



Fisiología y Bioquímica Animal

Licenciatura en Biotecnología



Trabajo Práctico

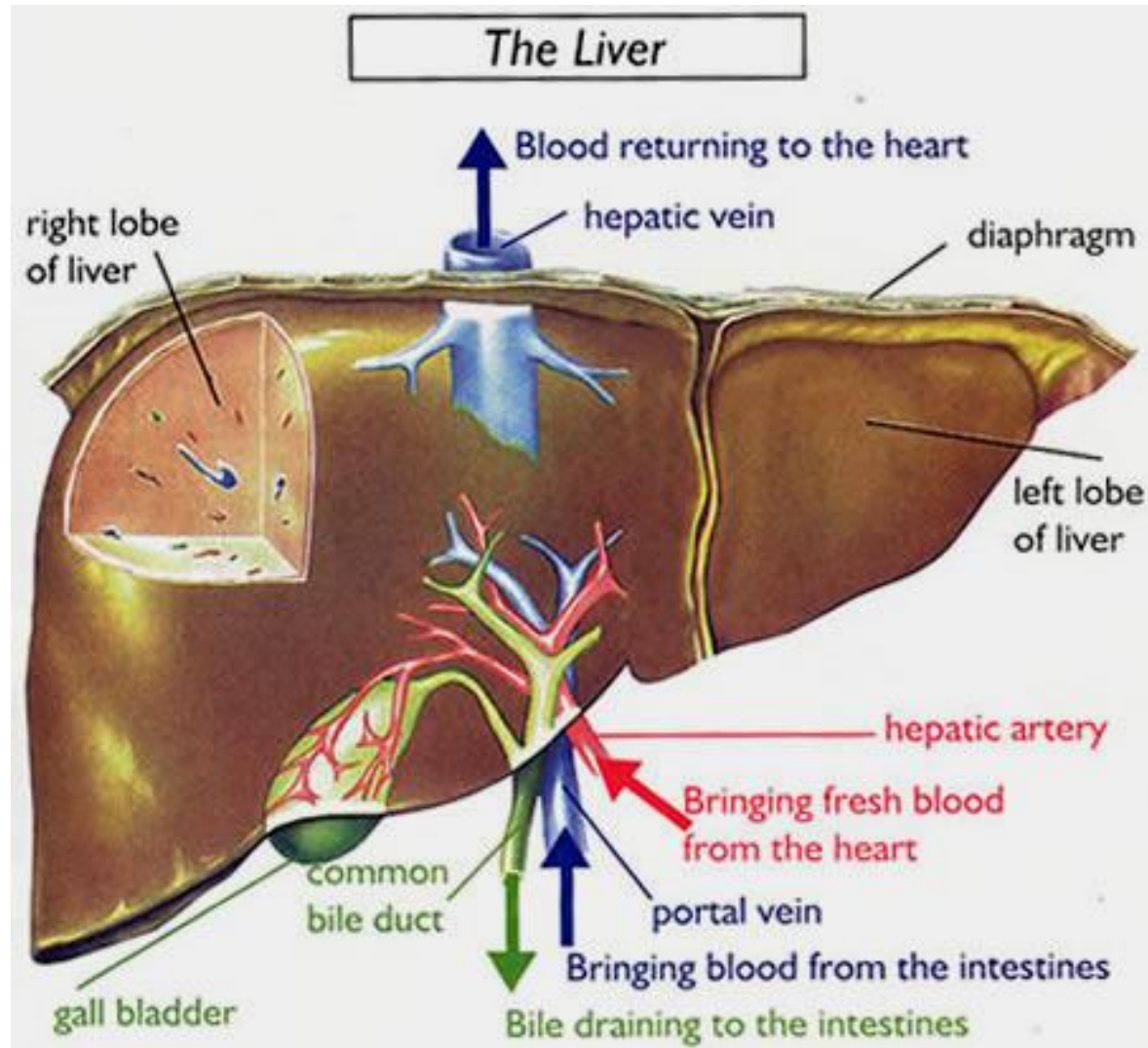
**Efecto de distintas sales biliares
sobre el flujo de bilis en la rata**

