



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



Fisiología Animal
Manual de Prácticas

Elaborado por: Dr. Ulises Pacheco Bardulla

CONTENIDO

<i>No. de práctica</i>	<i>Nombre de la práctica</i>	<i>No. Página</i>
<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>		
1	<i>Reporte de laboratorio</i>	
2	<i>Alteraciones morfofisiológicas por exposición al etanol durante el desarrollo embrionario del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)</i>	
3	<i>Análisis de la función motora en pez cebra (<i>Danio rerio</i>)</i>	
4	<i>Respuesta al estrés en adultos de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)</i>	
5	<i>Electromiograma y propiedades de los músculos</i>	
6	<i>Estudio de procesos digestivos y regulatorios a través de la exploración postprandial de glucosa en sangre</i>	
7	<i>Medición de la función dinámica renal</i>	
<i>Bibliografía</i>		

REPORTE DE LABORATORIO

Los reportes de laboratorio serán entregados en formato electrónico y por escrito con uso estricto del estilo de artículo científico utilizando el estilo de la revista de The Physiological Society: <http://physreports.physiology.org/author-guidelines>, el estilo debe seguir el formato de artículo original, (abstract en inglés y español, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y bibliografía) como se detalla en la liga.

Formato del documento:

- Arial o Times new roman 12
- Interlineado de 1.5. Sin sangrías.
- No utilizar doble columna en el documento

Consideraciones importantes:

1. **Si se detecta el plagio de fragmentos completos o párrafos extraídos de internet u otros documentos será anulada automáticamente la calificación del laboratorio.**
2. Toda argumentación que sustente el documento debe ser citada en el texto
3. Cada reporte debe contener **como mínimo 15 citas** bibliográficas correctamente interpretadas y citadas en texto y bibliografía, estas referencias deben ser utilizadas para sustentar la introducción, metodología o la discusión de resultados. Sólo se permiten 3 citas de libros de texto y 3 citas de artículos de internet.
4. **Las fechas de entrega de los reportes serán inaplazables**
5. **El primer reporte será retroalimentado, el segundo reporte se evaluará directo, en ambos casos se utilizará la rúbrica para su evaluación.**

Elementos del reporte

Un reporte debe llenar dos objetivos. Primero, debe describir clara y completamente los procedimientos seguidos (en términos reproducibles) y los resultados hallados (en forma original y posteriormente con su análisis). Segundo, debe ubicar los resultados en perspectiva con el estado actual del conocimiento, interpretando su importancia.

Las partes que contiene un reporte científico, son las siguientes:

TITULO

Nominación sintética de la investigación, la cual debe ser breve y concreta, enunciando el problema a resolver.

INTRODUCCIÓN

Presentación de la información base, que dentro del cuerpo de conocimiento nos ubica en el problema planteado así como la información relacionada a su resolución. También se refiere a la importancia del trabajo, esto último puede tratarse en un punto separado.

Fisiología animal

ANTECEDENTES

Resumen de otras investigaciones similares o bien que fundamenten los aspectos metodológicos del trabajo.

HIPOTESIS

La hipótesis debe plantear claramente la pregunta de investigación, su redacción debe ser predictiva acorde al estilo.

OBJETIVO Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

Se debe de enunciar el objetivo general del trabajo así como los objetivos específicos de acorde a la redacción de este apartado.

MATERIALES Y MÉTODOS DE TRABAJO

En forma sintética se explica la aplicación de los métodos, generalmente en forma referencial, así como la descripción de los materiales, de tal forma que el lector del trabajo, cuente con la información necesaria para poder repetir la experiencia, con base a lo descrito. **En este apartado se incluye como se realizó el análisis estadístico y el software utilizado.**

RESULTADOS

Presentación ordenada tanto los datos obtenidos, así como la información procesada, con los resultados de los estadígrafos. Los resultados deben ser narrados de forma organizada. **No se acepta solo la inserción de tablas con los resultados del software**

DISCUSIÓN

Corresponde a una disertación razonada del contraste de los resultados obtenidos contra los antecedentes bibliográficos (cuerpo de conocimiento existente), así como los puntos de vista fundamentados del autor. En esta sección se buscará obtener algunos de los siguientes puntos:

1. Analizar los resultados.
2. Compararlos con otros autores
3. Proponer explicaciones con base en la literatura a los resultados obtenidos
4. Identificar fuentes de error, sin llegar al extremo de invalidar el propio trabajo.
5. Especular (de forma cuidadosa) acerca de los significados más amplios de las conclusiones obtenidas.
6. Identificar los siguientes pasos en la investigación del problema.

CONCLUSIONES

En forma breve se presenta el cuerpo de conocimiento adquirido a partir de la investigación realizada así como los más sobresalientes resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA REFERIDA

Se cita en forma organizada y homogénea, tanto los libros, los artículos y en general las obras consultadas, que fue indispensable su indicación o referencia en el contenido del trabajo.

Fisiología animal

Considerando su valor utilitario, se describe a continuación en síntesis los procedimientos para citar material bibliográfico en el texto y en la sección final del reporte científico de literatura citada.

TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

Debido a que existen diversos criterios de ubicación de las presentaciones gráficas, especialmente cuando intervienen políticas editoriales, usualmente se presentan al final del trabajo, aunque en un reporte interno que no tiene que pasar por consideraciones editoriales, se recomienda intercalarlas de acuerdo al escrito

Alteraciones morfofisiológicas por exposición al etanol durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).

Habilidades y competencias que desarrollará el alumno:

- Manejo de animales de laboratorio de importancia biomédica (especies acuáticas)
- Desarrollar un diseño experimental con la finalidad de obtener datos cuantitativos y cualitativos
- Aplicar los métodos estadísticos correctos para el tratamiento de los datos experimentales
- Desarrollar la escritura científica a través de un reporte en extenso

Duración aproximada de la práctica: 4-5 semanas.

Introducción

El pez cebra, es un organismo que ha generado un notable interés en la investigación por sus cualidades biológicas, entre las que destacan: desarrollo embrionario externo y visible, ciclos de vida reducidos, economía en su implementación y cuidados, además que el pequeño tamaño de los huevos y larvas permite la implementación de pruebas de alto rendimiento con múltiples réplicas por lo que resulta ideal para evaluar de manera dinámica con un fuerte poder estadístico mecanismos fisiológicos normales o patológicos. Asimismo, este organismo ha demostrado mecanismos celulares y funcionales del sistema nervioso comparables a los mamíferos (Lieschke et al. , 2007, Peterson et al. , 2012, Steenbergen et al. , 2011), que para nuestros fines es importante, ya que el modelo despliega una importante variedad de conductas que pueden ser sujetas a evaluación con baterías de pruebas típicas de modelos murinos. Tomado junto este organismo ha probado ser un modelo robusto y de transición para la investigación en áreas como toxicología del desarrollo y ecotoxicología por lo que los datos arrojados por esta propuesta pueden sugerir afectaciones tanto para las poblaciones humanas como organismos silvestres especialmente, acuáticos.

La exposición del embrión al alcohol conduce a el deterioro o malformación de órganos, además de afectar el sistema nervioso (García- Algar, 2011). El síndrome alcohólico fetal es uno de los efectos menos conocidos; a este se le caracteriza por: malformaciones físicas, retardo del desarrollo y mental (Cancino y Zegarra, 2003). En esta práctica realizaremos una simulación de dichos efectos con el pez cebra (*Danio rerio*), el cual ha sido utilizado para simular efectos de agentes químicos. Entre sus cualidades para este tipo de estudios resalta el hecho de que está sujeto a un patrón muy similar de morfogénesis durante el desarrollo embrionario que sufren otros vertebrados, entre ellos el humano (Carvan, Loucks y William, 2004).

El objetivo de esta práctica es comprender los efectos del alcohol durante el desarrollo embrionario mediante una simulación con embriones de pez cebra, además de lograr obtener datos cualitativos y cuantitativos con el fin de analizar los parámetros obtenidos; se esperan efectos morfológicos y un cambio en el ritmo cardiaco y la actividad física por parte de individuos que serán expuestos a mayores concentraciones de etanol con el fin de demostrar sus efectos durante el desarrollo embrionario, lo anterior para concluir que entre más altas sean las concentraciones de etanol a las que un organismo es expuestos los efectos teratogénicos y mutagénicos aumentan, al igual que la tasa de mortalidad .

Fisiología animal

Material

- 1 pareja de peces cebra (Esto puede variar dependiendo de los resultados durante la reproducción)
- Equipo para pecera, calefactor de NO MAYOR A 50 Watts.
- Pecera, canicas y una planta (natural o artificial) para la pecera
- Etanol a partir de alcohol absoluto
- Medio E3 al 10X (Incluye: 5 mM NaCl, .17 mM KCl, 33 mM MgSo4, Azul de metileno al 10⁻⁵ %).
- Pipetas Pasteur
- Micropipeta de 1000 microlitros
- Cajas petri
- Contador
- Estereoscopio

Procedimiento

Mantenimiento de peces cebra reproductores

- Las peceras deben estar en condiciones óptimas de limpieza y aereación, idealmente deben de tener un sistema de filtración adecuado para eliminar los detritos, si no es posible se debe de hacer cambios diarios del 20% de agua.
- LA CALIDAD DEL AGUA ES CLAVE PARA LA REPRODUCCION
- La temperatura óptima para los animales es entre 26 y 29 grados, temperaturas mayores o menores producen estrés en los animales. El cuarto debe estar con temperatura o se debe colocar calentadores no mayores a 50 watts
- Alimenta con hojuelas de peces tropicales 2 veces al día. La cantidad de alimento debe ser aquella que los peces puedan comer en 3 minutos. Después retirar el alimento sobrante del agua para evitar su descomposición.

Reproducción y obtención de embriones

Diferenciación de macho y hembra

Machos	Hembras
Sus bandas se alternan en azul y dorado	Sus bandas se alternan en azul y plateado
Estilizados	Robustas
Vientre plano	Vientre abultado



Fisiología animal

Figura 2. Diferenciación macho-hembra. Ejemplares macho (esquina superior izquierda) y hembra (Esquina inferior derecha) de pez cebrá.

Elaboración de trampas para coleccionar embriones de pez cebrá.

Las plantas artificiales pueden servir como un estímulo para el desove, mientras que las canicas ayudan a evitar la depredación de huevos; tanto canicas como plantas se colocan dentro del recipiente.

Reproducción

El pez cebrá necesita ciclos de luz (14 hrs) y oscuridad (10 hrs), las trampas deberán colocarse en las peceras con los peces adultos antes de que las luces se apaguen el día antes de la prueba o antes de que la luz se encienda el mismo día de la prueba y recogerse entre 30-60 minutos después de que las luces prendan (el apareamiento, desove y fertilización se da en los primeros 30 minutos después de que la luz aparezca).

Para una obtención de embriones efectiva, la temperatura del agua debe de estar a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y condiciones óptimas de amonio, nitrato, nitrito y pH.



Figura 3. Obtención de embriones. Peceras con trampas para la recolección de embriones de pez cebrá.

Limpieza de embriones

- Limpieza, separación y preparación de soluciones- la mayoría de los embriones están depositados en el recipiente entre las canicas, estos se deben sacar y limpiar con medio E3 con la ayuda de una pipeta y depositandolos en una caja Petri.
- Preparar una solución Stock de Medio E3. El propósito de una solución stock es ahorrar tiempo y trabajo elaborando una solución concentrada: al 10X (Incluye: 5 mM NaCl, .17 mM KCl, 33 mM MgSo4, Azul de metileno al $10^{-5}\%$). **NO UTILIZAR LA SOLUCION STOCK PARA LIMPIAR A LOS EMBRIONES**

Fisiología animal

- **PASO CRÍTICO:** A partir de la solución Stock diluir hasta obtener una solución 1X (nueve partes del agua destilada + 1 parte de stock).
- La limpieza debe ser abundante de tal manera se eliminen los dentritos adheridos a los huevos.
- Con el uso del Estereoscopio se debe descartar a los huevos no fecundados

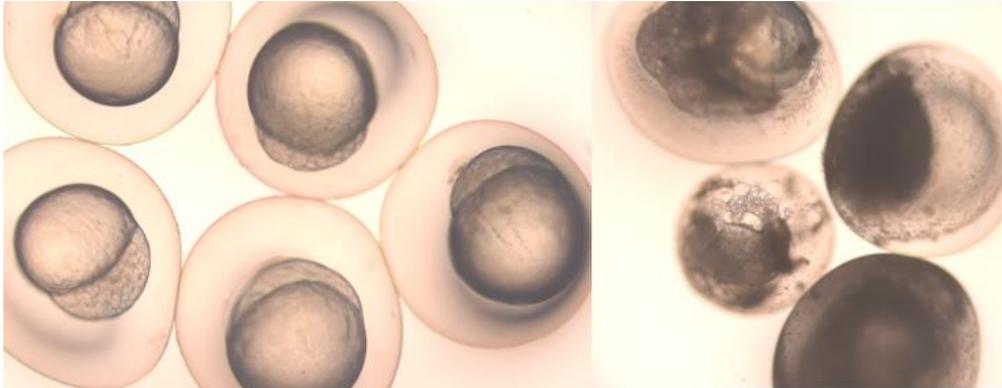


Figura 4. Selección de embriones. Embriones vivos (izquierda) y muertos (derecha) de pez cebra.

