



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**PAPEL DE LAS CÉLULAS GLIALES EN LAS FUNCIONES
SENSORIALES DEL INTESTINO**

Tesis que presenta

Gabriela Ruiz Velarde

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores del trabajo de tesis:

Dr. Carlos Barajas López

Dra. Marcela Miranda Morales

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Papel de las células gliales en las funciones sensoriales del intestino***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Gabriela Ruiz Velarde y aprobada el **primer día de septiembre de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas López
Codirector de la tesis

Dra. Marcela Miranda Morales
Codirectora de la tesis

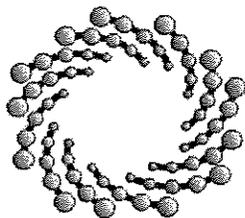
Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Carlos Barajas López (Proyectos no. 81409, 219859 CONACYT) y la Dra. Marcela Miranda Morales.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. De registro 590419) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 169 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de septiembre del año 2017, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Marcela Miranda Morales	Secretaria	UASLP
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gabriela Ruiz Velarde

sobre la Tesis intitulada:

Papel de las células gliales en las funciones sensoriales del intestino

que se desarrolló bajo la dirección de

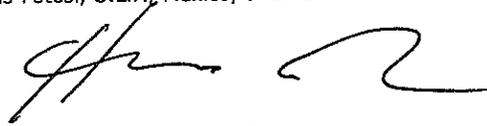
Dr. Carlos Barajas López
Dra. Marcela Miranda Morales (UASLP)

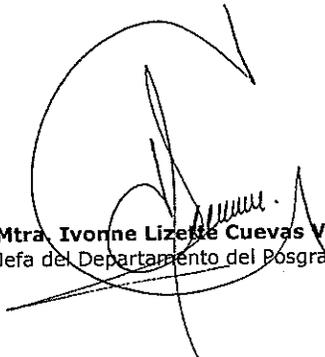
El Jurado, después de deliberar, determinó

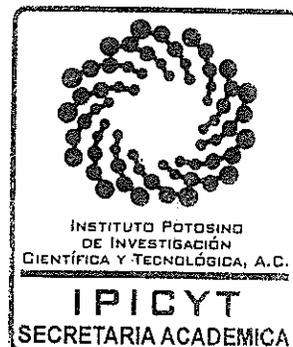
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 16:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de septiembre de 2017.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mis padres, Ramón Ruíz y Georgina Velarde

A mis hermanos, Ramón Ruíz (Ramoncito) y Rosario Melissa

A mi abuelo, Tomás Velarde

A mi familia Ruíz y mi familia Velarde.

¡Sean felices!

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Barajas López, por permitirme trabajar bajo su dirección, por sus enseñanzas, correcciones y su paciencia.

A la Dra. Marcela Miranda Morales, por todo su apoyo, por su disposición para contestar mis preguntas, por ayudarme en la tesis.

Al Dr. Rubén Hipolito López Revilla, por sus correcciones y sus comentarios hacia mi trabajo.

A la Enf. Rosa Espinosa Luna, por siempre estar en la mejor disposición para ayudarnos.

A Conacyt, por la beca otorgada, al Ipicyt, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. Cris, por enseñarme la técnica, apoyarme con el proyecto y siempre responder mis dudas.

Al Laboratorio 5 por brindarme su amistad.

A mis roomies, por su amistad, su apoyo y por hacerme sentir en Mazatlán cuando necesitaba estar cerca de casa.

Al laboratorio 4, sigan siendo muy felices.

A mi familia, por su apoyo constante, por sus consejos y ánimo.

CONTENIDO

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
METODOLOGÍA	5
Análisis de resultados	6
RESULTADOS	8
Identificación de los parásitos en los ratones infestados con <i>Syphacia</i> sp.	8
El fluoroacetato disminuye la actividad espontánea en ratones C57BL/6	8
El fluoroacetato disminuye la respuesta mecanosensorial total a la distensión intraluminal de los nervios mesentéricos en ratones no infestados e infestados con <i>Syphacia</i> sp.	9
El fluoroacetato inhibe la respuesta a la distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio umbral en ratones infestados con <i>Syphacia</i> sp.	10
DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS	15

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema del equipo utilizado para medir la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos de intestino de ratón	17
Fig. 2. El fluoroacetato disminuye la actividad espontánea en ratones infestados con el parásito <i>Syphacia</i> sp.	18
Fig. 3. El fluoroacetato disminuye la actividad inducida por distensión en nervios mesentéricos.	19
Fig. 4. El fluoroacetato disminuye la respuesta inducida por distensión intraluminal.	20
Fig. 5. La actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos en respuesta a distensión se mantiene constante a través del tiempo.	21
Fig. 6. El fluoroacetato inhibe la respuesta a distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio umbral en ratones infestados.	22
Fig. 7. El fluoroacetato inhibe la respuesta a distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio y alto umbral en ratones no infestados.	23
Fig. 8. La respuesta de las fibras que responden a bajo, amplio y alto umbral de presión intraluminal se mantiene a través del tiempo.	24
Fig. 9. Morfología de un gusano representativo del género <i>Syphacia</i> .	25

RESUMEN

Papel de las células gliales en las funciones sensoriales del intestino

El sistema nervioso entérico está compuesto por ganglios y fibras localizadas en las paredes del tracto gastrointestinal que en sincronía con el sistema nervioso central coordinan y regulan diversas funciones del tubo digestivo. Los ganglios entéricos están conformados por neuronas y células gliales. Las células gliales se encuentran en los plexos mientérico y submucoso, envuelven fibras nerviosas y varicosidades axónicas dentro de los ganglios entéricos y participan en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Se conoce muy poco acerca de las funciones de las células gliales en el sistema nervioso entérico. Estudios previos han mostrado que la presencia de parásitos en el intestino incrementa la producción de citocinas proinflamatorias en ratones. Se sabe que tanto las neuronas como las células gliales liberan citocinas como IL-6 cuyo aumento puede modular la transmisión sináptica y está asociada a disfunciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, a la fecha no hay reportes de la participación de las células gliales en las funciones aferentes de los nervios mesentéricos en ratones infestados. Los objetivos de este estudio fueron investigar el papel de las células gliales entéricas en la actividad multiunitaria aferente basal así como en la actividad mecanosensorial de los nervios mesentéricos del yeyuno de ratones, y evaluar el impacto de la infestación por el parásito *Syphacia* sp., en el papel de las células gliales. Para esto se llevó a cabo el registro de la actividad multiunitaria basal e inducida por presión intraluminal de un segmento de yeyuno de ratones C57BL/6 antes, durante y después de la aplicación extraluminal de fluoroacetato (gliotoxina) 0.3-10 mM (5-30 min). Su aplicación causó un decremento progresivo en la respuesta aferente de los nervios mesentéricos inducida por la presión intraluminal en el yeyuno de ratones infestados y no infestados. Estos resultados sugieren que las células gliales entéricas tienen un papel relevante en la actividad aferente de los nervios mesentéricos independiente de la infestación por *Syphacia* sp.

