



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de Servicio Social:

“Implementación y evaluación de la metodología para la extracción de plasma sanguíneo en ratas.”.

Presenta: Dariana Hernández Campa

Asesores: Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha

Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón

Periodo del proyecto: 2/12/2024 a 2/6/2025

Lugar: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco,
Laboratorio de Farmacología número 102

Introducción

Mediante este estudio se pretende evaluar los factores que influyen en la extracción de plasma sanguíneo en ratas utilizando varias técnicas que se presentarán de forma individual. Como objetivo secundario, se analizarán estos factores con respecto al uso de heparinización para preservar la integridad de la matriz plasmática. La sangre se compone principalmente de un líquido llamado suero y del corpúsculo rojo. El resto de las proteínas ocurre en el líquido llamado plasma. Por lo tanto, es del plasma donde se puede obtener la mayor parte de los datos empleando la extracción de unas pocas gotas de sangre.

El objetivo general del presente trabajo es evaluar los factores que influyen en la extracción de plasma en ratas utilizando varias técnicas. El plasma sanguíneo contiene el 90% de las proteínas, enzimas y productos del metabolismo secundario circulante. La finalidad de estas técnicas de recogida es extraer esta fracción plasmática para realizar estudios de laboratorio en los que sea imprescindible obtener información específica sobre el plasma, tales como niveles de fármaco, análisis de perfiles bioquímicos o para posterior investigación *in vitro*. A pesar del inmenso interés del uso de esta técnica para la toma de muestras y del avance tecnológico que experimentan los laboratorios, que posibilita el análisis de volúmenes de muestras cada día más pequeños, historias preclínicas y clínicas más cortas y menos invasivas, empieza a ser creciente el número de publicaciones donde se cuestiona la fiabilidad de los datos obtenidos de muestras pequeñas de sangre en animales.

Marco teórico

A medida que la medicina e investigación han evolucionado, se han impulsado diferentes campos de investigación sobre diversos temas, la farmacología y los estudios para el desarrollo de nuevos fármacos no son la excepción.

Los estudios clínicos han ayudado para analizar la seguridad y la eficacia de productos, técnicas, medicamentos u otras novedades médicas o sanitarias que permitan la mejora de la salud de la población, por medio de pacientes humanos (NIH, 2024). No obstante, existen diferentes etapas previas a la implementación de este modelo de investigación. Primero, se encuentra la investigación documental, que ayuda a obtener los datos de seguridad del fármaco y sus excipientes, recabando datos como toxicidad, efectos adversos, productos de degradación, conservación, interacciones con otros excipientes, entre muchos otros datos (Khan et al., 2022)

De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer (2020), posterior a la revisión bibliográfica, se implementan los estudios preclínicos, que ayudan a confirmar o refutar lo establecido en la investigación documental, adicionalmente, ayuda a descubrir nuevos efectos tóxicos, adversos o farmacológicos. La fase preclínica se divide en dos tipos:

- Estudios celulares: son a menudo las primeras pruebas que se realizan para estudiar un nuevo tratamiento. Para determinar si pudiera ser eficaz, los investigadores analizan los efectos del nuevo tratamiento sobre células cancerosas que han crecido en una placa de laboratorio o en un tubo de ensayo. Puede que estos estudios se realicen en células cancerosas humanas o células cancerosas de animales.
- Estudios en animales: los tratamientos que parecen ser prometedores en los estudios celulares son después probados sobre los cánceres de animales vivos. Esto proporciona a los investigadores una idea de qué tan seguro es el nuevo tratamiento en una criatura viviente.

Los estudios preclínicos proporcionan información sumamente útil, pero puede existir poca o nula similitud en los resultados respecto a lo esperado entre las diferentes especies, por ejemplo, los humanos y los ratones son diferentes en la forma en como absorben, procesan y desechan los medicamentos o tratamientos.

Este tipo de efectos farmacodinámicos, puede ser analizados por medio de la concentración en plasma, por lo que es muy importante realizar una correcta extracción de sangre para llevar a cabo los análisis correspondientes.

Se han investigado diferentes metodologías para la extracción sanguínea en ratas, buscando disminuir el dolor y las molestias generadas no solo por las punciones, también las lesiones provocadas por malas prácticas.

Una técnica muy utilizada es la punción cardiaca (D B Morton et al., 1993). Los procedimientos para esta metodología requieren de previa anestesia para evitar inducir estrés en el animal, utilizando pentobarbital sódico a una concentración de 25 mg/mL para posteriormente, administrará una dosis de 40 mg/kg. Adicionalmente, se prepara una solución de 0.1 UI/mL de heparina con solución salina para evitar la coagulación de la sangre.

