

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario



:::Departamento de Ciencias Fisiológicas:::

:::fisiología::: farmacia :::::

.:::guías de laboratorio:::

2019

.....Autores

Dra. C Carnovale

Dr. F Crocenzi

Dr. C Favre

Dr. D Francés

Dra. C Larocca

Dr. J Monti

Dr. M Roma

Dra. T Ronco

Generalidades para el desarrollo de los trabajos de Laboratorio Manejo de animales de experimentación

Introducción

El objetivo es poner en contacto al alumno con el animal de experimentación que se utilizará durante el curso.

La rata

Ciclo de vida

Pesos

Peso de nacimiento: 5-6 g

Peso de macho adulto: 300-400 g

Peso de hembra adulta: 250-300 g

Actividad Sexual

Pubertad en la hembra: 41 días (35-46) (80 g)

Edad de cruzamiento, hembra: 100 días (200 g)

Edad de cruzamiento, machos: 100 días (300 g)

Ciclo sexual: 5 días

Período de gestación: 20-22 días

Condiciones Ambientales

Temperatura: 22-27°C

Humedad: 45-55%

Horas de Luz: 12 horas

Frecuencia Cardíaca

Adulto: 328/min (261-600)

Recién nacido: 161/min (81-241)

Frecuencia Respiratoria

Adulto: 94/min (75-115)

Identificación

Se basa en la ejecución de orificios y cortes en cuñas en la zona anterior, exterior y posterior de las orejas.

Manipulación de la rata

Es difícil fijar normas sobre cómo manipular una rata por cuanto el procedimiento cambiará de acuerdo a lo que se realice con el animal (pesarlo, inyectarlo, identificarlo, etc.)

El alumno, sin embargo, al tomar la rata deberá cuidar que el animal no pueda morderlo y hacerle tomar una posición que facilite el trabajo.

Administración de sustancias en animales no anestesiados

La administración de sustancias en solución es uno de los sistemas más usados, tanto en la investigación de fenómenos fisiológicos como en el tratamiento de enfermedades. En animales anestesiados, la vía más frecuente de administración de sustancias es la intravenosa.

Las siguientes vías son las más utilizadas:

- a) Inyección subcutánea
Se realiza preferentemente bajo la piel del abdomen o del dorso con aguja de diámetro fino. Inyectada la sustancia, retire la aguja y masajee suavemente el sitio de la inyección, para prevenir el escape del fluido inyectado.
- b) Inyección intramuscular
Se realiza con agujas de características similares a la anterior, de preferencia en las masas musculares de las extremidades superiores o inferiores.
- c) Inyección intraperitoneal
Se realiza usando una aguja de diámetro fino y corta. El sitio de predilección para introducir la aguja es el cuadrante inferior izquierdo, con la aguja levemente inclinada, la misma se sentirá flotar libremente en la cavidad peritoneal, de no ser así, no inyecte líquido, porque este caerá en el interior de una víscera o en un músculo de la pared abdominal.
Después de la vía intravenosa, esta es la vía más rápida, por la gran superficie de absorción del lecho peritoneal.
- d) Administración oral
La administración de líquidos por vía oral se realiza con una sonda, conectada a una jeringa. Es necesario entibiar el líquido antes de inyectarlo.
Con el fin de facilitar el paso de la sonda por la faringe y la probable mordedura de ella es necesario abrir la boca con una pinza de algodón. En caso de que ella entre forzada, o solo 2 o 4 cm, es probable que se halla introducido en la laringe, por ello no inyecte la sustancia y retire la sonda para ensayar de nuevo.

Anestesia

El tipo de anestesia se elegirá de acuerdo a la duración del experimento.

Anestesia de corta duración

Eter etílico: En una campana de vidrio se coloca un algodón empapado con éter, para saturar el aire con este anestésico. Se introduce la rata y se cubre la campana. Cuando la rata cae, se retira y se mantiene la anestesia con un algodón mojado en éter, colocado cerca de los orificios nasales.

La anestesia por éter puede variar en su profundidad. Con una anestesia superficial, la respiración es predominantemente torácica y rápida, cuando se profundiza, la respiración es más pausada y abdominal y lleva al paro respiratorio. En esta última circunstancia, retire el algodón con éter y proceda a realizar de inmediato respiración artificial, insuflando aire con una pipeta por la boca, comprimiendo al mismo tiempo el abdomen con una mano. Una vez inflados los

pulmones cese de insuflar, dejando escapar el aire alveolar, puede ayudar la compresión del tórax con la mano.

