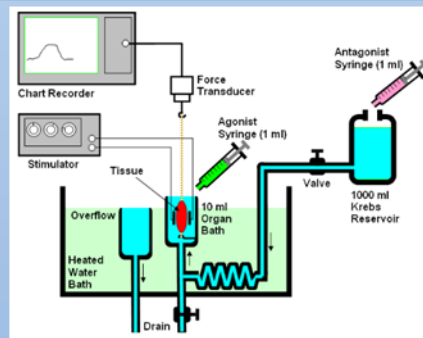


Grado en Biomedicina

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

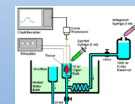
FARMACOLOGÍA



Práctica 4 Baño de órgano aislado

Curso: Alumno:

Dra. Marta Martín Fernández



La utilización de animales para generar “conocimiento científico” es una práctica conocida desde la antigua Grecia, donde ya se realizaban disecciones de diversas especies animales con el fin de comprender su anatomía y fisiología. Con el paso del tiempo, los investigadores se dieron cuenta que los animales y los seres humanos son muy parecidos, estando dotados de los mismos órganos que desempeñan las mismas funciones de una manera similar. Por ejemplo, el ser humano comparte el 95% de los genes con el ratón, lo que le convierte en un modelo muy cercano al cuerpo humano.

La investigación animal ha permitido a los científicos descubrir formas de curar enfermedades y prolongar la vida del ser humano, desempeñando un papel fundamental en casi cada uno de los descubrimientos de los últimos 20 años.

Gracias a la experimentación en animales se han desarrollado vacunas, como la de la viruela, tétanos o la polio entre otras, trasplantes, transfusiones sanguíneas, técnicas quirúrgicas...

Dentro del campo de la farmacología, se utilizan animales para probar medicamentos antes de ser utilizados en humanos. Para ello se recurre a modelos animales de enfermedad, que consisten en “provocar” en el animal una enfermedad, como, por ejemplo, cáncer, tuberculosis, gripe, asma o hipertensión arterial, entre otras.

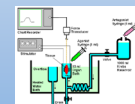
De esta forma se descubrió la insulina y se han desarrollado multitud de fármacos como los anestésicos modernos, o los tratamientos antirretrovirales altamente activos, entre otros.

En el proceso de evaluación preclínica de los fármacos, lo más relevante es constatar que es lo que “hace” o “no hace” el medicamento. Para ello, existen múltiples procedimientos entre los que se encuentran el “órgano aislado”, el animal vivo, como veremos en esta práctica, y los modelos de enfermedad en animales.

No obstante, en los últimos años se ha estado trabajando intensamente en alternativas para la sustitución de animales en la experimentación: técnicas fisicoquímicas, utilización de organismos de menor escala biológica, cultivos de células, tejidos y órganos, y simulaciones por ordenador.

Estos modelos “in vitro” son una parte importante en el desarrollo de medicamentos, y aunque no siempre será posible prescindir de los animales en la experimentación, si se podrá en algunos casos disminuir el número empleado en cada ensayo.

Práctica 4 – Baño de órgano aislado



El **objetivo** de esta práctica es analizar el efecto de ciertos fármacos en un modelo de simulación de baño de órgano aislado.

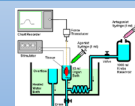
El baño de órganos aislado es la herramienta farmacológica clásica para evaluar la relación concentración-respuesta en el tejido contráctil. Aunque una variedad de herramientas a nivel molecular se ha desarrollado en las últimas décadas para evaluar las respuestas a nivel celular, el ensayo en baño de órganos es aún considerada una herramienta valiosa para la optimización y para la elucidación del mecanismo de acción. Además, los ensayos en baño de órganos son ampliamente utilizados en estudios preclínicos.

La aplicación más común de los ensayos en baño de órganos es la investigación cardiovascular, usando anillos aislados de aorta, tejido cardíaco (músculo papilar, ventrículo izquierdo) o arterias. Para el estudio de las afecciones gastro-intestinales se utilizan con frecuencia las preparaciones de íleon y de colon, pero también puede ser estudiado el músculo antral gástrico y el esfínter.

Con la realización de esta práctica, el alumno reforzará su conocimiento sobre diferentes fármacos ya estudiados en las clases de teoría. Para ello, se trabajará con diferentes simulaciones informáticas.

