

PAUTAS DE PROCEDIMIENTOS PARA LAS

PRÁCTICAS DEL CONCURSO DE AYUDANTE DE FISIOLÓGÍA

MATERIAL ELABORADO POR LOS ASISTENTES DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Alberto Rafael - Claudia Pascovich - Esteban Pino – Juan Manuel Castro –Lucía Zubizarreta
– Marcela Alsina – Matías Cavelli – Mayda Rivas - Santiago Castro

COORDINACIÓN Y EDICIÓN

Esteban Pino



*Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina*

2020



CARACTERÍSTICAS Y USO DE ESTA GUÍA

En este material son presentados los **preparados** y **dispositivos experimentales** empleados en las **prácticas** que integran la segunda prueba del *Concurso de Ayudante del Departamento de Fisiología*. Se presenta además en cada caso una selección de **procedimientos** y **maniobras experimentales** específicos para cada preparación. El material se divide en las siguientes secciones:

1. Preparación para el estudio de las propiedades mecánicas del **pulmón aislado**.
2. Preparación para el estudio electrofisiológico del **nervio ciático aislado**.
3. Preparación para el estudio *in vitro* del **útero aislado**.
4. Preparación para el estudio *in vitro* del **intestino aislado**.
5. Preparación para el estudio *in vivo* de la **transmisión sináptica neuro-muscular**
6. Preparación para el estudio *in vivo* de la **actividad mecánica y eléctrica del corazón**.

En cada una de estas secciones se detalla:

- a) Las características generales de los **preparados** y los **diseños experimentales** correspondientes a cada práctica.
- b) El procedimiento para la **obtención de los preparados biológicos** y su **montaje** en el **dispositivo experimental** correspondiente.
- c) Un **conjunto seleccionado** de **maniobras experimentales**, detallando los procedimientos fundamentales para su ejecución.
- d) Recomendaciones generales para el **análisis** y la **interpretación** de los resultados obtenidos a partir de las **maniobras experimentales** realizadas, con instrucciones referidas al uso de programas de procesamiento de datos de uso habitual en el salón de clases prácticas (SCP) de Fisiología.
- e) En algunas de estas secciones se ha incluido un breve capítulo de **INTRODUCCIÓN**, en el que se plantea una **justificación general** para el uso del diseño experimental detallado.

La última sección del material corresponde a un **ANEXO** en el que se incluye algunos principios fundamentales de los procesos de adquisición y digitalización de señales biológicas, características básicas de los componentes electrónicos empleados para estos procesos



(amplificadores, estimuladores, conversores A/D, transductores, etc.), así como herramientas informáticas para la adquisición y procesamiento de dichas señales.

Los procedimientos detallados en esta guía **no configuran un protocolo exhaustivo** de las prácticas, **quedando a criterio de cada aspirante la selección del conjunto adecuado de maniobras y la profundidad de análisis con la que procederá en cada caso, a los efectos de cumplir con los OBJETIVOS propuestos para cada actividad.** La definición de la HIPÓTESIS y los OBJETIVOS de cada práctica serán asimismo definidos por cada aspirante. En tal proceso, contará con el apoyo de equipos docentes asignados a cada práctica.

De modo resumido, la elaboración de una **práctica** implicará necesariamente que el aspirante:

- a) Conozca específicamente las características de las preparaciones detalladas en esta guía, así como los conceptos vertidos al material ANEXO.**
- b) Elabore el marco conceptual relevante para la realización del práctico, que presentará en la INTRODUCCIÓN al mismo, tomando eventualmente como referencia el texto contenido en este material y realizando la revisión bibliográfica correspondiente.**
- c) Plantee la HIPÓTESIS y defina los OBJETIVOS del práctico**
- d) Seleccione el conjunto de MANIOBRAS EXPERIMENTALES (del conjunto de las presentadas en este trabajo o bien, proponga maniobras adicionales/complementarias adecuado para el cumplimiento de sus OBJETIVOS.**
- e) Lleve a cabo el análisis correspondiente de los resultados obtenidos, apoyándose en algunas de las recomendaciones presentadas en este material.**
- f) Plantee la DISCUSIÓN correspondiente de sus datos y extraiga las debidas CONCLUSIONES, considerando los alcances y limitaciones de la(s) técnicas empleadas.**



(1) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL PULMÓN AISLADO

Esteban Pino

APLICACIÓN: El diseño experimental presentado en esta sección permite el análisis de la relación entre la **presión transpulmonar** y el **volumen pulmonar** [$V = f(P)$] del **pulmón aislado** en condiciones estáticas. Entre otros, este diseño permite:

- Obtener una curva de volumen pulmonar (V_p) en función de la presión transpulmonar (P_{TP}) en condiciones estáticas.
- Establecer si la relación $V_p = f(P_{TP})$ sigue una relación lineal, de la forma $V_p = a \cdot P_{TP}$, siendo $a = 1/C_p$.
- Estimar la *compliance* pulmonar (C_p) a partir de la curva $V_p = f(P_{TP})$.

1. JUSTIFICACIÓN PARA EL USO DE ESTE DISEÑO

1.1. MECÁNICA PULMONAR

El **intercambio gaseoso hemato-alveolar**, proceso central de la fisiología respiratoria, depende de tres mecanismos fundamentales:



1. La **ventilación pulmonar** ($\dot{V}, \frac{ml}{min}$), resultante de la **generación de gradientes de presión** entre la atmósfera (P_{atm}) y la luz alveolar (P_{alv}).
2. La **perfusión sanguínea pulmonar** ($\dot{Q}, \frac{ml}{min}$) y su relación con la ventilación pulmonar o relación $\dot{V}/\dot{Q}$.
3. La **difusión** de los gases a través de la **barrera hemato-alveolar**.

La **ventilación pulmonar** constituye un proceso **mecánico**, llevado a cabo por la contracción organizada de los **músculos respiratorios**. El **trabajo respiratorio** (W_{rs}) modifica el volumen de la unidad toraco-pulmonar, generando **gradientes de presión** entre la **atmósfera** y el compartimiento **alveolar** ($P_{atm} - P_{alv}$). De estos gradientes resulta el establecimiento de **flujos aéreos bidireccionales** entre la atmósfera y el alvéolo durante las fases correspondientes de un ciclo ventilatorio completo, lo que permite, en última instancia, la renovación periódica del **aire alveolar**.

Las propiedades mecánicas del pulmón y la pared torácica determinan la relación existente entre las **presiones y volúmenes pulmonares** y las **fuerzas desarrolladas por la musculatura respiratoria** para llevar a cabo el W_{rs} . La **mecánica pulmonar** analiza estas relaciones, deduciendo a partir de ellas características de la estructura y propiedades físicas de los componentes tisulares del pulmón y la pared torácica y sus implicaciones funcionales. Este es precisamente el propósito de aplicar un diseño experimental para el estudio del pulmón aislado, tal como será detallado posteriormente.

1.2. MODELO RESISTIVO-ELÁSTICO DEL PULMÓN

En este apartado se presenta un modelo simplificado de la mecánica pulmonar, cuya validez puede analizarse mediante el dispositivo experimental presentado luego.

En la **Fig. 1** se presenta un esquema simplificado del sistema respiratorio, representando a los principales componentes:

- a) Pared torácica, diafragma y músculos intercostales
- b) Pleura y cavidad pleural
- c) Pulmón (espacio alveolar)
- d) Vía aérea

En el esquema se señalan las presiones en cada sector: P_{va} , presión en la vía aérea; P_{IP} , presión intra pleural; P_{alv} , presión alveolar. Las presiones en el sistema respiratorio se expresan habitualmente en referencia a la **presión atmosférica o barométrica** (P_B), la que por razones prácticas se asumirá igual a 0 cmH₂O.

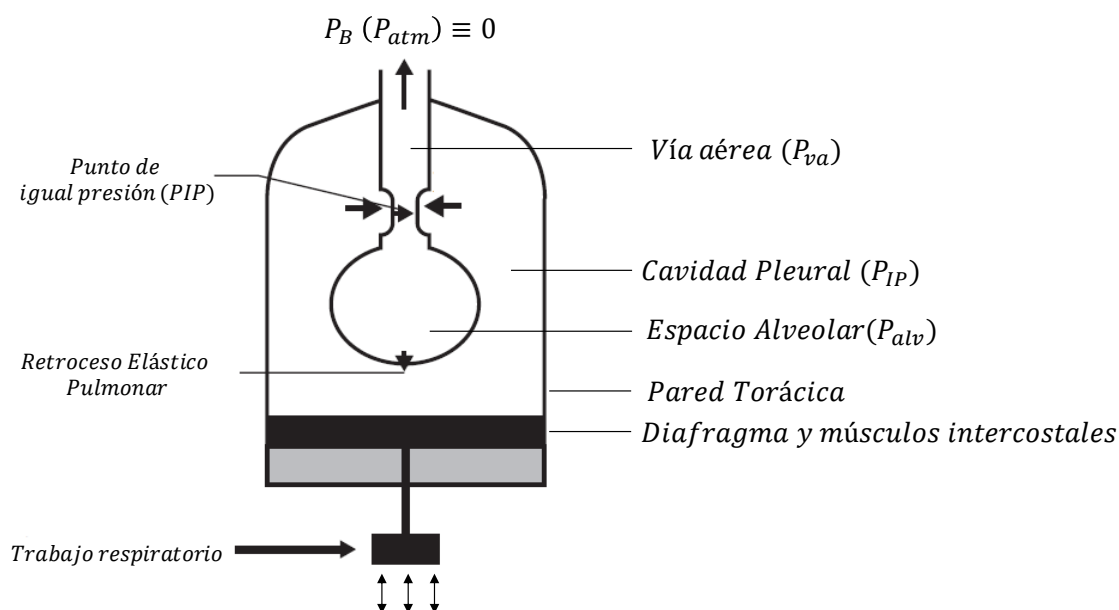


Fig. 1. Presiones en el sistema respiratorio. Explicación en el texto. Modificado de *Bruce R. Thompson and Joseph Ciorciari, "Respiratory Biophysics" in Andrew W. Wood: Physiology, Biophysics, and Biomedical Engineering. Series in Medical Physics and Biomedical Engineering. John G Webster et al. (Eds.) CRC Press, 2012.*