Palabras clave: Registro multiunitario, células gliales, Fluoroacetato, *Syphacia* sp., Actividad sensorial.

ABSTRACT

Role of the glial cells in the sensorial functions of the intestine

The enteric nervous system is a subdivision of the visceral nervous system. It is composed by ganglia and fibers located in the walls of the gastrointestinal tract that in synchrony with the central nervous system coordinate and regulate several functions of the digestive tract such as motility, digestion and secretion. Enteric ganglia consist of neurons and glial cells that outnumber neurons and are located in the myenteric and submucosal plexuses, embrace nerve fibers and varicose release sites within enteric ganglia and participate in neuronal homeostasis. Little is known about the functions of glial cells in the enteric nervous system. Previous studies have shown that the presence of parasites in the intestine increase the production of proinflammatory cytokines in mice. It is known that both, neurons and glial cells release cytokines such as IL-6 whose increase can modulate synaptic transmission and is associated with neuronal dysfunction in the peripheral and central nervous system. Nevertheless, there are no reports of the role of glial cells on the afferent activity of mesenteric nerves in infested mice. The aims of this study were to elucidate the role of enteric glia in the sensorial activity of the gut and the multiunit afferent activity of mesenteric nerves, both spontaneous and induced by increasing intraluminal intestinal pressure and to assess the impact of infestation by *Syphacia* sp. parasites on the role of the glial cells. A nerve from the mesenteric border was dissected, and its multiunit afferent activity was recorded, both basal and induced by increasing intraluminal pressure of a segment of the jejunum of C57BL/6 mice before, during and after extraluminal application of fluoroacetate (gliotoxin) 0.3-10 mM (5-30 min). Fluoroacetate application caused a progressive decrement in the afferent response of the mesenteric nerve. These results suggest that enteric glial cells play a relevant role in the afferent activity of the mesenteric nerves independent of the infestation by *Syphacia* sp.

Key words: Multiunitary activity, glial cells, Fluoroacetate, *Syphacia* sp., Sensorial activity

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso entérico es una subdivisión del sistema nervioso periférico. Está compuesto por células nerviosas (neuronas y células gliales), ganglios entéricos y fibras localizadas en las paredes del tracto gastrointestinal. En sincronía con el Sistema Nervioso Central (SNC) coordina y regula diferentes funciones como motilidad, digestión, secreción y flujo sanguíneo¹.

La pared del tracto gastrointestinal posee plexos ganglionados. El plexo mientérico encargado principalmente de procesos como la motilidad y sensor dolor, se encuentra entre las capas de musculo longitudinal y circular; por otro lado, el plexo submucoso, localizado entre las capas de musculo circular y mucosa, se encarga de procesos relacionados a secreción. Las fibras nerviosas conectan a los ganglios e inervan el musculo longitudinal y circular, así como la mucosa y arterias intrínsecas².

El sistema nervioso entérico en conjunto con las células gliales contribuye en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial. Las células gliales entéricas superan en número a las neuronas³, son encontradas en los plexos mientéricos y submucosos del tracto gastrointestinal, envuelven fibras nerviosas y varicosidades axónicas dentro de los ganglios entéricos y participan en el mantenimiento de la homeostasis neuronal¹. Se caracterizan por la liberación de ciertas proteínas, como la GFAP (por sus siglas en inglés: glial fibrillary acidic protein), utilizada por múltiples grupos de investigación como marcador para la identificación de las células gliales, y enzimas como la glutamato sintetasa, que cataliza la conversión de glutamato a glutamina⁴.

Se conoce muy poco acerca de las funciones de las células gliales en el sistema nervioso entérico o en los nervios que comunican al tubo digestivo con el SNC. Sin embargo, las células gliales entéricas han sido relacionadas a trastornos como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, padecimientos que comprometen la pared del intestino delgado y colon⁵, además han sido vinculadas al mantenimiento de la barrera intestinal⁶.

Estudios previos han mostrado que la eliminación de células gliales por una gliotoxina (fluoroacetato) reduce la motilidad gastrointestinal en animales⁷. Nasser y colaboradores demostraron que las células gliales ejercen un papel relevante en los procesos de contractilidad y velocidad del tránsito gastrointestinal en el intestino⁸ mediante la inyección intraperitoneal de fluorocitrato (gliotoxina) en ratones C57BL/6. El fluorocitrato es un compuesto tóxico para las células gliales, ya que inhibe a la aconitasa, lo que resulta en una disminución en el flujo de carbono a través del ciclo de Krebs y una posible reducción de ATP estas células. También se puede atribuir al fluorocitrato un efecto inhibitorio sobre el acarreador de citrato mitocondrial que incrementa la concentración de citrato en la célula⁹.

A la fecha no hay reportes del papel de las células gliales en las funciones aferentes de los nervios mesentéricos. Por otro lado, en estudios recientes en nuestro grupo de trabajo, se observó mediante registros multiunitarios de nervios mesentéricos de yeyuno de ratón C57BL/6 que la actividad aferente y mecanosensorial de los nervios mesentéricos se ve afectada en presencia de parásitos intestinales que incrementan los niveles de citocinas proinflamatorias en el intestino¹⁰. En 2006, un estudio demostró que las citocinas proinflamatorias modulan la secreción del factor de crecimiento nervioso (NGF) en células gliales

entéricas, el cual juega un papel importante en la supervivencia y desarrollo de las neuronas además de mantener la integridad del intestino regulando procesos sensoriales e inflamatorios¹¹. Además un incremento de citocinas como IL-6 proveniente de células neurales (neuronas o células gliales) se ha relacionado con una modulación de la transmisión sináptica y con disfunciones neurales como dolor neuropático, enfermedades psiquiátricas, enfermedades neurodegenerativas y epilepsia¹⁸.

Sin embargo, a la fecha es desconocido el papel de las células gliales en la actividad mecanosensorial del intestino delgado en ratones sanos y en ratones comprometidos con una infestación del parásito *Syphacia* sp.

OBJETIVOS

- Investigar el papel de las células gliales en la actividad multiunitaria aferente basal y mecanosensorial de los nervios mesentéricos de ratones C57BL/6.
- Estudiar el impacto de la infestación por el parásito *Syphacia* sp. en el papel de las células gliales.

METODOLOGÍA

Para evaluar el papel de las células gliales en la actividad aferente mesentérica, se llevaron a cabo registros de la actividad multiunitaria de nervios mesentéricos de yeyuno de ratón C57BL/6 de ocho semanas de edad. Los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento y fueron sacrificados por medio de dislocación cervical. Un segmento de yeyuno fue extraído del ratón y colocado en una cámara que cuenta con perfusión extraluminal e intraluminal, un transductor de presión y una válvula de salida (Figura 1). El segmento intestinal fue perfundido continuamente a una velocidad de 5 ml/min con solución de Krebs modificada cuya composición es: NaCl 118.4 mM, CaCl₂ 1.9 mM, MgSO₄ 7H₂O 1.2 mM, NaHCO₃ mM, KCl 4.7 mM, glucosa 11.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, constantemente gasificada con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ y una temperatura de 33 °C. El segmento también fue perfundido intraluminalmente de manera constante mediante una bomba (World Precision Instruments, AL- 1000) a una velocidad de 150 µl/min, se ataron los extremos del segmento intestinal mediante un hilo de seda a dos conectores de plástico que son la entrada y salida de la misma solución de Krebs modificada (Figura 1).