Área Fisiología

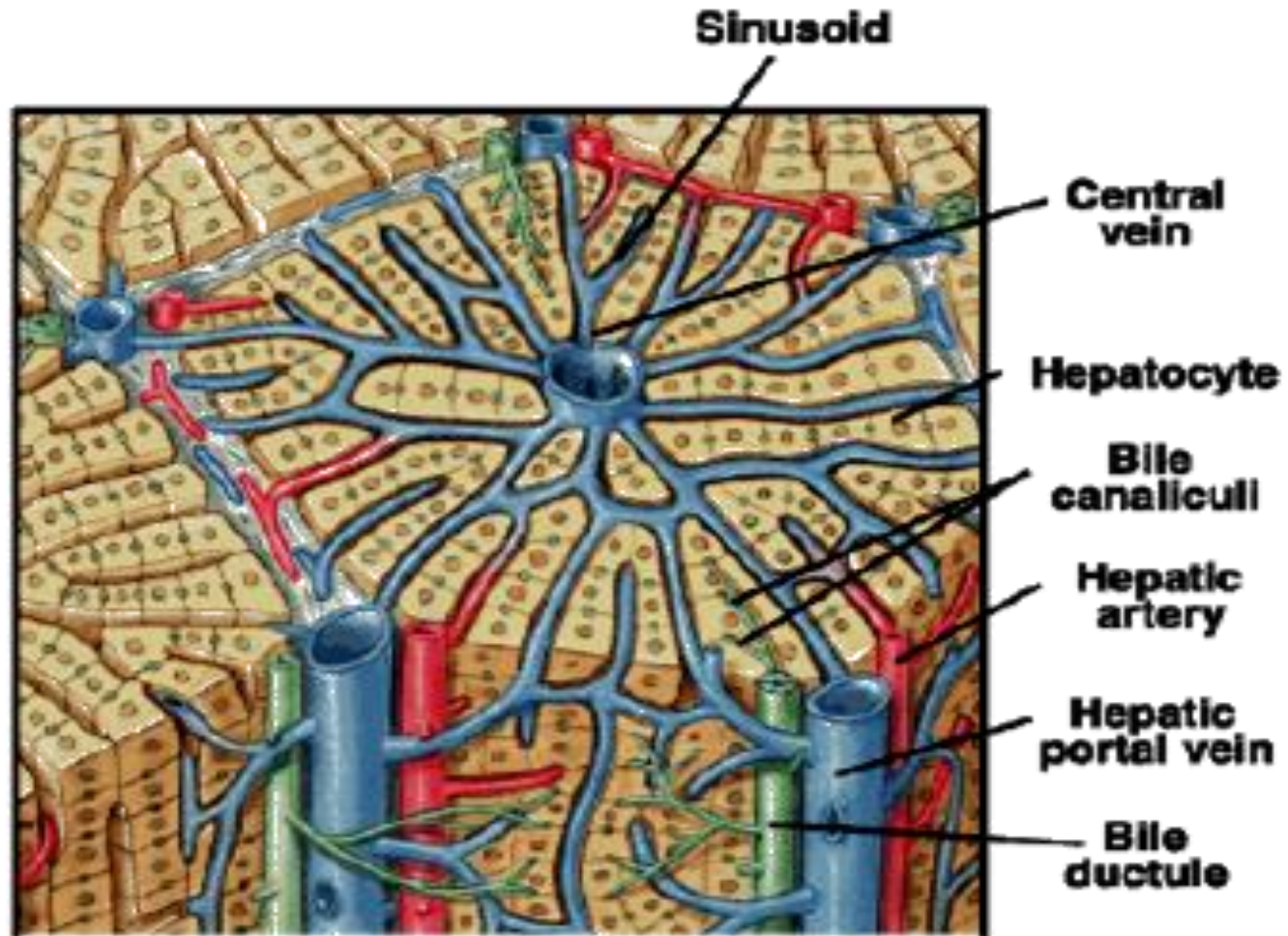
2024



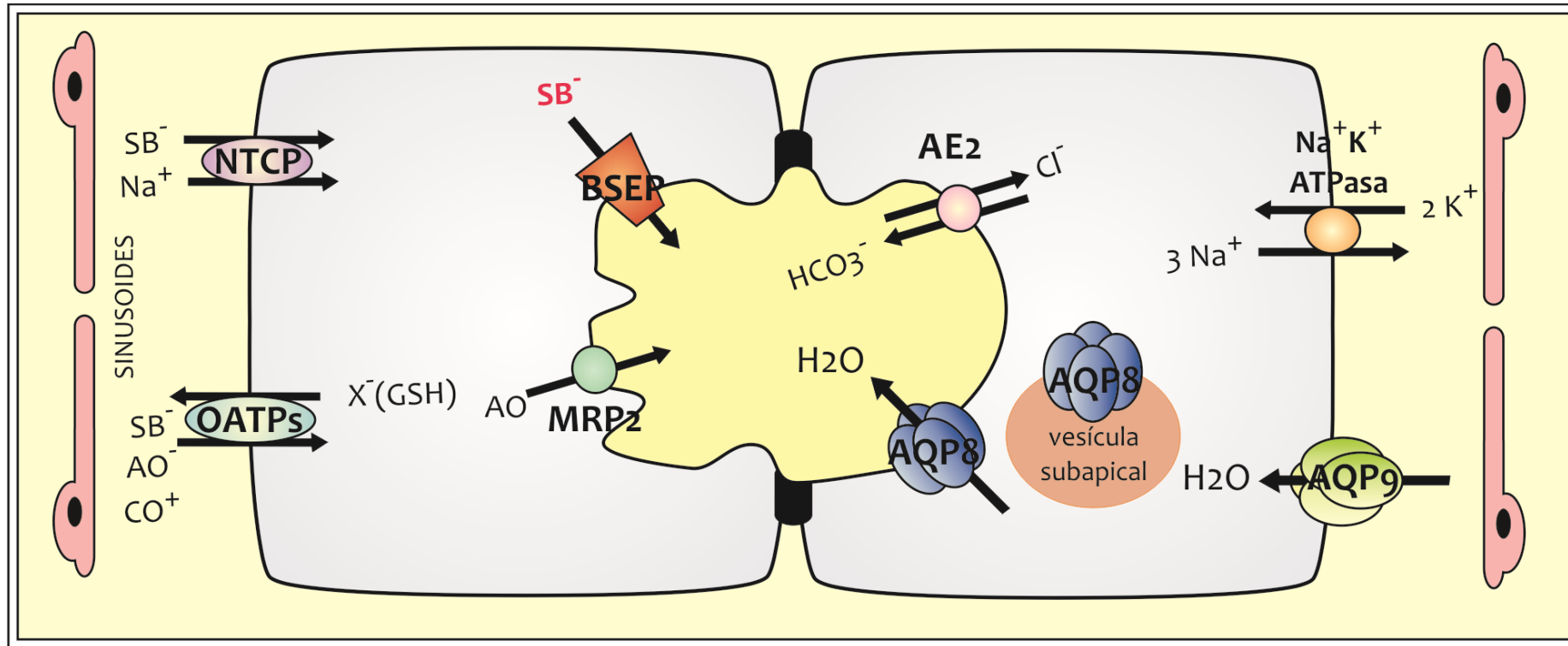
El hígado



El hígado



Secreción Biliar



Modificaciones en el Flujo Biliar

COLERESIS



Estímulo en la secreción biliar capaz de provocar un incremento del flujo de bilis

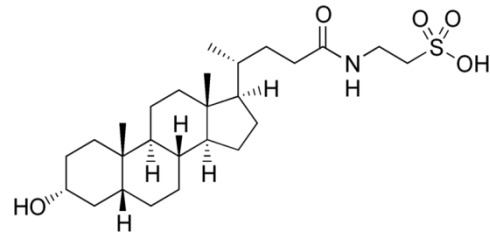
COLESTASIS



Disturbio en la secreción biliar capaz de provocar una reducción del flujo de bilis, llevando a la retención de constituyentes biliares en el hígado y en la circulación sistémica

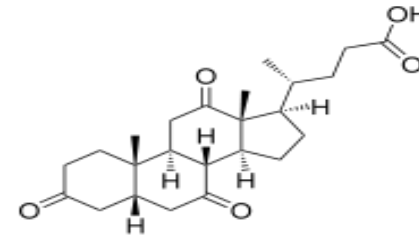
Objetivo del TP

El objetivo del presente Trabajo Práctico es evaluar el flujo biliar basal en la rata y su modificación por la administración de distintas sales biliares.