El pulmón y la vía aérea pueden ser representados a través de un modelo mecánico simple, conocido como **modelo resistivo-elástico** o **modelo lineal de compartimiento único**, esquematizado en la **Fig. 2.A**. De acuerdo con esta representación, el **pulmón** corresponde a un contenedor telescópico, capaz de alojar un volumen variable de aire alveolar, $V_p(t)$. Los dos sectores del contenedor se encuentran unidos por un resorte con una *constante elástica* de valor E . El pulmón se encuentra conectado a la atmósfera a través de un tubo de resistencia R_{va} . La **presión de retroceso elástico del pulmón** (P_{rel}) varía linealmente con $V_p(t)$ (**Fig. 2B**), mientras que la diferencia de presión (ΔP) entre los extremos del tubo R_{va} varía linealmente con el flujo aéreo ($\dot{V}$) a través de este (**Fig. 2C**). El parámetro indicado por E en la Fig. 2B corresponde a la **elastancia** o *módulo de Young*, y su inverso ($1/E$) a la **compliance** o *distensibilidad* pulmonar (C_p).

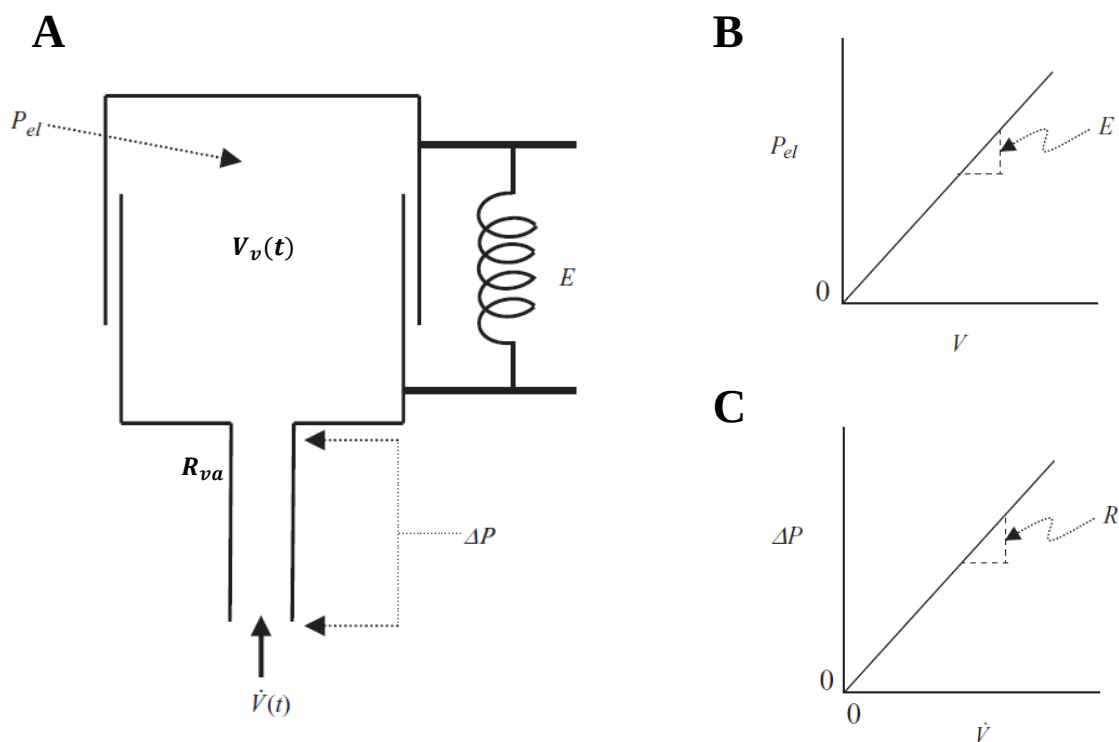


Fig. 2. Modelo de compartimiento único del pulmón. Explicación en el texto. *Modificado de. Bates, J. "The linear single-compartment model" en Bates J., Lung Mechanics An Inverse Modeling Approach. Cambridge, 2009 pp 37-61.*

El **modelo resistivo-elástico del sistema respiratorio** puede finalmente expresarse a través de la *ecuación de movimiento* correspondiente, dada por

$$P_{TP}(t) = \frac{V_p(t)}{C_p} + \dot{V}(t) \cdot R_{va}$$

Siendo

$$\frac{V_p(t)}{C_p} = P_{rel}$$

$$\dot{V}(t) \cdot R_{va} = \Delta P_{va}$$

P_{rel} corresponde a la presión de retroceso elástico del pulmón. Las presiones descritas por la ecuación precedente (P_{TP} , P_{rel} y ΔP_{va}) corresponden al **trabajo por unidad de volumen** realizado por el sistema respiratorio para producir una modificación del V_p o



un $\dot{V}$ dado (ver **ANEXO A**). De acuerdo con este modelo, entonces, el **trabajo** realizado por el sistema respiratorio, W_{rs} y, por tanto, las **presiones** desarrolladas en cada ciclo se emplean en:

a) Producir la **expansión pulmonar** durante la inspiración, realizando trabajo en contra de las **fuerzas de retroceso elástico** pulmonar (o *resistencia elástica* pulmonar, R_{el}) para alcanzar un $V_p(t)$ dado. Asumiendo que el pulmón presenta un comportamiento elástico, el trabajo realizado para vencer la R_{el} es almacenado como **energía potencial**, de modo tal que la deformación elástica que tiene lugar durante la **inspiración** constituye, según este modelo, la principal fuente de energía para la **espiración** en condiciones fisiológicas. Puesto que el W_{rs} es realizado primariamente por la musculatura respiratoria en condiciones fisiológicas, los cambios de volumen pulmonar durante la ventilación (ΔV_p) constituyen procesos de naturaleza **pasiva**.

b) El establecimiento del **flujo aéreo** a través de un sistema de conducción que ofrece una **resistencia** no nula ($R_{va} \neq 0$), determinada primariamente por las características geométricas de la vía aérea y sujeta a control neurohumoral. El W_{rs} realizado para vencer la R_{va} se disipa principalmente como calor.

La R_{el} y la R_{va} constituyen las principales fuentes de **impedancia** del sistema respiratorio, existiendo asimismo fuentes de menor relevancia cuantitativa tales como la **inercia de los gases y los tejidos**, o la **fricción** de los componentes tisulares durante la deformación.

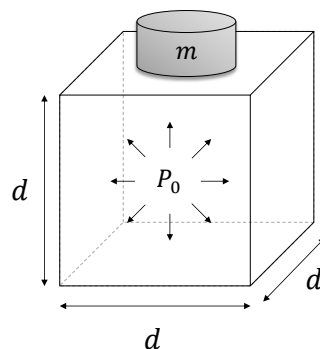
Mientras que en condiciones **dinámicas** (i.e., cuando V y $\dot{V}$ varían en función del tiempo) la caída de presión ΔP a través de la vía aérea es distinta de 0 ($\dot{V}(t) \cdot R_{va} = \Delta P_{va}$), puede deducirse inmediatamente que en condiciones **estáticas** ($\dot{V}(t) = 0$) esta caída de presión será nula ($\Delta P_{va} = 0$). En tales condiciones y dado un volumen pulmonar cualquiera, la presión total a través del sistema corresponderá únicamente a la P_{rel} pulmonar, por lo que la ecuación de movimiento antes introducida se simplifica a

$$P_{TP} = \frac{V_p}{C_p}$$

Nótese que, en estas condiciones, la P_{rel} corresponde exactamente a la P_{TP} antes definida. En suma, de acuerdo con este modelo, la relación Presión-Volumen (P-V) pulmonar en condiciones estáticas es **lineal**, caracterizándose por una constante **E** (o $C_p = 1/E$).

ANEXO A: PRESIÓN, TRABAJO Y VOLUMEN

Considere un sistema (esquemático en la figura a la derecha) constituido por un recipiente de dimensiones d^3 que contiene un líquido incompresible que lo ocupa completamente. En su cara superior (de superficie d^2) se dispone una masa (m), que ejerce una fuerza $m \cdot g$ sobre dicha superficie ($g \cong 9,8 \text{ m/s}^2$). La presión estática (P_0) ejercida sobre el líquido será:



$$P_0 = \frac{m \cdot g}{d^2}$$

Si multiplicamos al numerador y al denominador por d , la igualdad se conserva como

$$P_0 = \frac{m \cdot g \cdot d}{d^3}$$

Nótese que en el **sistema internacional de unidades** las dimensiones de $m \cdot g \cdot d$ son las de **trabajo** $[W] = \text{Kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$, mientras que las del denominador serán las de **volumen** $([V] = \text{m}^3)$. En este sentido, P_0 se puede entender como una medida de **energía por unidad de volumen**:

$$P_0 = \frac{W}{V}$$

2. MÉTODOS

2.1. ASPECTOS GENERALES

En esta práctica se analizará la relación P-V del **pulmón aislado**. Se empleará para ello una preparación *ex vivo* de pulmón-vía aérea de la rata, montada en un dispositivo experimental que permite la **modificación** y medida de la P_{TP} , y la **medida de los cambios del V_p** resultantes de dichas modificaciones en **condiciones estáticas**.