Un nervio mesentérico fue disecado y posteriormente succionado por un electrodo hecho mediante una pipeta de cristal, se llevó a cabo un sello con el tejido circundante, el registro extracelular de la actividad multiunitaria se llevó a cabo mediante un amplificador (Digitimer Neurolog System) y un digitalizador (Micro 1401, CED). Los datos fueron adquiridos y analizados mediante el software Spike 2 (CED) (Fig. 1).

En cada experimento se llevó a cabo el registro de la actividad basal multiunitaria y de la respuesta mecanosensorial a la distensión intraluminal del nervio mesentérico. Cada 15 minutos fue llevada a cabo la distensión, hasta alcanzar una respuesta mecanosensorial estable en el tiempo. Después se llevó a cabo la aplicación de fluoroacetato (gliotoxina) por perfusión extraluminal a concentraciones de 0.3, 5 y 10 mM durante 10-30 min. Además se realizaron experimentos en los cuales se registró la respuesta mecanosensorial a la distensión intraluminal cada 15 minutos sin la aplicación de fluoroacetato.

La distensión intraluminal se llevó a cabo cerrando la válvula de salida de la perfusión intraluminal, la solución se acumula en el interior del segmento provocando que se aumente la presión progresivamente en el intestino, de tal manera que el transductor de presión colocado dentro del intestino mide la presión intraluminal, cuyo valor máximo fue de 60 mm Hg; para liberar la presión se abre la válvula de salida.

El fluoroacetato (Sodium Fluoroacetate, MP Biomedicals, LLC) fue disuelto directamente en la solución de Krebs modificada, para preparar la concentración máxima usada (10 mM). La concentración de NaCl de la solución de Krebs modificada fue reducida en 5 mM.

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples Bonferroni y Dunnet ($p < 0.05$).

Análisis de resultados

Los registros de la actividad multiunitaria basal e inducida por la distensión intraluminal fueron analizados con el programa Spike2, mediante histogramas de

frecuencia cuyo valor umbral fue ajustado al doble de la amplitud del ruido basal en cada uno de los registros. Las espigas de cada registro fueron clasificadas de acuerdo a su forma y en base a su respuesta a la presión intraluminal: espigas de bajo (0-15 mm Hg), amplio (responden desde bajos hasta altos umbrales) y alto umbral (15-60 mm Hg).

El análisis de la frecuencia en la respuesta de cada espiga lleva a la clasificación: si de 0 a 15 mm Hg de presión la espiga respondió solo un 15% de su respuesta total, es considerada una espiga de alto umbral. En el caso de las espigas de bajo umbral, responden más del 50% de 0 a 15 mm Hg y por último, se consideran espigas de amplio umbral las que dan un 20 % de su respuesta total a 15 mm Hg de presión pero este porcentaje incrementa conforme aumenta la presión¹².

RESULTADOS

Identificación de los parásitos en los ratones infestados con *Syphacia* sp.

La infestación por *Syphacia* sp. fue evaluada mediante la presencia de parásitos en el ciego. Los gusanos fueron identificados morfológicamente bajo microscopio de luz (ZEISS) como miembros del género *Syphacia* sp., los cuales pertenecen a la familia Oxiuridae. Para su identificación se observó la terminación anterior del gusano, donde se encuentran las alas cervicales que terminan al nivel en el que inicia el esófago y además se observan los huevos en su etapa madura que tienen forma ovalada, característico del género (Fig. 9). Se llevaron a cabo registros de la actividad multiunitaria basal espontánea y en respuesta mecanosensorial a la distensión intraluminal de nervios mesentéricos de segmentos intestinales de yeyuno de ratón C57BL/6. Se obtuvieron registros de yeyuno de ratones de tres grupos diferentes: no infestados, infestados con *Syphacia* sp., y un grupo control el cual sirvió para medir el efecto del tiempo en las respuestas multiunitarias.

El fluoroacetato disminuye la actividad espontánea en ratones C57BL/6

Primero investigamos el papel de las células gliales sobre la actividad basal espontánea de las aferentes del yeyuno de ratón, mediante la aplicación de fluoroacetato. En nuestras condiciones experimentales, la aplicación extraluminal de fluoroacetato (0.3 - 10 mM; 10 min) disminuye la actividad basal espontánea de los nervios mesentéricos de yeyuno de ratón comparado con la actividad antes de la aplicación, tanto en el grupo de ratones infestados con *Syphacia* sp. (Fig. 2, línea verde) a los 60 minutos, como en los no infestados (Fig. 2, línea roja) hasta los 75

minutos después de la aplicación del fluoroacetato. Sin embargo en registros del grupo control (no se les aplicó fluoroacetato) la actividad basal espontánea no cambio con el tiempo (Fig. 2, línea naranja), $n=25$, ANOVA de dos vías y Bonferroni, $p<0.05$.

El fluoroacetato disminuye la respuesta mecanosensorial total a la distensión intraluminal de los nervios mesentéricos en ratones no infestados e infestados con *Syphacia* sp.

En los siguientes experimentos investigamos el papel de las células gliales en la respuesta mecanosensorial a la distensión intraluminal antes, durante y después de la aplicación de fluoroacetato (0.3 - 10 mM; 10 min). La aplicación extraluminal del fluoroacetato disminuyó la respuesta total promedio a la distensión intraluminal a los 60 minutos de la aplicación de la gliotoxina tanto en ratones infestados con *Syphacia* sp. (Fig. 3, línea verde) a los 60 minutos, como en los no infestados (Fig. 3, línea roja), no así en el grupo control (no se le aplicó fluoroacetato) en el cual la respuesta total promedio de la distensión intraluminal no cambió durante el tiempo (Fig. 3, línea naranja), $n=25$, ANOVA de dos vías, Bonferroni ($p<0.05$). En la Figura 4 se muestra la respuesta multiunitaria a la distensión intraluminal de los grupos de ratones infestados con *Syphacia* sp. (Fig. 4A) y el grupo de los no infestados (Fig. 4B) a los 0, 15, 30 y 60 minutos después de la aplicación de fluoroacetato. Como puede observarse, la respuesta mecanosensorial disminuyó a los 60 minutos de la aplicación de fluoroacetato en ratones infestados y no infestados y durante el intervalo de presiones 5 – 45 y 5 - 55 mm Hg, respectivamente, mientras que en el grupo control, el cual no se aplicó fluoroacetato, la respuesta mecanosensorial a

distensión intraluminal no cambió durante el tiempo (Fig. 5; n= 4, ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet, $p<0.05$).

