. El Verapamilo

El Verapamilo en el mercado se encuentra en dos presentaciones como son comprimidos y solución inyectables, este compuesto viene en forma de clorhidrato de Verapamilo, un polvo blanco que presenta una estructura química como la de la figura 7.



**Figura 7.** Estructura química de la molécula de clorhidrato de Verapamilo (MP Biomedicals, 2014)

Este fármaco es un vasodilatador de acción directa sobre el músculo liso vascular, es un antagonista del calcio, ya que bloquea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células a través de los canales de calcio tipo L, teniendo en cuenta que existen diferentes tipos de antagonistas del calcio, este fármaco es del tipo fenilalquilamina. (Rang & Dale, 2008)

El Verapamilo actúa sobre la contracción del músculo liso vascular, esta se genera por la entrada de calcio a través de los canales de calcio transmembrana (los cuales son bloqueados por el fármaco). Normalmente al ingresar calcio a la célula, este se combina con la calmodulina formando un complejo que transforma la enzima cinasa de cadena ligera de miosina hasta su forma activa. Esta última fosforila las cadenas ligeras de miosina lo que permite su interacción con la actina, generando finalmente la contracción. De acuerdo a lo anterior el fármaco genera la vasodilatación porque

disminuye el nivel de calcio intracelular que como ya se vio anteriormente es un modulador importante de la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina para que se produzca la contracción. (Katzung, 2010)

Este fármaco actúa sobre los canales de calcio tipo L, debido a que son los que se encuentran en mayor proporción en las fibras lisas y que además contienen algunos receptores de fármacos. Los canales están compuesto por subunidades  $\alpha_1$  (la mayor, que forma poro),  $\alpha_2$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , en el caso del Verapamilo este se fija a la subunidad  $\alpha_1$  de conductos abierto e inactivos. Esta unión disminuye la frecuencia de abertura en reacción a la despolarización lo que genera una disminución intensa en la corriente del calcio transmembrana, que a su vez hace que se produzca relajación duradera en el musculo liso. Este actúa sobre los canales de calcio hasta que sean ocupados completamente, teniendo en cuenta que el bloque también puede ser revertido de manera parcial aumentando la concentración de calcio o con el uso de fármacos como los simpaticomiméticos que incrementan el flujo transmembrana de calcio. (Katzung, 2010)

El Verapamilo es metabolizado por el hígado, tiene una vida media de 7 horas y su biodisponibilidad es solo del 20%, en promedio. (Dale, 2008)

Estudios que se han realizado previamente en anestesia espinal en ratas, demuestran que el Verapamilo presenta una dosis efectiva 50% (DE50) a una concentración de 0,65  $\mu\text{M}$ . (Chen, Chu, & Chen, 2010)

Otros estudios realizados en ratas que presentan cirrosis demostraron que la perfusión con Verapamilo en el hígado, mejoro notablemente la microcirculación de dicho órgano, esto asociado con mejoras en el consumo de oxígeno y el acaloramiento de antipirina, lo que les permitió concluir que la cirrosis hepática en ratas es parcialmente reversible por vasodilatadores y en este caso en particular por el Verapamilo. (Reichen & Le, 1986)

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Establecer un sistema de registro de diámetro arteriolar o venular en Hígado de *Eleutherodactylus Johnstonei*.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Diseñar un sistema por microscopia intravital que permita registrar el diámetro arteriolar o venular.
- Establecer una metodología semiautomatizada que mediante procesamiento de imágenes permita y estimar el diámetro arteriolar o venular.
- Evaluar farmacológicamente los efectos del Verapamilo en arteriolas o vénulas de hígado de *Eleutherodactylus Johnstonei*.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Requerimientos legales para experimentación con animales.

El desarrollo de este proyecto se regula bajo condiciones éticas según lo dispuesto en la *Resolución No. 008430 de 1993* del Ministerio de Salud, en la *Ley 84 de 1989* y cumpliendo con la resolución de Rectoría *No. 847* del 9 de julio de 2012, de acuerdo a lo anterior este proyecto está respaldado por el Comité de ética en experimentación animal de la Universidad Icesi y se utilizaron 19 ranas para hacer este trabajo.

### 5.2. Adaptación del montaje para registro de Imagen en Campo Oscuro

Para hacer un montaje similar al del sistema *Sidestream Dark Field Imaging (SDF)*, usado en la Fundación Valle del Lili, se hizo un video registro inicial en el hígado de *Eleutherodactylus johnstonei*. Esto se hizo con el propósito de verificar visualmente el grado de detalle (resolución) visual que debería esperarse como resultado del nuevo montaje adaptado para este trabajo. Con el sistema SDF fue tomado un video con una duración de 20 seg y el sistema almacenó el video en formato AVI. El video está compuesto por secuencias de imágenes a 29 imágenes por segundo (fps del inglés). Las imágenes fueron procesadas mediante el uso del software libre: ImageJ (National Institutes of Health, 2014).

Para construir el nuevo sistema, se tomó un microscopio Olympus con derivación para acople de una cámara fotográfica y con magnificaciones 10x, 20x y 40x.

Se empleó una fuente de luz fría con un filtro verde proyectado sobre la superficie del hígado de la rana y justo en el plano focal del objetivo.

Se empleó una cámara fotográfica con capacidad de registro de video a una tasa de 24 fps. Los videos fueron transformados a fotogramas, luego transformados a escala de grises. El diámetro del vaso sanguíneo escogido (arteriola o vénula) para el experimento, era medido con el conteo de píxeles que cubrían el diámetro mediante un segmento que se mantenía fijo a lo largo de los registros (opción presente en las aplicaciones del software ImageJ) para poder comparar el diámetro del en tiempos posteriores en los que se aplicaba alguno de los tratamientos. Cabe anotar que una vez seleccionada el área de filmación esta no era movida ni modificada para mantener constantes las áreas de registro fotográfico del experimento.

### **5.3. Captura, mantenimiento de ranas**

Como se dijo anteriormente en este proyecto se utilizaron ranas adultas de la especie *Eleutherodactylus johnstonei*. Estas fueron capturadas en zonas de fácil acceso como los viveros y jardines en la ciudad de Cali, y se las extrajo del medio siguiendo un procedimiento estandarizado de captura y de mantenimiento (Anexo 1), siguiendo parámetros bioéticos de bienestar animal.