2.2. OBTENCIÓN DEL PREPARADO

Ratas adultas de la cepa *Wistar* (270-330 g) serán anestesiadas (Ketamina 90 mg/Kg + Xilacina, 5 mg/Kg, i.p.) y heparinizadas (heparina 600 IU, s.d.). Se procederá luego a la exanguinación del animal, realizando para ello una incisión abdominal mediana para acceder a los grandes vasos retroperitoneales, seccionando finalmente la aorta y la vena cava inferior. Con el animal en decúbito dorsal, se practicará una traqueotomía, introduciendo una cánula endotraqueal y fijando la misma a la tráquea para el ulterior montaje del preparado en el dispositivo experimental. Podrá eventualmente aplicarse presión endotraqueal positiva, mediante la insuflación de 1 ml de aire atmosférico mediante una jeringa en la cánula, a los efectos de evitar la atelectasia pulmonar resultante del neumotórax quirúrgico. Se procederá luego a extender la incisión abdominal hacia el tórax, seccionando el diafragma y la inserción costo-esternal, rebatiendo la pared torácica anterior para acceder al mediastino y los campos pulmonares. Los pulmones y la tráquea serán luego removidos y colocados en un recipiente conteniendo solución fisiológica (NaCl 0,9 %) a temperatura ambiente.

2.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El dispositivo experimental se esquematiza en la **Fig. 3**. El preparado (**1**) se dispondrá en un recipiente de vidrio de 500 ml (**2**) conteniendo solución fisiológica (NaCl 0.9 %). Se fijará el extremo libre de la cánula endotraqueal (ver apartado anterior) al segmento final del tubo de vidrio en “J” indicado por (**3**) en el esquema. Mediante tubuladuras plásticas, este tubo será conectado a través de una unión en “T” localizada fuera del recipiente, a tres componentes:

- a) Jeringa de insuflación de 50 ml (**5**).
- b) Manómetro de agua (**6**).
- c) Transductor de presión *Gould Statham* (Mods. P23XX) (**7**).

El pulmón, la jeringa de insuflación, el manómetro de agua y el transductor de presión conformarán un sistema cerrado a la atmósfera. De este modo, el volumen de aire atmosférico contenido dentro de este sistema será el mismo durante todo el procedimiento.

Tal como se definiera anteriormente, la P_{TP} corresponde a la diferencia entre la presión alveolar o intrapulmonar (P_{alv}) y la presión intrapleural (P_{IP}). En este práctico se

provocará variaciones de la P_{TP} modificando directamente la P_{alv} , mediante el desplazamiento del émbolo de la jeringa de insuflación, desde una posición inicial de referencia. El recipiente que contiene al preparado se halla abierto a la atmósfera a través de un tubo graduado con capacidad para 5 ml, representado por (4) en el esquema. De este modo, las modificaciones del V_p resultantes de los cambios introducidos en la P_{TP} provocarán el desplazamiento de un volumen idéntico hacia el interior del tubo graduado (flechas). La graduación del tubo permite conocer el volumen desalojado y, por lo tanto, el ΔV_p correspondiente.

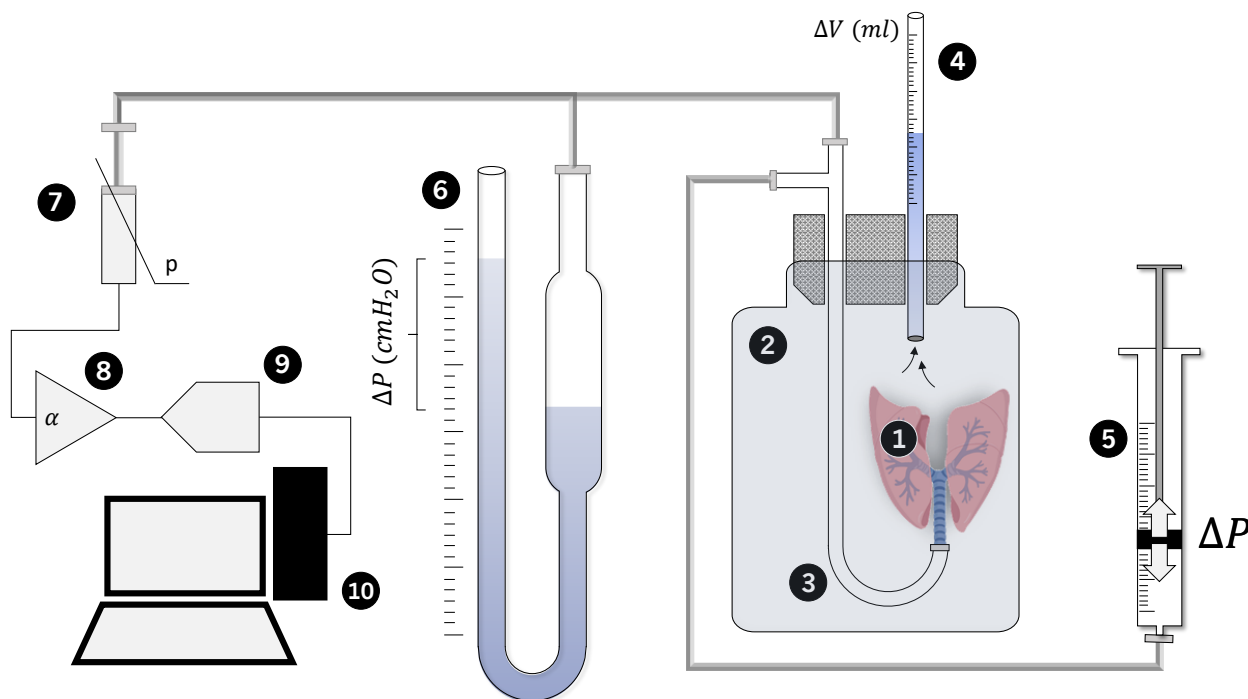


Fig. 3. Dispositivo experimental. Explicación en el texto. 1: Pulmón; 2: Recipiente de vidrio conteniendo solución salina (NaCl, 0.9%); 3: Tubuladura para la conexión del preparado al sistema de control de la presión intrapulmonar; 4: Tubo graduado para medida de los cambios de volumen; 5: Jeringa de 50 ml para la generación de los cambios de presión (jeringa de insuflación); 6: Columna de agua para medida de los cambios de presión intrapulmonar y calibración. 7: Transductor de presión; 8: Amplificador P11T (α : ganancia); 9: Conversor analógico-digital; 10: PC.

2.4. SIGNO DE LAS PRESIONES Y SIGNIFICADO FUNCIONAL

Consideremos la actividad mecánica toraco-pulmonar desarrollada en condiciones fisiológicas (**Fig. 4A**). Suponga que se realiza la expansión pulmonar desde un volumen

correspondiente a la *capacidad residual funcional* (CRF) al volumen correspondiente a la *capacidad pulmonar total* (CPT). Si se considera únicamente los estados inicial y final del proceso (i.e., condiciones estáticas con $\dot{V} = 0 \text{ ml/min}$), la presión alveolar será, en ambos estados, igual a la presión atmosférica (por definición igual a $0 \text{ cmH}_2\text{O}$); la presión pleural necesaria para expandir al pulmón (P_{TP}) es exactamente igual en magnitud y de signo opuesto a la presión intrapleural desarrollada por la contracción muscular, es decir

