

Grado en Medicina
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FARMACOLOGÍA



Práctica 6 Hipertensión arterial

Curso:

Alumno:

Prof. F. Javier Álvarez
Dr. Eduardo Gutiérrez Abejón

Revisión 3, febrero 2021



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 recurren 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 mas 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.



La utilización de modelos de experimentación animal en el desarrollo científico, ha sido fuertemente criticado y envuelto en polémica. Por ello, todos los procedimientos deben de seguir una serie de requisitos éticos y cumplir la normativa existente al respecto.

En esta práctica se analizarán algunos temas objeto de creciente debate como son:

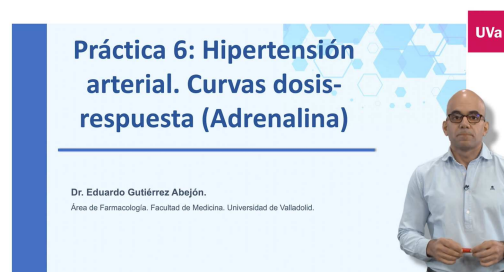
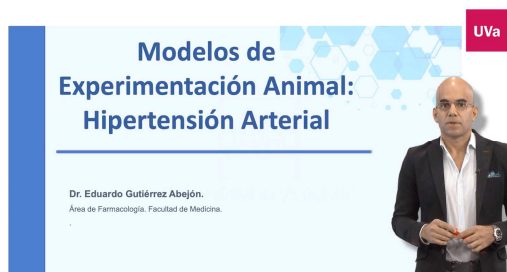
- La experimentación animal y la utilización de animales.
- Los modelos animales de enfermedad.

El **objetivo** de esta práctica es analizar el efecto de ciertos fármacos sobre la tensión arterial. Para ello, suponiendo un contexto de evaluación preclínica de fármacos, se analizará el efecto de ciertos medicamentos sobre la tensión arterial y la frecuencia cardíaca.

Con la realización de esta práctica, el alumno reforzará su conocimiento sobre receptores y fármacos que actúan sobre el sistema cardiovascular. Para ello, se visualizará un video de un modelo de “gato espinal” y se trabajará con diferentes simulaciones informáticas.

Las píldoras de conocimiento asociadas a esta práctica se pueden ver en la siguiente dirección:

https://www.youtube.com/playlist?list=PLSbo9kXA_LcxSceXhbm5xCvulbhSGM9vZ





1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Los animales que más comúnmente se utilizan en investigación se pueden diferenciar en dos grandes grupos.

Los de pequeño tamaño, entre los que se encuentran los roedores como los ratones, que pueden estar modificados genéticamente, como el ratón desnudo, la comúnmente utilizada rata wistar-lewis, hamsters, cobayas, conejos o los denominados minicerdos.

Por otra parte, se encuentran los animales de mayor tamaño, siendo los más comúnmente utilizados el perro, el gato y el mono “Rhesus” o macaco.

La utilización de un tipo u otro de animales para experimentación presenta una serie de ventajas e inconvenientes. De esta forma, la utilización de animales de pequeño tamaño tiene algunas ventajas como:

Ventajas	Desventajas
Bajo coste	Estructura orgánica sencilla
Periodo de cría reducido	Esperanza de vida corta
Manejo y estabulamiento sencillo	Bajo peso
Éticamente mejor considerado.	Genéticamente separados de los humanos

A medida que se va incrementando el tamaño de los animales, las ventajas mencionadas se convierten en desventajas y viceversa.

Para la utilización y manejo de animales en investigación es imprescindible tener en cuenta una serie de consideraciones legales y éticas.

Legalmente, en España se regula por el *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*.

En esta normativa se regulan diferentes aspectos de la experimentación animal como:

- Condiciones mínimas en las que han de alojarse los animales y los cuidados que han de recibir.
- Requisitos mínimos exigidos a los criadores, suministradores y usuarios de animales de experimentación.



- Normas a las que deben atenerse los proyectos y procedimientos experimentales.
- Medidas para proteger ciertos animales como los cefalópodos, animales asilvestrados, vagabundos y determinadas formas fetales de mamíferos.
- Prohíbe expresamente la utilización de ciertos primates no humanos como el gorila, el chimpancé, el bonobo y el orangután.

En la Universidad de Valladolid, el Comité de Ética en la Experimentación y Bienestar Animal, es el órgano encargado del bienestar de los animales conforme a lo dispuesto en el RDL mencionado. Además, es el órgano habilitado por la autoridad competente para la evaluación de proyectos en cuyos procedimientos se utilicen animales.

El objetivo final es el total reemplazo de los métodos que incluyen la utilización de animales vivos en beneficio de otros métodos alternativos que incluyan otro tipo de técnicas.

En este sentido, en 1959, Burch y Russell establecieron una serie de principios que se denominaron las 3Rs de la experimentación animal.