El fluoroacetato inhibe la respuesta a la distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio umbral en ratones infestados con *Syphacia* sp.

Con el objetivo de investigar el tipo de fibras involucrado en el efecto de disminución en la respuesta a la distensión intraluminal inducida por el fluoroacetato, para cada registro se realizó un análisis de discriminación de las espigas de acuerdo a su forma en el programa Spike 2; posteriormente se clasificaron de acuerdo a la manera en que responden al incremento de la presión. Las espigas de amplio umbral (Fig. 6B) presentaron una disminución significativa en la respuesta comparada con la respuesta al tiempo 0 de aplicación del fluoroacetato en ratones infestados con el parásito, su actividad fue afectada gradualmente a partir del minuto 30, después de la aplicación del fluoroacetato a concentraciones de 0.3, 5 y 10 mM y a presiones entre 15 y 45 mm Hg, mientras que las fibras de alto y bajo umbral de respuesta a distensión intraluminal no se vieron afectadas (Fig. 6A y 6C), ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p<0.05$). El efecto del fluoroacetato sobre la respuesta a distensión intraluminal en el grupo de ratones no infestados se observó en las fibras de alto y amplio umbral de respuesta (Fig. 7A y 7B) a los 30 y 60 minutos de la aplicación de la gliotoxina, mientras que no se observó cambio en las fibras de bajo umbral, ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p<0.05$). En el grupo control al cual no se le aplicó fluoroacetato, no hubo diferencia en las repuestas de las fibras de alto, amplio y bajo umbral respecto al tiempo (Fig. 8A, 8B y 8C).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que el fluoroacetato inhibe la actividad multiunitaria basal como la inducida por la presión intraluminal en nervios mesentéricos del yeyuno de ratón C57Bl/6, tanto en ratones infestados con *Syphacia* sp., como en ratones no infestados.

En este trabajo investigamos el papel de las células gliales periféricas en la actividad multiunitaria de los nervios aferentes en el yeyuno de ratón utilizando el fluoroacetato, compuesto que después de ser metabolizado inhibe algunas de las funciones de la células gliales. Se ha mostrado que esta gliotoxina reduce la motilidad gastrointestinal en animales⁷. Nasser y colaboradores demostraron que las células gliales ejercen un papel relevante en los procesos de contractilidad y velocidad del tránsito gastrointestinal en el intestino⁸, pero no se había investigado su participación en la actividad aferente del intestino delgado.

Nosotros encontramos que la aplicación extraluminal de fluoroacetato disminuye de manera gradual la actividad multiunitaria basal de los nervios mesentéricos y la inducida por la distensión pero es estadísticamente significativa a los 60 minutos de la aplicación de la gliotoxina.

También investigamos si existe una diferencia entre el efecto del fluoroacetato en ratones infestados con un parásito *Syphacia* sp. comparado con ratones no infestados, dado que existen reportes de un incremento de citocinas proinflamatorias en ratones infestados con parásitos^{10,13,15}. De manera particular se sabe que IL-6 se incrementa.

Nosotros utilizamos ratones infestados con el parásito *Syphacia* sp., y comparamos el efecto del fluoroacetato sobre la actividad multiunitaria basal y la inducida por la distensión y comparamos el efecto con el grupo de ratones no infestados. Encontramos que fluoroacetato inhibe la actividad multiunitaria basal y la inducida por la distensión de manera independiente de la infestación del parásito, sugiriendo que el papel de la células gliales es mucho más general en la transmisión neural aferente del intestino delgado y que el incremento de IL-6 en los ratones infestados con el parásito no aporta un cambio adicional en la modulación inducida por la toxina.

Además, investigamos el tipo de fibras que están involucradas en el efecto del fluoroacetato mediante la discriminación de las fibras en base a la clasificación (alto, amplio y bajo umbral) reportada¹². Encontramos que el fluoroacetato inhibe a las fibras de amplio umbral tanto en ratones infestados con el parásito como en los no infestados; sin embargo, fueron inhibidas las fibras de alto umbral solo en los ratones no infestados. Se sabe que la infestación por *Aspiculuris tetraptera* (otro miembro de la familia Oxiuridae) causa cambios en la transmisión colinérgica en el yeyuno¹⁰, de tal manera que dicha plasticidad podría impactar también en el papel de las células gliales sobre su efecto en la diferentes fibras involucradas en la respuesta mecanosensorial.

Las espigas de alto y amplio umbral tienen su origen en fibras espinales; debido a que responden a altos umbrales están relacionadas a respuestas patológicas, son reconocidas por mediar el dolor¹⁴. De acuerdo a nuestros hallazgos, el efecto del fluoroacetato en ratones no infestados parece estar mediado principalmente por espigas de alto umbral, ya que después de la aplicación de la

toxina se observa una disminución significativa de la respuesta en estas fibras. Sonekatsu y colaboradores han mostrado que el interferón-gamma (INF γ), citocina proinflamatoria implicada como uno de los agentes que causan dolor neuropático y participa en las respuestas inmunes en el sistema nervioso central y periférico, aumenta las corrientes inducidas por NMDA a través de la activación de los receptores de INF γ en microglia¹⁶; esto sugiere que las células gliales tienen un papel importante como iniciador de las interacciones que llevan a dolor neuropático en el sistema nervioso central.

Las espigas de bajo umbral tienen su origen en fibras vagales relacionadas con respuestas dentro de los niveles fisiológicos de distensión¹⁷ y parecen no ser afectadas por el fluoroacetato.

CONCLUSIONES

- El fluoroacetato disminuye la actividad espontánea e inducida por distensión en los nervios mesentéricos aferentes del yeyuno de ratones C57BL-6.
- El efecto del fluoroacetato es independiente de la infestación por el parásito *Syphacia sp.*, pero el mayor efecto en las espigas de alto umbral en ratones no infestados sugiere un papel diferencial de las células gliales en las diferentes fibras que componen la respuesta mecanosensorial.

REFERENCIAS

1. Sasselli, V., Pachnis, V., and Burns, A.J. (2012). The enteric nervous system. *Dev. Biol.* 366, 64–73.
2. Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and. *Nat. Publ. Gr.* 9, 286–294.
3. Jessen, K.R. (2004). Glial cells. 36, 1861–1867.
4. Derouiche, A. (2013). Glutamine synthetase as an astrocytic marker : its cell type and vesicle localization. 4, 1–5.
5. von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11, 3.
6. Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189–201.
7. Yu, Y.-B., and Li, Y.-Q. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* 20, 11273–11280.
8. Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C.M., Ho, W., Oland, L.D., Tibbles, L.A., Schemann, M., Macnaughton, W.K., Ru, A., Sharkey, K.A., et al. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology : effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. 1, 912–927.
9. Fonnum, F., Johnsen, A., and Hassel, B. (1997). Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. *Glia* 21, 106–113.
10. Villalobos-hernández, E.C., Barajas-lópez, C., and Salgado-delgado, R.C.