Como apoyo para esta práctica se puede visualizar en la siguiente dirección una píldora de conocimiento sobre la experimentación animal en Farmacología:

[Píldoras de conocimiento](#)

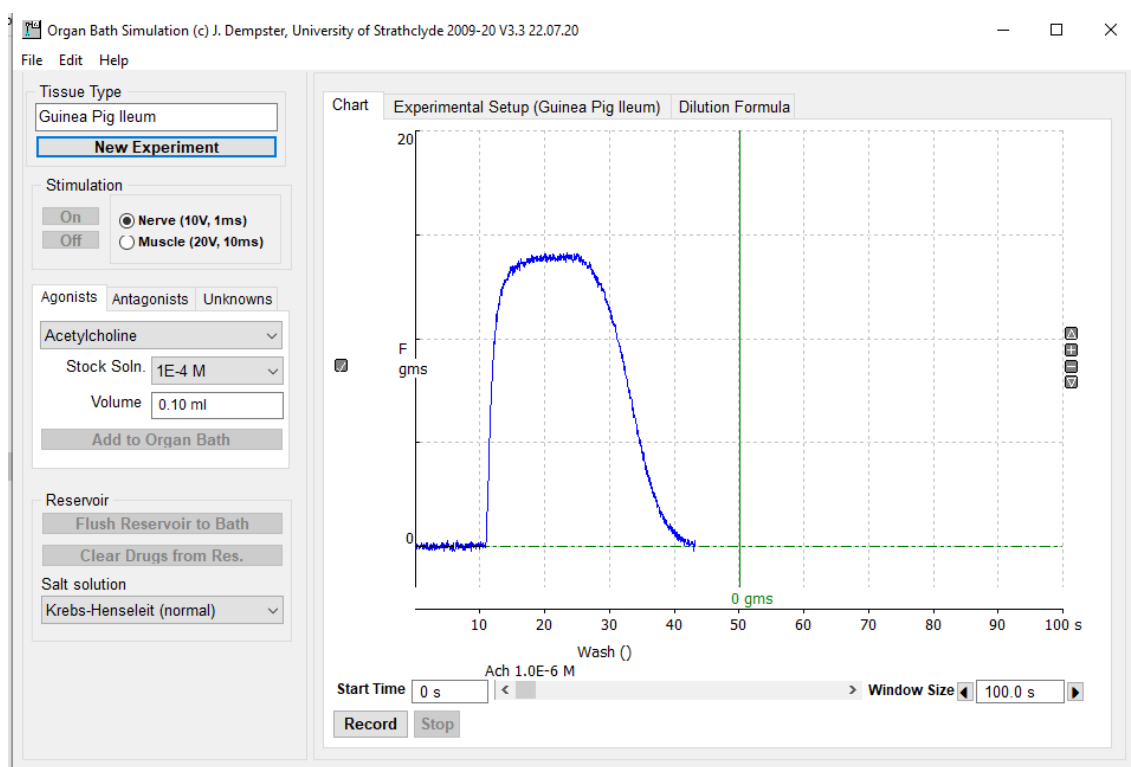
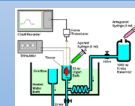


1. SIMULACIONES PARA BAÑO DE ÓRGANO AISLADO: PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

Las simulaciones informáticas son fundamentales para la docencia práctica en la asignatura de farmacología. En esta práctica vamos a emplear el simulador informático “Organ Bath Simulation V3.6 (OBSIM)”.

El programa OBSIM simula un experimento farmacológico clásico, in vitro, utilizando uno de los cuatro tipos diferentes de tejidos: íleon de cobaya, yeyuno de conejo, bíventer cervicis de pollo y arteria de rata.

Práctica 4 – Baño de órgano aislado



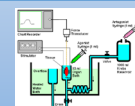
Los experimentos farmacológicos in vitro en órganos o tejidos aislados proporcionan un medio para descubrir o cuantificar los efectos de los fármacos en tejidos específicos antes de su aplicación en humanos o en animales vivos. Las propiedades de la mayoría de los medicamentos actualmente en uso se aclararon utilizando este método y, los experimentos in vitro continúan siendo una etapa esencial en el proceso de descubrimiento de fármacos.

Tipos de Tejidos

Hay cuatro tipos de tejidos disponibles para su estudio:

Íleon de cobaya: El íleon de cobaya es una sección cortada de la región del íleon del tracto gastrointestinal de una cobaya. El músculo liso dentro del íleon se contrae en respuesta a la aplicación de una variedad de agonistas. También tiene nervios en su interior que pueden ser estimulados eléctricamente para producir contracción.