Estos principios se basaban en tres principios:

1. **Reemplazar**: hay que buscar alternativas al uso de animales. Estas alternativas pueden ser los ensayos bioquímicos *in vitro*, los cultivos celulares, los órganos perfundidos, los cortes de tejido o las simulaciones informáticas.
2. **Reducir**: es necesario implementar estrategias para la utilización del menor número posible de animales para obtener la misma cantidad de información o para maximizar la información que se obtiene por animal.
3. **Refinar**: hay que evaluar el impacto de cualquier procedimiento o condición sobre el bienestar del animal y desarrollar estrategias para minimizar ese impacto.

Será responsabilidad del investigador cambiar aproximaciones experimentales para reducir, o no usar, animales, realizar procedimientos que no causen dolor en los mismos, y sobre todo responder una serie de preguntas antes de iniciar una investigación con animales:

- ¿Es indispensable el uso de animales en mi proyecto?
- ¿Se dispone de alternativas?
- ¿En que momento deberé utilizar animales?
- ¿Cómo debo utilizarlos?
- ¿Cómo puedo mejorar su uso?



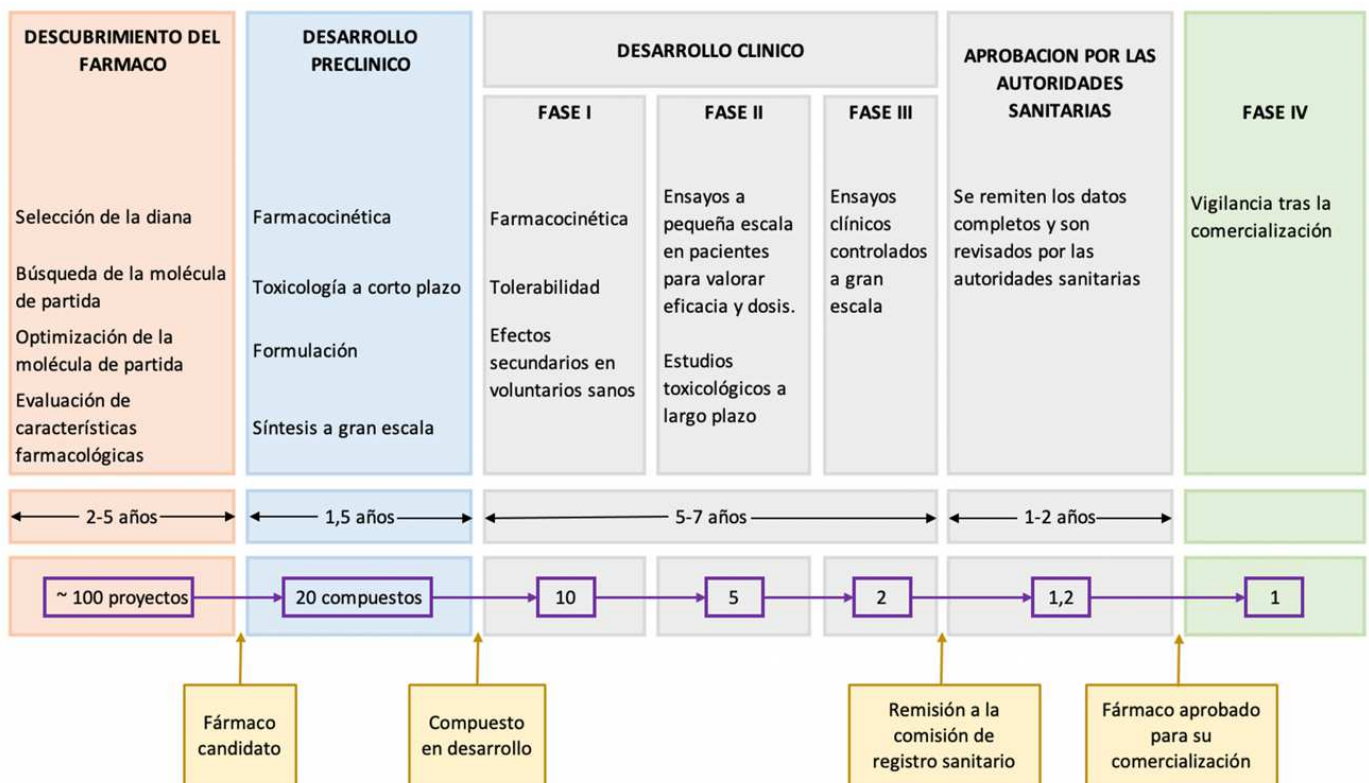
- ¿Cómo puedo reducir su número?

Referencias:

- “*Medical Research with Animals. From the National Institutes of Health*”.
<https://grants.nih.gov/grants/policy/air/AnimalResearchFS06.pdf>
- <https://grants.nih.gov/grants/policy/air/index.htm>
- <https://www.aamc.org/system/files/c/2/472898-responsibleuseofanimalsinresearch.pdf>
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
<https://www.boe.es/buscar/pdf/2013/BOE-A-2013-1337-consolidado.pdf>



2. EVALUACION PRECLINICA DE FARMACOS Y DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS



Adaptado de "Farmacología", de Rang, H. P., Dale, M. M., 2020, p. 751, Elsevier

En la rama de la farmacología, los estudios en animales siguen siendo esenciales para los ensayos de toxicidad a los que debe someterse una nueva sustancia que se desarrolla como posible fármaco. También son necesarios para ensayos de teratogenia y carcinogenicidad.