$$P_{TP} = -P_{IP}$$

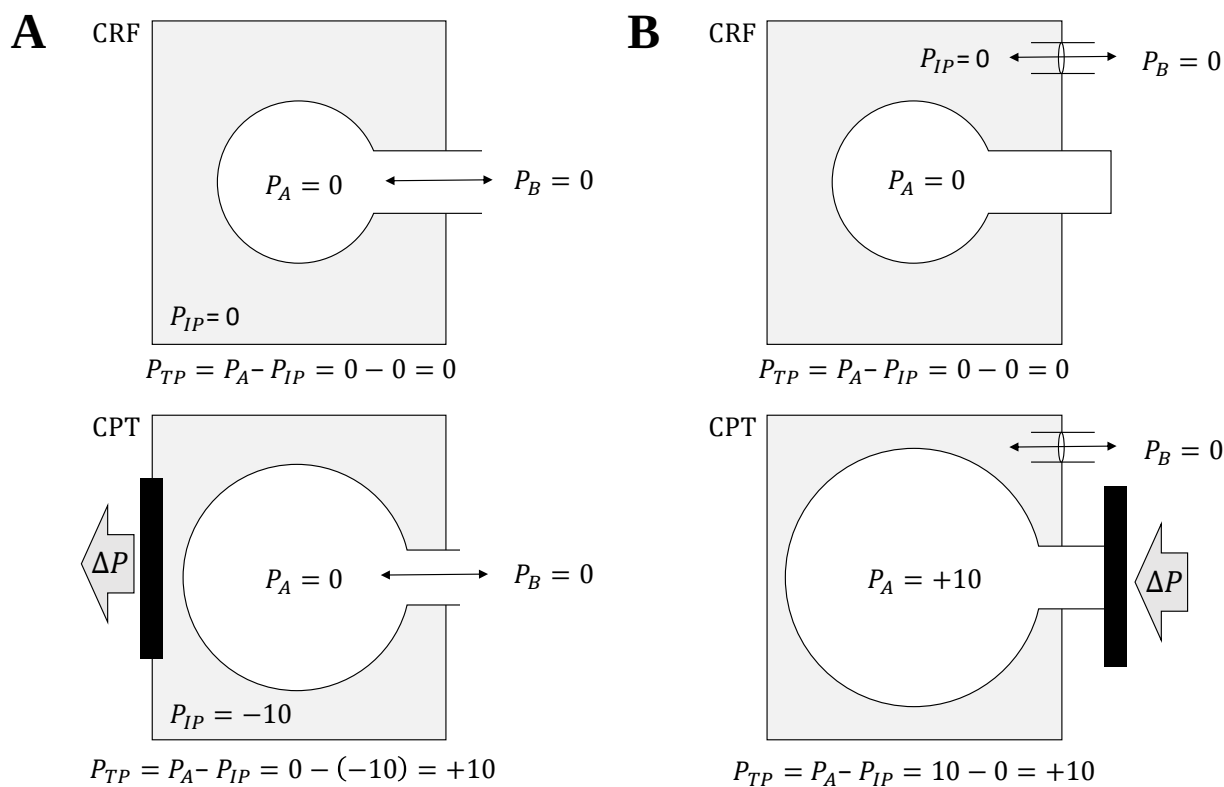


Fig. 4. Presiones transpulmonares en condiciones fisiológicas (A) y en la situación experimental ensayada en el práctico (B). Explicación en el texto.

Las condiciones experimentales ensayadas en el práctico se representan esquemáticamente en la **Fig. 4B**. La “cavidad pleural” en este dispositivo corresponde al volumen de solución fisiológica contenido dentro del recipiente. Como se ha dicho, el interior del recipiente no constituye un sistema cerrado, sino que está en comunicación con la atmósfera a través del tubo graduado. Así, podemos suponer que la P_{IP} alcanzará siempre un valor igual a P_{atm} . La P_{TP} en esta situación (es decir, la presión requerida para expandir



el pulmón desde la CRF a la CPT en el ejemplo) tiene el mismo valor que en condiciones fisiológicas (+10 en este caso), pero ahora, es alcanzada por una nueva “combinación” de valores de P_{IP} y P_A . Específicamente en este caso se tiene

$$P_{TP} = P_A$$

La situación es similar a la que tiene lugar en el curso de la **ventilación mecánica asistida** con presión positiva.

2.5. CORRECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN TRANSPULMONAR

En la sección anterior se supuso que la P_{IP} alcanza siempre un valor igual a P_{atm} . Debe tenerse en cuenta, no obstante, que el **volumen de solución desalojado del recipiente** por la deformación pulmonar no es eliminado, sino que permanece dentro del tubo graduado formando una columna líquida de altura h . Esta columna ejerce una **presión hidrostática** $\rho \cdot g \cdot h$ ($\rho = \text{densidad de la solución}$; $g \cong 9,8 \text{ m/s}^2$), que corresponde a la P_{IP} . Por lo tanto, este valor debe ser considerado para determinar la magnitud de la P_{TP} , de modo tal que

$$P_{TP} = P_A - \rho \cdot g \cdot h$$

Puesto que las presiones se expresan en cmH₂O, la expresión se simplifica¹ a

$$P_{TP} = P_A - h$$

Dado que el tubo graduado tiene un área de sección constante (A_ϕ), la altura de la columna líquida varía linealmente con el volumen desalojado:

$$V_p = A_\phi \cdot h$$

En los dispositivos disponibles en el Salón de Clases Prácticas, un volumen de 1 ml es alojado en una columna de 3,5 cm de altura. Con este dato (que deberá verificar para evitar errores) es posible determinar la P_{IP} simplemente como el producto $V_p \cdot 3,5 \text{ cm/ml}$

¹ Asumiendo con fines prácticos que la solución se comporta como el agua pura.

2.6. COLUMNA DE AGUA PARA MEDIDA DE LA P_A

La columna de agua consiste en un tubo en “U” (Fig.5) con una rama (1) abierta a la atmósfera, y otra conectada al compartimiento del que se desea conocer la presión (2). La presión ejercida por el gas contenido en este compartimiento (P_0) determina la generación de un desnivel entre las dos ramas (h). En la figura se señalan dos puntos (“A” y “B”) correspondientes a cada rama. Como se indica, la presión en A corresponde a P_0 . Puesto que los puntos “A” y “B” se encuentran en un mismo nivel horizontal, su presión hidrostática deberá ser la misma. La presión en “B” (P_B) corresponde a

$$P_B = P_{atm} + \rho \cdot g \cdot h$$

Si las medidas de presión son referidas a la presión barométrica (definiendo $P_{atm} = 0$), y expresadas en cmH₂O, resulta entonces

$$P_B = P_0 = \rho \cdot g \cdot h$$

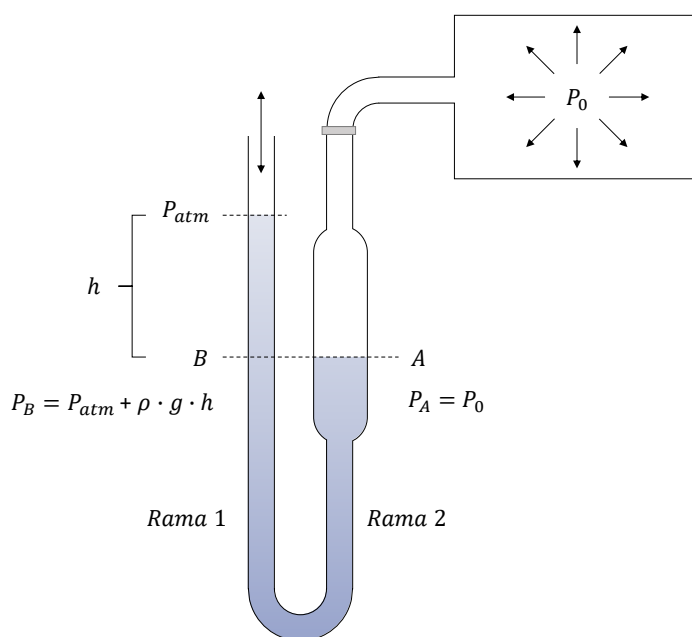


Fig. 5. Columna de agua para la medida de la presión alveolar.

Las unidades del producto $\rho \cdot g \cdot h$ en el SI son el Pa ($1 \text{ Pa} = 1000 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} \cdot 9,80665 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \cdot 1 \text{ m} = 1 \frac{\text{N}}{\text{m}^2}$). La presión puede expresarse sencillamente como la altura en cm de la columna de agua, siendo $1 \text{ cmH}_2\text{O} = 98,0665 \text{ Pa}$, de modo tal que



$$P_0 = h \text{ (cmH}_2\text{O)}$$

OBS: La altura h refiere a la diferencia de niveles de agua entre las ramas 1 y 2, no al valor absoluto de la altura de la columna líquida en la rama.

2.7. TRANSDUCTOR DE PRESIÓN Y DIGITALIZACIÓN DE LA MEDIDA DE PRESIÓN

Además de contar con una columna de agua para la medida de la presión intrapulmonar, se efectuará la medida y digitalización de la presión a través de un dispositivo de adquisición consistente en un **transductor** o **manómetro electromecánico** (Fig.3, -7-), un **amplificador** de DC (Fig.3, -8-) y un **convertor analógico-digital** (CAD, Fig.3, -9-). Además de posibilitar la medida de la P_A en condiciones estáticas, la adquisición de la señal de presión a través de este sistema permitirá analizar el curso temporal de los cambios de presión aplicados al preparado.

Los aspectos generales del funcionamiento de los **transductores y del amplificador P11T** son considerados en el **ANEXO 5** de los “*Anexos de las Prácticas de Fisiología*”, disponible en <http://www.fisio.fmed.edu.uy/SCPS.html>. Se remite al lector a este material. Los modelos de transductores de presión disponibles en el Salón de Clases Prácticas (Gould Statham P23XX) corresponden a los de tipo extensiométrico (“*strain-gauges*”). En la **Fig. 6** se presenta un esquema simplificado para ilustrar el funcionamiento de este dispositivo.

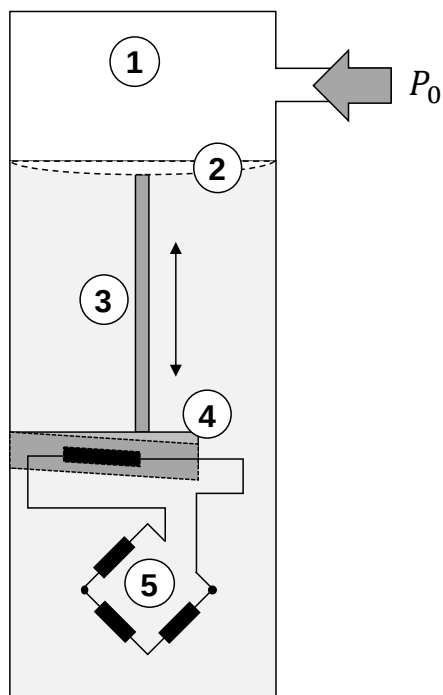


Fig. 6. Transductor de presión piezorresistivo. El compartimiento del que se desea conocer la presión (P_0) es conectado al *domo* (1), consistente en un compartimiento herméticamente cerrado, adosado a la superficie del transductor. La presión en este compartimiento determina la deformación del diafragma metálico del transductor (2), desplazando una viga metálica (3) la que, finalmente, transmite la deformación a un componente piezorresistivo (4) integrado a un *punto de Wheatstone* (5). El punto es alimentado por una fuente de voltaje constante. Las modificaciones de la resistencia de dicho componente, proporcionales a la presión aplicada al diafragma, determinan en última instancia cambios igualmente proporcionales del potencial eléctrico de *salida* del transductor.