### **5.4. Disección de la rana**

Previo al proceso experimental, cada rana fue extraída del terrario de paso, fue lavada y fue expuesta a baja temperatura (4 °C) para bajar el metabolismo. Una vez la rana entraba en “parálisis por hipotermia”, se introducía un micropunzón a través del foramen magno de la rana para cortar las comunicaciones que puedan estar relacionadas con “nocicepción”, manteniendo viva la rana pero en estado vegetativo. Este procedimiento está estandarizado y probado y cuenta con su POE (Ver Anexo 2). Con el fin de asegurar que solo se usaron ranas adultas, las ranas fueron medidas y solo eran escogidas aquellas que presentaron un tamaño igual o superior a 2,3 cm.

Acto seguido se dispone la rana en posición decúbito supina y se hace una incisión del epitelio a nivel central entre el tórax y el abdomen. Para exponer el hígado. Durante este procedimiento, el vientre de la rana fue irrigado con solución Ringer anfibio.

La solución Ringer Anfibio fue fabricada en agua desionizada y la composición fue: 115 mM de NaCl, 1 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, a pH: 6,8

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron 3 ranas para hacer los controles (solo solución Ringer anfibio) y 15 ranas (5 por cada una de las 5 concentraciones de Verapamilo) siguiendo concentraciones que ya han sido evaluadas para experimentos de dosis respuesta que en modelos murinos han permitido estimar la dosis efectiva 50% (Chen, Chu, & Chen, 2010). Inicialmente se empleó una rana para registrar mediante el equipo SDF.

### **5.5. Registros de video y experimentos**

Inicialmente previo a la utilización de los fármacos se realizó un registro en video de 5 min con ayuda de la cámara SDF, con el fin de evaluar los posibles cambios en el diámetro del capilar que se producen de manera fisiológica en la rana, como respuesta a las condiciones en las que se encuentra.

Posteriormente con el fin de evaluar la respuesta endotelial de los capilares que se encuentran en el hígado, se buscó un fármaco de acción directa sobre los vasos sanguíneos, como es el Verapamilo, el cual actúa generando vasodilatación. Esta vez los registros se realizaron con ayuda de un montaje que fue adaptado a condiciones y características similares la de un sistema de registro SDF. La adaptación se muestra como resultados de este trabajo.

Chen, Chu, & Chen (2010) estimaron que en ratas, el Verapamilo presenta una dosis efectiva ( $DE_{50}$ ) de  $0.65 \mu\text{M}$ . Para calcular si la  $DE_{50}$  de Verapamilo en *Eleutherodactylus johnstonei* era similar al del modelo murino, se tomó el trabajo de Chen, Chu, & Chen (2010) y calcularon dosis en un rango que estuviera por encima y por debajo de  $0.65 \mu\text{M}$ . Las dosis calculadas fueron: 0.2, 0.5, 0.65, 0.8 y  $0.95 \mu\text{M}$  y fueron preparadas disolviendo Verapamilo (Sigma 99% pureza) en solución Ringer Anfíbio.

Se hicieron experimentos por triplicado para cada concentración de Verapamilo, pero inicialmente se hicieron registros de los cursos temporales del cambio de la fracción de diámetro de arterias en hígado de tres ranas con el propósito de estimar “la ventana experimental” del organismo, es decir, hacer experimentos y registrar los cambios en los diámetros de las arteriolas del hígado durante periodos largos de tiempo. Por lo general las ranas duran más de 3 horas en estado vegetativo y con el corazón en función normal si es que no se presentan hemorragias como se ha observado en otros trabajos en el pasado hechos con esta especie. Para el caso particular de este trabajo, no ocurrió ningún evento hemorrágico.

Para hacer los registros de actividad del fármaco, se propuso hacer los registros iniciando con perfusión con solución Ringer y a los dos minutos exactos, el sistema de perfusión fue cambiado por la solución a la concentración a la cual se quería exponer el hígado. A partir del minuto 25 se suspendió la administración del fármaco y se reestableció la de solución ringer, con el objetivo de evidenciar si había reversión del efecto vasodilatador, evidenciándose en nuevos cambios en el diámetro de los vasos estudiados.

Para cada una de las mediciones que se realizaron a las diferentes concentraciones, se tomó un volumen de 5 mL de la solución y se administró hasta cumplir los 25 minutos de iniciado el experimento (23 minutos de perfusión con Verapamilo).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Montaje para registro

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados, se realizó un montaje con el cual se obtuvo registros de video de los capilares del hígado de las ranas, tanto de controles como de pruebas con Verapamilo. Para esto se tuvo en cuenta las principales características y funciones que cumple la cámara SDF (*Sidestream Dark Field Imaging*), entre ellas la capacidad de grabar característica que se resolvió utilizando una cámara fotográfica Nikon D3100 (figura 8), la cual permite obtener videos con duración máxima de diez minutos, con una resolución de 1920 x 1080 a 24 fotogramas por segundo. Es muy importante tener en cuenta que se deben realizar registros con periodos de duración cortos. Que para el caso particular fue de 1 minuto, ya que periodos más largos genera gran cantidad de fotogramas y la información es redundante y difícil de procesar mediante el software Image J. Teniendo en cuenta el margen de grabación, durante los experimentos que se realizaron por triplicado, se tomaron registro cada 5 minutos.



**Figura 8.** Cámara que se utilizó dentro del montaje para grabar

La cámara fue adaptada a la derivación visual del microscopio Olympus y los videos fueron registrados a una magnitud 20X con el ajuste de foco adecuado.

Otra característica importante que presenta la SDF es que utiliza luz polarizada verde con una longitud de onda de 530nm la cual es absorbida por la hemoglobina y muestra los glóbulos rojos como estructuras negras. Para lograr un sistema similar se empleó una fuente de luz fría (Kardell 1200) con un filtro verde 536 nm proyectado mediante fibra óptica cuya luz fue proyectada en posición de 45 grados