Muchas pruebas farmacológicas se realizan en animales (en ocasiones preparados quirúrgicamente) para ayudar a la detección y el estudio de las actividades buscadas, por ejemplo, sobre inflamación, secreción gástrica o tensión arterial.

La observación del efecto de los fármacos sobre la tensión arterial es fundamental en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que si se observa que una nueva molécula modifica sustancialmente este parámetro puede parar su desarrollo, salvo que su fin sea encontrar fármacos hipotensores.



3. MODELOS DE INVESTIGACIÓN ANIMAL EN FARMACOLOGÍA. MODELOS ANIMALES

Se puede definir como modelo animal a toda aquella especie no humana que se utiliza en investigación biomédica con el fin de validar diferentes características de una determinada enfermedad presente en el ser humano. El objetivo de los modelos animales en cuanto al conocimiento de una patología es triple:

1. Prevención.
2. Diagnóstico.
3. Tratamiento.

Gracias a los modelos animales se pueden llevar a cabo experimentos impracticables o no éticos si se realizaran en humanos.

Modelos animales de hipertensión arterial (HTA)

Los modelos animales mejoran la comprensión del comportamiento de la HTA, así como su prevención y tratamiento.

Antiguamente, la mayoría de los estudios en la HTA experimental se llevaron a cabo sobre perros, mientras que actualmente, se utiliza preferentemente la rata, así como otras especies como el ratón y el conejo.

A continuación, se resumen una serie de ejemplos de modelos de animales hipertensos:

- Cepas de animales genéticamente hipertensos:
 - Ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
 - Ratones knock-out
- Modelos “quirúrgico-farmacológicos”:
 - Modelo de hipertensión DOCA-sal: nefrectomía unilateral más administración de un mineralocorticoide (acetato de desoxicorticosterona – DOCA).
 - Modelo de hipertensión por nefrectomía subtotal: se realiza una nefrectomía unilateral y a la ligadura de ramas vasculares (dependientes de la arteria renal) del otro riñón. De esta forma, se inutilizan las dos terceras partes del riñón remanente.

**Referencias.**

- Animal Models of Hypertension a Scientific Statement From the American Heart Association". *Hypertension*. 2019;73:e87–e120.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYP.0000000000000090>
- Dornas, W.C. y Silva, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 2011; 36(4):731-737
<https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/036/04/0731-0737>
- Bashyam, H. Lewis Dahl and the genetics of salt-induced hypertension. *J Exp Med* 2007; 204: 1507-1516
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118645/>
- Takahashi, N. y Smithies, O. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension. *N Trends Genet* 2004; 20(3): 136-145



4. VIDEO DE LA REALIZACIÓN DE UN MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL. TÉCNICA DEL GATO ESPINAL

En este modelo de experimentación se van a utilizar diferentes sustancias farmacológicas que van a influir en la presión arterial del animal.

La técnica del animal espinal consiste en la destrucción de la parte del Sistema Nervioso Central que va desde el bulbo a la porción encefálica (descerebración). Además, se interrumpe el automatismo respiratorio.

Mediante esta técnica se pueden evaluar los efectos de los fármacos con acción vascular exclusivamente, evitando los reflejos centrales y la influencia de las sustancias anestésicas.

Es muy útil en técnicas de valoración en las que interese que la presión arterial no varíe sensiblemente, para así comparar mejor el efecto de los fármacos.

En el modelo de experimentación animal que se muestra en este video se administra al animal diferentes fármacos como la acetilcolina o la adrenalina, entre otros y se toman registros para observar los efectos que producen sobre la tensión arterial.

En la imagen se muestra la carátula del video del “*gato espinal*” y los efectos sobre la tensión arterial del animal tras la administración de adrenalina.





5. SIMULACIONES PARA LA EVALUACIÓN DE FÁRMACOS SOBRE LA TENSIÓN ARTERIAL: PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Las simulaciones informáticas sobre los efectos de los fármacos en la tensión arterial y otros parámetros cardiovasculares son fundamentales para la docencia práctica en la asignatura de farmacología.

Actualmente existen varios programas informáticos disponibles, como por ejemplo.

- CardioLab (<http://biosoft.com/w/cardiolab.htm>).
- Virtual Cat (<https://norecopa.no/norina/strathclyde-pharmacology-simulations-the-virtual-cat>).
- Rat Cardiovascular System Simulation (<https://norecopa.no/norina/strathclyde-pharmacology-simulations-the-virtual-rat>).

Los objetivos a alcanzar con la realización de estas simulaciones informáticas son los siguientes:

- Complementar los conocimientos teóricos sobre fármacos que actúan sobre el sistema cardiovascular.
- Comprobar los efectos de diferentes fármacos sobre un animal de experimentación a través de una simulación informática.