Taurolitocolato (TLC)

($C_{26}H_{45}NO_5S$, 483.70 g/mol)



Dehidrocolato (DHC)

($C_{24}H_{34}O_5$, 402.52 g/mol)

Metodología

Ratas Wistar macho adultas

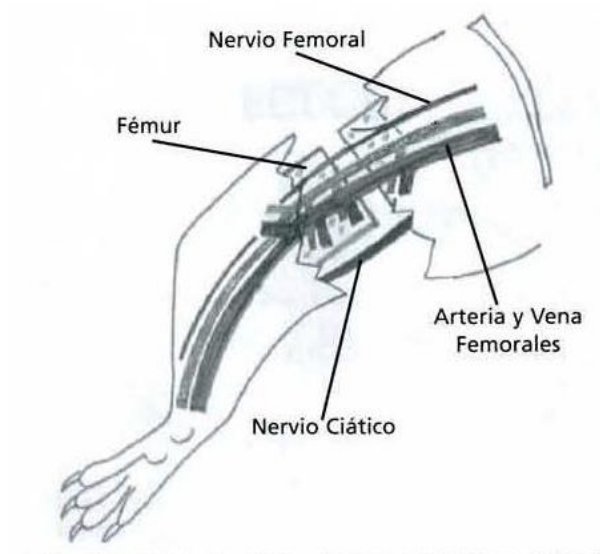


Anestesia

Cirugía

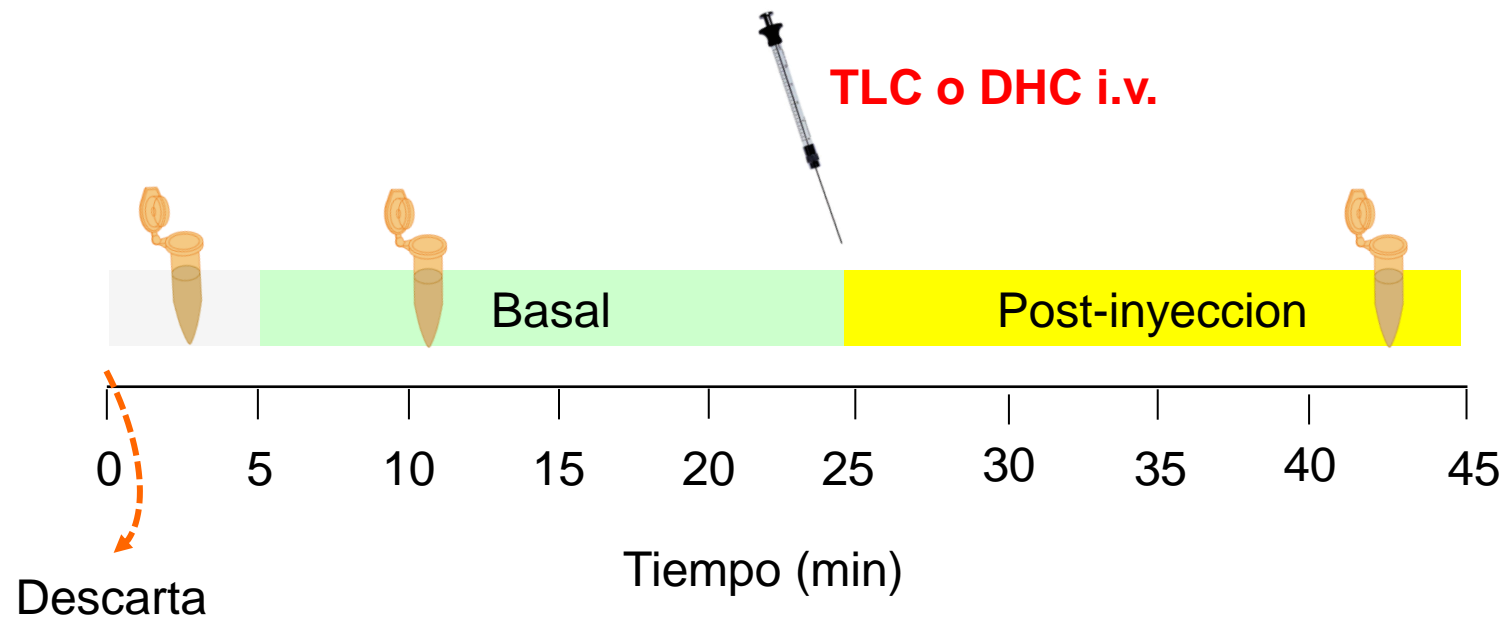
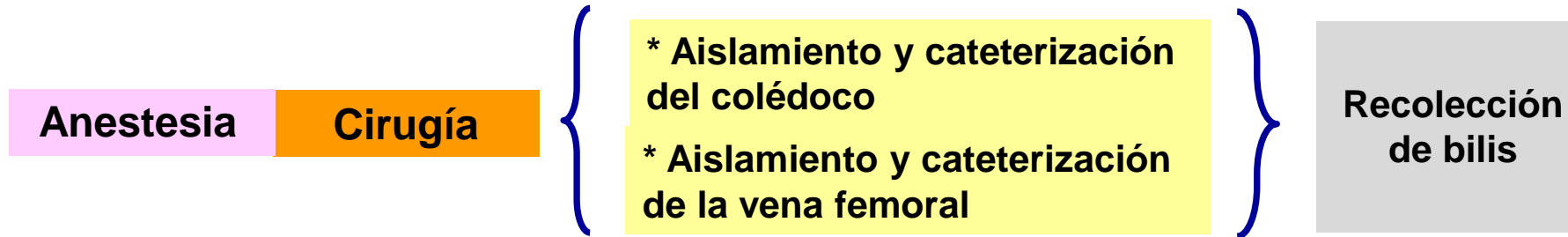
- * Aislamiento y cateterización del colédoco
- * Aislamiento y cateterización de la vena femoral