(2017). *PT US. Auton. Neurosci. Basic Clin.*

11. Boyen, G.B.T. Von, Steinkamp, M., Reinshagen, M., and Scha, K. (2006). Nerve Growth Factor Secretion in Cultured Enteric Glia Cells is Modulated by Proinflammatory Cytokines *Neuroendocrinology*. 820–825.

12. Booth, C.E., Shaw, J., Hicks, G.A., Kirkup, A.J., Winchester, W., and Grundy, D. (2008). Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat. 149–158.

13. Gao, W., and Pereira, M.A. (2002). Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *32*, 167–170.

14. Grundy, D. (2002). Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. 2–5.

15. Michels, C., Goyal, P., Nieuwenhuizen, N., and Brombacher, F. (2006). Infection with *Syphacia obvelata* (Pinworm) Induces Protective Th2 Immune Responses and Influences Ovalbumin-Induced Allergic Reactions. *74*, 5926–5932.

16. Sonekatsu, M., and Taniguchi, W. (2016). Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia – neuron interaction. *12*, 1–10.

17. Grundy, D. (2004). What activates visceral afferents ? *53*, 5–8.

18. Vezzani, A., Viviani, B., (2014) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability, *Neuropharmacology*.

FIGURAS

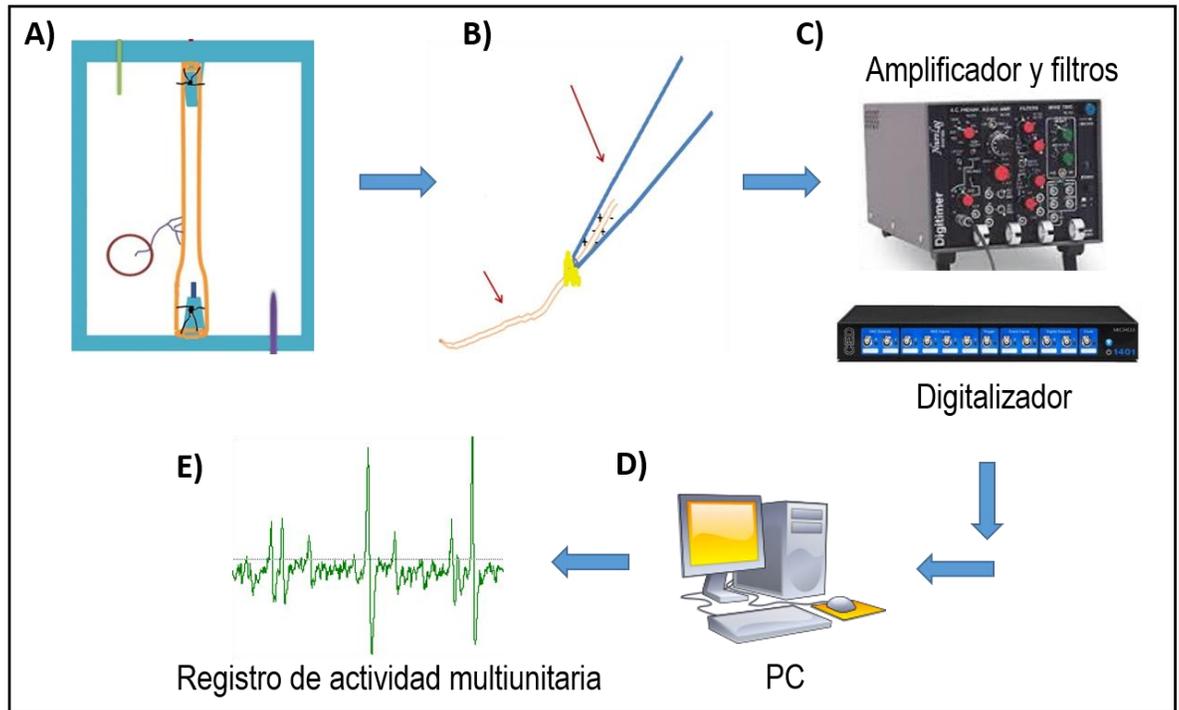


Fig. 1. Esquema del equipo utilizado para medir la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos de intestino de ratón.

Donde se muestra, A) Un segmento de yeyuno con tejido mesentérico de ratón de la cepa C57BL-6 es colocado en la cámara de registro que cuenta con perfusión intraluminal, perfusión extraluminal, transductor de presión y sistema de succión. B) Un nervio mesentérico es disecado y succionado por un electrodo fabricado con un capilar de cristal. C) La actividad aferente multiunitaria del nervio es amplificada, filtrada y adquirida, para finalmente analizarla. D) Los registros de actividad se analizan al final del experimento con la ayuda del programa Spike 2.

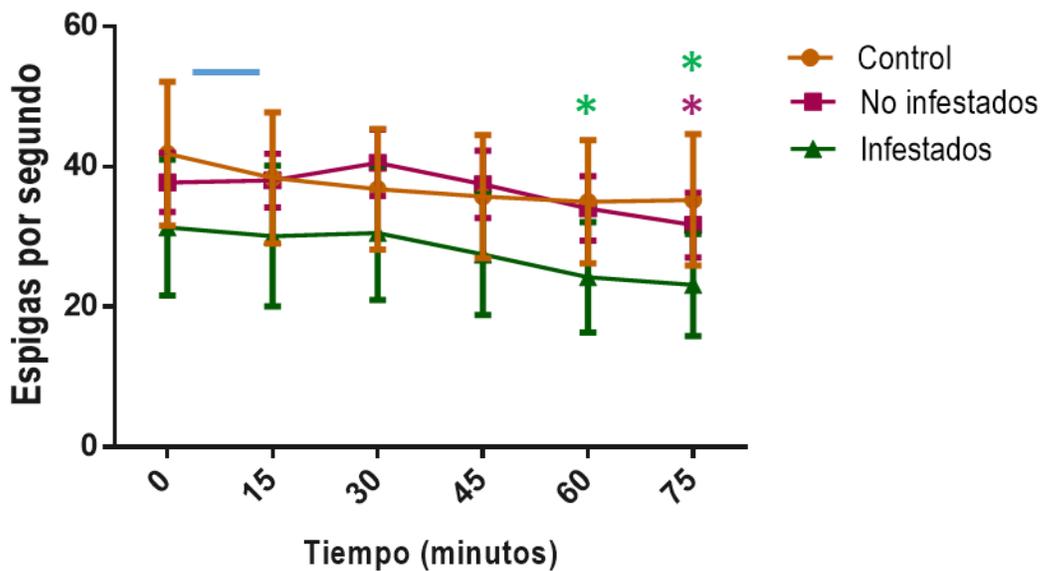


Fig. 2. El fluoroacetato disminuye la actividad espontánea en ratones infestados con el parásito *Syphacia* sp.