Biventer cervicis de pollo: El biventer cervicis de pollo es un músculo esquelético del cuello de un pollo joven. Se disecciona con el nervio que lo inerva intacto. Se puede hacer que se contraiga mediante la aplicación de agonistas o mediante la estimulación eléctrica de su nervio.

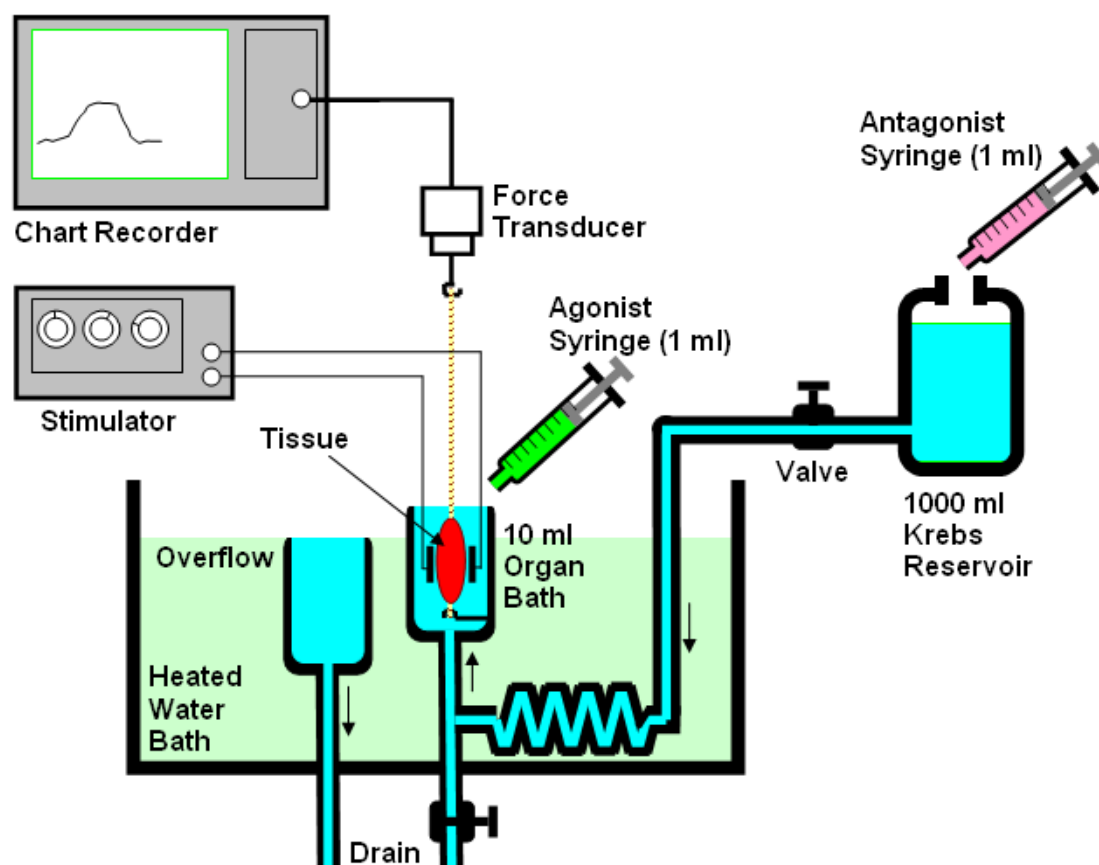


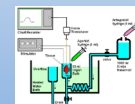
Anillo arterial de conejo: El anillo arterial de conejo es una sección cortada de una arteria de conejo y se adjunta a un transductor de fuerza. Se puede hacer que se contraiga mediante la aplicación de KCL o del agonista noradrenalina. La arteria puede volver a relajarse aplicando una serie de antagonistas.

Yeyuno de conejo: El yeyuno de conejo (preparación de Finkleman) es una sección cortada de la región del yeyuno del tracto gastrointestinal de un conejo. Se contrae espontáneamente y estas contracciones pueden ser inhibidas mediante la aplicación de agonistas adrenérgicos o mediante la estimulación del suministro nervioso simpático.

1. Experimento

El tejido en estudio se sumerge en un baño de órgano con un pequeño volumen de 10 ml que contiene una solución salina fisiológica, Krebs-Henseleit (K-H), que se asemeja a los fluidos extracelulares que normalmente bañan el tejido in vivo. El baño de órgano está contenido dentro de un baño de Perspex que contiene agua del grifo, mantenida a una temperatura cercana a la temperatura corporal normal del animal (37°C) mediante un calentador y un termostato.