Exposición al etanol

PASO CRÍTICO: La exposición de los embriones debe iniciar entre 2-3 horas post fertilización. Es decir si la reproducción inicio a las 8 am. Los embriones deben estar en sus soluciones de etanol a más tardar a las 11 am. Si se prolonga el inicio de la exposición el efecto del etanol será menos evidente. ¿Por qué?

Se preparan 3 soluciones:

1. Medio E3 a concentración 1X (Grupo Control)
 2. Etanol a una concentración de 150 mM preparado en medio E3
 3. Etanol a una concentración de 300 mM preparado en medio E3
- Utilizar cajas Petri plástico/ o vidrio, tomando precaución de no confundir soluciones, las cajas deberán ir marcadas con su respectiva concentración.
 - Repartir los embriones equitativamente y colocar una cantidad de solución equivalente en cada caja.
 - La cajas con etanol deben ser sellada con parafilm para evitar su evaporación
 - Se inicia la incubación a 28.5 (ideal) o en un cuarto aclimatizado.
 - **PASO CRÍTICO:** La soluciones deben ser cambiadas todos los días durante el experimento.

Registro de los parámetros de toxicidad

Generalidades

Colecta de evidencia- a partir de las primeras 24 horas post fecundación se empezarán a tomar parámetros; esto se realizará a las 24, 48 y 72 horas por medio de fotos y videos. Además se analizaran los datos obtenidos, de los cuantitativos se tomará registro a fin de presentar y analizar gráficas. ¿Qué parámetros tomar y cuando?:

Fisiología animal

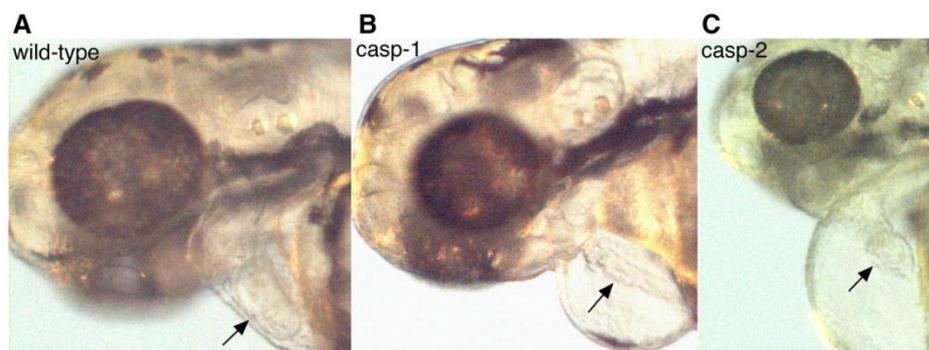
Parámetros	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Desprendimiento cola	X		
Malformaciones	X	X	X
Edema		X	X
Escoliosis	X	X	X
Eclosión		X	X
Coagulación	X		
Sobrevivencia	X	X	X
Movimiento espontáneo	X		
Frecuencia cardíaca		X	

Sobrevivencia

La sobrevivencia se cuantifica determinando el número de individuos

Registro de la frecuencia cardíaca

La transparencia de los embriones permite identificar fácilmente el corazón en las larvas de desarrollo desde las **48 post fertilización**. Además su ritmo cardíaco puede cuantificarse y correlacionarse con patologías del desarrollo o la alteración por fármacos o contaminantes



- El registro debe ser realizado en por lo menos 15 larvas.
- Con el uso de un estereoscopio y la ayuda de un contador se cuantifica el número de latidos en 15 segundos y posteriormente se multiplica por cuatro.
- Se repite tres veces en el mismo animal para obtener un promedio, esto permitirá disminuir la variabilidad producida por el conteo manual
- Es importante colocar al organismo en posición que el corazón pueda ser visible

Registro del movimiento espontáneo

La función motora es posiblemente uno de los primeros incidios de conducta que muestran los embriones de animales en desarrollo. Las neuronas motoras a lo largo del eje axial comienzan a conectarse con las células musculares desde las 19 hrs post fertilización y finaliza a las 26 hrs, este fenómeno induce un movimiento espontáneo en el embrión de cebra y posiblemente en otros

Fisiología animal

vertebrados, el coleteo nos recuerda al pataleo un bebe en el vientre. Tomando ventaja de su transparencia el fenómeno puede ser verificado y cuantificado por simple observación o con la ayuda de software de análisis de imagenes, por lo que es de interés en la investigación biomédica.



- **PASO CRÍTICO:** El momento de registro es crítico. Este fenómeno inicia a las 19 hrs post fertilización y tiene su pico máximo a las 22 hrs hpf y declina para las 24 hpf. Por lo que los embriones que registren deberán encontrarse entre las 22-24 hpf.
- Colocar embriones 25 por tratamiento en un caja Petri cuidando no confundir tratamientos en caso de existan.
- Se toma un video de 1 minuto para registrar el movimiento y contarlo manualmente
- Si se desea hacer una verificación a través del tiempo el video de 1 minuto debe hacerse a cada hora.

Desarrollo normal

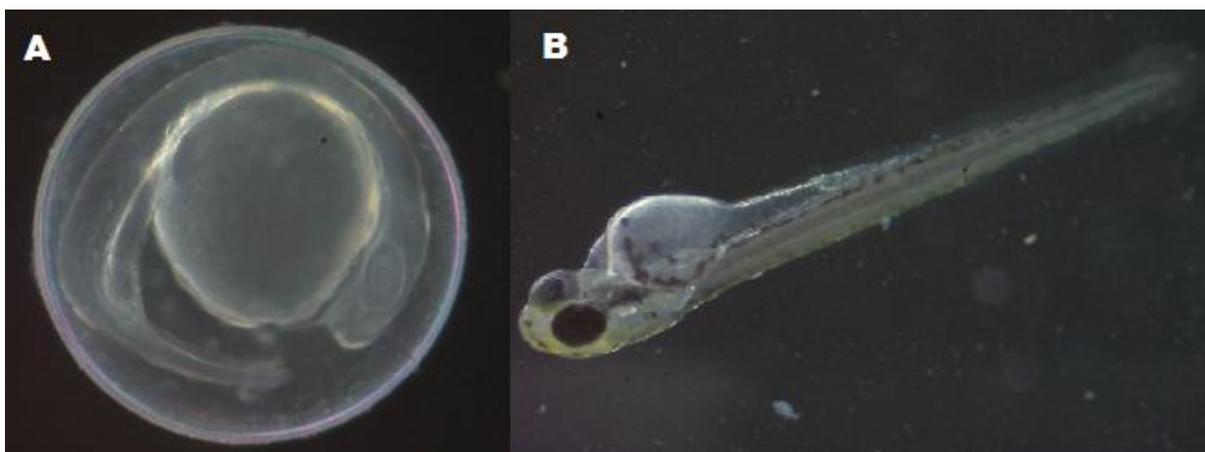


Figura 1. Organismos control observados bajo el estereoscopio. A- 24 horas post-fecundación; B-72 horas post-fecundación.

Catálogo de malformaciones por exposición al etanol

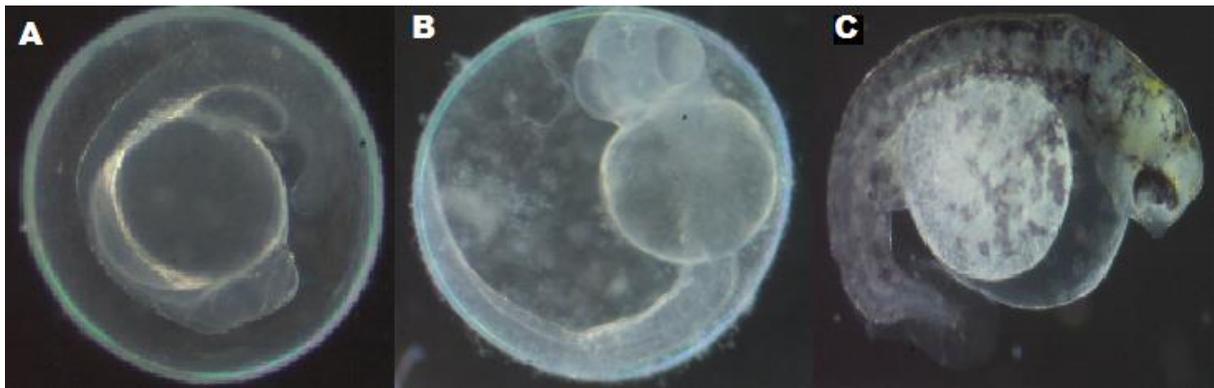


Figura 2. Organismos expuestos a una concentración de 150 mM de etanol, observados bajo el estereoscopio. A- 24 horas post-fecundación; B-48 horas post-fecundación; C- 72 horas post-fecundación.

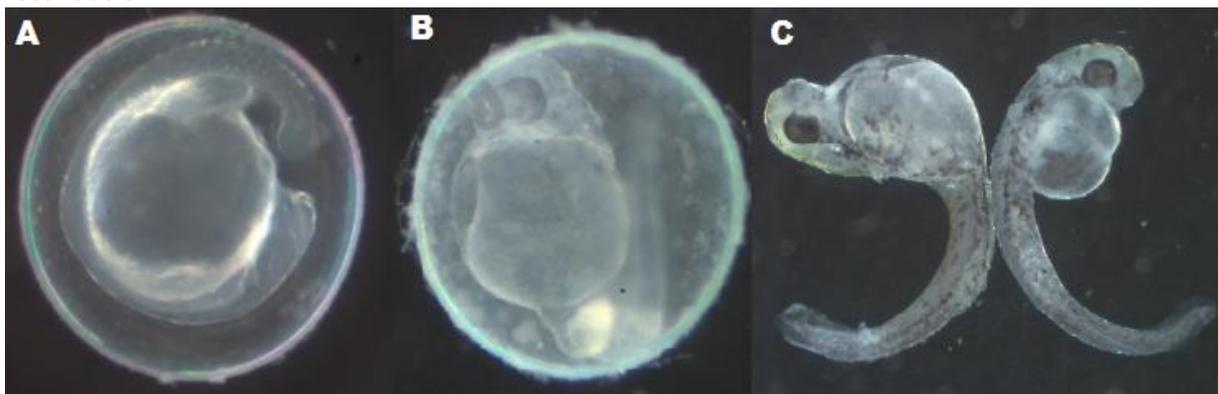


Figura 3. Organismos expuestos a una concentración de 300 mM de etanol, observados bajo el estereoscopio. A- 24 horas post-fecundación; B-48 horas post-fecundación; C- 72 horas post-fecundación.

Análisis de resultados y gráficas esperadas

Bibliografía consultada:

Aucker, L. (2000). *Farmacología en enfermería*. 2da Ed. España: Ediciones Harcourt S.A. pp. 25

Gilbert, S. (2003). *Biología del desarrollo*. 7ma Ed. España: Editorial Médica Panamericana S. A. pp 3.

Carvan MJ , Loucks E, Weber DN, Williams FE. (2004). *Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis*. 9 de diciembre del 2017, de PubMed.gov Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451040> .

Cancino, F. & Zegarra, J. (2003). *Síndrome alcohólico fetal*. Revista de neuro- psiquiatría, 66, 302-312.

García- Algar, O. (2011). *Efectos del alcohol durante el desarrollo embrionario*. 13 de Septiembre del 2017, de Universidad Autónoma de Barcelona. Sitio web: http://www.uab.cat/PDF/PDF_1345683256546_es.pdf

POTENCIAL DE ACCIÓN DEL NERVIIO CIÁTICO EN *Xenopus laevis*

Práctica #1

Puede observarse un potencial de acción mediante la disección del nervio ciático de una rana, en este caso de *Xenopus laevis* por medio de un estimulador (dispositivo para suministrar estímulos eléctricos precisos). El potencial de acción se desplaza a lo largo del nervio y se detecta a medida que pasa por dos electrodos externos, la respuesta detectada se amplifica y se visualiza en la pantalla de la computadora. El estímulo, tiempo, distancia y velocidad pueden ser calculables.

Este método no mide el flujo de iones, sólo potencial de acción neto. Se tiene la ventaja de que se puede utilizar para registrar el paso de un potencial de acción (como en un músculo) a partir de la superficie del cuerpo y puede utilizarse también para registrar potenciales de acción de los nervios enteros.

Potencial de acción compuesto: representa la suma de los potenciales de acción disparados por las neuronas individuales.

Objetivos:

Materiales y equipo:

1. Nervio ciático de la rana *Xenopus laevis*.
2. Solución de Ringer (ya está preparada).
3. Cámara para potencial de acción y programa para computadora Lab tutor.
4. Estuche de disección.
5. Regla.

Metodología:

Preparación de la solución de Ringer.