El amplificador P11T (Grass) se utilizará para amplificar el potencial eléctrico de salida del transductor de presión. El amplificador provee asimismo el potencial de alimentación al transductor. La salida del amplificador es una conexión BNC la que será conectada al CAD para la digitalización de la señal. La señal digitalizada mediante el CAD (NI-USB 6009, National Instruments o similar) será adquirida, almacenada y procesada mediante los programas de adquisición y procesamiento disponibles, tales como DASyLab, WinWCP, Spike2 u otros. Los fundamentos de la digitalización y adquisición de señales son tratados en el **ANEXO 3** del material antes referido.



2.8. MANIOBRAS EXPERIMENTALES SUGERIDAS (I)

A. OBTENCIÓN DE LA CURVA PRESIÓN-VOLUMEN PULMONAR

- Antes de comenzar con el procedimiento para la obtención de la curva $V_p = f(P_{TP})$ es necesario verificar que el sistema de generación de los cambios de presión pulmonar y de medida (columna de agua y transductor) no presenten pérdidas. Antes de montar el preparado, disponga de una cánula sellada en uno de sus extremos en lugar de la cánula que sostendrá al preparado. Conecte los componentes del dispositivo tal como se representa en la **Fig.3**. Aplique presión positiva hasta alcanzar valores en el entorno de los 50 cm H₂O. Verifique que se alcance un valor estable de presión durante algunos minutos, tanto en la columna de agua como en el *display* del amplificador de presión.
- En esta etapa es importante además verificar que la GANANCIA del amplificador seleccionada para el registro de presión sea adecuada. Si el valor asignado a este parámetro es excesivo, los cambios de presión de magnitud elevada excederán su rango operativo, por lo que no podrán ser leídos (*saturación*). Aplique presiones negativas de aproximadamente -30 cm H₂O y presiones positivas de 50-60 cmH₂O, asegurándose que los valores mostrados en el *display* del amplificador estén dentro del rango operativo (± 6 Volts para el amplificador P11T).

Para la obtención de la curva $V_p = f(P_{TP})$ se recomienda el siguiente procedimiento:

1. Enrase el recipiente de 500 ml con solución salina, permitiendo que desborde.
2. Monte el preparado a través de la cánula endotraqueal en el tubo en “J” dispuesto para ello en el tapón del recipiente. Asegúrese que el sistema de tubuladuras para la vía aérea se encuentra abierto a la atmósfera en este momento.²
3. Introduzca el preparado en el recipiente. Verifique la formación de un menisco entre el tapón del recipiente (a través del cual son fijados el tubo en J y el tubo graduado) y el líquido en su interior, para evitar la formación de burbujas de aire en este.
4. Presione el tapón hasta constatar que el recipiente está completamente sellado.
5. Notará que asciende un determinado nivel de líquido por el tubo graduado. Disponga de una jeringa de 2-5 ml con un catéter de bajo calibre (máx. 1 mm) de longitud suficiente para enrasar el nivel de líquido al valor de referencia dentro del tubo. ESTE

² Si optó por extraer el preparado aplicando presión positiva a la vía aérea, tenga en cuenta que es necesario aplicar una presión positiva ahora a todo el sistema tubular que se conectará al pulmón antes de montarlo, para prevenir el colapso en esta etapa. Tenga en cuenta este detalle al fijar los valores de referencia de presión y volumen para el resto del procedimiento.



CORRESPONDERÁ AL VOLUMEN INICIAL o DE REFERENCIA DEL PULMÓN para la práctica. LOS CAMBIOS SUBSIGUIENTES DE VOLUMEN SERÁN RELATIVOS AL “0” DEFINIDO EN ESTE PASO.

6. Lleve el émbolo de la jeringa de insuflación a aproximadamente 40 ml mientras la tubuladura que conecta esta jeringa al preparado **PERMANECE ABIERTA A LA ATMÓSFERA**. Los cambios de presión se efectuarán ulteriormente a partir de este nivel, desplazando el émbolo en dirección a 0 en pasos discretos.

7. Verifique que, hallándose el sistema de tubuladuras y la columna de agua abiertos a la atmósfera, el nivel de agua en ambas ramas de la columna SEA EL MISMO. Este nivel corresponde al “0” de referencia para la presión intrapulmonar. Asimismo, girando el control de *offset* del amplificador, establezca el valor de referencia (el potencial eléctrico que corresponderá al “0”) para la medida de presión efectuada con el transductor.

8. Proceda a cerrar el sistema de tubuladuras, de modo que LA COLUMNA DE AGUA, EL PULMÓN, el TRANSDUCTOR y LA JERINGA DE INSUFLACIÓN formen un sistema cerrado. A partir de este momento, podrá comenzar a realizar la maniobra de expansión del volumen pulmonar para la obtención de los datos.

9. OBTENCIÓN DEL CONJUNTO ORDENADO DE VALORES P_{TP} ; V_p (**Tabla 1**, pág. 15)

En el protocolo se incluye una TABLA “tipo”. Se recomienda que esta tabla sea construida en una planilla de cálculo del PC, automatizando las operaciones que debe llevarse a cabo para el cálculo de P_{IP} y la P_{TP} . Los datos de presión pueden completarse directamente con los obtenidos a partir de la lectura en el manómetro de agua o bien, con los extraídos del registro digital de presión tras la correspondiente *calibración* del sistema de registro. Este procedimiento se detalla en una sección posterior.

a) Como se dijo, los valores iniciales de V_p , P_A y P_{IP} corresponden a los fijados por el experimentador en las etapas anteriores del procedimiento. Recuerde que el V_p inicial puede corresponder al de los pulmones colapsados a presión atmosférica (atelectasia) o, de haber elegido esta alternativa, un volumen fijado por la presión positiva aplicada antes de generar el neumotórax en el curso la disección (ver secc. 4.2).

b) Desplace el émbolo de la jeringa de insuflación hasta obtener un cambio inicial del V_p de aproximadamente 0,1-0,2 ml. Consigne en la **Tabla 1** los valores correspondientes de presión y volumen.



c) Repita el procedimiento detallado en (b). Notará que, para obtener un nuevo cambio del V_p de 0,1-0,2 ml, deberá realizar un cambio de presión menor al efectuado en el paso anterior. Consigne los valores en la **Tabla 1**.

d) Aplique un cambio de presión de magnitud similar a la ensayada en (c), independientemente del cambio de volumen alcanzado en este caso. Consigne los valores de presión y volumen en la **Tabla 1**.

e) Repita el procedimiento detallado en (d) anotando cada vez los valores de presión y volumen en la **Tabla 1**, hasta constatar que los cambios de presión son incapaces ocasionar cambios de volumen.

INSUFLACIÓN (INSPIRACIÓN)				VACIADO (ESPIRACIÓN)			
P_A (cmH ₂ O)	V_P (ml)	P_{IP} (cmH ₂ O)	P_{TP} (cmH ₂ O)	P_A (cmH ₂ O)	V_P (ml)	P_{IP} (cmH ₂ O)	P_{TP} (cmH ₂ O)
		$= V_p$ $\times 3,5 \text{ cm/ml}$	$= P_A - P_{IP}$				
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

TABLA 1. Valores de Presiones y Volúmenes pulmonares.

f) Para el vaciado del volumen pulmonar (espiración) repita el procedimiento detallado en (d), generando en este caso reducciones de la presión mediante el desplazamiento del émbolo de la jeringa de insuflación en sentido opuesto, hasta constatar que los cambios de presión son incapaces ocasionar reducciones adicionales del volumen. Consigne en cada paso los valores en la **Tabla 1**.

Durante el procedimiento de insuflación y vaciado, observe las características del preparado en el recipiente. Consigne aspectos que entienda relevantes; por ejemplo ¿es uniforme la expansión pulmonar o, por el contrario, advierte la presencia de lóbulos o regiones de estos en los que la expansión ocurre en momentos diferentes? ¿Es gradual el cambio de volumen cuando se modifica la presión o, por el contrario, la expansión ocurre de modo abrupto? Estas observaciones deberán ser incluidas en la discusión final del práctico.

g) A partir de los datos de P_A y V_P obtenidos para la expansión y el vaciado, calcule los valores de P_{IP} y P_{TP} . Anótelos en la **Tabla 1**.

h) Represente gráficamente el V_P en función de la P_{TP} .

B. ANÁLISIS SUGERIDO DE LOS RESULTADOS

En la Fig. 7. se presenta una curva presión-volumen obtenida con el dispositivo experimental.