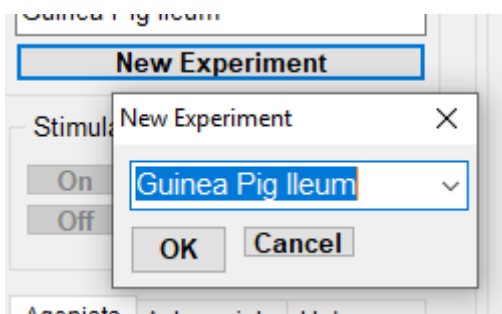


Los fármacos se pueden aplicar al tejido pipeteando pequeños volúmenes de solución que contienen el fármaco directamente en el baño de órgano y se eliminan al enjuagar el baño de órgano con solución fresca de un depósito que contiene solución K-H. Al abrir el grifo del depósito, la solución fisiológica fluye a través de la bobina de calentamiento hacia el baño de órgano. Una mezcla de oxígeno (95%) y dióxido de carbono (5%) se burbujea tanto en el depósito como en el baño de órgano para proporcionar oxígeno y mantener el pH del tejido. El tejido también se puede estimular eléctricamente utilizando un estimulador conectado a un par de electrodos colocados a ambos lados del tejido dentro del baño de órgano.

El tejido está unido a un transductor de fuerza que genera una señal eléctrica proporcional a la fuerza contráctil generada por el tejido cuando se aplica un fármaco. Este transductor está conectado a un amplificador que aumenta los pequeños voltajes producidos por el transductor a un nivel adecuado para su medición por la computadora. La señal amplificada se alimenta luego a un convertidor analógico-digital (A/D) que digitaliza la señal y la almacena en la computadora, bajo el control de un programa de registro de gráficos digitales.

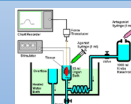
2. Iniciar un experimento.

a) Para comenzar un nuevo experimento, haz clic en el botón de "Nuevo Experimento" y selecciona el tipo de tejido que se colocará en el baño de órgano desde la lista de Tipos de Tejido.



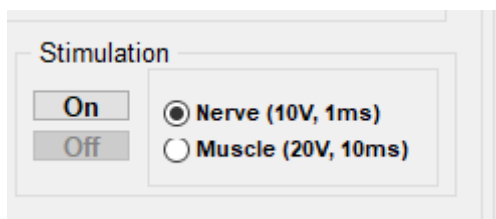
b) Haz clic en el botón de "Grabar" para iniciar el funcionamiento del registrador gráfico.

c) Selecciona y aplica fármacos de la lista de Agonistas, Antagonistas o fármacos Desconocidos disponibles.



4. Estimulación eléctrica

Para estimular eléctricamente el tejido, selecciona "Nervio" para estimular las fibras nerviosas que inervan el tejido muscular o "Músculo" para estimular directamente las fibras musculares dentro del tejido. Luego, haz clic en el botón "Encender" para comenzar a estimular a intervalos regulares.

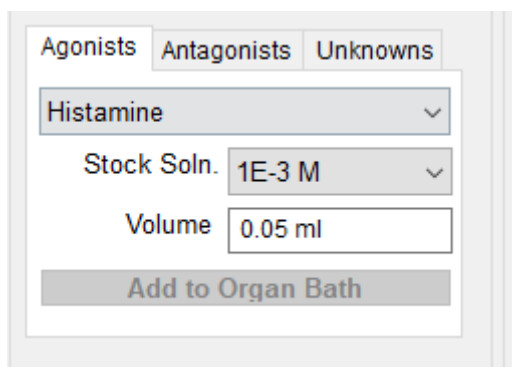


Haz clic en el botón "Apagar" para detener la estimulación.

5. Uso de agonistas

Para agregar un fármaco agonista al baño de órgano:

a) Selecciona la página de Agonistas.

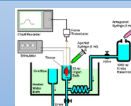


b) Selecciona el tipo de agonista a aplicar de la lista de agonistas disponibles.

c) Selecciona la concentración de la solución del fármaco a aplicar en la lista de "Solución de Reserva" (Stock Soln.).

d) Introduce el volumen (entre 0 y 1 ml) de la solución de reserva que se va a aplicar en el cuadro de Volumen.

e) Haz clic en el botón "Agregar al Baño de Órganos" para inyectar el volumen seleccionado de la solución de reserva del agonista en el órgano.



f) Cuando la respuesta del tejido en el registro gráfico alcance un estado estable (o después de 30 segundos si no se ha producido ninguna respuesta), haz clic en el botón "Enjuagar Reservorio al Baño" para eliminar el agonista del baño de órgano.