Agregar NaCl (6.5 gr), KCl (0.14 gr), CaCl₂ (0.12 gr), NaHCO₃ (0.2 gr) llevar a un litro con agua destilada y mezclar bien.

Obtención de nervio ciático (Figura 1).

Antes del experimento, es necesario sacrificar al animal sin sufrimiento. Una técnica para esto es la inserción de una aguja o varilla de metal en su cerebro (pithing). En el caso de las ranas el cerebro se encuentra entre los ojos, por lo que debe tomársela cabeza de ella utilizando los dos primeros dedos, el primero en la nariz y el segundo debajo de la mandíbula, se debe perforar rápidamente con la aguja en la cavidad craneal y se llega al cerebro y la médula espinal, la aguja debe moverse de lado a lado para destruir el cerebro (B).

Fisiología animal

Para realizar la disección debe retirarse la piel, esta se levanta a la altura de la cadera y se realiza un corte separándola de los músculos, la piel debe retirarse con unas pinzas jalando hacia abajo (C).

Para encontrar el nervio ciático debe separarse el músculo del muslo con cuidado, es fácil de distinguir por su color blanco (D) al encontrar el extremo se amarra con hilo para posteriormente poder jalar de él, debe irse desprendiendo del músculo con ayuda de tubos de vidrio (E) sin romperlo hasta encontrar su otro extremo, es importante estar lavando constantemente con la solución de Ringer.

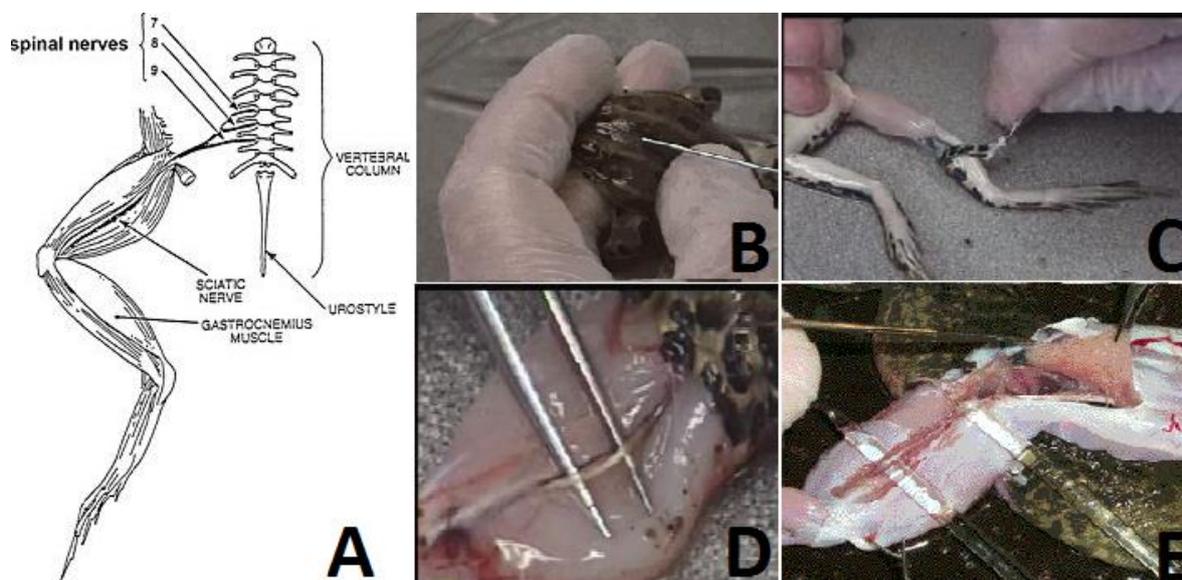


Figura 1. Obtención de nervio ciático en rana. **A** Localización de nervio ciático. **B.** Pithing. **C.** Desprendimiento de piel, **D.** separación de músculos para localizar el nervio. **E.** Uso de tubos de vidrio para obtener el nervio ciático completo.

Preparación de equipo para observar potencial de acción

La cámara donde se coloca el nervio debe de contener solución Ringer, el nervio ciático debe estar sobre los cables, obsérvese la configuración del equipo en la figura 2.

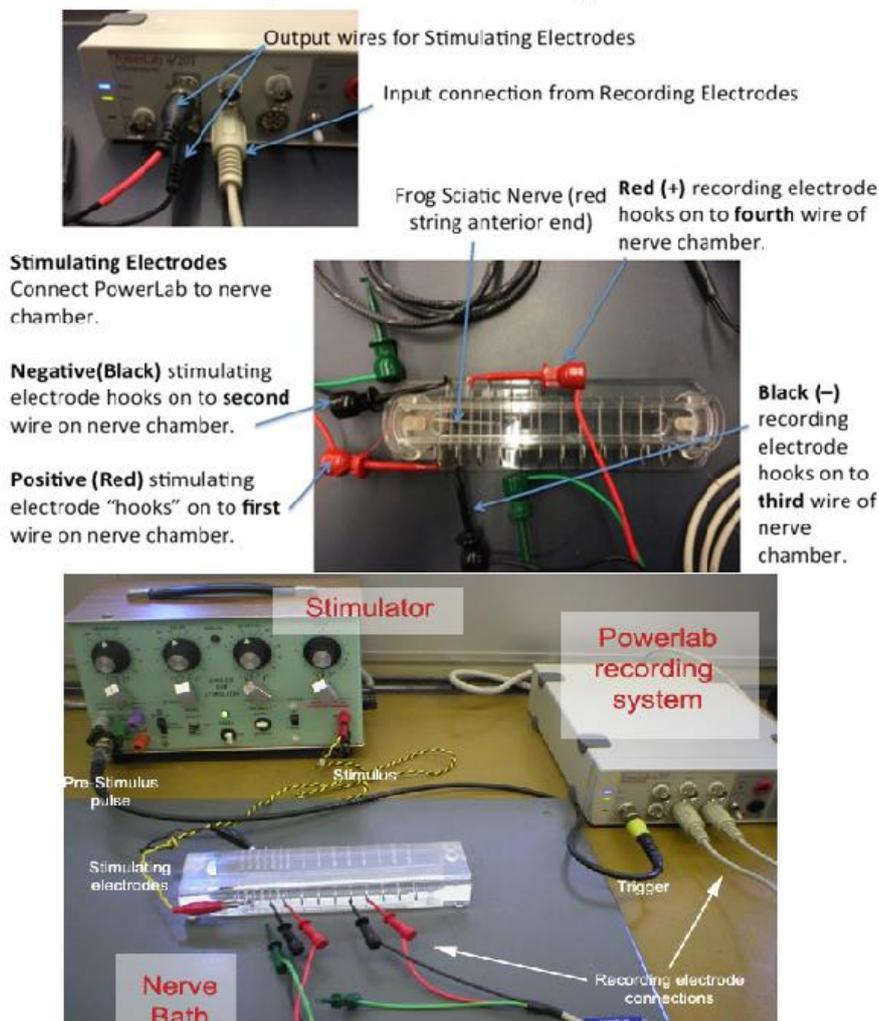


Figura 2. Equipo para medir potencial de acción.

Lab Tutor

Ejercicio 1: Nerve threshold

Con el nervio ciático en la cámara, los electrodos bien conectados y el programa andando se comienza a dar voltaje desde la computadora, con una amplitud inicial baja, ningún CAP será visible, pero se verá una breve desviación bifásica cerca del comienzo de la pantalla, este es el artefacto del estímulo, a medida que se aumente lentamente la tensión del estímulo, aparecerá una segunda desviación, este es el Potencial de Acción Compuesto, al ir aumentado el estímulo se observarán cambios en la forma del CAP y su amplitud.

Características del CAP (figura 3).

- **Amplitud del pico del CAP:** Es el valor de la tensión del pico de la respuesta del CAP.
- **Latencia de la aparición del CAP:** es el tiempo desde el inicio del estímulo artefacto hasta la aparición del CAP.
- **Latencia del pico del CAP:** Es el tiempo desde la aparición del estímulo artefacto al pico de la CAP.
- **Duración del CAP:** es el tiempo desde el comienzo de la fase positiva al final de la fase negativa del CAP.
- **Voltaje de estímulo máximo:** es el punto en el cual un aumento adicional en el voltaje no produce ningún aumento adicional en la amplitud del CAP.

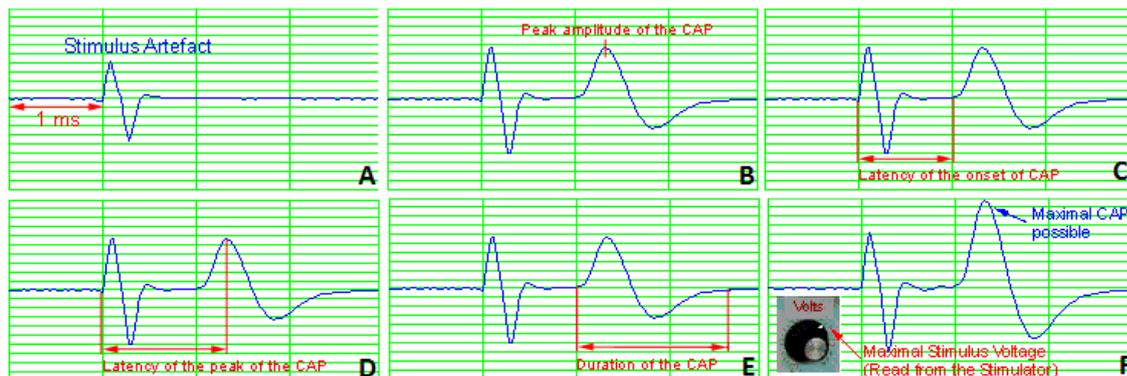
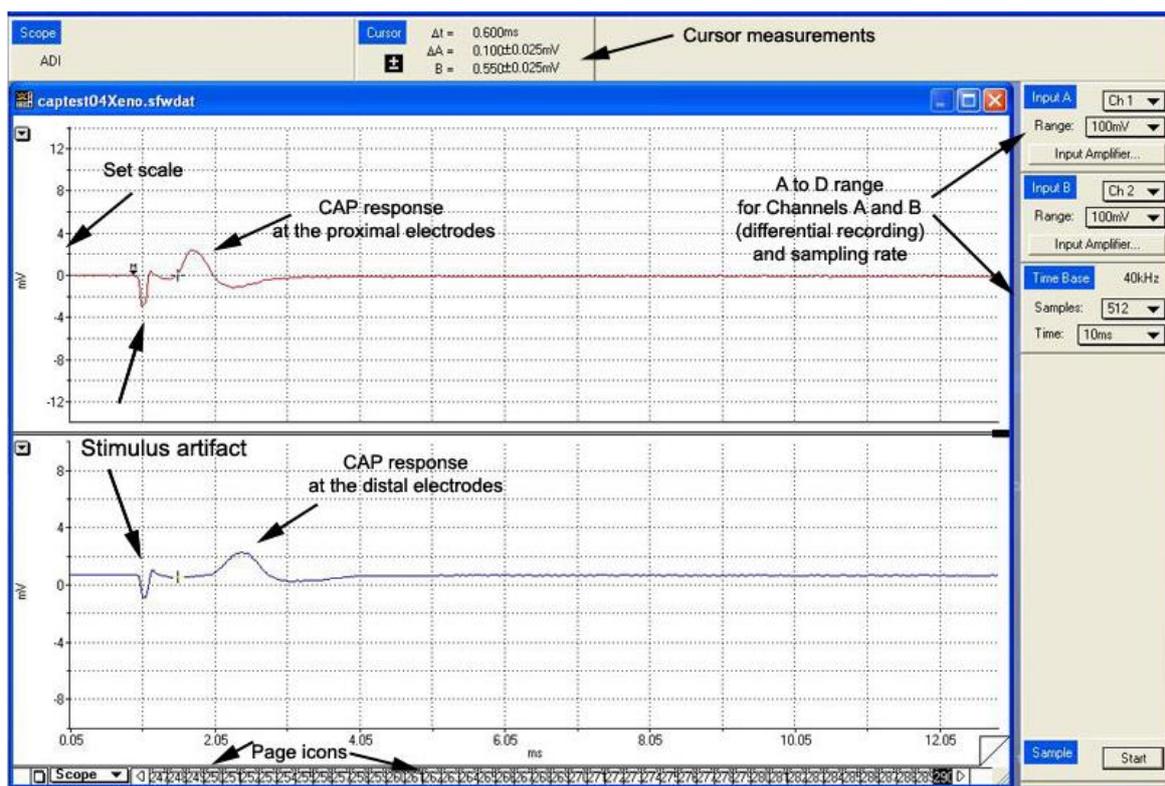


Figura 3. Características de un CAP. **A** Artefacto estímulo. **B.** Amplitud del pico del CAP. **C.** Latencia de la aparición del CAP. **D.** Latencia del pico del CAP. **E.** Duración del CAP. **F.** Voltaje de estímulo máximo.

Analysis Threshold.

Con los resultados obtenidos se llenará una tabla, para obtener una gráfica de comportamiento figura 4.