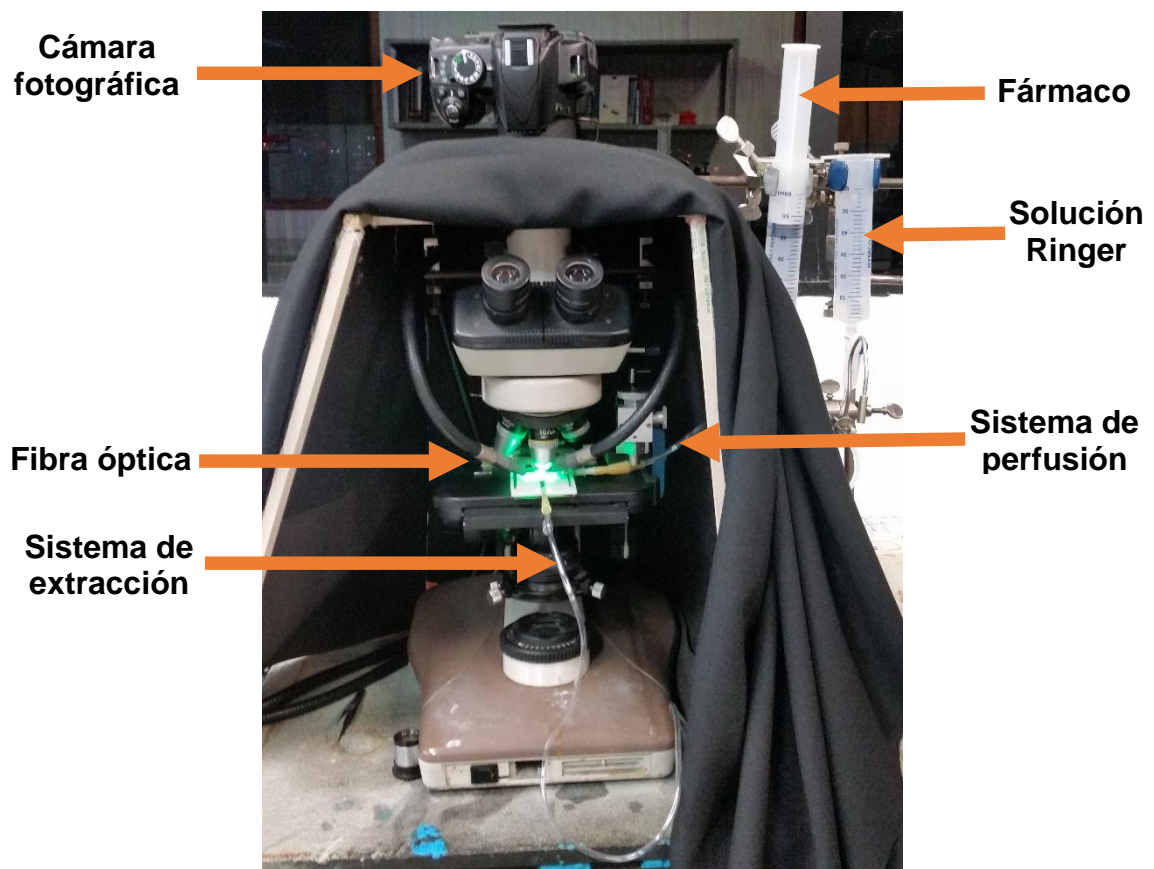
con respecto a la superficie del hígado de la rana y justo en el plano focal del objetivo.

Cada rana fue ubicada en la plancha del microscopio mediante un receptáculo diseñado para este organismo, con el fin de mantenerla húmeda con solución Ringer (Ver Figura 9).



**Figura 9. Receptáculo para la rana.** En la imagen se puede observar el hígado expuesto, segundos previos a la realización de un experimento.

Finalmente se utilizó en el montaje un sistema de perfusión, el cual permitió controlar el volumen de fármaco que se adiciono en cada prueba, además del tiempo de administración. Para evitar que el líquido que se administra a la rana se riegue se diseñó y construyó un receptáculo con canales acordes a la figura de la rana, lo que permitía además que el líquido circule y pueda mantener a la rana húmeda completamente, adicional esto se conectó a una bomba de extracción para que absorba el líquido sobrante. El sistema completo se puede observar en la Figura 10.



**Figura 10. Montaje para microscopia intravital.** En la imagen se puede observar que el montaje está compuesto el microscopio, cámara fotográfica, los contenedores de las soluciones, el sistema de perfusión, el sistema de extracción y la fibra óptica.

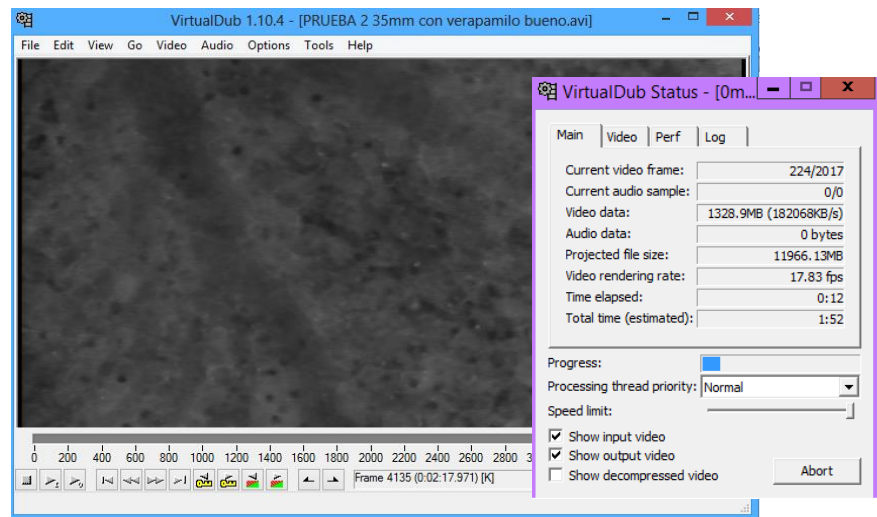
## 6.2. Metodología de análisis

Se diseñó una metodología que permite evaluar el cambio en el diámetro de los capilares, utilizando el programa ImageJ. El análisis de los registros obtenidos se realiza con el siguiente procedimiento:

1. **Archivos en formato AVI:** Para poder procesar y hacer análisis de imágenes empleando el programa ImageJ se requiere que los archivos de video estén en formato AVI, pero tanto la cámara SDF como la cámara Nikon usada en este trabajo almacenan los archivos en formato .MOV, por lo que fue necesario hacer una conversión de un formato a otro empleando la aplicación libre *Video to Video Converter* (Softonic, 2013)
2. **Extracción de imágenes:** Teniendo en cuenta que el archivo se encuentra en un formato de video, se realizó la extracción de una secuencia de