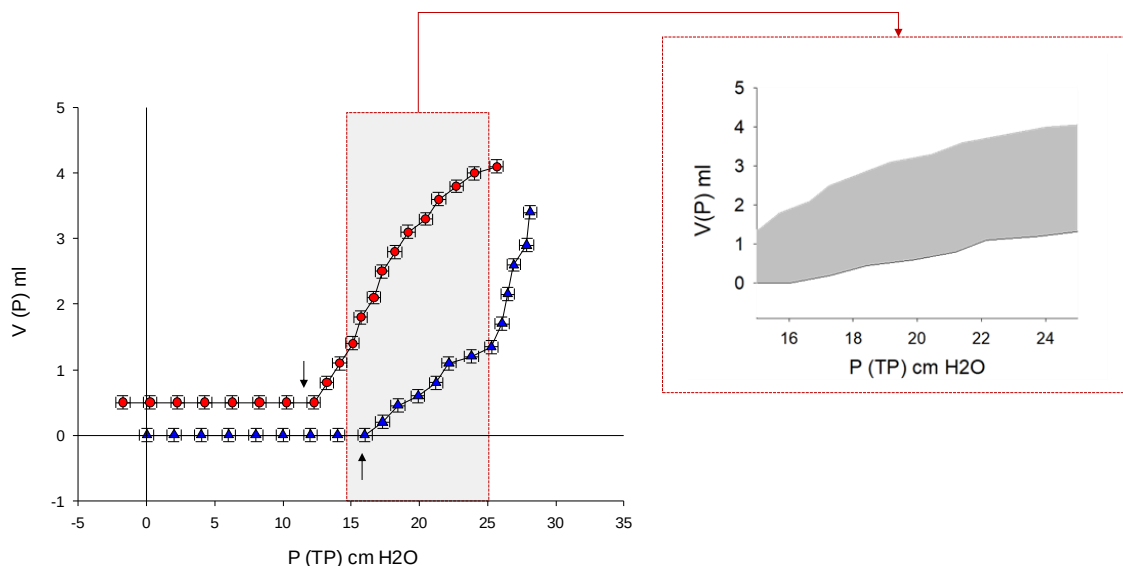


Fig. 7. Curva P-V obtenida para el primer ciclo de expansión ($\blacktriangle$) y vaciado ($\bullet$). Durante la extracción del pulmón no se empleó presión positiva. Las flechas indican dos puntos de inflexión de la curva. Los puntos se han unido con segmentos de recta para facilitar la visualización; los trazados **no** corresponden a ajustes de la dispersión de puntos. El área sombreada se reproduce en el inserto, para poner de manifiesto el área de histéresis. Los puntos son representados con los errores de medida definidos para la columna de agua ($\pm 0,5$ cmH₂O) y la pipeta empleada para la medición del volumen pulmonar ($\pm 0,2$ ml). Las líneas horizontal y vertical continuas que pasan por 0 indican los niveles de referencia de volumen y presión, respectivamente.

El análisis de los resultados presentados en la curva $V_p = f(P_{TP})$ estará dirigido a determinar la validez de la hipótesis formulada. Se sugiere incluir en este análisis³:

a) El ajuste de la dispersión $V_p = f(P_{TP})$ a una recta ($y = ax + b$) para las ramas de expansión y vaciado. Determinar el coeficiente R^2 para establecer la adecuación del ajuste.

b) Puede ensayarse el ajuste de otras funciones, para todo el rango de valores de P_{TP} o para rangos definidos de la curva.

c) Reconocer la existencia de un “loop” en el que la rama inspiratoria y la espiratoria no describen la misma trayectoria. Puesto que el trabajo (W) corresponde a la integral $P \cdot dV$, puede escribirse:

$$\int_{V_0}^{V_{m\acute{a}x}} P \cdot dV > \int_{V_{m\acute{a}x}}^{V_0} P \cdot dV$$

Esta expresión establece que el **W realizado durante la expansión** ($\int_{V_0}^{V_{m\acute{a}x}} P \cdot dV = W_{ins}$) es **mayor que el realizado durante el vaciado** ($\int_{V_{m\acute{a}x}}^{V_0} P \cdot dV = W_{esp}$). Las áreas se representan en los gráficos mostrados en la **Fig. 8**.

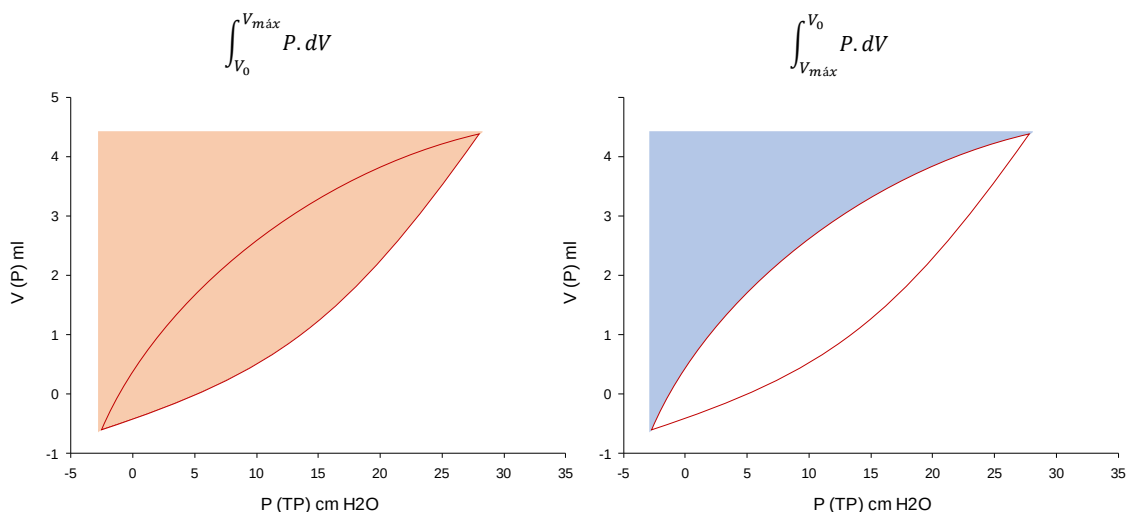


Fig. 8. Trabajo realizado durante la expansión pulmonar (área en rojo, izquierda) y durante el vaciado (área en azul, derecha).

³ Los elementos incluidos en este listado tienen carácter ilustrativo. El conjunto de herramientas de análisis aplicado dependerá del abordaje particular del práctico adoptado por cada lector.

Para hallar los valores correspondientes al W_{ins} y al W_{esp} podrá optar por diversas estrategias. Una alternativa es construir en primer lugar el gráfico $P_{TP} = f(V_p)$. Para estimar el W_{ins} deberá hallar la **integral definida** $\int_{V_{min}}^{V_{max}} P \cdot dV$ para la curva correspondiente a la expansión, representada por el área en rojo (izquierda) de la **Fig.9**. Para estimar el W_{ins} deberá hallar la **integral definida** $\int_{V_{min}}^{V_{max}} P \cdot dV$ para la curva correspondiente al vaciado, representada por el área en azul (derecha) de la **Fig.9**.

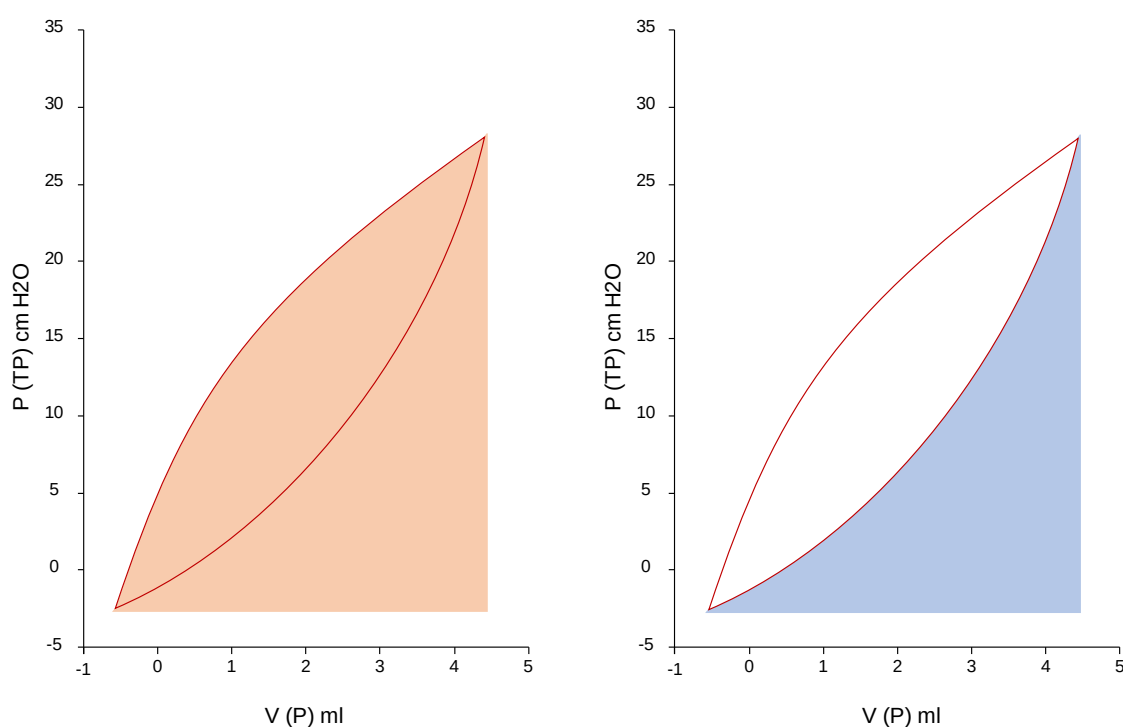


Fig. 9. Explicación en el texto.