<u>mV</u>	<u>mV</u>
10	0
40	0
70	18.6
100	20.2
130	22
160	25.4
180	27

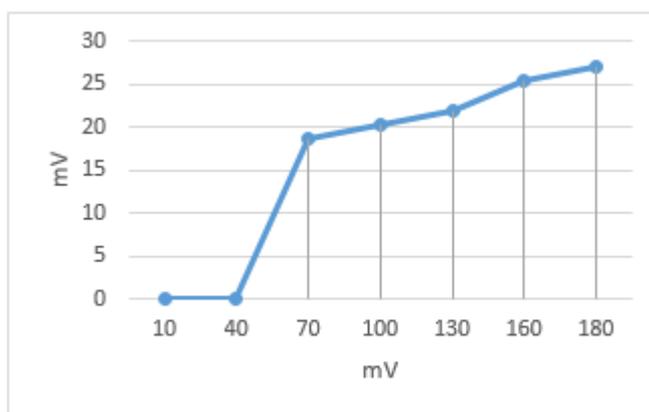


Figura 4. Ejemplo de análisis de CAP.

Ejercicio 2: Nerve Refractory Period

El periodo refractario absoluto es el breve intervalo después de un estímulo donde no hay un segundo choque, pero un choque máximo puede producir un segundo estímulo (periodo refractario relativo). En el programa debe buscarse con qué voltaje se observa un solo estímulo.

Ejercicio 3: Conduction velocity.

Debe provocarse un CAP máximo, la velocidad de conducción se calcula utilizando una sola latencia (mm/ms) y la distancia (mm) de los electrodos.

$$V = \frac{\text{distancia de electrodos}}{\text{latencia}}$$

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MOTORA EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

Práctica #2

Objetivo:

Determinar la función motora de ejemplares de pez cebra con exposición a diferentes sustancias (Alcohol, tricaina y control).

Metodología

Se deberán obtener embriones de pez cebra y mantenerlos con vida durante 7 días, realizando cambios de medio E2 cada tercer día.

Llegado el séptimo día se procede a realizar el análisis de la función motora en pez cebra, colocando 8 peces en una placa con solución E2, 8 en etanol 50mM y 8 más en tricaina.

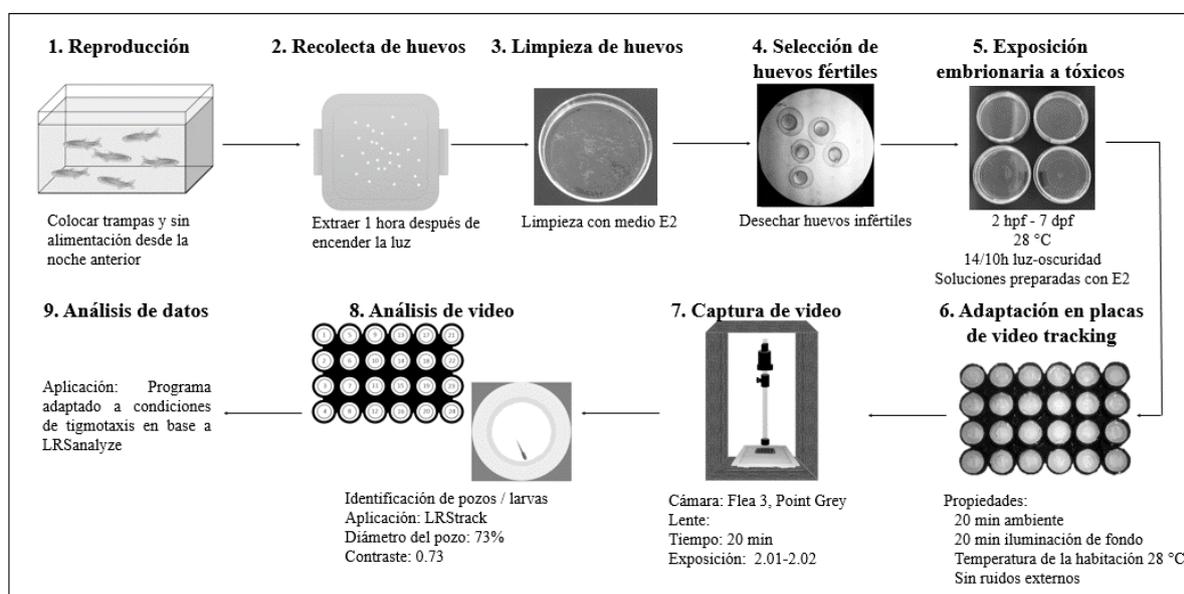


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra el diseño de un experimento de neurotoxicidad motora en larvas de pez.

Preparación de medio E2

E2 A

- Cloruro de sodio
- Cloruro de Potasio
- Sulfato de Magnesio

E2 A Buffer mix

- Fosfato de Potasio dihidrogenado

Fisiología animal

- Fosfato de sodio dibásico

Agregar 10 ml de E2 A Buffer mix a E2 A (500 ml)

E2 B

- Cloruro de Calcio

E2 C

- Bicarbonato de sodio

Para preparar un litro de medio E2 a 1x

- 5 ml de E2 A
- 1 ml de E2 B
- 1 ml de E2 C

Aforar a un litro de Agua destilada, mantener a temperaturas entre 22-27°C.

Videograbación

Se utiliza un programa de computadora hecho en Matlab: LSRtrack y LSAalyze.

En una caja Petri limpia se agregan 8 larvas con etanol 50mM, en otra caja 8 larvas con tricaina y en la tercera caja 8 larvas con medio E2 por 10 minutos.

En una placa modificada se colocan los tres tratamientos ya con medio E2, se debe de identificar en qué pozos están los tratamientos para evitar confusiones.

En el cuarto de grabación a temperatura de 27°C se coloca la placa por 10 minutos para el tiempo de aclimatación, después pasa a la lámpara de la grabación por otros 10 minutos y se prosigue con la grabación por 10 minutos, es importante evitar hacer cualquier ruido durante este tiempo pues cualquier sobresalto altera los resultados.

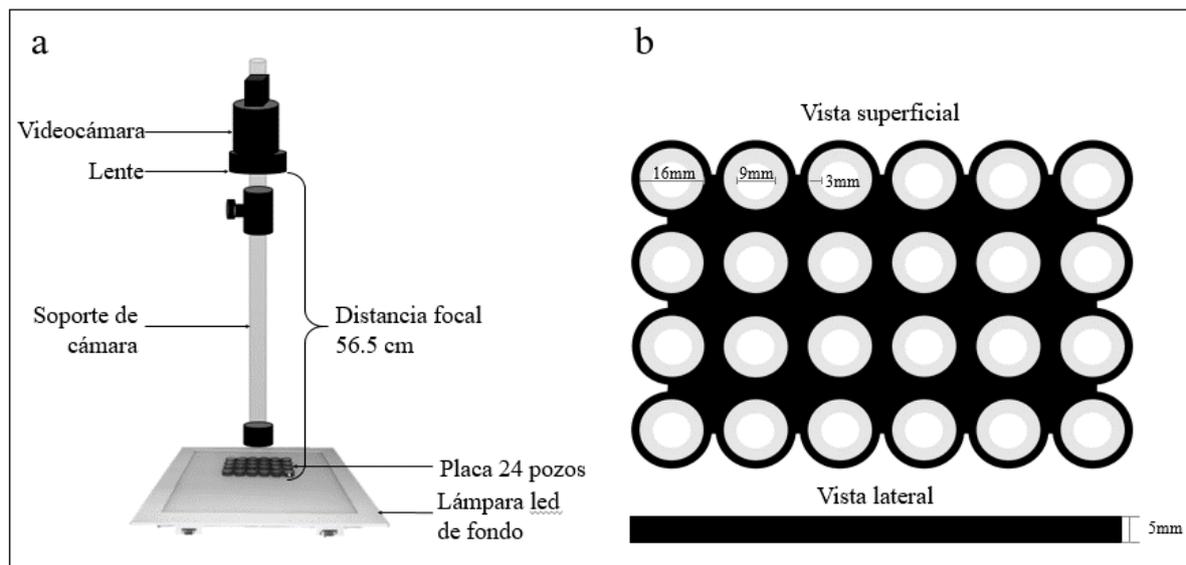
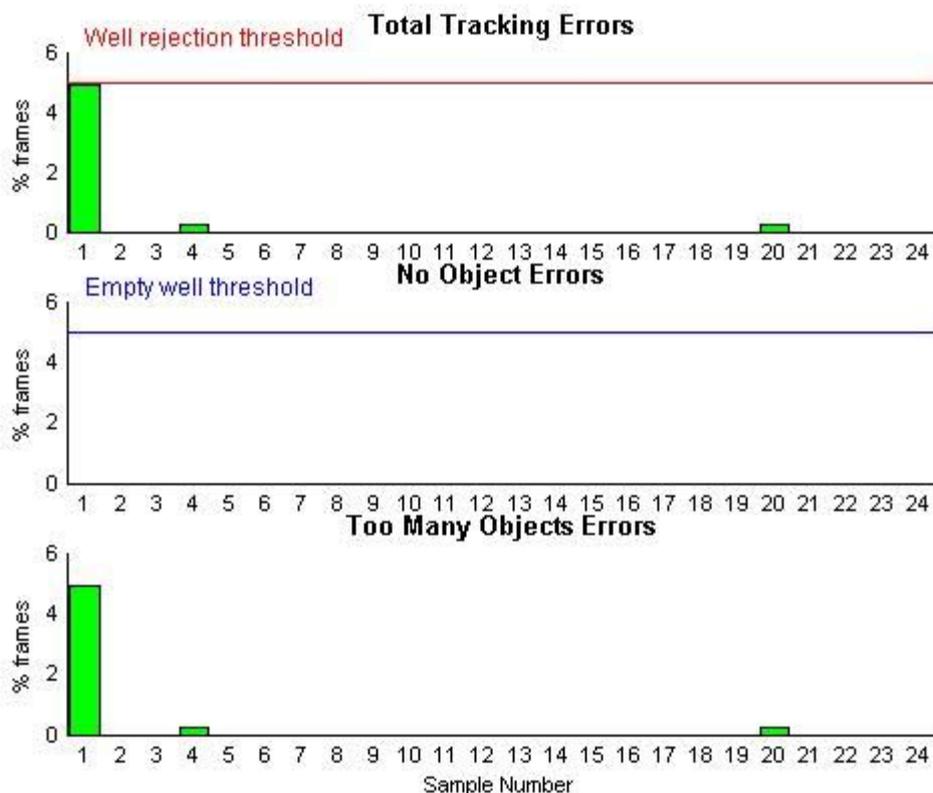
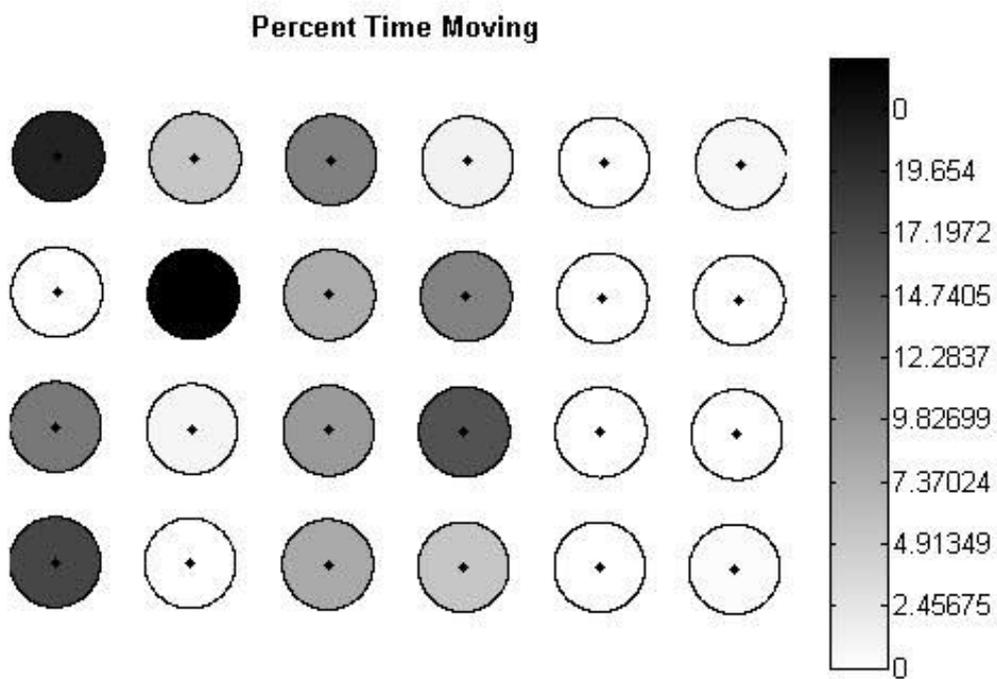
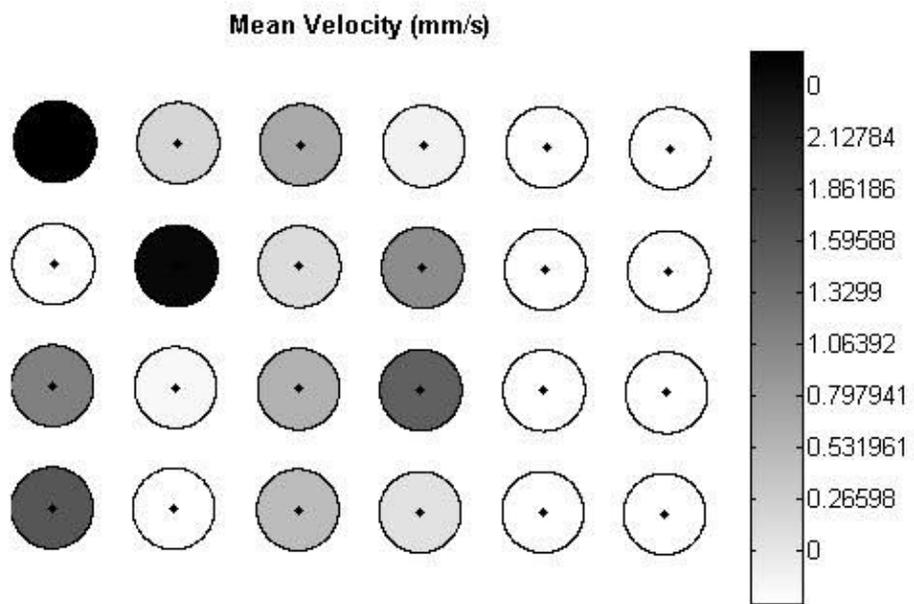