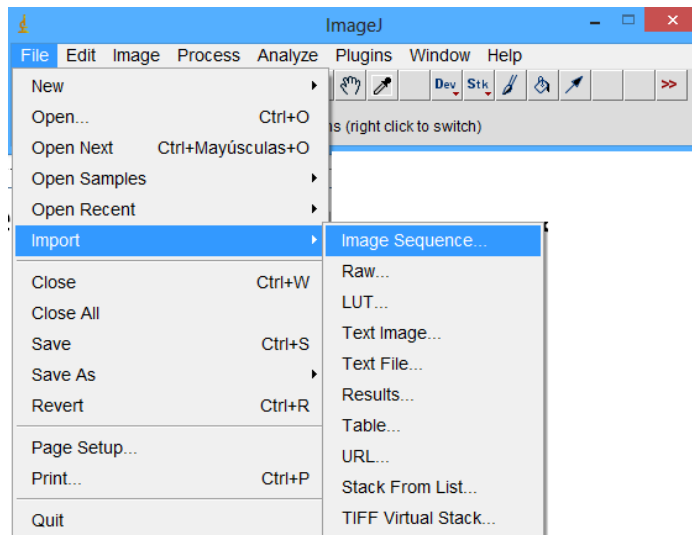
imágenes con la ayuda del programa libre como el *Virtual Dub* (Softonic, 2014) así:

- a. Clic en *File*
- b. Clic en *Open video file...*
- c. Se selecciona el archivo de video del cual se va a extraer la secuencia de imágenes y se hace clic en *Abrir*
- d. Una vez abierto el archivo, nuevamente clic en *File*
- e. *Export* → *Image sequence*
- f. Se asigna un nombre al archivo y en la opción *Output format* se elige *JPEG* y clic en *OK*, donde finalmente se abre una ventana como la de la figura 11, mostrando la cantidad de imágenes que se van a obtener del video, además del progreso.



**Figura 11. Pantalla del Virtual Dub.** Esta imagen muestra la información que proporciona el programa, en el momento de la extracción de imágenes.

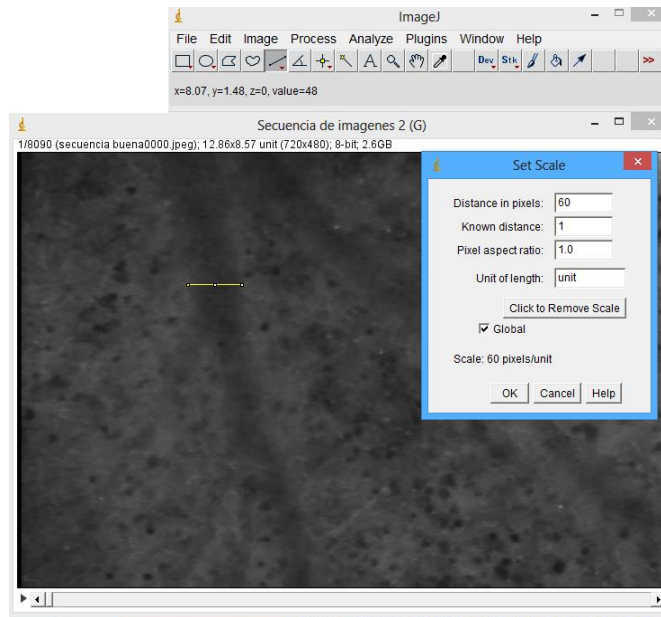
3. **Análisis con ImageJ:** Ya con este programa libre en cuestión, lo que se hace inicialmente es importar la secuencia de imágenes de la carpeta donde se guardó, proceso que se muestra en la figura 12.



**Figura 12. Secuencia de imágenes.** La imagen muestra el proceso que se debe realizar para poder importar las imágenes al programa Image J.

Posteriormente en la imagen inicial se traza una línea recta con el ancho del vaso, de acuerdo al contraste que se genere, como se muestra en la figura 13. Esta se ubica en el mismo lugar durante el paso de cada fotograma, si en algún momento se elimina la selección, esta se puede ubicar nuevamente en el mismo punto gracias a las coordenadas en los ejes X, Y y Z que el programa indica, como se muestran en la figura 13, esto con el fin de asegurar que la medición se realice en el mismo lugar.

Este ajuste inicial es tomado como el tiempo 0, y en la barra de herramientas se hace clic en *Analyze*, luego en *Set Scale* y en el recuadro que aparece se introduce en la casilla *Known distance* una distancia conocida o en este caso se tomó como uno, y si se quiere las unidades estas se introducen en la casilla *Unit of length* y se preciona *CTRL + M*.



**Figura 13. Estandarización.** La imagen muestra la manera en que se debe trazar la línea para obtener la medida inicial.

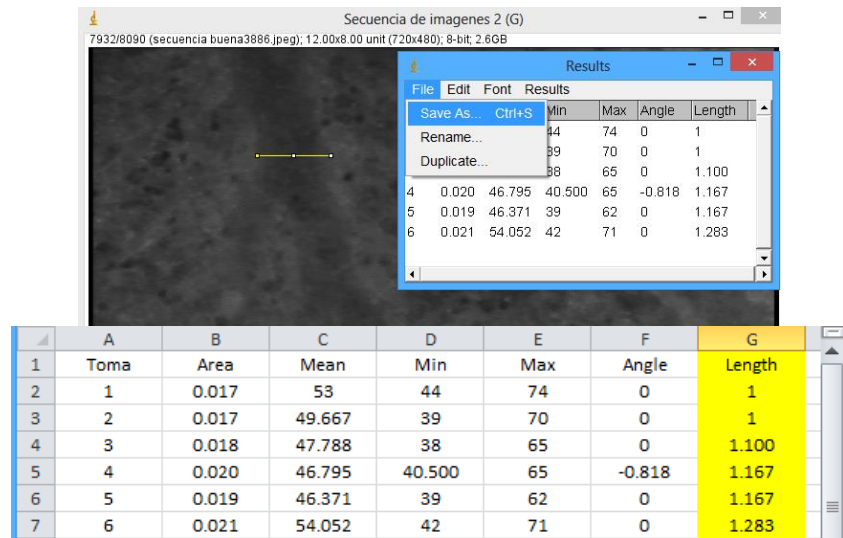
Luego en las siguientes imágenes se traza nuevamente la línea recta, en el tiempo que se quiera medir, de acuerdo con el ancho del capilar que se está evaluando y se presiona CTRL + M u otra alternativa es dirigiéndose hasta *Analyze* y luego a *Measure*. En este punto se abre una nueva ventana con cada una de las mediciones que se toman, como se observa en la figura 14



**Figura 14. Cuadro de resultados.** La imagen muestra la manera como el programa ImageJ presenta los resultados de cada una de las mediciones que se están realizando.