Esta práctica se va a dividir en dos partes diferenciadas.

1. Realización de una demostración en clase de una curva dosis-respuesta en el programa CardioLab, para la que se utilizarán dos fármacos: acetilcolina y atropina.
2. Trabajo personal con el programa Rat Cardiovascular System Simulation (Virtual Rat)



5.1. CardioLab:

Este programa se puede descargar gratuitamente a través del siguiente enlace:

<http://www.biosoft.com/w/cardiolab.htm>

En la siguiente figura se muestran ejemplos de registros tras la administración de dosis ascendentes de acetilcolina (1, 5 y 10 μg).





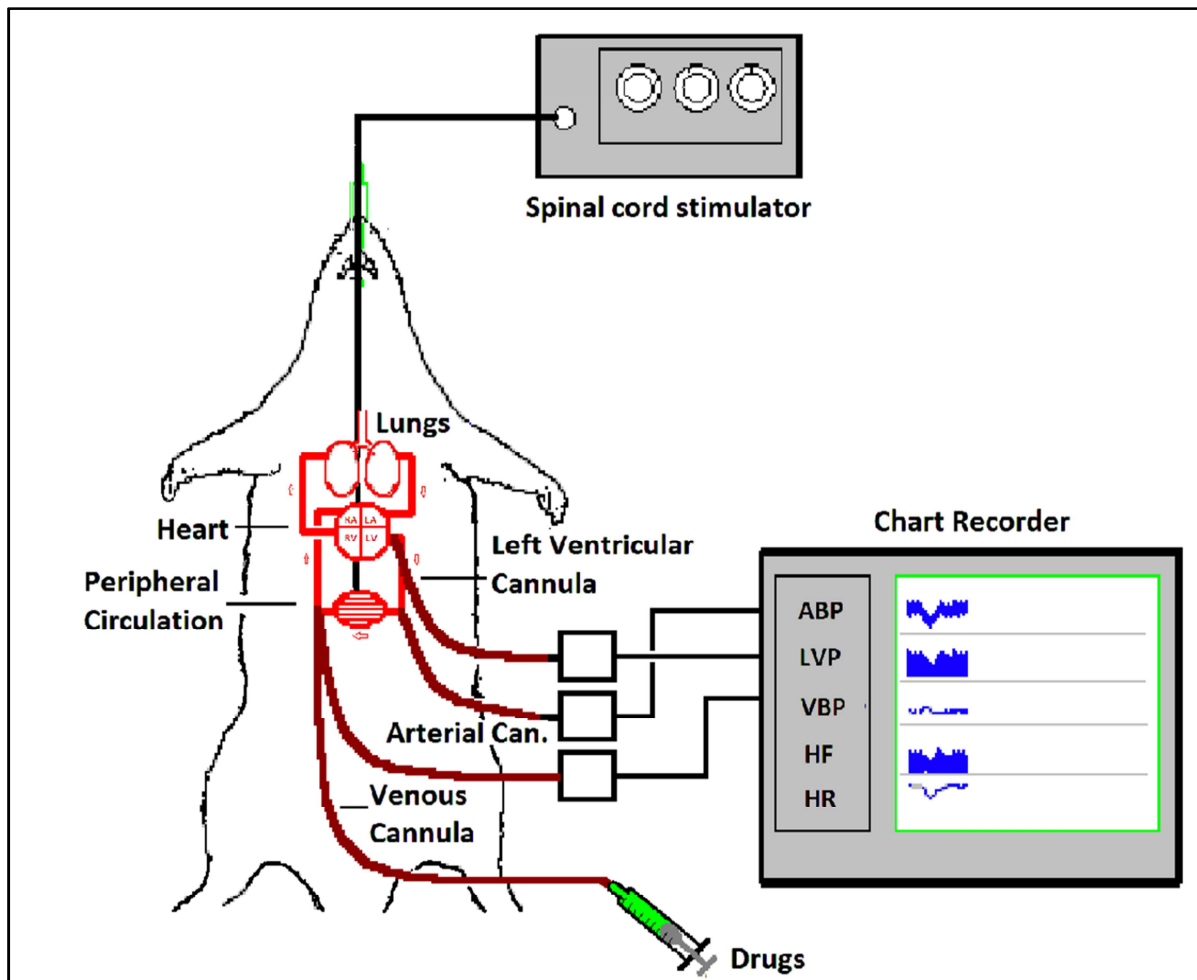
5.2. Rat Cardiovascular System Simulation

Este programa fue desarrollado por la Universidad de Strathclyde (Glasgow) y se puede descargar gratuitamente a través del siguiente enlace:

http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software_sims

El programa Rat Cardiovascular System simula una preparación de rata anestesiada y ventilada mecánicamente.

Para simplificar la interpretación de los efectos farmacológicos, el programa da la opción de utilizar un modelo de rata descerebrada y desmedulada ("*pithed rat*") en la que están anulados los reflejos asociados a los barorreceptores de la arteria carótida.