Notas:

Los agonistas son fármacos que, cuando se aplican al tejido, provocan una respuesta (contracción en el caso de los tejidos que normalmente se estudian en baños de órganos) al unirse a receptores específicos en la superficie de las células dentro del tejido.

6. Uso de antagonistas

Para agregar un fármaco antagonista al baño de órgano o al reservorio de solución de Krebs:

a) Selecciona la página de Antagonistas.

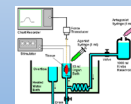
b) Selecciona el tipo de antagonista a aplicar de la lista de antagonistas disponibles.

c) Selecciona la concentración de la solución del fármaco a aplicar en la lista de "Solución de Reserva" (Stock Soln.).

d) Introduce el volumen (entre 0 y 1 ml) de la solución de reserva que se va a aplicar en el cuadro de Volumen.

e) Selecciona "Baño de Órganos" en la lista de "Añadir a" si el antagonista se va a aplicar directamente al baño de órgano. Selecciona "Reservorio" si el fármaco se va a agregar al reservorio de solución de Krebs.

f) Haz clic en el botón "Agregar" para inyectar el volumen de la solución de reserva seleccionada del antagonista en el baño de órgano o en el reservorio.



Notas:

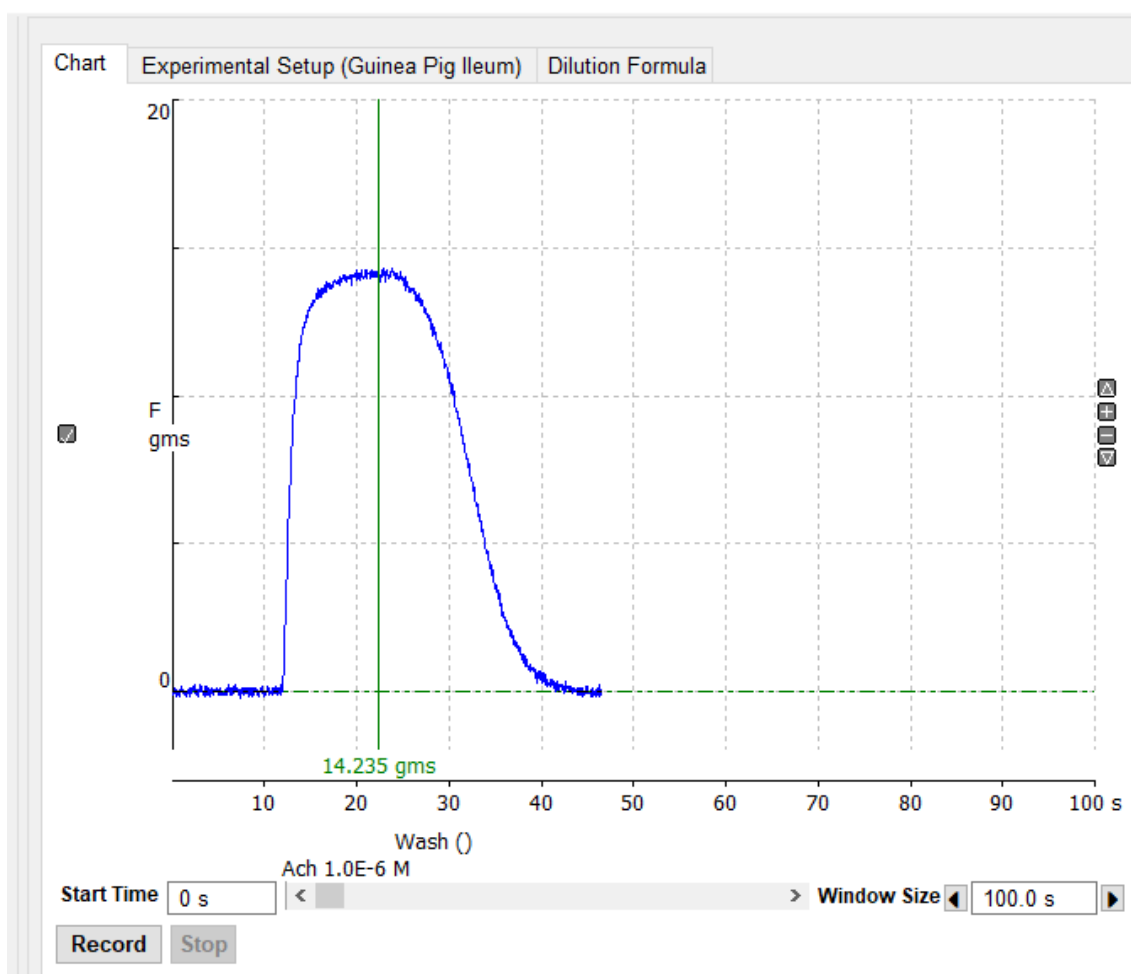
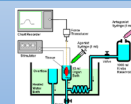
Los antagonistas son fármacos que bloquean las acciones de los agonistas en el tejido, reduciendo o impidiendo la respuesta del tejido. Por lo tanto, la aplicación de un antagonista no tendrá un efecto aparente en el tejido en el baño de órgano a menos que un agonista esté presente (o el tejido esté siendo estimulado). Los antagonistas se estudian típicamente observando los efectos que un antagonista tiene sobre diferentes concentraciones de un agonista elegido. Para evitar la necesidad de aplicar repetidamente el antagonista al baño de órgano antes de cada agonista, generalmente se agrega al reservorio de solución de Krebs utilizado para enjuagar el baño de órgano entre aplicaciones de agonistas.