Ya cuando se tengan el análisis completo, con el fin de poder evaluar los resultados obtenidos, se guarda los datos en un archivo de Excel como el que se muestra en

la figura 15 así: en la ventana *Results* hay que dirigirse hasta *File*, donde posteriormente se hace clic en *Save*, se le asigna un nombre y se guarda.

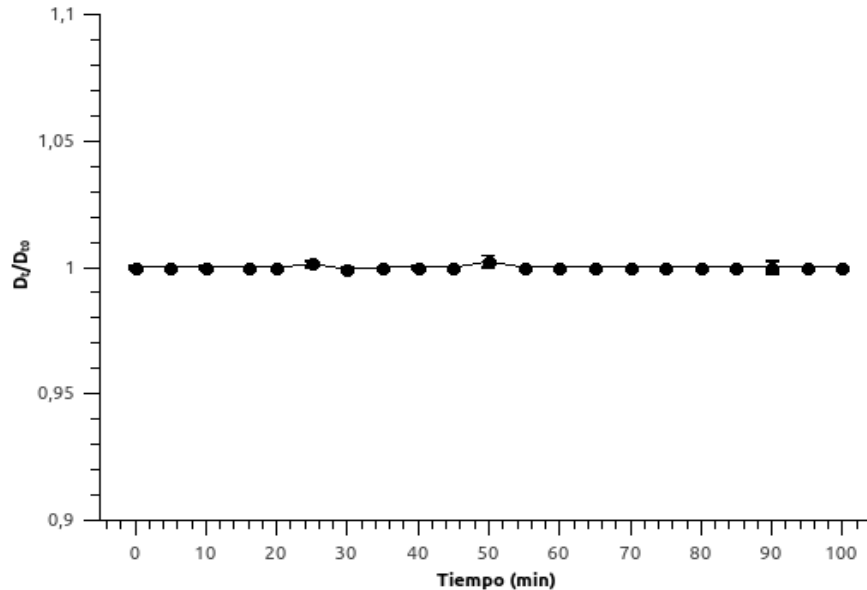


**Figura 15. Archivo final.** La imagen muestra cómo se deben guardar los datos obtenidos del análisis y como se presentan en Excel

### 6.3. Efecto del Verapamilo

#### 6.3.1. Experimentos control

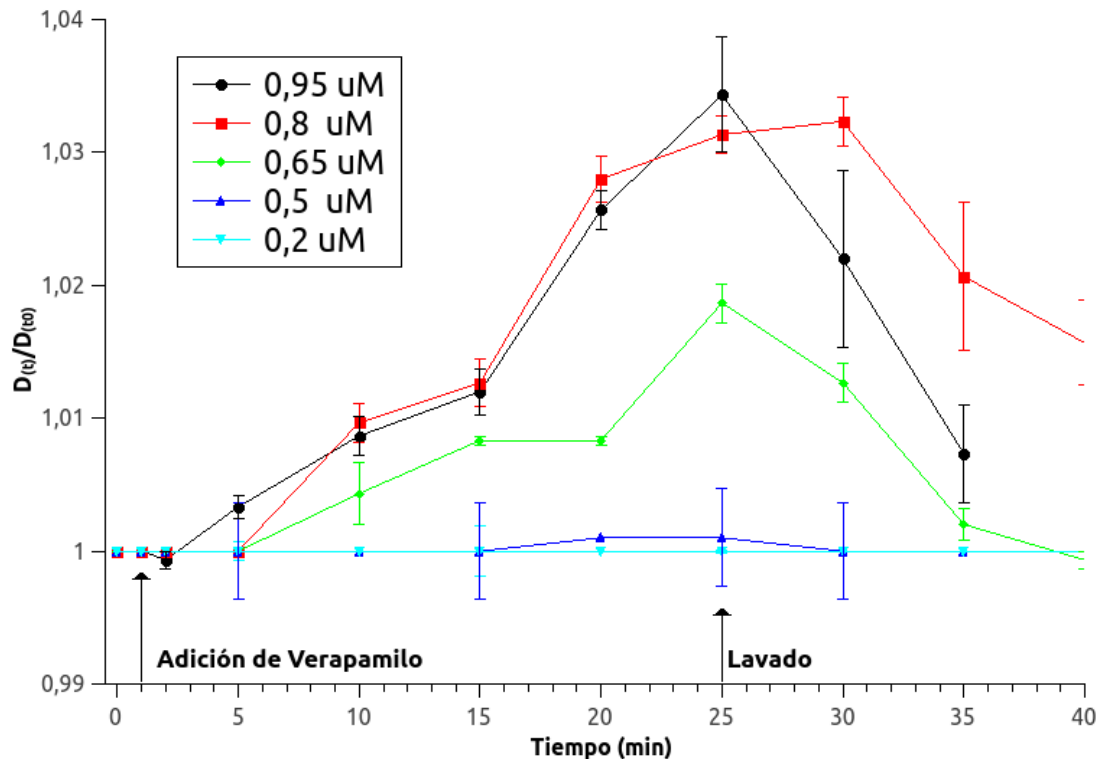
Los cursos temporales (controles) de la fracción de cambio de diámetro en las tres ranas expuestas a solo solución Ringer se exponen en la figura 16. Los experimentos lograron durar por más de una hora y 40 minutos, mostrando que el diámetro de las arteriolas son prácticamente invariantes durante este tiempo de registro. Esto se puede observar en la figura 16. La fracción del cambio de diámetro fue calculada como la fracción del diámetro a cada minuto dividido sobre el diámetro al inicio del experimento ( $t_0$  de "tiempo sub cero").



**Figura 16. Fracción de cambio de diámetro en arteriolas hepáticas de rana *E. johnstonei*.** Se puede observar que el diámetro es invariante para estos experimentos en los que solo se irriga con solución Ringer durante 100 minutos. Los puntos muestran el promedio normalizado por el  $D_{10}$  del diámetro registrado a cada intervalo de tiempo y se incluyeron los errores estándar pero son muy pequeños