La integral definida puede hallarse si se conoce la **primitiva** de la función, la que puede obtenerse al realizar el ajuste de la dispersión $P_{TP} = f(V_p)$ a una función determinada. Adicionalmente, el área puede hallarse por **métodos de aproximación**. Estos métodos consisten en dividir el intervalo de integración en n partes, y multiplicar la longitud h de los subintervalos por:

i) El valor mínimo de la función en el subintervalo: Se sustituye cada segmento del área por un rectángulo menor: método de la **suma inferior**.

ii) El valor máximo de la función en el subintervalo: Se sustituye cada segmento del área por un rectángulo mayor: método de la **suma de Riemann por la derecha** (o suma superior n -ésima); ver **Fig. 10**.

iii) El promedio de los valores de la función en los extremos del subintervalo: Se sustituye cada segmento del área por la de un trapecio: **suma trapezoidal**.

iv) **Suma de Simpson**.

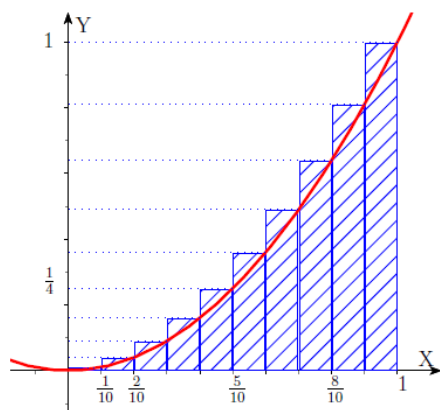


Fig. 10. Estimación del área bajo la curva a través del método de suma superior. El ejemplo ilustra la estimación del área de $f(x) = x^2$ en el intervalo $[0, 1]$, subdividiendo el rango en $n = 10$ subintervalos idénticos de ancho h . El área de cada rectángulo corresponde a $\frac{1}{n} \times \left(\frac{i}{n}\right)^2$ con $i = 1 \dots n$. En general, el área bajo la curva en el intervalo $[0, n]$, puede estimarse como la **suma de Riemann por la derecha** ($SR_h(f)$) de acuerdo con

$$\int_0^n f(x) \cdot dx \cong SR_h(f) = h \sum_{i=1}^n f(x_i)$$

Otra alternativa puede ser trabajar sobre la curva original $V_p = f(P_{TP})$. En tal caso, deberá estimar el área del rectángulo de área $(P_{máx} - P_{mín}) \times (V_{máx} - V_{mín})$, representado en la **Fig. 11**.

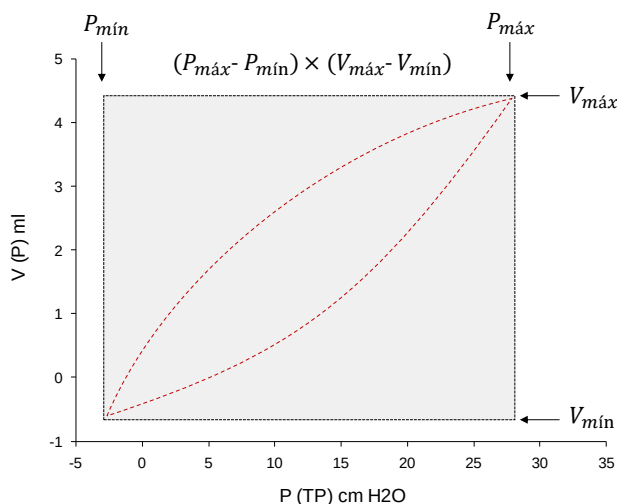


Fig. 11. Explicación en el texto.



Empleando el método preferido para la aproximación a la integral definida, debe hallar

- i) $\int_{P_{\min}}^{P_{\max}} V \cdot dP \text{ (exp)}$, para la rama de expansión.
- ii) $\int_{P_{\min}}^{P_{\max}} V \cdot dP \text{ (vac)}$, para la rama correspondiente al vaciado.

Finalmente, puede calcular

$$W_{\text{ins}} = [(P_{\max} - P_{\min}) \times (V_{\max} - V_{\min})] - \int_{P_{\min}}^{P_{\max}} V \cdot dP \text{ (exp)}$$
$$W_{\text{esp}} = [(P_{\max} - P_{\min}) \times (V_{\max} - V_{\min})] - \int_{P_{\min}}^{P_{\max}} V \cdot dP \text{ (vac)}$$

Tenga en cuenta que $P_{\min}$ y $V_{\min}$ no necesariamente valen 0. Para simplificar el cálculo, puede sumar el valor absoluto de $P_{\min}$ y $V_{\min}$ a todos los puntos, haciendo que el gráfico se origine en el punto (0;0).

Establecida el área bajo las curvas de expansión y vaciado puede hallarse la diferencia, cuantificando así la magnitud de la *histéresis*. Abordar el significado *termodinámico* de esta característica.

d) Cuantificar la C_p . Discutir el significado de la existencia de sectores de la curva $V_p = f(P_{TP})$ con valores distintos de C_p . Analizar las eventuales causas de esta característica.

e) Identificar los *puntos de inflexión* de la curva para las ramas inspiratoria y espiratoria, discutiendo el significado funcional de estos.

f) Comparar los volúmenes pulmonares con $P_A = 0$ para las ramas inspiratoria y espiratoria. Detectar eventuales diferencias y discutir los mecanismos implicados en su generación.

g) Introducir los conceptos de punto de igual presión y colapso de la vía aérea. Considerar la aplicación de estos conceptos en el análisis de los resultados.

C. MANIOBRAS EXPERIMENTALES SUGERIDAS (II)

C.1. OBTENCIÓN DE BUCLES P-V MÚLTIPLES

En la **Fig. 12.** se presenta un conjunto de curvas P-V, a los efectos de mostrar que la “*historia previa*” del volumen pulmonar tiene un marcado impacto sobre una curva ulterior.

La reiteración del procedimiento para la obtención de la curva inicial podrá mostrar resultados similares. Discuta las eventuales causas de este comportamiento.

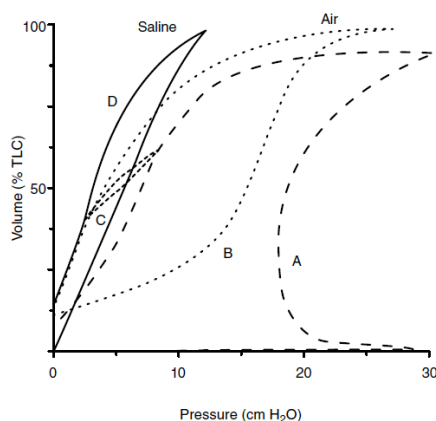


Fig. 12. Curvas de presión-volumen obtenidas para un pulmón inmediatamente luego de su extracción (A), y luego de realizado un primer ciclo expansión-vaciado (B). *Air*: curva obtenida durante el tercer ciclo; C: Curva obtenida en iguales condiciones, pero para un rango más acotado de volúmenes pulmonares; D (*Saline*): bucle obtenido tras el llenado del pulmón con solución fisiológica. El volumen se expresa como porcentaje de la capacidad pulmonar total (%TLC). Tomada de Hoppin FG Jr, Stothert JC Jr, Greaves IA, et al. Lung recoil: elastic and rheological properties. In: Macklem P, Mead J, editors. Handbook of physiology: the respiratory system. Vol. III, Part I. Bethesda, MD: American Physiological Society; 1986. p. 195–215.

C.2. ANÁLISIS DE LA CURVA P-V EXPLORANDO RANGOS ACOTADOS DE VOLUMEN

Se obtendrá un conjunto de curvas $V_p = f(P_{TP})$ explorando la relación en rangos de volumen menores que el ensayo inicialmente. Por ejemplo, se podrá obtener curvas desde valores sucesivamente menores de P_{TP} pero alcanzando siempre un mismo valor máximo.

C.3. SUSTITUCIÓN DE LA INTERFASE AIRE-LÍQUIDO ALVEOLAR

Esta maniobra permite **obtener una curva P-V tras la reducción del área de la interfase aire-líquido alveolar**. Para llevar a cabo este procedimiento, deberá desmontar el pulmón removiendo la cánula endotraqueal del tubo en "J". Puede emplearse uno de los siguientes procedimientos:

1. El procedimiento representado en la **Fig. 13** consiste en colocar el pulmón colapsado dentro de una jeringa de 50 ml en posición vertical, conteniendo solución fisiológica (A). Se cierra la jeringa a la atmósfera, generando luego presión negativa dentro de la misma, desplazando el émbolo hacia afuera (B). La presión negativa causará la expansión pulmonar, la que determinará a su vez la entrada de solución salina al espacio alveolar.

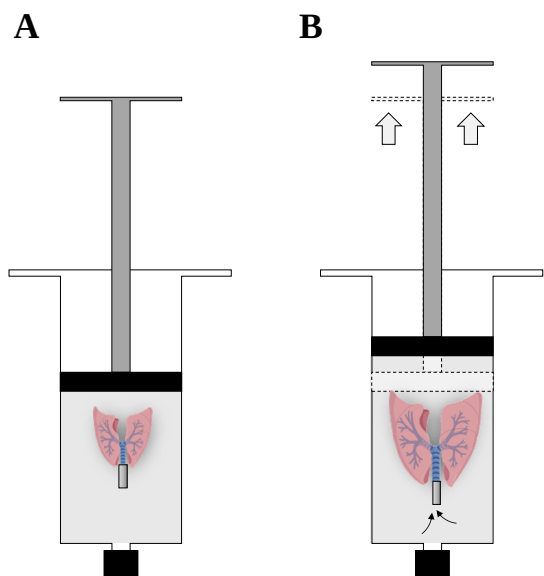


Fig. 13. Sustitución del aire alveolar por solución fisiológica (1).