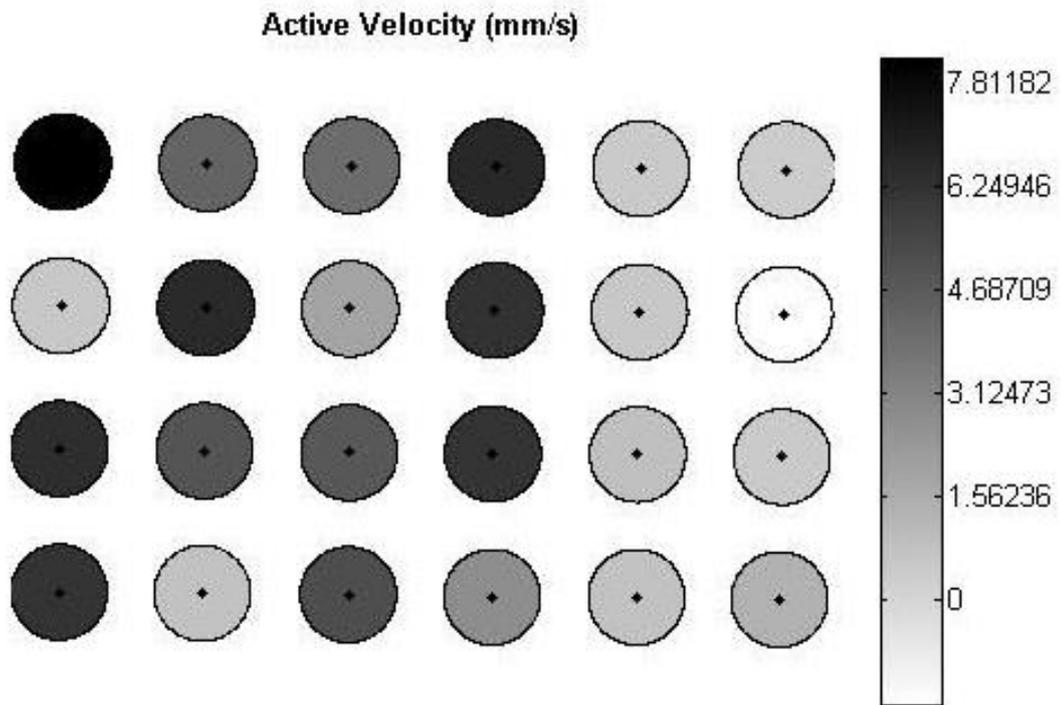
Figura 5. Diseño de equipo y material para el análisis locomotor en larvas de pez cebra. (a) set-up para videograbación de placas (b) placas de 24 pozos con delimitación de agar en la periferia de los pozos.

Resultados esperados

- Primeros 8 pozos: Etanol (Mayor Actividad)
- 9-16 pozos: Control
- 17-24: Tricaina (Sin actividad)







RESPUESTA AL ESTRÉS EN ADULTOS DE PEZ CEBRA

Práctica #3

El pez cebra (*Danio rerio*) es comúnmente utilizado como un modelo animal para la experimentación, en temas como genética, producción de fármacos y actualmente se ha vuelto muy popular en investigaciones relacionadas a las neurociencias, esto es debido a su comportamiento activo, facilidad de aclimatación a nuevos entornos, bajo costo de mantenimiento, ciclo reproductivo rápido y gran número de descendientes.

Se utilizan ensayos de comportamiento para la detección de mutaciones genéticas y drogas psicotrópicas en el pez cebra. Aquí se trabajará con el método de “novel tank” para evaluar los índices de comportamiento de ansiedad tomando en cuenta la reducción de la exploración, aumento de comportamiento de congelación y movimientos erráticos, estos son cuantificables mediante el registro manual y el video-seguimiento.

Objetivo

Medir los niveles de ansiedad en un tratamiento ansiolítico (Etanol) y el otro ansiogénico (feromona de alarma).

Materiales

- Tres peceras de tamaño mediano
- Cámara de video
- Etanol al 0.3%
- Extracto de feromona de alarma
- Agua natural
- 20 peces adultos (*Danio rerio*)

Protocolo

Siete días antes del experimento se colocan los peces para su aclimatación a las condiciones del laboratorio, 6 de ellos en etanol al 0.3%, otros 12 en agua natural y los 2 restantes serán utilizados para extraer la feromona de alarma.

Exposición crónica de etanol

Se prepara etanol al 0.3% en ellos se ponen 6 peces cebra durante 7 días, haciendo cambios de solución cada 2 días.

Extracción de feromona de alarma

Se extrae a partir de células epidérmicas de pez cebra sacrificado, para esto se debe dañar estas células con pequeño cortes de poca profundidad en la piel del

pez (puede utilizarse una navaja para afeitar), los cortes deben ser con cuidado para evitar el flujo de sangre pues contaminaría la solución. Se realiza un lavado del pez por 5 minutos en una caja Petri con 10 ml de agua destilada, se repite el procedimiento pero ahora por el otro lado del pez, se guarda en refrigeración para su preservación.

Montaje del Novel Tank (Figura 1)

Se llena una pecera mediana a la mitad con agua natural la cual deberá ser dividida por la mitad del nivel del agua con un marcador, se coloca una cámara de forma frontal a la pecera de modo que la línea divisora quede en la grabación.

Grabación

Cada uno de los peces deberá ser puesto en el cuarto de grabación para que se aclimaten por 20 minutos.

- **Crónico de etanol:** después de la aclimatación, los peces que estuvieron por 7 días en el crónico se colocarán en el novel tank con agua normal, en cuanto se haga el cambio se comienza la grabación por 6 minutos.
- **Feromona de alarma:** seguido de la aclimatación, se agregan 7 ml de la feromona de alarma al novel tank, posteriormente se colocan 6 peces que no hayan estado por 7 días en agua natural y se inicia la grabación por 6 minutos.

Es importante ir haciendo anotaciones del comportamiento del pez (ver tabla 1)

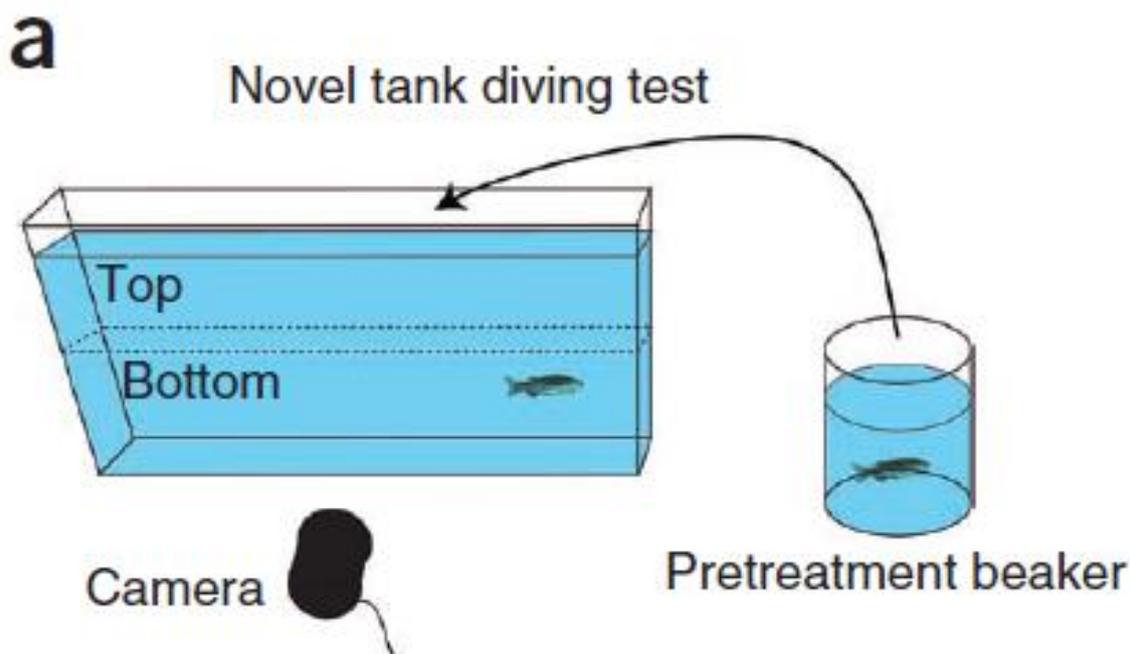


Figura 1. Montaje de Novel tank.

Un incremento del valor en cada caso indica:	
Comportamiento	Cómo obtener el valor
Bajos niveles de ansiedad	
Número de entradas a la parte superior	Contando las veces en que el pez nada a la mitad superior de la pecera (cruza línea divisora)
Tiempo pasado en parte superior	Tiempo total en que el pez pasa en la mitad superior
Duración media de entradas	Tiempo de permanencia en la parte superior dividida por el número de entradas en la parte superior
Altos niveles de ansiedad	
Latencia para entrar a parte superior	Es el tiempo que tarda el pez en cruzar a la mitad superior del tanque
Total de movimientos erráticos	Total de movimientos bruscos, como cambios de dirección.
Frecuencia de episodios de congelación	Es el periodo de inmovilidad del pez, pueden durar 1s y se caracteriza por tener sólo movimiento de ojos y branquias
Duración de congelación	El total de tiempo dedicado a episodios de congelación

Tabla 1. Relación de comportamiento con los niveles de ansiedad.

Resultados esperados

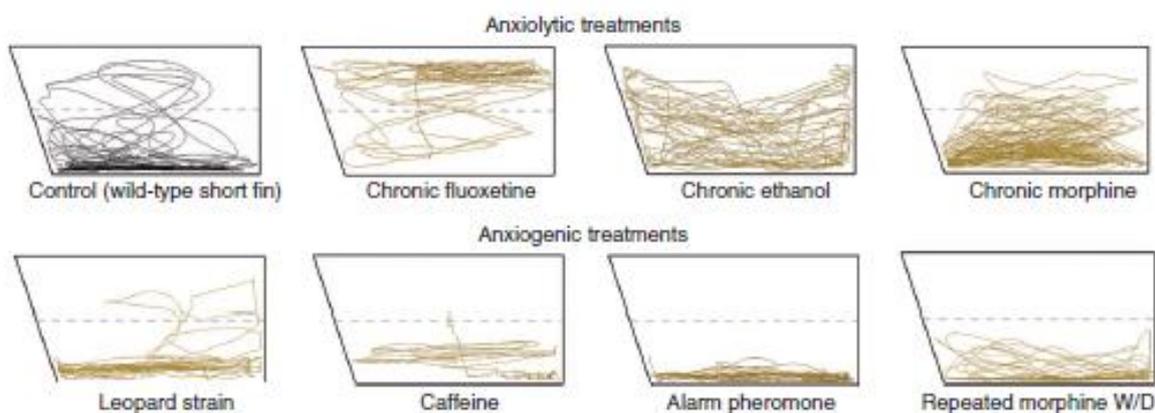


Figura 2. Representación típica de trazas de comportamiento de pez cebra en la prueba de Novel tank por 6 minutos.