Anestesia de larga duración

Pentobarbital: La dosis utilizada es de 50 mg por kg. de peso, por vía intraperitoneal. Esta anestesia da mejores valores de presión arterial, es menos tóxica, por lo que se puede recuperar el animal. De buen nivel anestésico, se mantiene solo de 1 1/2 a 2 horas, por lo que frecuentemente es necesario administrar dosis de mantenimiento.

Tiopental: La dosis utilizada es de 75 mg por kg. de peso, por vía intraperitoneal.

Ketamina + xilasina: La dosis utilizada es de 100 mg ketamina-3 mg xilasina por kg de peso, por vía intraperitoneal.

Obtención de sangre de la rata

Es posible obtener pequeñas muestras de sangre de rata no anestesiada, cortando la punta de la cola. Esto también puede hacerse en ratas anestesiadas, siendo el éter la anestesia más indicada para estos casos, por cuanto produce vasodilatación caudal.

Para muestras de sangre de 0,5 o más ml, es necesario canular un vaso, de preferencia una arteria, heparinizando la rata a través de la cánula (1 mg de heparina por 100 g de peso corporal, por vía i.v.). Con este sistema se pueden obtener 2 o más muestras de sangre.

Si se trata de una muestra única de gran volumen, 2 ml o más, se puede obtener por punción de arteria aorta abdominal con una aguja de gran calibre (G21 a G18), aspirando rápidamente. Para evitar la coagulación, se humedece la jeringa con heparina.

Eutanasia en la rata

- Por decapitación.
- Si se está realizando un experimento en ratas anestesiadas, el animal se puede matar produciéndole un neumotórax bilateral, o bien inyectándole por vía intravenosa 1 cc de una solución de cloruro de potasio al 20 %.

Procedimientos Quirúrgicos

Disección del paquete vasculo-nervioso de las extremidades posteriores y canulación de la vena femoral.

Este procedimiento está indicado cuando debe administrarse alguna sustancia por vía sanguínea.

Procedimiento

Al animal anestesiado, depilarlo en la región inguinal.

Con una pinza de diente de ratón, levante la piel de esta región y con una tijera haga un corte en ojal que permita ver totalmente el paquete vasculo-nervioso formado por el nervio ciático, la arteria femoral y la vena femoral.

Con ayuda de una pinza de algodón pase dos hilos por debajo de la vena. Con uno de ellos ligar lo más distal posible, con el fin de detener la circulación.

Apoyándose en la sonda acanalada, introducir una aguja de cono verde en la vena, retirarla y colocar un catéter P-40 heparinizado, unido a una jeringa con solución fisiológica.
Mantener el catéter lleno con solución fisiológica, para que la sangre no lo obture.

1. Obtención de muestras para todos los Trabajos Prácticos

Objetivo

El objetivo del presente práctico es obtener, para conservar hasta su uso, todas las muestras (orina y plasma) necesarias para la realización de los TP propuestos a continuación.

Material y Métodos

Ratas Wistar.

Material de disección.

Balanza para animales.

Balanza analítica.

Centrífugas.

Lámparas de calentamiento.

Jeringas: 20 ml, 10 ml (vidrio para punción cardíaca), 5 ml, 1 ml.

Micropipetas automáticas.

Algodón, hilo de cirugía.

Tubos de centrífuga, Eppendorf, capilares, tubos de hemólisis.

Drogas:

Anestésicos Ketamina 50 mg/ml, Xilasina 2 %

Azul de Evans 1 g/l en solución fisiológica

Heparina

Solución Fisiológica (Cloruro de sodio 9 g/l)

Protocolo Experimental

Las ratas previamente colocadas en las **jaulas metabólicas** desde el día anterior, **serán pesadas** para determinar las cantidades de **anestésico (ketamina + xilasina, 100 mg + 3 mg/Kg de peso corporal)** y demás drogas administradas según el peso corporal. En este momento se recogerá también la orina del contenedor para medir el **volumen de orina recolectado** y **se congelará** una alícuota de la misma en tubo eppendorf. También se determinará el volumen de agua ingerido.

Una vez anestesiados (administración intraperitoneal de la dosis de anestésico correspondiente), los animales serán inmovilizados en tablas de cirugía y se realizará **incisión en la cola** para obtener sangre venosa. La **muestra de sangre** (200-400 ul) será recogida en **tubo eppendorf heparinizado**. Con una gota de la misma se procederá a **cargar capilares para determinación de hematocrito**. Los capilares serán centrifugados a 3000 rpm 5 minutos. El resto de la sangre será centrifugada a la misma velocidad para **separar el plasma y congelarlo** (muestra basal).