### 6.3.2. Experimentos con Verapamilo y curva de dosis respuesta

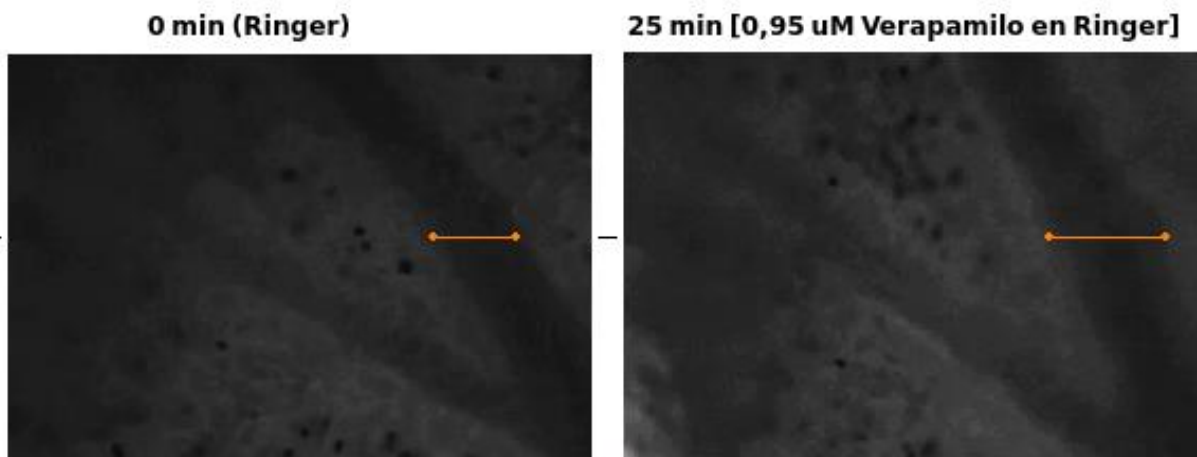
Por los datos anteriores se decidió hacer los registros con tratamientos (diferentes concentraciones de Verapamilo) añadiendo solo solución Ringer y a los dos primeros minutos del experimento añadir el Verapamilo a la concentración deseada y a los 25 minutos (teniendo en cuenta que previamente mediante experimentación se estableció que a partir de este tiempo el diámetro era invariable) hacer un lavado para observar si hay remoción del fármaco. Los promedios (y sus errores estándar) de las fracciones de cambio de diámetro durante los experimentos en los que se añadió Verapamilo a cada concentración se exponen en la figura 17.



**Figura 17. Cursos temporales de la fracción de cambio de diámetro de arteriolas de *E. johnstonei* expuestas a diferentes concentraciones de Verapamilo en solución Ringer. En la gráfica se señala con flechas el inicio de la perfusión con Verapamilo a cada concentración y el lavado a los 25 minutos.**

En la figura 17 se puede observar incrementos en la fracción de cambio del diámetro de las arteriolar al exponer los hígados a Verapamilo disuelto en Ringer, siendo mayores los cambios cuando hay exposición a concentraciones mayores de 0,5  $\mu\text{M}$ . A concentraciones mayores (0,8 $\mu\text{M}$  y 0,95  $\mu\text{M}$ ) la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) el diámetro tiende a permanecer en un límite cercano a 1,03 y 1,04. En la gráfica de la figura 17 también se puede observar que en general, para todas las concentraciones, la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) disminuye cuando se realiza el lavado con solución Ringer, demostrando que farmacológicamente se puede remover el fármaco reperfundiendo con solución Ringer

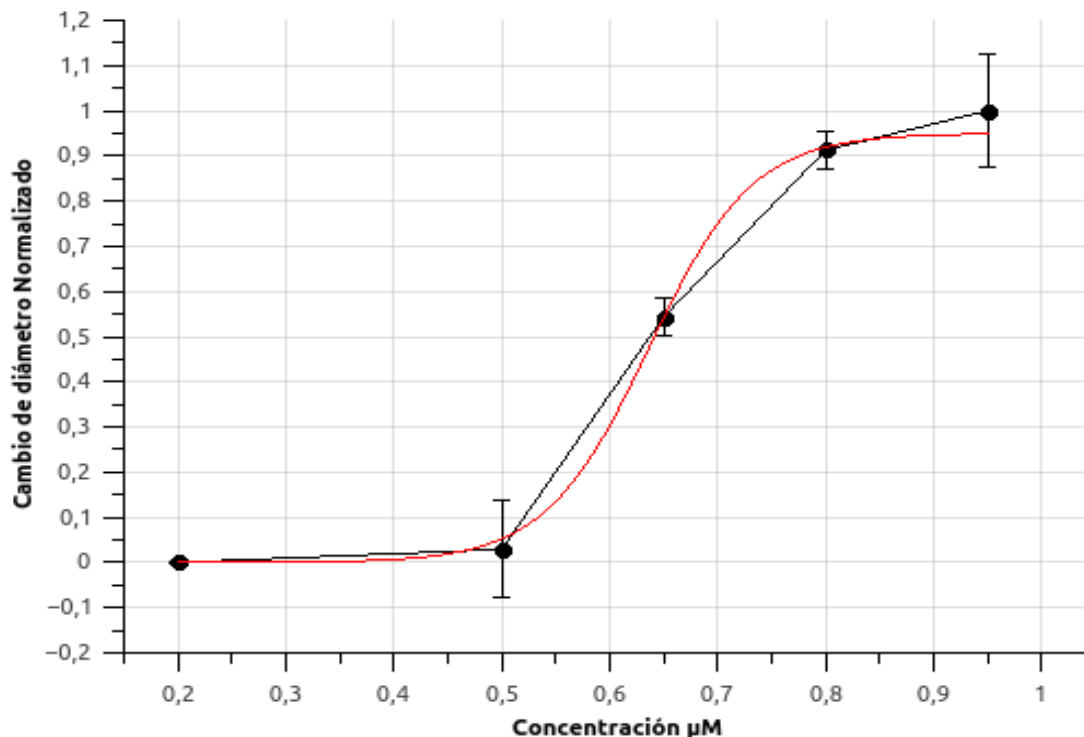
Un ejemplo de fotogramas de algunas arteriolas registradas tanto en su condición inicial (solo Ringer) y bajo el efecto de Verapamilo a cada concentración, se muestran en la figura 18



**Figura 18. Fotogramas de arteriolas registradas tanto en su condición inicial (solo Ringer) y bajo el efecto de Verapamilo a 0,95  $\mu\text{M}$ . El cambio en el diámetro se puede observar en los segmentos en color anaranjado**

A partir de los datos obtenidos se propuso hacer una curva dosis respuesta tomando como referencia los promedios de la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) a los 25 minutos. Para hacer la nueva normalización (a cada concentración), los datos fueron transformados tomando 1 como línea de base igual al límite inferior o valor 0 (de la curva sigmoideal) y el valor promedio máximo de la dilatación observado a la más alta concentración (1,03433333) como 1, el límite superior de la curva sigmoideal. La fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) inicial se toma como 0 por que por lo visto en los controles es improbable que este varíe significativamente a menos que un fármaco induzca este cambio. La nueva probabilidad 1 sería el máximo funcional que corresponde a la saturación de receptores por el fármaco. Esta saturación puede sugerirse a partir de los valores de ( $D_t / D_{t0}$ ) para las concentraciones 0,8 $\mu\text{M}$  y 0,95 $\mu\text{M}$  (a los 25 min).