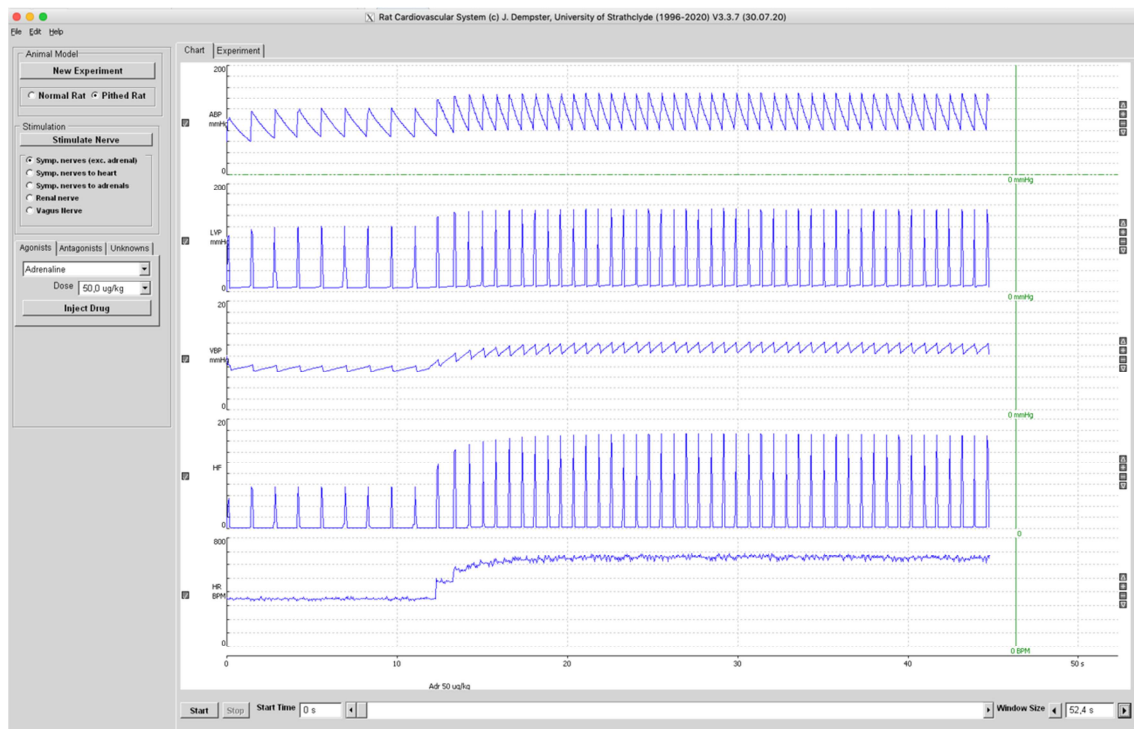
Para la preparación del modelo de experimentación animal se utilizan tres catéteres:

- Un catéter arterial para la medición de la presión sanguínea arterial (arterial blood pressure, ABP) y la frecuencia cardíaca (heart rate, HR)