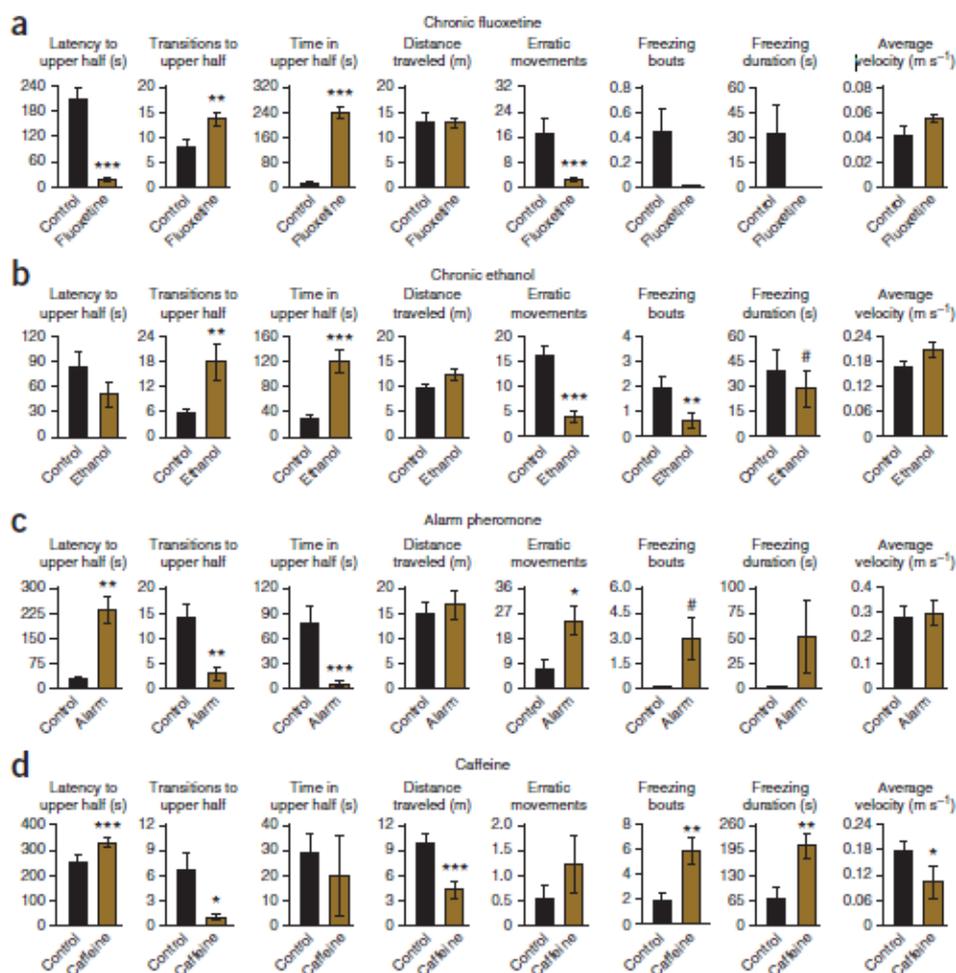


Figura 3. Efectos de comportamiento de las manipulaciones ansiolíticos y ansiogénicos en adultos del pez cebra en la prueba del Novel tank por 6 minutos.

Referencias

Cachat J, Stewart A, et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. Nature protocols. Vol. 5 No. 11, 1786-1799 (2010).

Egan R. J., Bergner C. L., et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. El Sevier. Behavioural Brain Research 205, 38-44 (2009).

MECANISMO DE COMPORTAMIENTO AGRESIVO EN *Betta Splendens*:
EXPERIMENTO FISIOLÓGICO NO INVASIVO CON APLICACIÓN DE
FLUOXETINA.

Práctica #4

Introducción

Es posible explorar los mecanismos de comportamiento agresivo en vertebrados. La expresión del comportamiento agonístico del pez betta, sobre los límites del territorio permite un acceso exclusivo a recursos (comida, parejas, sitios de anidación) que son importantes para reproducción y sobrevivencia. La agresión territorial puede tomar una variedad de formas, incluyendo el comportamiento de vigilancia y patrullaje, exhibición de vocalizaciones, perseguimiento de intrusos y entrar en combate físico.

Los patrones de comportamiento agresivo en el pez betta incluyen la apertura del opérculo, aletas, y cola mientras encara al oponente; nado con uno de los lados del cuerpo al frente; y ataque físico al intruso. Estos peces son útiles en el laboratorio debido a su facilidad para observar y cuantificar su comportamiento agresivo, ya que los machos exhibirán un alto nivel de agresión cuando se coloquen frente a un espejo.

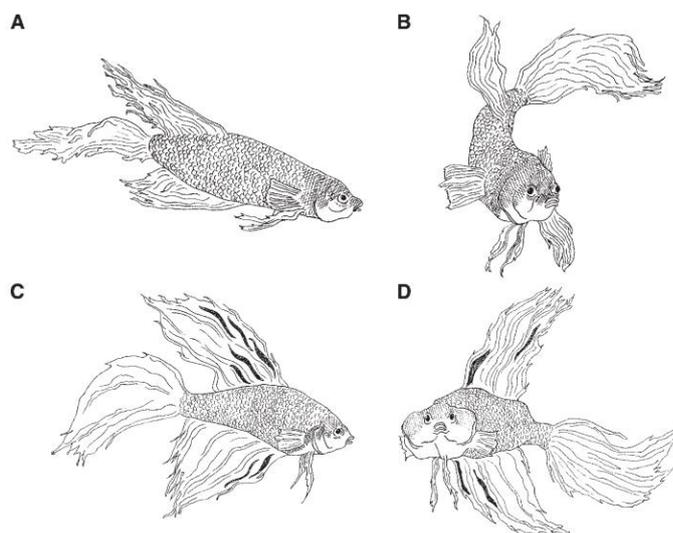


Figura 1. *Betta splendens*, posiciones no agresivas (A, B), y agresivas (C, D) con zona opercular abierta.

El neuromodulador de serotonina es un regulador importante del comportamiento agresivo en vertebrados. Experimentalmente incrementa los niveles sinápticos de la serotonina con fluoxetina, un inhibidor selectivo de la receptación de serotonina (SSRIs), que ha mostrado disminuir la expresión del comportamiento agresivo. La Fluoxetina puede administrarse no invasivamente a los machos *Betta splendens*, lo cual te permite investigar experimentalmente los mecanismos fisiológicos del comportamiento agresivo. Una exposición corta (3 h) con una concentración baja de 10ppm de fluoxetina es suficiente para reducir la expresión específica del comportamiento agresivo. Este ejercicio enfatiza el rol del sistema serotoninérgico

Fisiología animal

regulando la agresión, la interacción de contaminantes ambientales y la fisiología en regulación de expresión del comportamiento.

Competencia

Los objetivos de este laboratorio son demostrar:

- Las interrelaciones de la fisiología y comportamiento de *B. Splendens*,
- El rol del sistema serotoninérgico en el control neural del comportamiento agresivo
- Mecanismo de acción de SSRIs y la importancia de las bombas de reabsorción de neurotransmisores.
- Interacción de contaminantes ambientales y fisiología animal en la regulación de expresión del comportamiento.
- Aspectos del diseño experimental y análisis estadísticos que son útiles cuando los tamaños de muestras son bajos y la variación individual es alta.

Materiales y Equipo

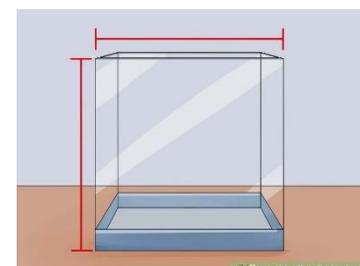
Individual:

- 1 pez betta
- 1 pecera 2lt.
- 1 espejo (24 x 27 cm aproximadamente)
- 1 regla (30 cm)
- Videocámara o cámara de teléfono
- Fórmula para alimentación de bettas
- Recipiente con tapadera ajustada (200 ml)
- Solución de fluoxetina 10ppm

Metodología

1 semana previa al experimento:

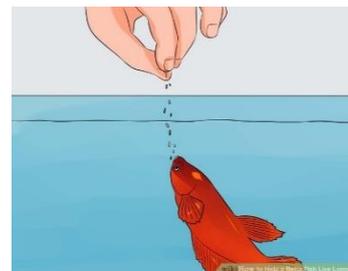
- Por equipo, se necesita un pez Betta macho, que se debe colocar en una pecera pequeña con 1.5 lts de agua.
- El pez debe ser aclimatado dentro de su pecera, en el lugar que se desarrollara el experimento desde una semana anterior, evitando mover la pecera de lugar durante este tiempo.
- Cubrir la pecera en tres de sus paredes con hojas de papel blanco, así el pez no podrá ver a otros machos en las peceras vecinas. Una de las paredes grandes debe



Fisiología animal

quedar descubierta para realizar las observaciones de comportamiento durante el experimento.

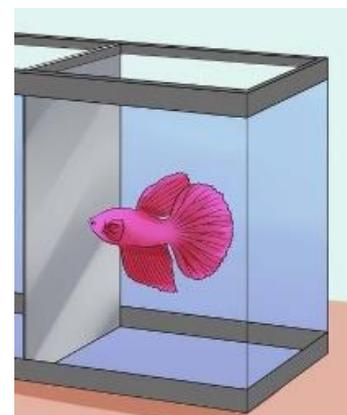
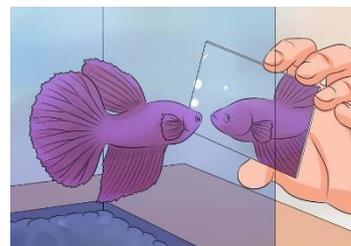
- Colocar una regla (30cm) en la base del lado descubierta para medir la posición del pez, en relación con el espejo



Nota: El pez debe ser alimentado diariamente tratando de hacerlo en un horario uniforme durante todo el desarrollo de este experimento.

Protocolo de tratamiento y grabación de comportamiento

1. Agrupar la mitad de los peces del grupo como control, y la otra mitad de los peces como tratados.
2. Preparar una solución Stock de 0.1mg/ml de fluoxetina con agua destilada.
3. A partir de la solución Stock preparar una a concentración de 10ppm de fluoxetina.
4. Remover el pez de su pecera y colocar en un contenedor transparente de 200 ml con una tapadera ajustada que tiene un orificio en el centro (los contenedores en los cuales los betas fueron comprados en la tienda de mascotas, son ideales contenedores de tratamiento). El contenedor debe contener la solución de fluoxetina y debe colocarse dentro de la pecera en el cual se encontraba, de manera que flote en el centro durante toda la duración del tratamiento, para asegurarse que la temperatura del agua y el campo visual asociado con el entorno del pez no cambie drásticamente durante el periodo de tratamiento.
5. Exponer al pez en el tratamiento durante 4 horas.
6. Remover al pez de los contenedores usando una red y rápidamente colocarlo en su pecera. Debe aclimatarse durante 15 minutos.
7. Colocar el espejo dentro del agua, en uno de los lados del tanque con el lado reflejante frente al pez (el pez debe ver su reflejo).
8. Grabar el comportamiento agresivo del pez durante 5 minutos a través del lado de la pecera que quedo descubierta.
9. Al concluir, remover el espejo del tanque.



Se deberá registrar:

- La latencia de la primera exhibición agresiva, tiempo (s) con la zona opercular abierta y tiempo (s) que pasa el pez dentro de los 10 cm cercanos al espejo.
- El número de giros de 90° que realizo el macho durante la exhibición.

Fisiología animal

- Distancia del espejo al pez (cm) cada 5 segundos durante los 5 minutos de la prueba.

Recomendaciones para plasmar los resultados y análisis

Análisis de datos

PERFIL DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS EN HUMANOS

Reporte #2

Objetivo: Este trabajo tiene como objetivo estudiar el funcionamiento de los sistemas denominados periféricos, entre los que se encuentran, el sistema cardiorespiratorio, muscular, digestivo y renal. Con el objetivo de comprender su funcionamiento y las implicaciones en diversas áreas biológicas particularmente en la investigación biomédica básica y clínica, El equipo hará un análisis extenso de diversos procesos fisiológicos utilizando como sujeto a los integrantes del curso, durante las sesiones recopilará los datos obtenidos por otros grupos para hacer un perfil extenso y un análisis comparativo entre hombres y mujeres. También se espera que al finalizar realiza diferentes análisis de regresión con el objetivo de correlacionar variables fisiológicas entre los mismos individuos. **El estudio deberá incluir el análisis de los siguientes parámetros:**

- Electromiograma y función muscular
- Análisis de la función respiratoria (respirometría)
- Respuesta cardio-respiratorio al frío
- Análisis de la función renal
- Glucosa posprandial

ELECTROMIOGRAMA Y PROPIEDADES DE LOS MÚSCULOS

Práctica #1

Introducción.

Electromiograma

En la primera parte de este laboratorio, deberá estudiar la actividad eléctrica del músculo esquelético registrando el electromiograma (EMG) de un voluntario. Deberá analizar el EMG de acciones musculares tanto voluntarias como provocadas y medir la velocidad de conducción nerviosa. La electromiografía es una técnica que mide la actividad eléctrica de los músculos y nervios que los controlan. El registro obtenido se llama electromiograma, los estudios de conducción nerviosa miden con qué eficacia y a qué velocidad los nervios pueden enviar señales eléctricas.