Luego se efectuará una incisión a nivel inguinal a fin de localizar la **vena femoral**. Se pasará por debajo de la misma una sonda acanalada que servirá como superficie de apoyo para efectuar la inyección. Se aislará el vaso y **se inyectarán 0,1 ml de la solución de Azul de Evans de concentración de 1 g/l**. efectuándose compresión sobre el orificio para evitar la pérdida de sangre. Luego de **5 minutos** después de la inyección se extraerá sangre (5-8 ml) por **punción cardiaca** con aguja y jeringa heparinizadas. La sangre será recolectada en tubos de centrifugación y centrifugada para la separación y congelado del plasma.

2. Determinación del volumen de líquidos corporales

- Medición del Volumen Sanguíneo

Introducción:

La medición del volumen sanguíneo es un complemento importante del recuento globular. Hay casos en que un recuento normal puede ser resultado de la pérdida de líquido en un paciente anémico o también que el recuento de eritrocitos sea bajo por una retención de agua. En estos casos la medición del volumen total de sangre permitirá comprobar la verdadera condición del animal.

La distribución del agua en los distintos compartimientos ha sido fundamentalmente calculada por técnicas de dilución. Dichas técnicas se efectúan mediante la inyección de sustancias que se suponen están distribuidas uniformemente en el compartimiento cuyo volumen se desea calcular. Una vez alcanzado el equilibrio en su espacio de distribución conociendo la cantidad total inyectada y determinando la concentración de la sustancia en dicho espacio, podremos calcular el volumen aparente de distribución.

La sustancia a ser administrada en el organismo deberá reunir los siguientes requisitos:

1. No ser tóxica
2. Debe distribuirse uniformemente en el compartimiento a ser medido.
3. Debe poder ser determinado fácilmente por métodos químicos.
4. No debe ser metabolizada ni sintetizada por el organismo.

Objetivo

El objetivo del presente práctico es la medición del volumen sanguíneo y la osmolaridad en animales normales y sometidos a una hidratación aguda.

Determinación del volumen sanguíneo

Se define como volumen sanguíneo o volemia a la suma del volumen globular y el volumen plasmático. ($V_s = V_g + V_p$)

El volumen globular se estimará utilizando el valor del hematocrito.

Para la determinación del volumen plasmático se utilizará Azul de Evans (colorante que se une a la albúmina), midiéndose su concentración en plasma por espectrofotometría. En el rango apropiado de concentraciones la determinación cumple con la ley de Beer y la recta pasa por el origen.

Material y Métodos

Ratas Wistar.

Material de disección.

Balanza para animales.

Balanza analítica.

Espectrofotómetro.

Osmómetro.

Centrífugas.

Lámparas de calentamiento.

Jeringas: 20 ml, 10 ml (vidrio para punción cardíaca) 5 ml, 1 ml.

Micropipetas automáticas.

Algodón, hilo de cirugía.

Tubos de centrifuga, Eppendorf, capilares, tubos de hemólisis.

Drogas:

Anestésico.

Azul de Evans (T 1824):

Colorante a inyectar: concentración 1 g/l en cloruro de sodio 9 g/l.

Concentración de la solución testigo 250 mg/l.

Heparina.

Solución Fisiológica (Cloruro de sodio 0,9 g/l).

Protocolo Experimental

Las ratas previamente pesadas, se anestesian y se efectúa una incisión a nivel inguinal a fin de localizar la vena femoral. Se pasa por debajo de la misma una sonda acanalada que servirá como superficie de apoyo para efectuar la inyección.

Se cateteriza el vaso y se inyectan 0,1ml de la solución de Azul de Evans de concentración de 1 g/l. efectuándose compresión sobre el orificio para evitar la pérdida de sangre. 5 minutos después de la inyección se extrae sangre por punción cardíaca con aguja y jeringa heparinizadas,

la sangre se centrifuga a 3000 rpm 10 minutos y del plasma sobrenadante se toman 100-200 ul y se llevan a 1 ml con agua destilada. De la solución testigo (250 mg/l) se toman 20 ul y se lleva a igual volumen final que la muestra con agua destilada. La absorbancia de la muestra y el testigo se lee a 620 nm contra blanco de agua destilada, con estos datos se calcula el volumen plasmático aplicando la fórmula: $V_p = Q/[AE]_p$.

La volemia para el animal entero se calcula aplicando la fórmula:

$$\mathbf{Volemia} = V_p / (1 - H_{to}) \quad (H_{to}: \text{ expresado en número decimal})$$

El resultado final se expresa cada 100 g de peso corporal.

Discusión de los resultados obtenidos.