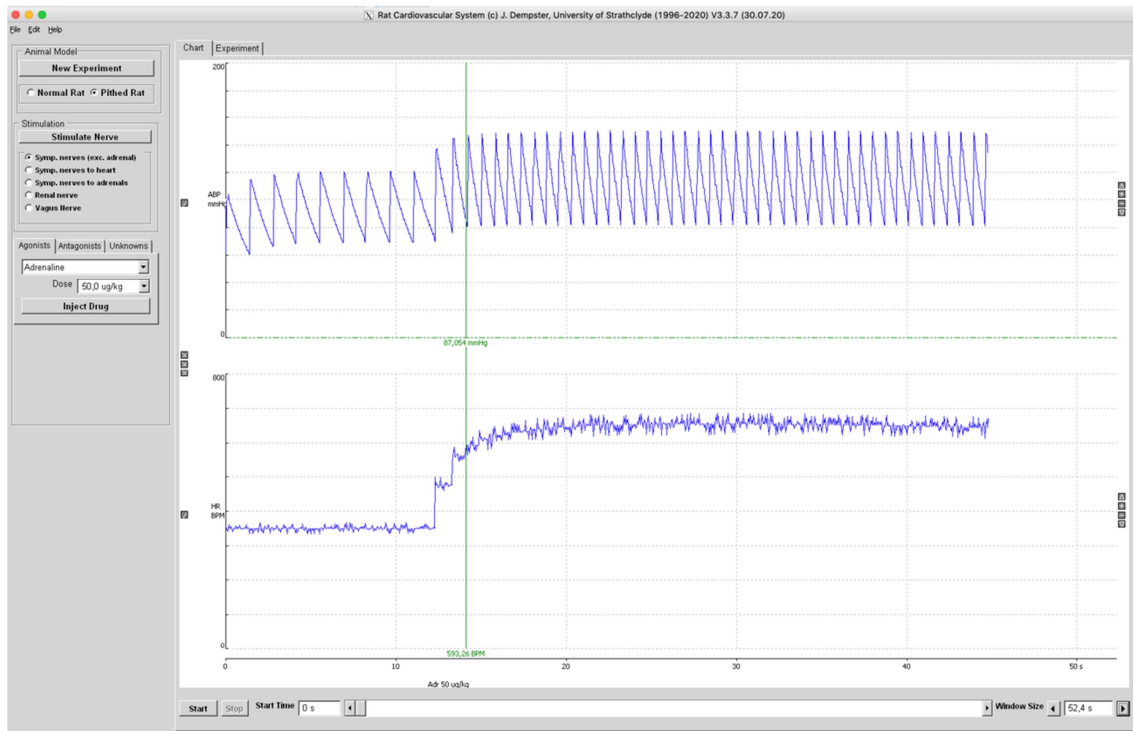


- Un catéter insertado en el ventrículo izquierdo para la medición de la fuerza de contracción cardíaca (heart force, HF) y la presión ventricular izquierda (left ventricular pressure, LVP).
- Un catéter insertado en la vena femoral para la medición de la presión sanguínea venosa (venous blood pressure, VBP) y para administrar los diferentes fármacos a estudiar.

A continuación, se muestra un ejemplo de la evolución de los diferentes parámetros tras la administración de **50µg/kg** de adrenalina.



Para la realización de esta práctica nos centraremos en la observación de la presión sanguínea arterial (ABP) y de la frecuencia cardíaca (HR), por lo que procederemos a deshabilitar las gráficas correspondientes al resto de parámetros, clicando en las casillas correspondientes resaltadas en la figura anterior.



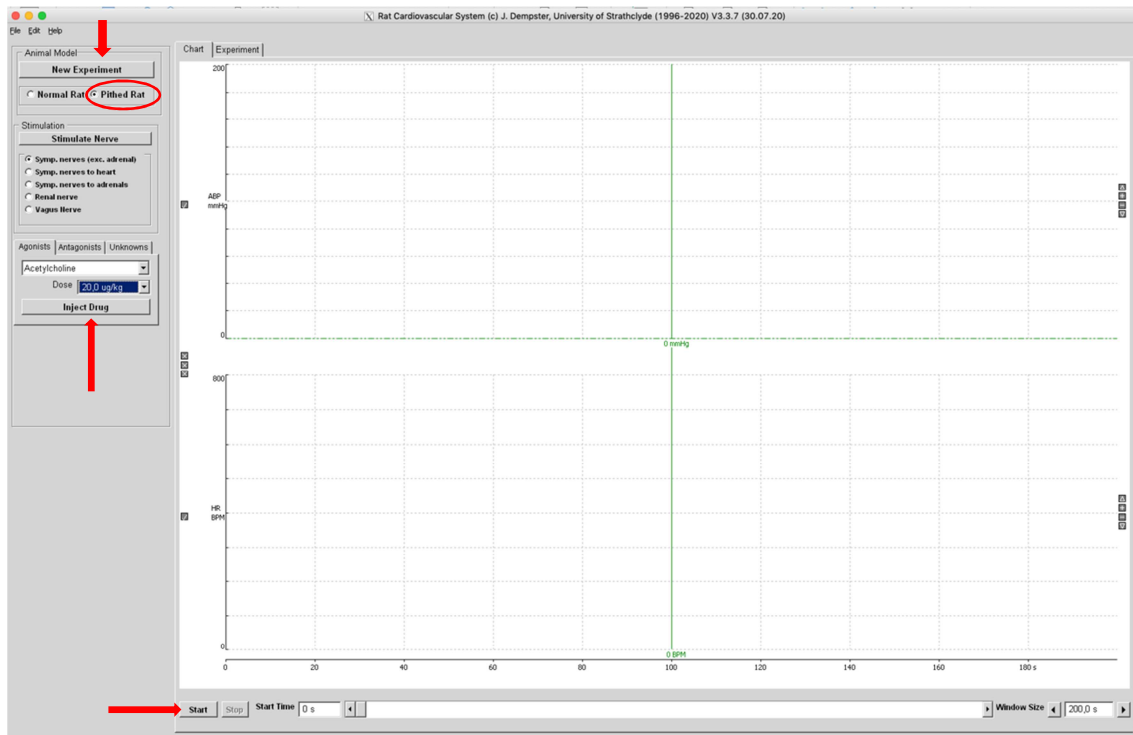
En la parte derecha de cada gráfica nos encontramos con una serie de botones que sirven para redimensionar la escala de la medición de cada parámetro. Finalmente, moviendo con el ratón la raya vertical de color verde sobre la gráfica obtendremos la medición numérica del parámetro correspondiente.

A continuación, se presentarán una serie de problemas que se deberán responder mediante la realización de diferentes simulaciones. Las respuestas deberán contener datos cuantitativos, es decir, no es suficiente con responder “se observó una elevación de la tensión arterial tras la administración del fármaco X”, sino que será necesario tener mas precisión aportando datos como: “se observó una elevación de X mmHg tras la administración del fármaco X a la concentración Y”.