Existen dos métodos para realizar este registro: con electrodos de aguja insertados en el músculo a través de la piel, o con electrodos colocados sobre la superficie de la piel. El tamaño y la forma de la onda medida proporcionan información acerca de la capacidad de respuesta del músculo al estimular los nervios.. Su análisis permitirá distinguir entre una debilidad muscular provocada por alteraciones neurológicas y otras afecciones..

Efectuaremos tres ejercicios de la primera parte:

1. Cambio voluntario en la fuerza contráctil.

Registre el EMG durante las contracciones musculares voluntarias e investigue cómo cambian las fuerzas contráctiles con una mayor demanda.

2. EMG evocado.

En este ejercicio, registraremos las respuestas EMG evocadas por la estimulación del nervio medial de la muñeca.

3. Velocidad de conducción de nervio.

En este ejercicio mediremos la velocidad de conducción nerviosa a partir de las diferentes respuestas de latencia evocadas por la estimulación nerviosa en la muñeca y el codo.

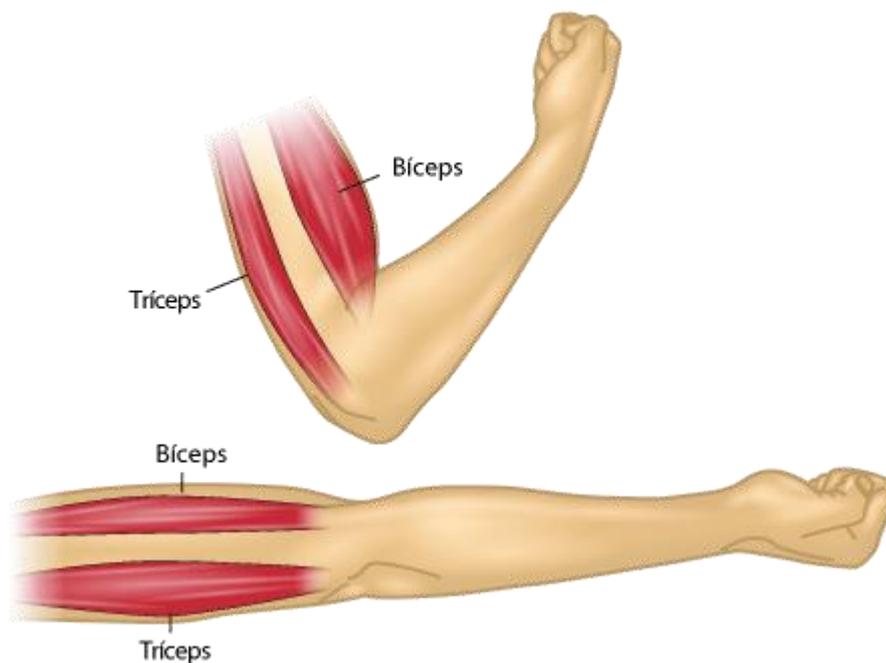
Propiedades de los músculos

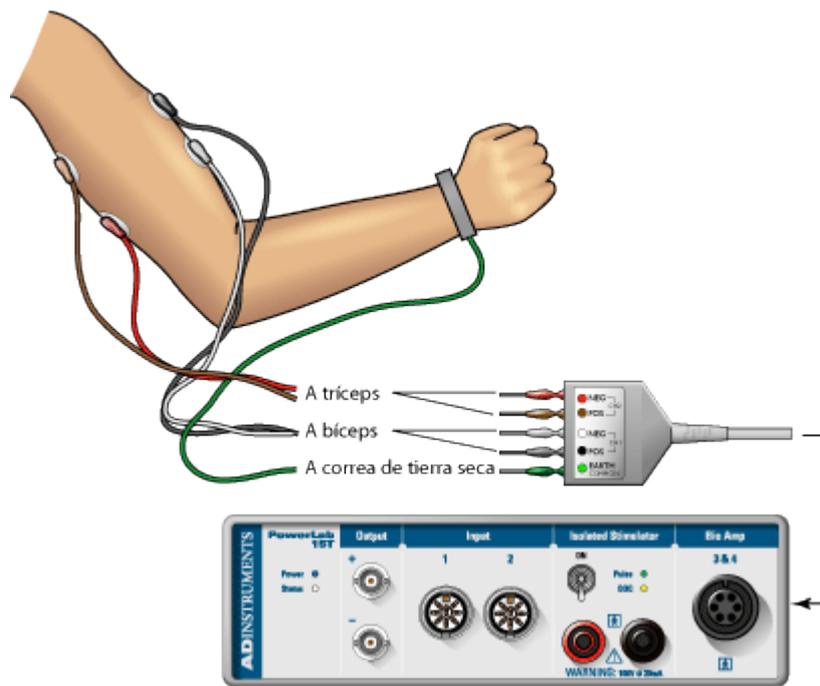
En una segunda parte se explorará cómo funcionan los músculos y examinará algunas de las propiedades del músculo como la fatiga muscular y la tetanización. Bajo frecuencias de estimulación altas, el músculo no tiene tiempo para relajarse entre estímulos sucesivos. Esto resulta en una contracción continua, mucho más fuerte que la de una contracción simple. Se trata de una contracción tónica y se dice que el músculo se encuentra en estado de "contracción tetánica. En el último ejercicio, la fuerza prensil ejercida por la mano será registrada mediante un transductor de fuerza de prensión para investigar el fenómeno de la fatiga muscular.

En la segunda parte se realizarán dos ejercicios:

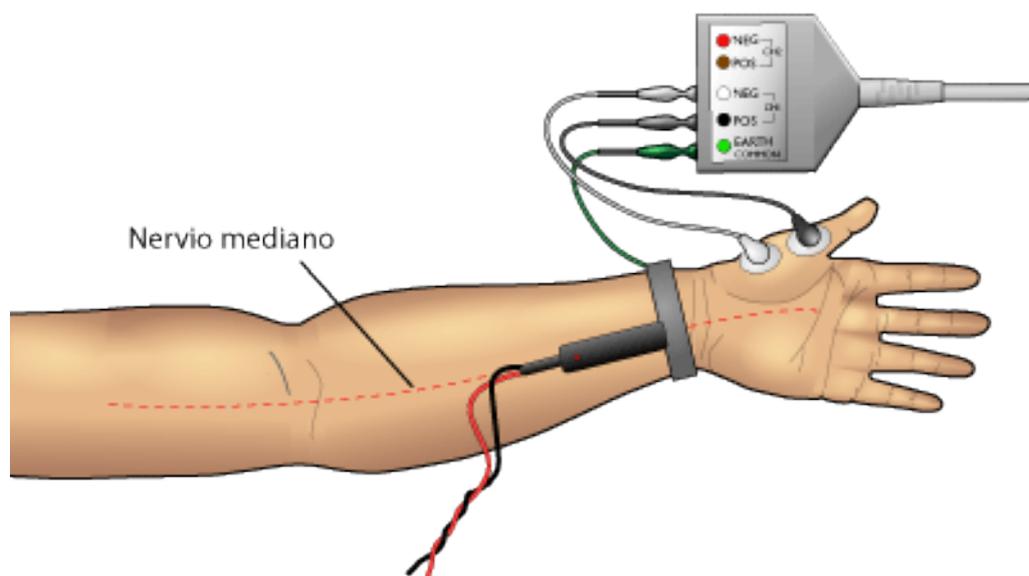
- 1 Tétanización.** Induzca y observe una contracción tetánica corta en un estudiante voluntario.
- 2 Fuerza de sujeción y fatiga.** Calibre un dinamómetro manual y mida la disminución en la fuerza máxima durante una contracción sostenida.

Montaje del equipo y posición de electrodos





Montaje para estudiar las fuerza contractiles



Montaje para estimular el nervio mediano.

Actividades a realizar

- Determinar el umbral.
- Respuesta de contracción.
- Respuesta de sumación.
- Respuesta de contracción tetánica

PRÁCTICA #2

Introducción

Muchos mamíferos exhiben una disminución de la frecuencia cardiaca (bradicardia) y reducen su circulación sanguínea durante los periodos en los que mantienen la respiración mientras se sumergen en un medio acuático. Las respuestas varían enormemente entre los taxa, con algunos de los más pronunciados en los mamíferos marinos.

Los cambios fisiológicos están relacionados con “la respuesta al buceo”. Estos varían de un organismo a otro pero usualmente consiste en la bradicardia y disminución del flujo sanguíneo en las extremidades. Parece ser que este reflejo es una protección para los mamíferos acuáticos, ayudando a los animales a conservar oxígeno. De hecho, en agua fría, el consumo de oxígeno aumenta a medida que se intenta producir más calor por medio de temblores. El agua dispersa el calor lejos del cuerpo, 24 veces más eficientemente que en el aire, y para evitar este enfriamiento el cuerpo actúa constriñendo los vasos sanguíneos en los pulmones, así el cuerpo es capaz de mantener un gran porcentaje de su sangre en el torso.

Los componentes esenciales de la respuesta al buceo en el humano son un rápido comienzo de la bradicardia, y la vasoconstricción periférica por lo que la sangre se desvía hacia el torso. Esto causa un incremento en el volumen de sangre que regresa al corazón, y resulta en un incremento significativo de la presión arterial. Para compensar el incremento, habrá un descenso en la frecuencia cardiaca.

La respuesta al buceo se desencadena por el sumergimiento repentino de la cara en agua fría. Esto estimula a los receptores del nervio trigémino que se encuentran alrededor de la nariz. Al descender la temperatura del agua, la estimulación de los receptores se mejora y la severidad de la bradicardia incrementa. La estimulación mejorada de estos receptores con agua fría resulta en una inhibición del centro cardiovascular, así como una subsecuente reducción de la frecuencia cardiaca a través de ambos, en la salida parasimpática como en la reducción de la salida simpática hacia el corazón.

El estrés por frío repentino causa una descarga masiva del sistema nervioso simpático y la liberación de norepinefrina. Esto provoca respuestas en el sistema cardiovascular que incluyen la constricción de las arteriolas, aumento de la frecuencia cardiaca y el aumento de la contractibilidad cardiaca. Estas respuestas se combinan para incrementar la presión sanguínea. Esto se conoce como respuesta opresora y la prueba con estrés frío se conoce como prueba opresora del frío.

Cambios en la circulación periférica inferida de plestimografía de oclusión venosa.

Fisiología animal

Un esfigmomanómetro colocado alrededor del muslo se puede utilizar para bloquear el retorno venoso de la sangre de la pierna. Una presión de 60mmHg es suficiente para lograr esto. Durante la oclusión venosa, la sangre continua fluyendo en la pierna haciendo que el volumen de la pierna aumente lentamente. Cuando se suelta el esfignomanómetro, la sangre venosa puede regresar al cuerpo y el volumen de la pierna disminuye rápidamente. Se utiliza un transductor de cinta respiratoria colocado alrededor de la pantorrilla para medir la disminución del volumen de la pierna.

Se completaran dos ejercicios:

1. Grabación de frecuencia cardíaca en reposo y la amplitud durante una inmersión simulada. Se debe investigar los efectos de una inmersión simulada sobre la frecuencia cardíaca y la amplitud del pulso.
2. Grabación de los cambios en el pulso en reposo y el volumen de la pierna durante la retención de la respiración. Se debe investigar los efectos de contención de la respiración en el ritmo cardíaco y la amplitud del pulso.

Se examinarán los cambios fisiológicos, mientras que la cara del voluntario se sumerge en agua fría.

Competencia

- Describir y explicar las vías del control fisiológico que subyacen a la respuesta de la presión sanguínea a la prueba del frío.
- Desarrollar una hipótesis y diseñar un experimento para probarlo
- Recopilar y analizar datos y dibujar conclusiones apropiadas
- Diseño de crítica experimental para perfeccionar futuras exploraciones de nivel de actividad.

Materiales y Equipo

- Power Lab
- Cinturón transductor respiratorio
- Transductor de pulso digital
- Esfigmomanómetro
- Estetoscopio
- Balde
- Hielo
- Termómetro
- Cinta adhesiva

Metodología

Fisiología animal

Se trabajará con 16 voluntarios (8 mujeres y 8 hombres), los cuales se someterán a 3 ejercicios: apnea y 2 de buceo a diferentes temperaturas (4°C y temperatura ambiente). Los datos a tomar en cuenta son: la presión sanguínea y frecuencia cardiaca.

La hoja de datos se muestra en la tabla 1 y 2.

Apnea

1. Tomar presión sanguínea y frecuencia cardiaca del individuo antes de realizar el ensayo (t = 0s)
2. El voluntario deberá aguantar la respiración por 60s, tomando cada 30 segundos la PS y FC.
3. Pasados los 60s, se procede a tomar los datos de la recuperación, a los tiempos de: 30s, 60s y 120s.

Inmersión a temperatura ambiente.

1. Preparar un balde con agua a temperatura ambiente y tomar presión sanguínea y frecuencia cardiaca en el tiempo 0s.
2. Sumergir la cabeza dentro del agua por 1 minuto. Si el frío se vuelve doloroso, el sujeto deberá retirar la mano en cualquier tiempo.
3. Determinar la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca cada 30 segundos.
4. Remover al sujeto del agua fría.
5. Inmediatamente medir la presión sanguínea sistólica y diastólica y contar la frecuencia cardiaca en los tiempos: 30s, 60s y 120s.