La vía de administración es intraperitoneal, por lo que a cada rata se le debe administrar 0.4 mL en caso de que pese 200 g, ajustar el volumen de administración de acuerdo con su peso real. El animal estará anestesiado cuando no presente reflejos ante estímulos como picazón en la pata o reacciones ópticas.

Para llevar a cabo la extracción por punción cardiaca, se debe cortar la piel del animal y abrir el abdomen hasta descubrir el corazón, quebrando las costillas y con ayuda de unas pinzas, descubrir el tórax revelando los órganos internos. Es importante localizar el corazón y llevar a cabo la punción de manera adecuada, la aguja se inserta con un ángulo de 30° respecto a la mesa de trabajo y en dirección a la cabeza del animal. Tras insertar la aguja unos 0.2-1 cm, la sangre comienza a fluir. Es importante evitar atravesar el mismo con la jeringa (D B Morton et al., 1993).

Con ayuda de una aguja previamente heparinizada, se realizará la punción en el corazón y se comenzará con la extracción de la sangre en una jeringa, donde se recolectarán aproximadamente 3 mL por cada rata. Al finalizar este procedimiento, se deberá cortar la

arteria para asegurar la muerte del animal, se deben desechar los cadáveres en una bolsa amarilla para proceder con su respectiva incineración.

Planteamiento del problema y justificación:

La extracción de muestras sanguíneas en ratas resulta estresante para el animal y doloroso en caso de que el procedimiento no se realice de manera adecuada; este tipo de problemática puede influir en los resultados del estudio, provocando resultados erróneos. Este proyecto será de utilidad para estandarizar un proceso en el que se obtienen muestras sanguíneas por la arteria caudal de la cola, con una cánula temporal y previa anestesia para evitar inducir estrés al animal.

Objetivo General:

Estandarizar la metodología para la extracción de plasma sanguíneo en ratas

Objetivos específicos:

Extracción de plasma sanguíneo de ratas Wistar por punción cardiaca

Centrifugar y acondicionar el plasma para su posterior análisis

Materiales y Métodos:

Los requisitos para un correcto manejo de animales y toma de muestras incluyen el uso de guantes, toalla, algodón, tubo para la recolección de muestras, aguja Vacutainer y alcohol al 70%. Los experimentos se realizarán en ratas macho de cepas Wistar, con un peso promedio de aproximadamente 250 g, que tendrán acceso libre a agua y ayuno de no más de 12 horas, antes de cada experimento. Los animales serán facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Todos los experimentos serán llevados a cabo siguiendo los Lineamientos y Estándares para la investigación de la biodisponibilidad de un desparasitante en una nueva forma farmacéutica. Adicionalmente, el estudio será sometido para su aprobación ante el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de la UPEAL-Bioterio.

El día del estudio, las ratas serán previamente inmovilizadas y anestesiadas con pentobarbital sódico con una dosis de 60 mg/kg vía intraperitoneal, esperando a que este haga efecto, se llevará a cabo una incisión desde el abdomen hasta el tórax para descubrir el corazón con unos fórceps, se realizará la extracción de sangre del corazón y posteriormente, se cortará la arteria para asegurar la muerte del animal.

Las muestras serán transferidas a tubos de ensayo, se someterán a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para lograr la separación del plasma de los glóbulos, se almacenarán a -20 °C para su posterior análisis.

Cabe mencionar que los animales serán manejados y tratados conforme a la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y siguiendo un código de ética y bienestar de los mismos, evitando sufrimiento, estrés y formas inadecuadas para sacrificarlos.

Resultados y discusión:

Se realizó la anestesia del animal con Pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/Kg vía intraperitoneal, y se llevó a cabo la extracción de sangre por punción cardiaca, extrayendo en promedio 9 mL de sangre por cada rata utilizada. Durante la extracción, se utilizó heparina sódica para evitar coagulación y la obstrucción de la aguja; no se reportaron problemas ni dificultades.

Debido a la facilidad con la que la sangre fluía hacia la jeringa, se evitó la hemólisis de la muestra, obteniendo plasma limpio, de color rosa, y eficientes para analizar por las técnicas correspondientes



De acuerdo con Parasuraman (et al., 2010), para llevar a cabo la punción cardíaca, el animal debe estar en un estado de anestesia terminal, y se debe realizar al final del estudio para hacer la recolección de un volumen considerable de sangre, tomando la muestra del ventrículo para evitar el colapso del corazón.

Además, mencionan que la extracción de sangre es una de las etapas más importantes en la investigación biomédica, ya que un error puede causar grandes variaciones entre los resultados.