Acto seguido, se empleó el software QtiPlot 0.9.8.9 para graficar la Normalización de la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) en función de la concentración (a los 25 min) y con estos datos, hacer un ajuste sigmoideal de Boltzmann. Los datos de las medias Normalizadas de ( $D_t / D_{t0}$ ) y sus respectivos errores estándar de cambio de diámetro a cada concentración se pueden ver en negro en la figura 19, mientras que la función de ajuste se puede observar en rojo en la misma gráfica.



**Figura 19. Normalización de la fracción de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) en función de la concentración de Verapamilo.** En negro se muestran las fracciones de cambio del diámetro ( $D_t / D_{t0}$ ) y sus errores estándar para 3 ranas por cada concentración, tomados a los 25 min de cada experimento. El ajuste a la función sigmoideal muestra una curva dosis respuesta característica.

El ajuste sigmoideal de Boltzman utilizado el software QtiPlot 0.9.8.9 fue: Algoritmo Levenberg-Marquardt con tolerancia = 0,0001 y cuya función es :  $A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$ , esto con el propósito de estimar la dosis efectiva 50% ( $DE_{50}$ ) a partir del valor en x (de la función), este valor en x, corresponde a la concentración en la cual se produce el 50% del efecto (0,5 en la gráfica entre 0 y 1).

Los datos del ajuste arrojado por el software se exponen a continuación:

El análisis se hizo desde  $x = 2,00000e-01$  a  $x = 9,50000e-01$   
 A1 (init value) =  $-4,86904e-04$  (+/-  $2,37288e-03$ )  
 A2 (final value) =  $9,80048e-01$  (+/-  $4,26937e-02$ )  
**x0 (center) =  $6,38534e-01$  (+/-  $8,10729e-03$ )**  
 dx (time constant) =  $5,71392e-02$  (+/-  $1,61849e-02$ )

---

**Chi<sup>2</sup>/doF = 4,549177177035175e-01**

**R<sup>2</sup> = 0,999981**

RMSE (Root Mean Squared Error) = 0,67447

RSS (Residual Sum of Squares) = 0,454917

A partir de este análisis se puede decir que el ajuste es muy alto (Ver valor de R<sup>2</sup> y la prueba estadística Chi<sup>2</sup>/doF) sugiriendo que el comportamiento sigmoide es como debía esperarse para este tipo de experimentos farmacológicos con un punto de saturación de receptores y un efecto máximo que tiende a un límite. El punto medio **x<sub>0</sub>** de la gráfica muestra que para este trabajo, la DE<sub>50</sub> de Verapamilo diluido en solución Ringer para la rana *E. johnstonei* es de 6,38534e-01 (+/- 8,10729e-03) μM, que es un valor muy cercano a 0,65 μM reportado en un estudio en ratas. (Chen, Chu, & Chen, 2010)

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró establecer un sistema homólogo al SDF, objeto que es verificable por la calidad y detalle (en la fotografía y el tiempo) que permite discriminar los capilares vénulas y arteriolas en hígado de la rana *E. johnstonei* viva en estado vegetativo.

Mediante el diseño metodológico se pudo establecer una metodología con dos tipos de software (validados) que permiten semiautomatizar el procesamiento de fotogramas en el tiempo y que para este caso permitieron monitorear el diámetro de vénulas y arteriolas

Si solo se añade solución ringer durante un experimento de microscopía intravital en hígado de *E. johnstonei*, las vénulas o arteriolas muestran diámetros invariables en periodos cercanos a una hora y cuarenta minutos.

Las vénulas y arteriolas de hígado de *E. johnstonei* son sensibles al Verapamilo, generando vasodilatación y su  $DE_{50}$  es cercana a la reportada para ratas.

Se ha logra establecer un sistema semiautomatizado para la medición del diámetro de vasos sanguíneos. Es posible adicionalmente desarrollar estrategias que permitan automatizar el análisis por medio de medición umbral en escala de grises, aprovechado el contraste que genera la hemoglobina al paso por os vasos.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que en el momento en que se vayan a realizar los registros con el montaje, que este se tenga cubierto para evitar la entrada de luz exterior, ya que puede generar disminución en la calidad de las imagen o del contraste que se genera gracias a la incidencia de la luz verde.

Este estudio se centró en el registro de la microcirculación del hígado de la rana, por lo que se debería realizar registros de video y análisis con otros órganos de la rana *E. johnstonei* o incluso con otros modelos animales, con el fin de demostrar que esta metodología es aplicable de manera general para cualquier tipo de órgano y biomodelo.

Teniendo en cuenta que el programa ImageJ, ofrece una amplia gama de opciones para el análisis de imágenes, se debería tener en cuenta para el mejoramiento de esta metodología y para el desarrollo de otros posibles puntos de análisis.

## 9. BIBLIOGRAFIA


1. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca - Dirección Técnica Ambiental. (2010). *Amphibian Survival Alliance*. Recuperado el 23 de 11 de 2013, de Plan de acción para la conservación de los anfibios del departamento del Valle del Cauca: <http://www.amphibians.org/wp-content/uploads/2013/07/Plan-de-acci%C3%B3n-para-la-conservaci%C3%B3n-de-anfibios.pdf>
2. Demir, S. U., R. Hakimzadeh, R. H. Hargraves, K. R. Ward, E. V. Myer, and K. Najarian, 2012, An automated method for analysis of microcirculation videos for accurate assessment of tissue perfusion: *BMC Medical Imaging*, v. 12, p. 37-37.
3. Dvorkin, M. A., D. P. Cardinali, and R. H. Iermoli, 2010, Bases fisiológicas de la práctica médica, *Médica Panamericana*, p. 55 - 66.
4. García-Porrero, J. A., and J. M. Hurlé, 2005, *Anatomía Humana*, McGraw-Hill - Interamericana de España, p. 588 - 590.
5. Hendry, C., A. Farley, and E. McLafferty, 2012, Blood vessels, circulation and blood pressure: *Nursing Standard*, v. 27, p. 35-40.
6. Katzung, B. G., 2007, *Farmacología básica y clínica*, El manual moderno, p. 173.
7. Mohrman, D. E., 2007, *Fisiología cardiovascular*, McGraw-Hill Interamericana, p. 205 - 220.
8. Secomb, T. W., 2008, Theoretical Models for Regulation of Blood Flow: *Microcirculation*, v. 15, p. 765-775.
9. Strain, W. D., D. D. Adingupu, and A. C. Shore, 2012, Microcirculation on a large scale: techniques, tactics and relevance of studying the microcirculation in larger population samples: *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, v. 19, p. 37-46.
10. Treu, C. M., O. Lupi, D. A. Bottino, and E. Bouskela, 2011, Sidestream dark field imaging: the evolution of real-time visualization of cutaneous microcirculation and its potential application in dermatology: *Archives Of Dermatological Research*, v. 303, p. 69-78.