Inmersión a temperatura ambiente.

6. Preparar un balde con agua a temperatura ambiente y tomar presión sanguínea y frecuencia cardiaca en el tiempo 0s.
7. Sumergir la cabeza dentro del agua por 1 minuto. Si el frío se vuelve doloroso, el sujeto deberá retirar la mano en cualquier tiempo.
8. Determinar la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca cada 30 segundos.
9. Remover al sujeto del agua fría.
10. Inmediatamente medir la presión sanguínea sistólica y diastólica y contar la frecuencia cardiaca en los tiempos: 30s, 60s y 120s.

Calcular el promedio normal de la presión sanguínea sistólica y diastólica de los datos obtenidos antes de la inmersión. (Los sujetos que incrementan su presión sanguínea sistólica un 25 o más de mmHg o en la presión sanguínea diastólica en 20 o más mmHg son considerados hiperreactivos).

HOMBRES		Pre	Apnea		Recuperación			Pre	Inmersión 15°C		Recuperación		
Tiempo (s)		0s	15s	30s	30s	60s	120s	0s	15s	30s	30s	60s	120s
1	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
2	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
3	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
4	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
5	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
6	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
7	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												
8	Frecuencia cardiaca												
	Presión sanguínea diastólica												
	Presión sanguínea sistólica												

Tabla 1. Registro de datos para hombres.

	MUJERES	Pre	Apnea			Recuperación			Pre	Inmersión 15°C		Recuperación		
		0s	15s	30s	30s	60s	120s	0s	15s	30s	30s	60s	120s	
1	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
2	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
3	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
4	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
5	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
6	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
7	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													
8	Frecuencia cardiaca													
	Presión sanguínea diastólica													
	Presión sanguínea sistólica													

Tabla 2. Registro de datos para mujeres.

Realizar el mismo análisis para la temperatura #2 (15°C).

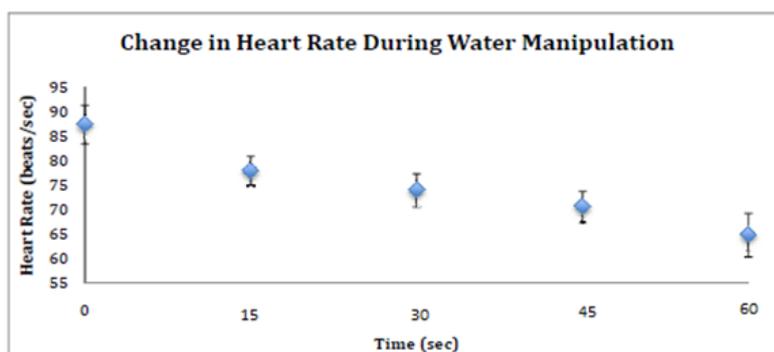
Resultados

Presentar los datos como gráficas. Se pueden graficar los valores de presión sanguínea sistólica y diastólica y posteriormente calcular y graficar el promedio de la presión sanguínea. Puede incluirse la frecuencia cardiaca en un eje separado de la misma gráfica.

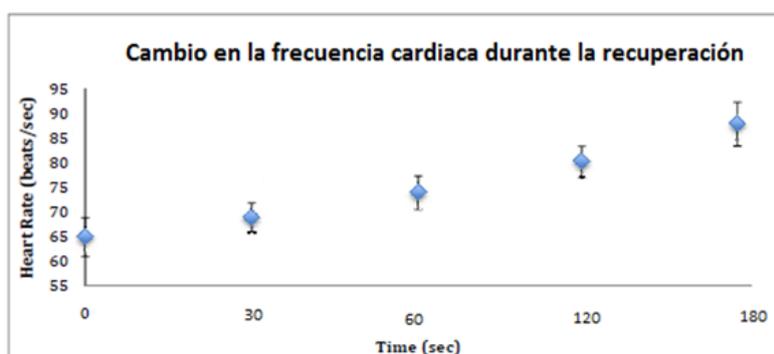
Se deberán incluir análisis estadísticos con pruebas t-Student.

En todas las gráficas se deben plasmar los resultados obtenidos de hombres vs mujeres.

Las barras de error representan la variabilidad entre individuos



Frecuencia cardiaca mientras se tiene la cabeza sumergida en el agua a 4°C en diferentes tiempos (0s, 15s, 30s, 45s y 60s).



Frecuencia cardiaca durante la recuperación, después de haber tenido la cabeza sumergida en el agua a 4°C. Tiempos: 0s, 30s, 60s, 120s y 180s.

- Realizar gráfica similar para la presión sanguínea diastólica y sistólica.
- Registrar la recuperación de la frecuencia cardiaca, la presión sanguínea diastólica y sistólica.
- Los resultados de hombres y mujeres se representan en la misma gráfica.

Ejercicio 1. Simulación de inmersión y frecuencia cardiaca en reposo

- 1) Describe cualquier cambio en la frecuencia del pulso durante y después de la inmersión simulada.
- 2) Describe cualquier cambio en la amplitud del pulso durante y después de la inmersión simulada

Ejercicio 2. Sostener la respiración y frecuencia cardiaca en reposo

- 1) Compara los efectos del buceo y de sostener la respiración en la frecuencia del pulso. Fueron los mismos?
- 2) Compara los efectos de la inmersión simulada versus sostener la respiración en la amplitud del pulso. Fueron los mismos?
- 3) Cuales factores ambientales pueden explicar las diferencias entre sostener la respiración y el buceo?
- 4) Compara los cambios en la frecuencia cardiaca durante la inmersión entre los miembros de otros grupos. Es el efecto entre los individuos similares?

Ejercicio 3. Respuesta al buceo y circulación periférica

- 1) Tus resultados para el volumen de la pierna sugiere que la circulación periférica cambia durante la inmersión?
- 2) Tus resultados para el volumen de la pierna sugiere que la circulación periférica cambia al sostener la respiración?
- 3) Basado en tus datos, describe las potenciales ventajas y desventajas de la respuesta al buceo. Que otros factores deben tenerse en cuenta durante una inmersión real que no fueron simulados en este experimento?
- 4) Cual fue el curso del tiempo de la respuesta al buceo? Cuánto tiempo se tarda en producirse la respuesta? Que tan rápido regreso a su frecuencia cardiaca normal después de la inmersión?

ESTUDIO DE PROCESOS DIGESTIVOS Y REGULATORIOS A TRAVÉS DE LA EXPLORACIÓN POSTPRANDIAL DE GLUCOSA EN SANGRE

Práctica #3

Introducción

Esta práctica provee un enfoque a los procesos digestivos y regulatorios a través de la exploración postprandial de niveles de glucosa en sangre. El ejercicio consiste en participar en un test de tolerancia a glucosa con tres tratamientos basados en un desayuno típico de estudiantes: 1) Alta carga glicémica (HGL), 2) Moderada carga glicémica (MGL), y 3) Baja carga glicémica (LGL). El valor calórico es de 540 kcal. Se utiliza un glucómetro para determinar inmediatamente, a los 30, 60 y 120 minutos el nivel postprandial de glucosa en sangre. Lo que permite descubrir los niveles de glucosa para cada uno de los tratamientos.

Se deberá discutir sobre la importancia de la homeostasis de glucosa, plasmar resultados gráficamente, revisar literatura para describir los resultados en base a datos publicados y describir relaciones entre hiperglicemia e hiperinsulinemia así como el proceso de la enfermedad.

Competencia

Describir conceptos relacionados con el proceso metabólico de glucosa, así como la descripción de la regulación en niveles de glucosa en sangre, explicando los mecanismos de liberación de insulina en páncreas y el transporte de glucosa a través de tejidos periféricos estimulado por insulina. Analizar los niveles normales de glucosa, para predecir el nivel postprandial basado en la dieta. Discutir acerca de la importancia de la regulación de niveles de glucosa en sangre.

Materiales y Equipo

1. Glucómetro.
2. Tiras para pruebas en glucómetro. 1 por estudiante.
3. Solución control para glucómetro.
4. Lancetas o pluma disparadora para lancetas. 1 por estudiante.
5. Torundas con alcohol.
6. Contenedores de objetos punzocortantes con riesgo biológico.
7. Bolsas rojas de riesgo biológico.
8. Venditas

Alimentos:

1. Bebida energética o mountain dew (8oz, 1/estudiante)
2. Pop-tarts (cualquier sabor, 2/estudiante)
3. Plátanos (mediano, maduro, 1/estudiante)

Fisiología animal

4. Bagel (mediano, integral o blanco, 1/estudiante)
5. Crema de cacahuete (cucharadas soperas, 2/estudiante)
6. Dedos de queso (1 oz, 4/estudiante)
7. Rebanada de jamón (200 g, 16 rebanadas/estudiante).

Metodología

Las comidas fueron seleccionadas en base a la alimentación típica de estudiantes durante las mañanas y agrupadas para proveer variaciones en la concentración de glucosa. La bebida energética y pop-tarts proveen un nivel relativamente alto de glucosa (HGL); el bagel, la banana y la crema de cacahuete proveen un moderado nivel de glucosa (MGL); y el jamón con queso proveen un bajo nivel de glucosa (LGL).



1 semana previa al experimento:

1. Seleccionar uno de los 4 tratamientos
2. Se debe evitar hacer ejercicio excesivo, así como seguir una dieta balanceada, ya que tanto la dieta como el ejercicio pueden impactar en los resultados.

1 día previo al experimento:

1. Comprar alimentos
2. Dividir cada uno de los tratamientos con las raciones establecidas

El día del experimento:

1. El alumno debe presentarse en ayunas o haber tomado un desayuno ligero al menos 6 horas antes del laboratorio
2. Calibrar el glucómetro

Determinar nivel de glucosa en ayuno-

3. Utilizar torundas con alcohol para limpiar la punta del dedo que será utilizado para tomar la muestra se sangre.
4. Colocar una lanceta en la pluma para lancetas y pinchar el dedo, posteriormente colocar una gota de sangre en la tira del glucómetro (seguir las instrucciones del glucómetro), el glucómetro determinara el nivel de glucosa.
5. Desechar las tiras y lancetas en la bolsa de desechos biológicos y en el contenedor de punzocortantes respectivamente. Limpiar la punta del dedo con alcohol y cubrir con una venda.

Determinar nivel de glucosa después del ingerir el alimento-

6. Se tendrá un tiempo 20 min para consumir el alimento fuera del laboratorio.

Fisiología animal

7. Al regresar al laboratorio el tiempo será registrado en tiempos de muestreo de 30, 60 y 120 minutos postprandial y los datos serán registrados en la tabla de datos.
8. Repetir los pasos 3 a 5, obteniendo la muestra de sangre en los periodos de tiempo designados.
9. Después de terminar el experimento, se deben anotar anónimamente los resultados en el pizarrón (Tabla 1).

Sexo	Ayuno	30 min	60 min	120 min
Promedio	80 ± 2.5 mg/dl	137 ± 7.1 mg/dl	151 ± 8.4 mg/dl	111 ± 7.4 mg/dl

Tabla 1. Datos referentes a nivel de glucosa postprandial.

Cuestionario

1. Entre las comidas, la concentración de glucosa en plasma se mantiene entre 75 y 100 mg/dl. Discute cómo se logra y porque es importante para la homeostasis.
2. ¿Cómo se digieren y absorben los carbohidratos? ¿Cómo está relacionada la glucosa postprandial en plasma, con el contenido en carbohidratos del alimento?
3. ¿Qué efectos tiene la grasa y proteína de una comida en el proceso de digestión y absorción? ¿Y en los niveles de glucosa e insulina postprandial?
4. ¿Qué es la insulina y cuando es secretada? ¿Una vez liberado por el páncreas, cual es el rol de la insulina?
5. ¿Qué efectos tiene la insulina en el tejido esquelético, adiposo y hepático? ¿Qué esperarías que pasara si los tejidos fueran resistentes a insulina?
6. ¿Qué es el síndrome metabólico y como está relacionado con la resistencia a la insulina?
7. ¿Que es una OGTT? ¿Cuál es el propósito de esta prueba?
8. ¿Cómo se comparan los niveles de glucosa en una prueba de OGTT con los tratamientos HGL, MGL y LGL?
9. ¿La OGTT es un buen indicador para las respuestas fisiológicas?

10. ¿Cuáles son las implicaciones en la salud de las elevaciones en glucosa o insulina? Hay alguna relación entre glicemia, insulinemia y el desarrollo de enfermedades?

Recomendaciones para plasmar los resultados y análisis:

Práctica #4

Introducción:

Competencia:

Materiales y Equipo:

Metodología:

LITERATURA

Clave indicada para biblioteca UABC-Campus Ensenada

- Moyes Christopher D. 2007. Principios de fisiología animal. QP31.2 M6918 2007
- Hill, Richard W. 2006. Fisiología Animal. QP31.2 H5518 2006