La gráfica muestra la actividad basal multiunitaria de los nervios mesentéricos, expresada en espigas por segundo en función del tiempo (minutos), los valores representan el promedio (n=25 experimentos) y las líneas el error estándar de la media, cada valor fue obtenido de un intervalo de 100 segundos de actividad, 30 segundos antes de realizar cada distensión, la línea azul indica el tiempo en que fue aplicado el fluoroacetato en la perfusión extraluminal. El registro control, en el cual no se aplica fluoroacetato, se mantiene constante; sin embargo, el fluoroacetato afecta de manera significativa a los registros con ratones no infestados e infestados hasta los 60 min de su aplicación. Cada punto de las líneas es comparado con el valor inicial al tiempo 0 mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

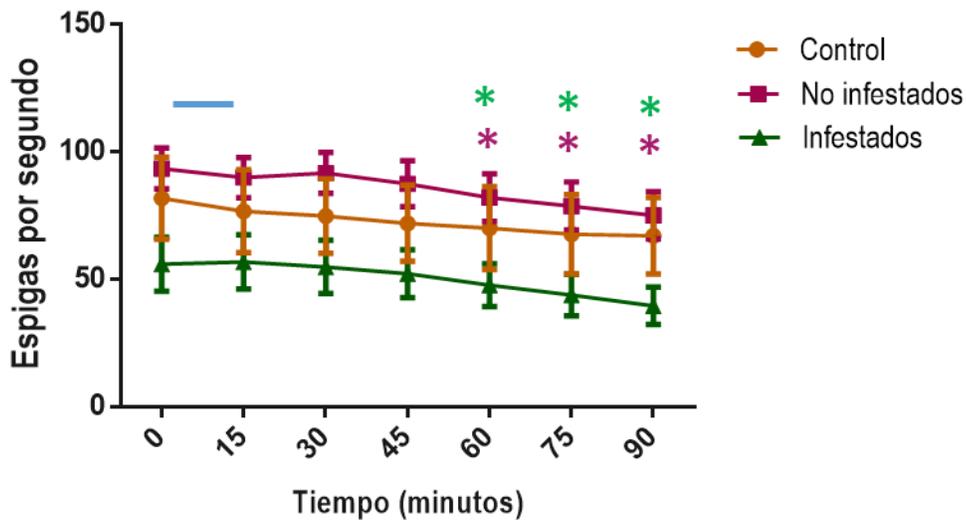


Fig. 3. El fluoroacetato disminuye la actividad inducida por distensión en nervios mesentéricos.

La gráfica muestra la respuesta de los nervios mesentéricos cuando el intestino es sometido a presión intraluminal y a la aplicación de fluoroacetato (línea azul, 10 minutos) a diferentes concentraciones. Los valores representan el promedio (n=25) ± el error estándar de la respuesta total (0-60 mm Hg), a cada 15 minutos, antes, durante y después de la aplicación de fluoroacetato. El color de las líneas representa el grupo de ratones: control (naranja), infestados (verde) y no infestados (rojo). Los valores de cada línea se compararon con la respuesta a distensión antes de la aplicación del fluoroacetato. (ANOVA de dos vías, Bonferroni (p<0.05)).

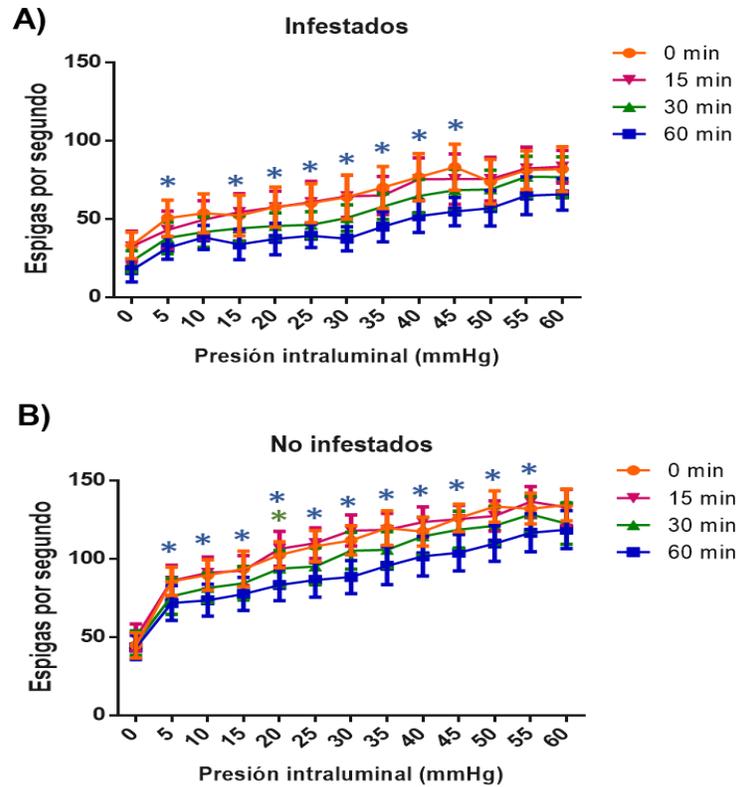


Fig. 4. El fluoroacetato disminuye la respuesta inducida por distensión intraluminal.

Las gráficas muestran la actividad de nervios mesentéricos inducida por el incremento de presión intraluminal; cada punto representa el valor promedio (n=21) de la respuesta (espigas por segundo) en respuesta a la presión intraluminal inducida (mm Hg) \pm el error estándar de la media. Las líneas muestran la respuesta en condiciones control, antes (naranja), durante (rojo) y después de 30 (verde) y 60 minutos (azul) de la aplicación de fluoroacetato en ratones (A) infestados y en (B) no infestados. Los grupos fueron comparados al grupo control mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

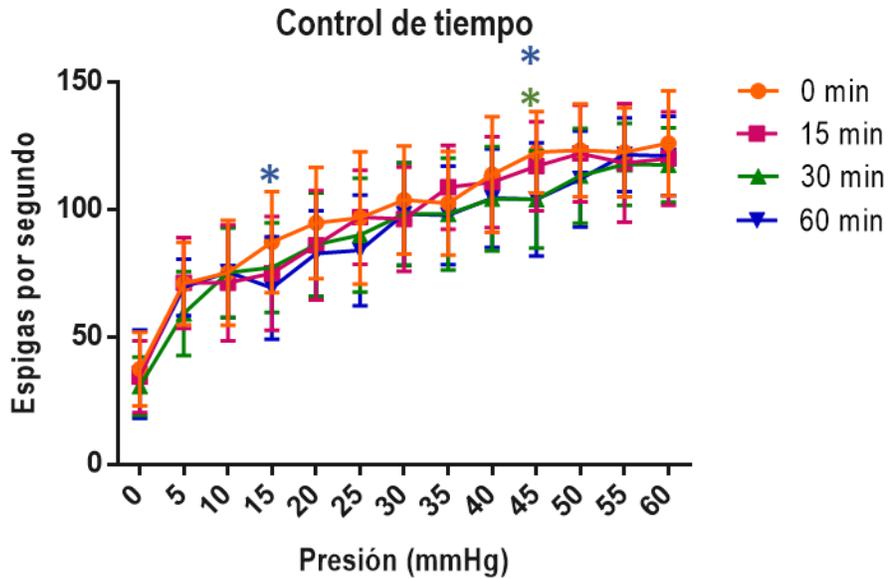


Fig. 5. La actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos en respuesta a distensión se mantiene constante a través del tiempo.

