

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.  
Universidad Nacional de Rosario

**::.Departamento de Ciencias Fisiológicas::.**

**::.fisiología::. farmacia :...::**

**.::guías de laboratorio::**

**::. 2023**

**Autores:**

**Dres. Arana,**

**Capiglioni,**

**Crocenzi, Favre,**

**Francés, Larocca,**

**Marrone, Rivabella**

**Maknis, Roma,**

**Ronco, Sanchez**

**Pozzi.**

## **Generalidades para el desarrollo de los trabajos de Laboratorio. Manejo de animales de experimentación**

### **Introducción**

El objetivo es brindar al alumno la información respecto al 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 mas 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. Lo mismo se practica para inyectar una solución cuando es necesaria la vía intravenosa.

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**

Diseción 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 es obtener las muestras (orina y plasma) necesarias para la realización de los TP propuestos subsiguientemente.

### Material y Métodos

Ratas Wistar.

Jaulas metabólicas

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.

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)

Solución Fisiológica + Sacarosa (Cloruro de sodio 9 g/l + Sacarosa 60 g/l)

### Protocolo Experimental

Las ratas serán colocadas en las **jaulas metabólicas**, separadas en dos grupos: **1. Grupo Control:** la botella de bebida contendrá agua de la canilla; **2. Grupo Sacarosa/Fisiológica:** la botella de bebida contendrá la solución fisiológica + sacarosa. Las ratas permanecerán en las jaulas metabólicas durante la noche, por un período específico que debe ser determinado. Las ratas **serán pesadas** para determinar las cantidades de **anestésico (ketamina + xilasina, 100 mg + 3 mg/Kg de peso corporal)** a administrar. En este momento se recogerá también la orina del contenedor para medir el **volumen de orina recolectado**. La orina será centrifugada 5 min a 3000 RPM, y parte del sobrenadante alicuotado en tubos eppendorf. Las alícuotas se congelarán a -20°C. También se determinarán los volúmenes de agua o de solución Fisiológica + Sacarosa ingeridos.

Una vez anestesiados (administración intraperitoneal), los animales serán inmovilizados en tablas de cirugía. 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 la vena y se inyectarán **100 µl de la solución de Azul de Evans (Cc=1 g/l)**, efectuándose compresión sobre el orificio para evitar la pérdida de sangre. Luego de un período de **5 min**, se extraerá sangre (5-8 ml) por **punción cardíaca** con aguja y jeringa heparinizadas. Algunas gotas de la misma se utilizarán para cargar capilares heparinizados y determinar el valor del hematocrito por centrifugación. La sangre será recolectada en tubos de centrifuga y centrifugada 5 min a 3000 RPM para la separación del plasma. Varias alícuotas del plasma se congelarán a -20°C en tubos eppendorf, hasta su uso.

## 2. Determinación del volumen de líquidos corporales: Volemia

### Introducción:

La medición del volumen sanguíneo (volemia) 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 idealmente se distribuyen uniformemente en el compartimiento cuyo volumen se desea calcular. Una vez alcanzado el equilibrio en su espacio de distribución conociendo la cantidad total inyectada (Q) y determinando la concentración de la sustancia en dicho espacio (Cc), podremos calcular el volumen aparente de distribución ( $Cc=Q/Vd$  o sea que  $Vd=Q/Cc$ ).

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 en animales normales sometidos a distinto tipo de hidratación.

### Determinación del volumen sanguíneo

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

La fracción 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). Por lo tanto, la volemia puede calcularse como:  $V_s= 100.V_p/100-H_{to}$

### Material y Métodos

Muestras de plasma provenientes de las ratas "controles" y "fisiológica + sacarosa" inyectadas con Azul de Evans (100  $\mu$ l de Azul de Evans 1 g/l)

Espectrofotómetro.

Agua destilada

Testigo Azul de Evans (concentración de la solución testigo 250 mg/l).

### Protocolo Experimental

Se pipetea en un tubo 100-200  $\mu$ l de las muestras de plasma y se llevan a 1 ml con agua destilada. De la solución testigo de Azul de Evans (250 mg/l) se toman 20  $\mu$ l 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 se calcula aplicando la fórmula:  $100.V_p/100-H_{to}$  (el resultado final se expresa cada 100 g de peso corporal).

### 3. Fisiología Renal

#### Introducción

La función renal se cumple por medio de la filtración glomerular de todos los componentes plasmáticos a excepción de gran parte de las proteínas, y la reabsorción selectiva de distintos componentes del filtrado glomerular hacia el plasma y secreción selectiva de distintos componentes del plasma hacia el líquido tubular, efectuado a través del epitelio tubular en sus distintos segmentos.

Un parámetro para evaluar la función renal es 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 filtre libremente, que no difunda pasivamente, ni sea secretada ni reabsorbida por los túbulos renales. La sustancia exógena que reúne estas condiciones es la inulina.

En la clínica, para conocer la VFG, en general se utiliza 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 ratas en contacto con distintos líquidos de bebida.

#### Material y Métodos

Muestras de plasma y de orina provenientes de las ratas “controles” y “fisiológica + sacarosa”.

Espectrofotómetro.

Centrífugas.

Micropipetas automáticas.

Baño a 37°.

Tubos Eppendorf.

Kit comercial “Creatinina Directa” de Wiener lab ([https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/creatinina\\_directa\\_sp.pdf](https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/creatinina_directa_sp.pdf))

#### Protocolo Experimental

##### Determinación de creatinina

Se determinará la concentración de creatinina en plasma y en una alícuota de la orina recolectada diluída 1/50.

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

#### **4. Regulación de la glicemia:** (Opcional)

##### **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 animales normales expuestos a bebidas azucaradas y no azucaradas.

##### **Material y Métodos**

Muestras de plasma proveniente de las ratas “controles” y “fisiológica + sacarosa”.

Espectrofotómetro.

Micropipetas automáticas.

Tubos Ependorff.

Kit comercial de glicemia.

##### **Protocolo Experimental**

Se trabajará con las muestras de plasma proveniente de las ratas “controles” y “fisiológica + sacarosa”. Se seguirán las instrucciones del kit de Glicemia para determinar las concentraciones de glucosa en las distintas muestras.