Para la realización de esta práctica se pueden consultar los apuntes tomados en clase, así como cualquier fuente de información externa (bases de datos de medicamentos, fichas técnicas...).



5.2.1- Fármacos colinérgicos



- En primer lugar, se escoge para la realización del experimento el modelo de rata descerebrada (“Pithed rat”).
- Se pone en marcha el procedimiento, accionando el botón “Start” y se dejan unos segundos para estabilizar las constantes del animal, e inyectamos una dosis de 20 $\mu\text{g/kg}$ de acetilcolina (ACh), accionando el botón “Inject Drug”.
- Tras la “inyección” del fármaco, hay que anotar las variaciones en las constantes del animal y medir el tiempo que tarda en recuperar los niveles basales. Razonar las observaciones.
- Repetir de nuevo el proceso (“New experiment”), y 5-10 segundos después de administrar la acetilcolina, inyectar 0,5 mg/kg de atropina (ATR), anotando y razonando las observaciones.
- Repetir el paso anterior invirtiendo el orden de inyección de los dos fármacos.
- Repetir los experimentos a distintas dosis, observando las diferencias y anotando los resultados.



Actividad 1. Cumplimentar la siguiente tabla con los datos recogidos

Intervención	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Frecuencia cardíaca (lpm)
Antes de inyectar el fármaco			
20 µg/kg de ACh			
Observaciones:			
20 µg/kg ACh + 0,5 mg/Kg ATR			
Observaciones:			
0,5 mg/Kg ATR			
En presencia de ATR + 20 µg/kg de ACh			
Observaciones:			

**Para cada inyección de fármaco, anotar al lado del valor de cada parámetro si el cambio ha sido + o -*



5.2.2- Fármacos adrenérgicos.

- Comenzar un nuevo experimento ("New experiment").
- Se pone en marcha el procedimiento, se dejan unos segundos para estabilizar las constantes del animal, e inyectamos una dosis de 2 $\mu\text{g/kg}$ de isoprenalina (o isoproterenol), observando las variaciones de las constantes del animal.
- Repetir de nuevo el proceso ("New experiment"), y 5-10 segundos después de administrar la isoprenalina, inyectar 2 mg/kg de propranolol, anotando y razonando las observaciones.
- Repetir el paso anterior invirtiendo el orden de inyección de los dos fármacos.

Actividad 2. Cumplimentar una tabla similar a la de la actividad 1 con los resultados obtenidos.

Intervención	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Frecuencia cardíaca (lpm)
Antes de inyectar el fármaco			
2 $\mu\text{g/kg}$ de isoprenalina			
Observaciones:			
2 $\mu\text{g/kg}$ isoprenalina + 2 mg/Kg propranolol			
Observaciones:			
2 mg/Kg propranolol			
En presencia de propranolol + 2 $\mu\text{g/kg}$ de isoprenalina			
Observaciones:			

**Para cada inyección de fármaco, anotar al lado del valor de cada parámetro si el cambio ha sido + o -*



5.2.3- Adrenoreceptores α y β .

- Comenzar un nuevo experimento ("New experiment"), seleccionando "Pithed rat"
- Inyectar los siguientes fármacos (elegir una concentración de la mitad de la lista)
 - Adrenalina
 - Noradrenalina
- Repetir de nuevo los mismos experimentos, tras la inyección de 0,5 mg/kg de prazosina. ¿Cómo se ven afectados por la prazosina los efectos originales de la adrenalina y la noradrenalina? Razonar la respuesta
- Repetir de nuevo los mismos experimentos cambiando la inyección previa de prazosina por 5 mg/kg de propranolol. ¿Cómo se ven afectados los efectos originales por el propranolol?

Actividad 3. Cumplimentar la siguiente tabla con los datos recogidos

Intervención	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Frecuencia cardíaca (lpm)
Antes de inyectar el fármaco			
En presencia de Adrenalina			
En presencia de Noradrenalina			
Observaciones:			
Prazosina + Adrenalina			
Prazosina + Noradrenalina			
Observaciones:			
Propranolol + Adrenalina			
Propranolol + Noradrenalina			
Observaciones:			



--

**Para cada inyección de fármaco, anotar al lado del valor de cada parámetro si el cambio ha sido + o -*



5.2.4- Relaciones Dosis-Respuesta.

Se realizará una curva dosis-respuesta a adrenalina, a concentraciones crecientes anotando el valor máximo obtenido en cada caso, utilizando el rango de dosis que ofrece el programa:

- Comenzar un nuevo experimento ("New experiment").
- Se pone en marcha el procedimiento, se dejan unos segundos para estabilizar las constantes del animal, e inyectamos las dosis de adrenalina que figuran en la tabla siguiente, observando y anotando en la tabla las variaciones de las constantes del animal.
- Representar esos efectos como % del efecto máximo en papel semilogarítmico, utilizando el archivo Excel de la práctica (ANEXO).