Recolección de bilis



Metodología

Ratas Wistar macho adultas



ANIMAL ENTERO



Máxima verosimilitud para predecir mecanismos o efectos en humanos
Mantiene las interrelaciones entre aparatos y/o sistemas
Conserva en su contexto fisiológico procesos tales como regulación hormonal/nerviosa y metabolismo/excreción
Empleo en estudios de depuración de endo/xenobióticos
Testeo de drogas en fase de evaluación experimental

HÍGADO AISLADO Y PERFUNDIDO

Hígado: Ventaja de poder estudiar acciones directas de distintos compuestos o tratamientos, evitando la influencia nerviosa y de la circulación sistémica o general.

Se canula a través de la vena porta, la vía biliar y la vena cava en donde se puede controlar y registrar el flujo de perfusión controlado a una temperatura de 37 °C y oxigenación constante.

Se pueden **cuantificar en la solución que perfunde al hígado**, una serie de moléculas y metabolitos derivados de la transformación hepática; por ejemplo, antioxidantes, citocinas, que proveen información sobre algún evento inflamatorio; enzimas como la alfa glutatión-S-transferasa, enzima citosólica predominantemente localizada en los hepatocitos y que representa un parámetro temprano de daño en la membrana de las células hepáticas. También se puede cuantificar lactato deshidrogenasa, una enzima localizada en el citosol y, si se detecta en el efluente hepático, es considerado como un marcador de daño como resultado del rompimiento de las células. Otras moléculas y enzimas de importancia para cuantificar en el efluente hepático son óxido nítrico, calcio, radicales libres, ácidos biliares, fosfatasa alcalina, transaminasas