7. Medición de la respuesta tisular

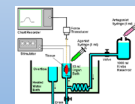
Para medir la amplitud máxima de las contracciones del tejido:

- a) Haz clic en el botón "Detener" para detener la grabación.

Práctica 4 – Baño de órgano aislado



- b) Utilizando la barra de desplazamiento en la parte inferior de la pantalla del gráfico, selecciona una sección de la grabación que contenga la contracción del tejido que deseas medir. También puedes ajustar el tamaño de la ventana de visualización ingresando una nueva duración en el cuadro de "Tamaño de la Ventana" o expandir o contraer la ventana usando los botones de flecha.
- c) Arrastra el cursor de medición en la pantalla del gráfico hasta el punto de la traza de la grabación que deseas medir (el pico de las respuestas estimuladas por nervios o la meseta de las respuestas a los agonistas). La fuerza contráctil en el punto del cursor (en unidades de gramos) se muestra debajo del cursor.



8. Opciones de menú

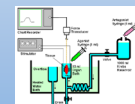
- File > Print: Permite imprimir una copia de la grabación mostrada. Seleccione “Print” en el menú “File”. Para seleccionar una impresora específica o cambiar la configuración de la impresora, seleccione “Printer Setup” en el menú “File”.
- Edit > Copy Data: Para copiar los puntos de datos del registro visualizado en el portapapeles de Windows y poder pegarlos en una hoja de cálculo o en un programa de trazado de gráficos, seleccione “Copy Data” en el menú “Edit”.
- Edit > Copy Image: Copia una imagen de la grabación visualizada para poder pegarla en un documento de Word o en una presentación de PowerPoint, seleccione “Copy Image” en el menú “Edit”.
- File > Save Experiment: Guarda la grabación del experimento actual en un archivo de datos, seleccione “Save Experiment” en el menú “File” e introduzca el nombre de un nuevo archivo de datos en el cuadro de diálogo.
- File > Load Experiment: Cargar una grabación previamente guardada de un archivo de datos, seleccione “Load Experiment” en el menú “File” y seleccione el archivo de datos de la lista que aparece en el cuadro de diálogo.

2. ACTIVIDADES PARA REALIZAR USANDO EL PROGRAMA DE SIMULACIÓN DE ÓRGANO AISLADO.

1. Obtención de la curva concentración-respuesta de acetilcolina.

Adicionad concentraciones acumulativas crecientes de las distintas soluciones de acetilcolina (0,10 ml de cada solución en un baño de 10 ml). Cada concentración se añade al baño una vez alcanzado el efecto máximo de la anterior. Al finalizar la adición de todas las concentraciones, se lava la preparación.

Práctica 4 – Baño de órgano aislado



Actividad 1. Cumplimentar las siguientes tablas con los resultados obtenidos empleando el Excel incluido en la práctica.

Ach (M)	Log	Efecto (g)	% efecto
1,00E-10			
1,00E-09			
1,00E-08			
1,00E-07			
1,00E-06			
1,00E-05			
1,00E-04			
1,00E-03			
1,00E-02			

	CCR I
log CE50	
CE50 (M)	