Actividad 4. Cumplimentar la tabla siguiente con los resultados obtenidos.

Dosis de adrenalina (µg/Kg de peso)	Presión arterial sistólica (mmHg)	% del efecto máximo	Presión arterial diastólica (mmHg)	% del efecto máximo	Frecuencia cardíaca (lpm)	% del efecto máximo
0,1						
0,2						
0,5						
1						
2						
5						
10						
20						
50						
100						



Actividad 5. Realizar la curva dosis-respuesta correspondiente a la acetilcolina (utilizar el Excel de la práctica, ANEXO).

Dosis de acetilcolina ($\mu\text{g/Kg}$ de peso)	Presión arterial sistólica (mmHg)	<i>% del efecto máximo</i>	Presión arterial diastólica (mmHg)	<i>% del efecto máximo</i>	Frecuencia cardíaca (lpm)	<i>% del efecto máximo</i>
1						
2						
5						
10						
20						
50						
100						
200						
500						



ANEXO

ACTIVIDAD 4

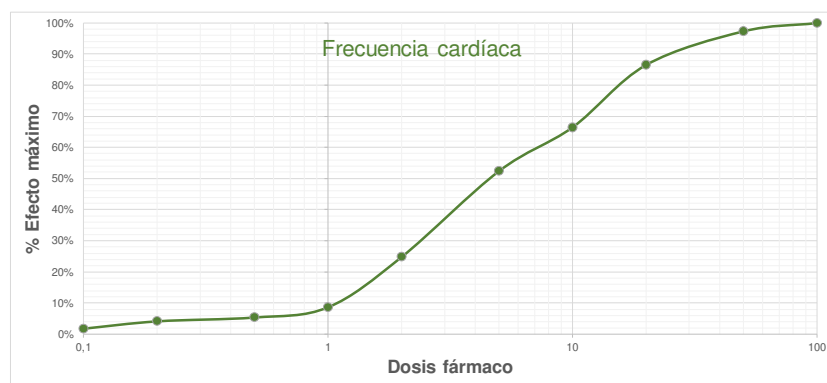
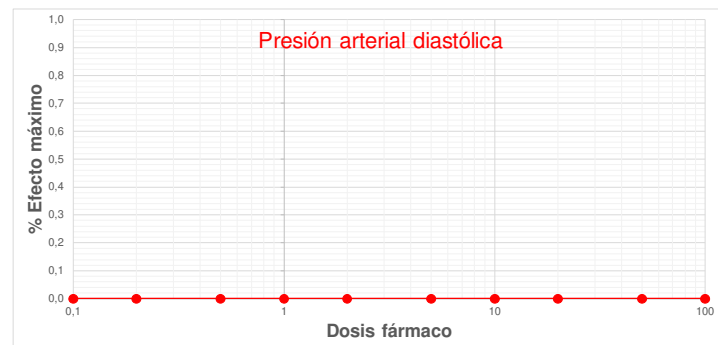
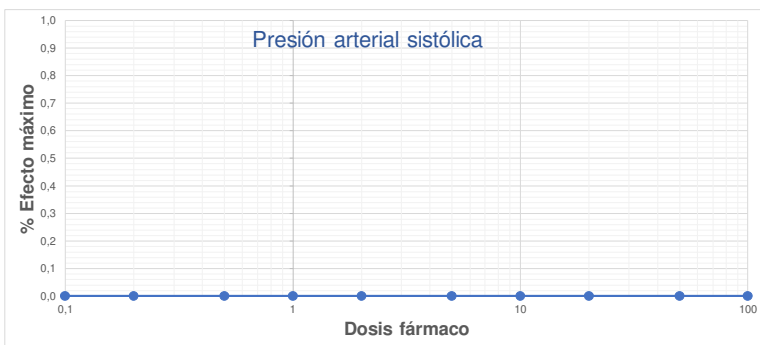
CURVA DOSIS-RESPUESTA: ADRENALINA

[IR A INICIO](#)

Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento		
0,1		
0,2		
0,5		
1		
2		
5		
10		
20		
50		
100		

Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento		
0,1		
0,2		
0,5		
1		
2		
5		
10		
20		
50		
100		

Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento	365	0%
0,1	371	2%
0,2	379	4%
0,5	383	5%
1	394	9%
2	448	25%
5	540	52%
10	587	66%
20	654	87%
50	690	97%
100	699	100%





ACTIVIDAD 5

CURVA DOSIS-RESPUESTA: ACETILCOLINA

[IR A INICIO](#)

PRESION ARTERIAL SISTOLICA (mmHg)		
Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento		
0.1		
0.2		
0.5		
1		
2		
5		
10		
20		
50		
100		

PRESION ARTERIAL DIASTOLICA (mmHg)		
Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento		
0.1		
0.2		
0.5		
1		
2		
5		
10		
20		
50		
100		

FRECUENCIA CARDIACA (lpm)		
Dosis	Valor	% del efecto máximo
Sin medicamento		
0.1		
0.2		
0.5		
1		
2		
5		
10		
20		
50		
100		