3. Fisiología Renal

Introducción

La función renal se cumple por medio de la filtración glomerular de todos los componentes plasmáticos a excepción de las proteínas. Los túbulos renales reabsorben selectivamente distintos componentes del filtrado glomerular como la glucosa, aminoácidos, etc.

Un parámetro para evaluar la función renal es medir la velocidad de filtración glomerular (VFG). La velocidad de filtración glomerular (VFG) puede estimarse a través del cálculo de la depuración plasmática de una sustancia que sólo sea filtrada libremente, que no difunda pasivamente, ni sea secretada ni reabsorbida por los túbulos renales.

La sustancia exógena que reúne estas condiciones es la inulina. También puede utilizarse para conocer la VFG una sustancia endógena que es la creatinina, la cual proviene de la metabolización de la glicina, arginina y metionina. La creatinina se encuentra especialmente en el tejido muscular donde la creatina-fosfato cumple un importante rol fisiológico. La creatina pierde una molécula de agua y se transforma en la creatinina de estructura cíclica.

El clearance osmolar (Closm) representa el volumen de plasma depurado de todos los solutos de la orina por el riñón en un minuto de actividad. La comparación del Closm con el V_o es una medida útil para estimar el funcionamiento de los segmentos del nefrón involucrados en los mecanismos de concentración/dilución de la orina.

Objetivo

El objetivo del presente práctico es estimar la velocidad de filtración glomerular (VFG) y el clearance osmolar (Closm) en la rata.

Material y Métodos

Ratas Wistar.

Tijeras.

Balanza para animales.

Balanza analítica.

Espectrofotómetro.

Centrífugas.

Lámparas de calentamiento.

Micropipetas automáticas.

Baño a 37°.

Tubos Eppendorf.

Jaula metabólica.

Heparina.

Kit comercial de determinación de creatinina.

Protocolo Experimental

Todos los animales serán colocados en jaulas metabólicas 16 hs. antes del práctico, para la recolección de orina, no agregar alimento ya que contamina la orina.

El día del experimento, se anestesiarán, se realizará la extracción de sangre por punción cardíaca y se medirá el volumen de orina recogido durante las 16 hs (V_{16h}). Este valor se puede complementar con el volumen de agua ingerida.

Determinación de creatinina

Se determinará la concentración de creatinina en plasma y en una alícuota de la orina de 16 hs diluída 1/50. Después de separar el suero de las respectivas muestras por centrifugación, se determinará la concentración de creatinina utilizando el método enzimático de un reactivo comercial

Depuración plasmática de creatinina = $[creatinina]_o \cdot V_o' / [creatinina]_s$

Determinación de Closm

Se determinarán las osmolaridades del plasma y de la orina recogidos utilizando el osmómetro.

Closm = $[Osm]_o \cdot V_o' / [Osm]_p$

Discusión de los resultados obtenidos.

4. Regulación de la glicemia

Introducción

Los hidratos de carbono de la dieta son digeridos y absorbidos en el intestino para luego ser transportados al hígado que actúa como reservorio para su distribución. De esta forma, son mantenidos los niveles de glicemia, tanto luego de la ingesta como en ayuno, dependiendo de los requerimientos energéticos de los tejidos. La regulación hormonal de este proceso involucra, fundamentalmente, la secreción de insulina y glucagon pancreáticos. En ayuno la relación I/G es baja; en contraposición, con la ingesta la relación aumenta por un incremento en la secreción de insulina (producida y almacenada en las células beta del páncreas), que tiene como principales órganos blanco el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. En estos tejidos insulina aumenta el metabolismo de glucosa (glucólisis, síntesis de glucógeno, etc.), por lo que disminuyen los niveles de glicemia.

Objetivo

El objetivo del presente práctico es evaluar los niveles de glucosa en sangre en respuesta a la administración de glucosa exógena.

Material y Métodos

Ratas Wistar.

Balanza para animales.

Instrumental quirúrgico.

Jeringa 1 ml.

Espectrofotómetro.

Centrífugas.

Lámparas de calentamiento.

Micropipetas automáticas.

Tubos Eppendorf.

Kit comercial de glicemia.

Drogas:

Insulina.

Glucosa

Protocolo Experimental

Se trabajará con animales ayunados ó consobrecarga de glucosa. Para esto, los animales serán pesados y anestesiados y su temperatura corporal será mantenida con lámpara infrarroja. Se procederá a obtener una muestra de sangre basal recogida de la cola (aprox. 200 ul en tubo Eppendorf).

Se recogerá en tubos Eppendorf heparinizados muestras de sangre de la cola.

Los animales serán sacrificados por neumotórax.