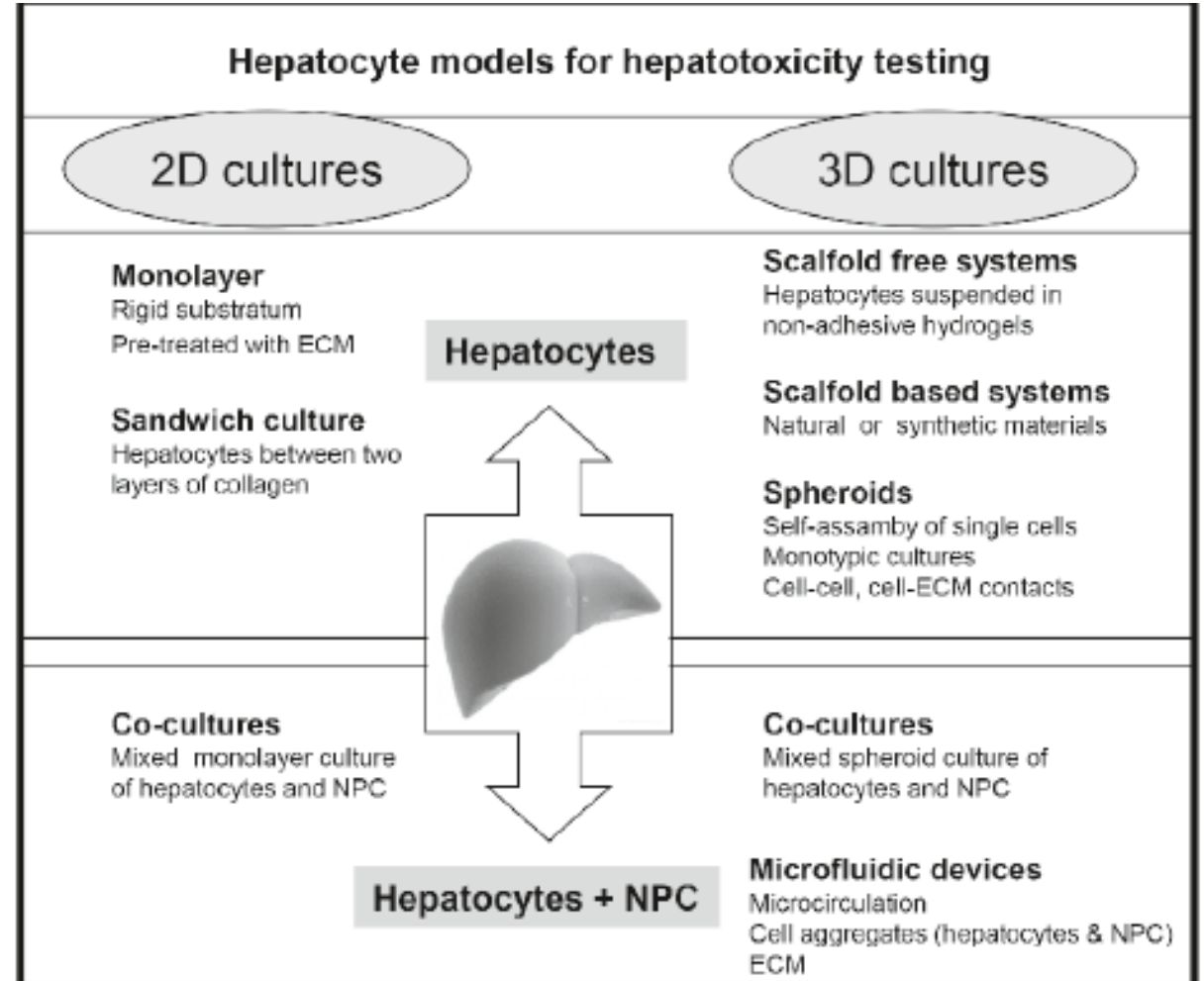
CULTIVOS CELULARES

Cultivo primario: Limitación fundamental de los hepatocitos cultivados en **monocapa** es la pérdida temprana de funciones hepáticas, en particular la capacidad para metabolizar fármacos. El **cultivo tipo sándwich** mantiene la polaridad de los hepatocitos y los sistemas de transporte y estabiliza su funcionalidad mejor que el cultivo en monocapa.

Líneas celulares de hepatoma tienen menor capacidad metabólica que los hepatocitos, presentan ventajas clave para el cribado de fármacos (vida ilimitada, reproducibilidad, gran disponibilidad, fácil manejo).