La gráfica muestra la actividad de nervios mesentéricos inducida por el incremento de presión intraluminal a los tiempos 0 (naranja), 15 (rojo), 30 (verde) y 60 minutos (azul) de la inducción de la distensión. Cada punto representa el valor promedio (n=4) de la respuesta (espigas por segundo) en respuesta a la presión intraluminal inducida (mm Hg) \pm el error estándar de la media. Los grupos fueron comparados con el grupo al tiempo 0 mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

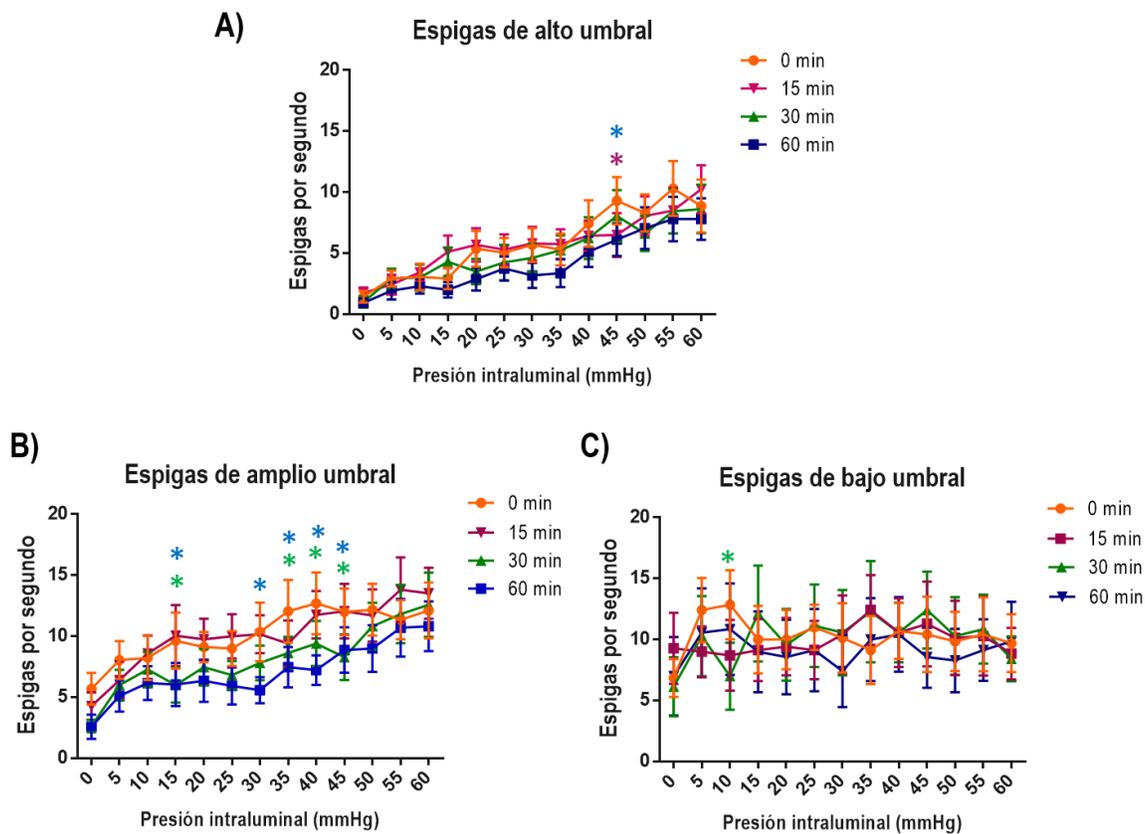


Fig. 6. El fluoroacetato inhibe la respuesta a distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio umbral en ratones infestados.

Las gráficas muestran la frecuencia (espigas por segundo) en función de la presión intraluminal (mm Hg) a los 60 minutos después la aplicación de 0.3 a 10 mM de fluoroacetato, de las fibras que responden a A) alto, B) amplio y C) bajo umbral. La separación de las fibras se llevó a cabo mediante discriminación por forma de las ondas utilizando el programa Spike 2. Cada punto representa el valor promedio de la respuesta (espigas por segundo) en respuesta a la presión intraluminal inducida (mm Hg) \pm el error estándar de la media. Las líneas muestran la respuesta en condiciones control, antes (naranja), durante (rojo) y después de 30 (verde) y 60 minutos (azul) de la aplicación de fluoroacetato en ratones no infestados. Los grupos fueron comparados con el grupo control mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

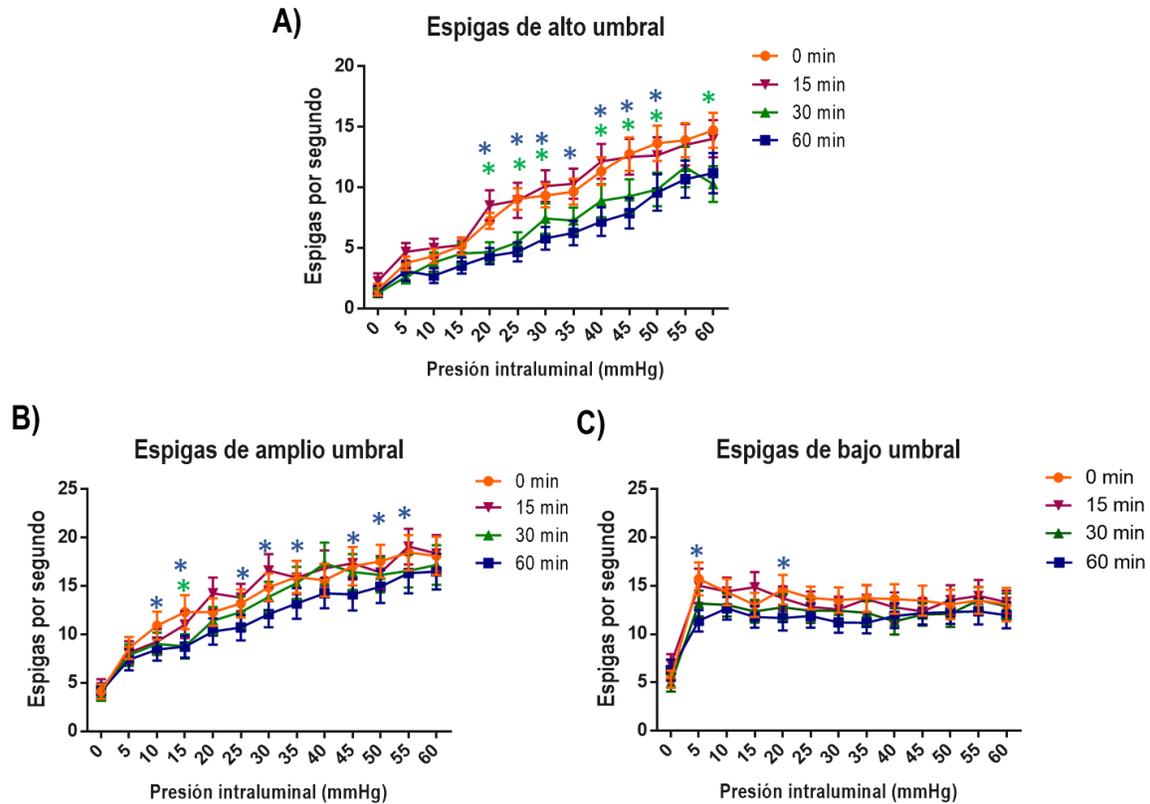


Fig. 7. El fluoroacetato inhibe la respuesta a distensión intraluminal de las fibras que responden a amplio y alto umbral en ratones no infestados.