Adicionalmente, el Grupo Conjunto de Trabajo sobre el Refinamiento (2011) menciona que la punción cardíaca siempre deberá llevarse a cabo bajo anestesia general para todos los Animales de Laboratorio. Normalmente se pincha el ventrículo izquierdo con el animal tumbado sobre el lado derecho o tumbar el animal de espaldas e introducir una larga aguja justo debajo del esternón hasta el corazón, esto para obtener muestras únicas. Cuando se aplica este procedimiento con fines terminales, se debe asegurar la muerte del animal después de la exanguinación.

Esta técnica tiene severos problemas, como fracaso en la entrada al ventrículo, sangrado en el pericardio con paro cardíaco (a menudo debido a entradas múltiples), sangrado en el tórax debido a una perforación de un vaso sanguíneo. (N.A. los coágulos pueden ser retirados post-mortem y procesados para suero como la sangre). Se puede producir contaminación de la muestra con constituyentes pulmonares (aire, líquido o incluso pus si el animal tiene neumonía) (Grupo Conjunto de Trabajo sobre el Refinamiento 2011).

No obstante, Beeton C et al (2007) mencionan que, la técnica por punción cardíaca, tiene ventajas y desventajas generales frente a otras técnicas de extracción, entre las más destacables, se encuentran:

- Mayor volumen de muestra: La punción cardíaca permite obtener una mayor cantidad de sangre en comparación con otras técnicas, lo que puede ser útil para análisis más exhaustivos.

- Acceso directo al torrente sanguíneo: Al extraer sangre directamente del corazón, se obtiene una muestra no diluida y sin interferencias de otros tejidos.
- Menos variabilidad: La punción cardiaca puede ser más consistente en términos de volumen y calidad de la muestra.

Desventajas:

- Invasiva: La punción cardiaca es más invasiva que otras técnicas, lo que puede causar más estrés y malestar en las ratas.
- Requiere anestesia: Para realizar la punción cardiaca, generalmente se requiere anestesia, lo que agrega complejidad y riesgo.
- Mayor habilidad técnica: Realizar una punción cardiaca precisa requiere habilidades y experiencia específicas.

Conclusiones:

La punción cardiaca resultó ser una técnica sumamente eficiente para la obtención de grandes cantidades de plasma sin hemoglobina, ya que la técnica permite la facilidad del flujo de la sangre, evitando la hemólisis de la muestra y, por consiguiente, la contaminación de esta. Una de las claras desventajas es que se considera un método invasivo y es para una sola toma de muestra, por lo que no es conveniente en estudios de larga duración.

Derivado de este proyecto, se recomienda para para futuras investigaciones el uso de esta técnica en estudios como diagnóstico y detección, cuidando la técnica para evitar daños al ventrículo y por ende, eventos irreversibles en el animal. Adicionalmente, se propone el desarrollo de una técnica que pueda ser de manera prolongada y eficiente, siguiendo los códigos de ética y evitando el estrés y sufrimiento del animal..

Referencias

- Putcha, L., Bruckner, J. V., Muralidhara, S., C Feldman, S. (1982). A simple method for repetitive blood sampling from rats. *Journal of Pharmacological Methods*, 8(2), 145-149. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(82\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0160-5402(82)90068-7)
- Tablas de extracción de sangre: Org.ar.
- (N.d.). Org.Ar. Retrieved July 12, 2024, from <https://www.ibyme.org.ar/archivos/laboratorios/adjuntos/poe-vias-de-extraccion>
- Parasuraman, Raveendran, C Kesavan. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology C Pharmacotherapeutics*, 1(2), 87-93. <https://doi.org/10.4103/0976-500x.72350>
- DAVID M. COCCHETTO and THORIR D. BJORNSSON (1983) *Methods for Vascular Access and Collection of Body Fluids from the Laboratory Rat*
- NIAMS. (2017, May 26). Los estudios clínicos. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. <https://www.niams.nih.gov/es/acerca/estudios-clinicos>
- Tipos y fases de los estudios clínicos. (n.d.). Cancer.org. Retrieved July 17, 2024, from <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tomar-decisiones-sobre-el-tratamiento/estudios-clinicos/lo-que-usted-necesita-saber/fases-de-los-estudios-clinicos.html>
- El Refinamiento, B. S. (1993). Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio. Umh.Es. <https://sea.umh.es/files/2011/07/Refinamiento-extracci%C3%B3n-sangre.pdf>
- Martínez, M. G. P. (n.d.). EXTRACCIÓN SANGUÍNEA DE LA VENA CAVA CRANEAL EN RATAS Y HÁMSTERES. Ehu.Es. Retrieved July 17, 2024, from <http://www.oc.lm.ehu.es/Fundamentos/Doctorado/cursos/CirExp/F-076.PDF>