Líneas celulares derivadas de hepatomas humanos (ej: HepG2, Hep3B, Huh7, HepaRG)

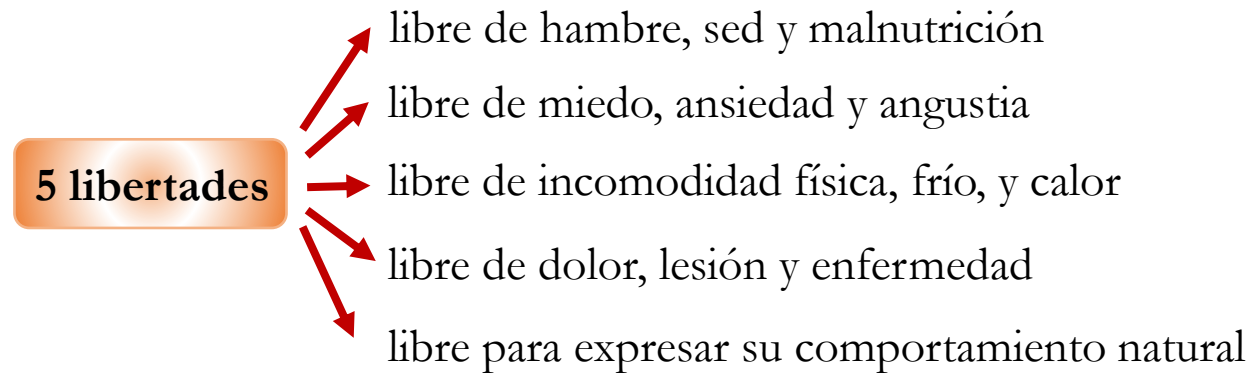
Puesto que la organización espacial **3D** y las interacciones celulares heterotípicas son esenciales para la homeostasis funcional del hígado, los hepatocitos cultivados en sistemas que reproducen las interacciones entre células, célula-biomatriz y el flujo de nutrientes característicos del microambiente hepático (cultivos 3D, co-cultivos con células no parenquimales, sistemas microfluidicos) presentan mayor capacidad metabólica y han sido propuestos para mejorar la predicción *in vitro* de la hepatotoxicidad.



Comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio (**CICUAL**)

Bioterio: lugar donde se alojan los animales de experimentación/ instalación dedicada a la crianza, mantenimiento, cuidado y uso de los animales de laboratorio

Es necesario que tanto el bioterio como su personal proporcionen al animal un perfecto estado de salud física y mental en sincronía con el ambiente



Principio de las 3 ERRES (Rusell y Burch)

Los científicos deben hacer tres preguntas en relación con cualquier experimento:

1) ¿Es imprescindible el uso de animales? **REEMPLAZO**

2) ¿Pueden utilizarse menos animales? **REDUCCIÓN**

3) ¿Pueden realizarse los experimentos de modo que no provoquen sufrimiento ni dolor a los animales? **REFINAMIENTO**

Tabla 1. Recomendaciones para el alojamiento de los principales roedores utilizados en experimentación animal según la Federación de Asociaciones Europeas para la Ciencia en Animales de Laboratorio y la Convenio Europeo para la protección de animales vertebrados usados para la experimentación y otros fines científicos

Bienestar animal*	Ratones	Ratas
Dimensiones de jaulas (se puede incrementar durante la cría)	Menos de 20 g de peso, 60 cm ² por animal	Menos de 200 g de peso, 200 cm ² por animal
	20-25 g de peso, 70 cm ² por animal	200-400 g de peso, 300 cm ² por animal
	25-30 g de peso, 80 cm ² por animal	400-600 g de peso, 450 cm ² por animal
	Más de 30 g de peso, 100 cm ² por animal	Más de 600 g, 600 cm ² por animal
Número de animales por jaula	4-6	2-4
Cantidad alimento por día	3-6 g	10-20 g
Ingesta de agua por día	3-7 mL	15-30 mL
Temperatura	20 °C a 24 °C	20 °C a 24 °C
Humedad	45-65%	45-65%
Ruido	< 20 kHz	< 20 kHz
Ciclos de luz/oscuridad	12 horas de luz / 12 horas de oscuridad	12 horas de luz / 12 horas de oscuridad
Ventilación	Ambiente controlado y purificado de 15 a 18 recambios aire / hora. Animales en jaulas ventiladas. Controlar niveles de CO ₂	Ambiente controlado y purificado de 15 a 18 recambios aire / hora. Animales en jaulas ventiladas. Controlar niveles de CO ₂
Olores	Controlar el nivel de amoníaco	Controlar el nivel de amoníaco
Camaje	Pino blanco, sin olores y libre de patógenos	Pino blanco, sin olores y libre de patógenos
Enriquecimiento de las jaulas	Papel, cajas de cartón, bastidores para escalar	Tubos, bastidores para escalar, cajas de cartón