Las gráficas muestran la frecuencia (espigas por segundo) en función de la presión intraluminal (mm Hg) a los 60 minutos después de la aplicación de 10 mM de fluoroacetato, de las fibras que responden A) alto, B) amplio y C) bajo umbral. La separación de las fibras se llevó a cabo mediante discriminación por forma de las ondas utilizando el programa Spike 2. Cada punto representa el valor promedio de la respuesta (espigas por segundo) respecto a la presión intraluminal inducida (mm Hg \pm el error estándar de la media). Las líneas muestran la respuesta en condiciones control, antes (naranja), durante (rojo) y después de 30 (verde) y 60 minutos (azul) de la aplicación de fluoroacetato en ratones no infestados. Los grupos fueron comparados con el grupo control mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

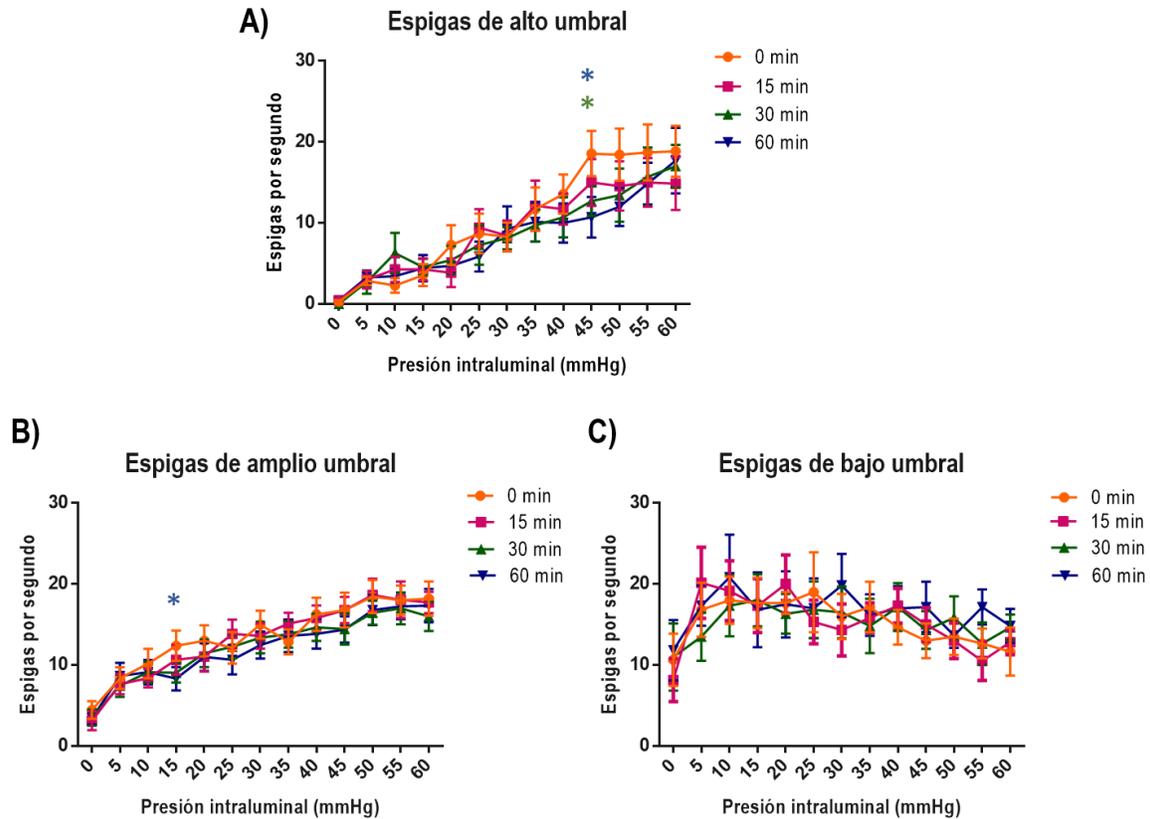


Fig. 8. La respuesta de las fibras que responden a bajo, amplio y alto umbral de presión intraluminal se mantiene a través del tiempo.

Las gráficas muestran la respuesta de los nervios mesentéricos (espigas por segundo) en función de la presión intraluminal (mm Hg) para las fibras que responden a: A) alto, B) amplio, y C) bajo umbral. Cada punto representa el valor promedio de la respuesta (espigas por segundo) en respuesta a la presión intraluminal inducida (mm Hg \pm el error estándar de la media). Los grupos fueron comparados con el grupo al tiempo 0 mediante la prueba de ANOVA de dos vías y con una prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

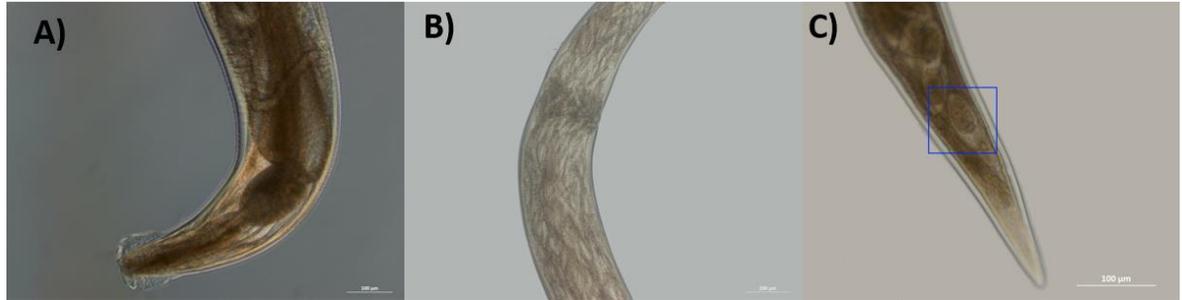


Fig. 9. Morfología de un gusano representativo del género *Syphacia*.

Fotografías obtenidas por una cámara Axiocam Color (Zeiss) integrada a un microscopio de luz (Zeiss) de un gusano obtenido de uno de los ratones infestados utilizados en los experimentos de registro de la actividad aferente de los nervios mesentéricos de yeyuno. El tamaño de la escala es 100 μM . (A) Hembra, terminación anterior, aspecto lateral. (B) Huevos, aspecto lateral. (C) Huevos en forma ovalada.