11. Collage, V. V. (s.f.). *Victor Valley Collage*. Recuperado el 23 de 11 de 2013, de <http://www.vvc.edu/academic/biology/hinrich/RESEARCH%20PHOTOS.htm> Biology:
12. Reichen, J., & Le, M. (1986). Verapamil Favorably Influences Hepatic Microvascular Exchange. *The Journal of Clinical Investigation*, 448-455.
13. Chen, Y.-W., Chu, C.-C., & Chen, Y.-C. (2010). The dose-dependent study of verapamil and diltiazem on spinal anesthesia in rat. *Elsevier*, 76-80.
14. Maneyro, R., Camargo, A., & da Rosa, I. (29 de 12 de 2014). *Facultad de Ciencias de Montevideo, Uruguay*. Obtenido de [http://zvert.fcien.edu.uy/nuevos\\_cursos/practico\\_04\\_anfibios.pdf](http://zvert.fcien.edu.uy/nuevos_cursos/practico_04_anfibios.pdf)
15. Parker, T., & Haswell, W. (1997). *Zoología cordados Vol. 2*. Barcelona: Reverte.
16. Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC). (2003). *Laboratorios Bagó*. Obtenido de <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/cardio427webbis.htm#>
17. MP Biomedicals. (29 de 12 de 2014). *Verapamil hidrocloreto*. Obtenido de <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195545&country=47>
18. National Institutes of Health. (20 de 01 de 2014). *ImageJ*. Obtenido de <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>
19. Softonic. (02 de 05 de 2013). *Softonic*. Obtenido de <http://video-to-video-converter-1.softonic.com/>
20. Softonic. (20 de 01 de 2014). Obtenido de <http://virtualdub.softonic.com/>
21. Rang H. P., Dale M. M. (2008). *Farmacología*. Barcelona: Elsevier.
22. Katzung, B. G. (2010). *Farmacología básica y clínica*. Mexico D.F.: Mc Graw Hill.




## ANEXOS 1

### POE: Captura y mantenimiento en cautiverio de *Eleutherodactylus johnstonei*.

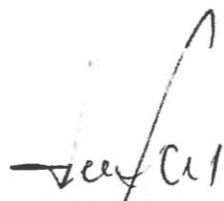
	TITULO PROCEDIMIENTO	Proceso:
UNIDAD Facultad de Ciencias de la salud Departamento de ciencias básicas medicas	<b>POE Captura y mantenimiento en el laboratorio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> (Anura: <u>Eleutherodactylidae</u>)</b>	Sub proceso: Cría en cautiverio Procedimiento: Página: 1-3
OBJETO/PROPOSITO	Establecer una guía para dar a conocer el procedimiento y las recomendaciones que se deben tener en cuenta para la captura en campo y cría en cautiverio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> para que sea accesible como <u>biomodelo</u> para estudios en fisiología, biología molecular, etc.	
ALCANCE/CAMPO APLICACION	<b>Materiales y reactivos a utilizar:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Frascos de plástico con hojarasca humedad en su interior y con tapa con ventilación (agujeros) para el momento de la captura.</li> <li>2. Terrarios de vidrio de tamaño grande y ventilados</li> <li>3. Sustrato para el terrario: arena o tierra.</li> <li>4. Plantas para la percha y para mantener la humedad, preferiblemente de la familia <u>Bromeliaceae</u> y el género <u>Bromelia</u>.</li> <li>5. Jama o red entomológica</li> <li>6. Recipientes para el agua.</li> <li>7. Rociador</li> </ol>	
RESPONSABLES		
DEFINICIONES	Esta especie es encontrada en gran cantidad en la vegetación ornamental de los viveros y jardines de la ciudad. Usualmente se pueden encontrar en reposo entre la vegetación, bajo troncos, materas, ladrillos, y rocas.	

## ANEXO 2

### POE: Sacrificio y disección de *Eleutherodactylus johnstonei*

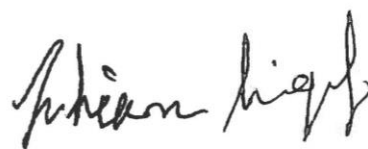
NOMBRE DE LA INSTITUCION  	TITULO PROCEDIMIENTO  <b>POE  Sacrificio y disección de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i></b>  <b>(Anura: <u>Eleutherodactylidae</u>)</b>	Proceso:
UNIDAD  Facultad de Ciencias de la salud  Departamento de ciencias básicas medicas		Sub proceso: Laparotomía
Procedimiento: 01		
Página: 1-3		
OBJETO/PROPOSITO	Establecer una guía para ejecutar un procedimiento de disección con el fin de realizar reconocimiento y aislamiento de órganos reproductivos para estudios en histología y fisiología siguiendo los parámetros <u>bioéticos</u> establecidos.	
ALCANCE/CAMPO APLICACION	<b>Materiales y reactivos a utilizar:</b>  1. Equipo de disección: escalpelo, hojas de bisturí, Tijera, Pinza finas. 2. Congelador 3. Aguja mangonada 4. <u>Ringer</u> anfibio 50 % 5. Estereoscopio 6. Guantes látex 7. Tapa bocas 8. Formaldehido 3.7 % 9. Pipetas cuentagotas 10. Papel absorbente 11. Frasco lavador	
RESPONSABLES		
DEFINICIONES		

**APROBADO POR:**



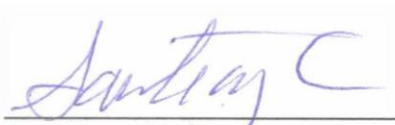
---

Alejandra Jerez  
Evaluador Externo.



---

Juliana Rengifo  
Evaluador Externo.



---

Santiago Castaño  
Director del Proyecto.