Tabla 2. Propuesta de plantilla para evaluar el estado de los animales

Observación	Evaluación	Comentario
Condiciones generales	0	Comportamiento normal según la especie
	1	Menos alerta, se asusta cuando se manipula, responde a estímulos umbrales e intensos
	4	Animal inmóvil, no responde a estímulos intensos, vocaliza, agresivo, miedo al contacto, pobre aseo, dilatación de las pupilas, aumento de salivación y sudoración, orejas hacia atrás
Porfirina	0	Ojos claros, limpios y húmedos
	1	Escasa porfirina o secreción alrededor de los ojos y la nariz
	4	Porfirina evidente y secreciones alrededor de los ojos y la nariz
Movimiento y postura	0	Normal
	1	Moderado descoordinación, postura ligeramente encorvada
	4	Marcada descoordinación, cabeza arqueada, postura encorvada, no apoyo en cuatro extremidades, parálisis, contracciones reflejas de la musculatura esquelética
Piloerección	0	Normal, limpio y ordenado
	1	Moderado piloerección
	4	Marcada piloerección, piel dañada, pelo sucio
Piel	0	Piel cubierta totalmente por pelos
	1	Pequeñas llagas o costras sin infección o signos de picor
	4	Automutilación, mordedura a otros animales, signos de infección
Peso	0	De 1-3 días, pérdida de peso de menos del 5% en comparación con el peso antes del experimento
	1	De 1-3 días, pérdida de peso de menos del 5-10% en comparación con el peso antes del experimento
	4	De 1-3 días, pérdida de peso de menos del 10-20% en comparación con el peso antes del experimento
Apetito	0	Apetito normal
	1	Moderado interés por la comida, disminución en el consumo de agua, hasta menos del 25% del consumo de alimentos y agua
	4	Desinterés por la comida, signos de deshidratación
Función	0	Normal función intestinal y urinaria
	1	Heces más sueltas que lo normal
	4	Estreñimiento, heces como pasas, diarreas prolongadas (más de 3 días) incremento o disminución de la orina, olor fuerte en la orina
Respiración	0	Normal
	1	Intermitente respiración por la boca
	4	Respiración con la boca abierta, respiración abdominal o jadeo, ruidos jadeantes, respiración laboriosa
Estado microbiológico	0	Presencia de bacterias y hongos como flora normal
	1	Infección bacteriana, fúngica parasitaria o viral que remite con tratamiento
	4	Infección bacteriana, fúngica, parasitaria o viral que afecta el bienestar del animal

* Si la suma de los puntos de evaluación es igual o superior a 3 se recomienda consultar a un veterinario o proceder a la eutanasia de los animales

Tabla 3. Parámetros de comportamiento animal, fisiológicos y *post mortem* para evaluar el dolor y el malestar animal.

Parámetros	Comentarios
Comportamiento animal	<ul style="list-style-type: none">- Intranquilidad, miedo al contacto, agresividad- Vocalización- Protección de la parte dolorosa, lamido, mordisqueo o rascado del área afectada, automutilación- Animal encorvado, cambios en la forma de andar, tensión del abdomen, animal renuncia a moverse- Pérdida del apetito- Pobre construcción del nido- Pobre aseo
Fisiológicos	<ul style="list-style-type: none">- Presencia de porfirina- Pérdida de peso, disminución del consumo de agua y alimentos- Piloerección- Cambios endocrinos e inmunológicos- Contracciones reflejas de la musculatura esquelética- Aumento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca- Cambios en el patrón respiratorio- Aumento de la salivación y sudoración- Cambios en el brillo de los ojos y dilatación de las pupilas- Cambios en la expresión facial, posición de las orejas y del bigote- Disminución de la reproducción
<i>Post mortem</i>	<ul style="list-style-type: none">- Depósito de grasa- Masa muscular- Tamaño de órganos linfoides y corteza adrenal- Balance de fluidos- Presencia de úlceras estomacales