2. El procedimiento representado en la **Fig. 14** consiste en conectar al pulmón a una llave de triple vía, aplicando además a una de las entradas libres de la llave una jeringa vacía de 2-5 ml y una jeringa de igual volumen conteniendo solución fisiológica a la otra (**A**). Cerrando la conexión entre el pulmón y la jeringa con solución salina, desplace de la jeringa vacía hasta colapsar el pulmón. Cambie luego la posición de la triple vía, cerrando la conexión a la jeringa vacía y abriéndola a la jeringa que contiene solución salina. Desplace el émbolo para transferir 1 o 2 ml de solución al pulmón.

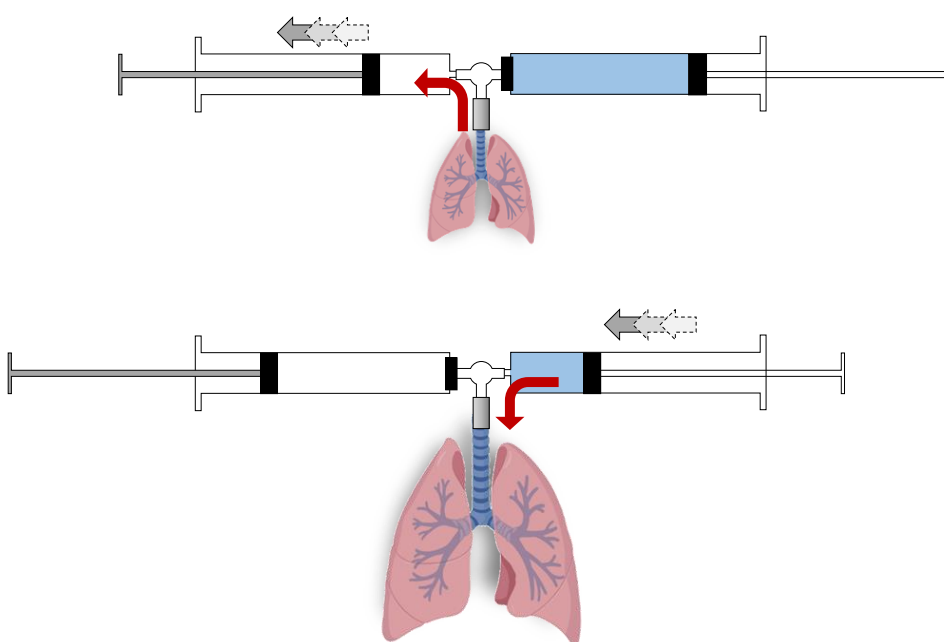


Fig. 14. Sustitución del aire alveolar por solución fisiológica (2).



C.4. ANÁLISIS DEL CURSO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS DE PRESIÓN INTRAPULMONAR, $P_A = f(t)$.

MARCO CONCEPTUAL: EXTENSIÓN DEL MODELO RESISTIVO ELÁSTICO ANTERIORMENTE PRESENTADO

En la **Fig. 15 A** se ilustra el curso temporal de los cambios de presión en función del tiempo para un sistema resistivo-elástico (gráfico inferior), ante una deformación aplicada a velocidad constante entre los instantes t_0 y t_1 (gráfico superior). En un sistema resistivo-elástico como el expuesto en la INTRODUCCIÓN, la presión (o trabajo) aplicados se emplean en la deformación del componente elástico y en el establecimiento de un flujo a través del componente resistivo (presión resistiva). La diferencia entre los trazados con línea entrecortada y continua en el gráfico (flecha de doble punta) corresponde a la diferencia entre la presión del componente elástico puro (línea entrecortada) y la del sistema resistivo-elástico (línea continua). Esta diferencia representa, por tanto, la presión requerida para vencer la resistencia al flujo a través del componente resistivo. En el instante en que la deformación del sistema cesa haciéndose nulo el flujo (t_1), se produce una caída abrupta de la presión a un nuevo valor constante, correspondiente a la presión de retroceso elástico del mismo. En la **Fig. 15 B** se representa el mismo ensayo, pero aplicado a un sistema con las características de un cuerpo viscoelástico. Obsérvese que, en este caso, una vez alcanzado el nivel final de la deformación, la presión se reduce exponencialmente (flechas de doble punta) hasta alcanzar un valor estable por debajo del que corresponde a t_1 .

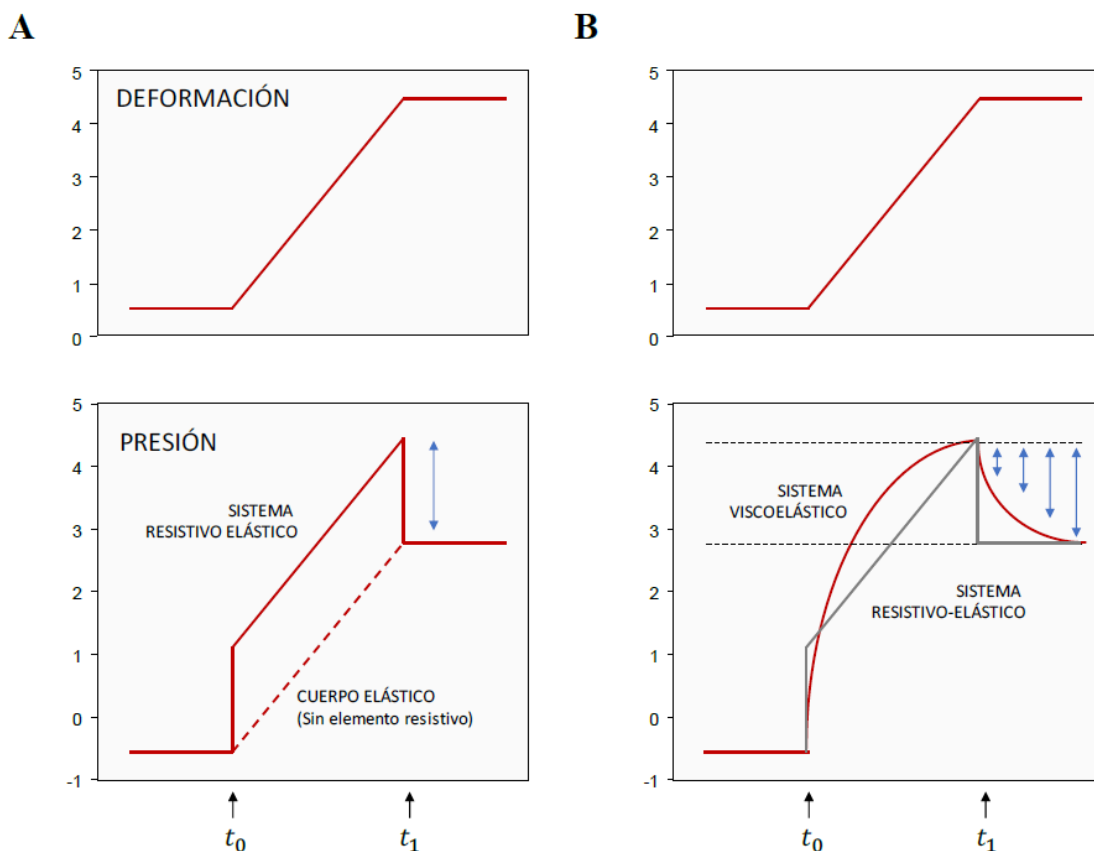


Fig. 15. Representación esquemática del curso temporal de la presión total desarrollada durante la deformación de un sistema resistivo-elástico (A) y de un sistema viscoelástico (B). Explicación en el texto.

Dos modelos simples habitualmente empleados para representar un sistema viscoelástico son el *cuerpo de Maxwell* y el *cuerpo de Voigt*, esquematizados en la parte superior de la **Fig. 16**. El modelo de Maxwell representa el comportamiento de las sustancias viscoelásticas como una combinación en serie de un resorte o componente elástico (E) y un amortiguador (componente viscoso, η); el modelo de Voigt coloca a ambos elementos en paralelo. En la parte inferior de la **Fig. 16** se muestra un proceso de relajación capaz de explicar el curso temporal de la presión tras el cese de la deformación mostrado en la Fig. 15 B ($t > t_1$). El sistema se encuentra a una longitud inicial (l_0). Se aplica instantáneamente un cambio de longitud (Δl), provocando inicialmente la deformación del componente elástico. El trabajo realizado para provocar esta deformación permanece almacenando en el resorte



como energía potencial. La energía potencial es ulteriormente transferida al amortiguador, desplazando hacia arriba al pistón. El resorte retorna así a su longitud inicial, pero la longitud total del cuerpo ($l_0 + \Delta l$) no se modifica. La tensión describe una caída exponencial caracterizada por una constante de tiempo $\tau = \eta / EY$.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El marco conceptual previamente considerado permite extender el modelo resistivo-elástico planteado al comienzo, considerando al pulmón como un cuerpo viscoelástico. El análisis del curso temporal de los cambios de presión ofrece evidencias adicionales en favor de esta consideración. Se sugiere para ello:

a) Obtener el registro de la $PA=f(t)$ mediante el sistema de adquisición detallado en la sección 4.7., siguiendo el procedimiento indicado en el apartado de MÉTODOS para la obtención de la curva P-V.

b) Describir las características temporales de los cambios de presión, poniendo de manifiesto la ocurrencia de un fenómeno de características similares al presentado en la Fig. 15 B en cada paso sucesivo de cambio de PA .

c) Caracterizar la relajación de la PA . En el software de procesamiento elegido, puede realizarse el ajuste de una exponencial a la dispersión $PA=f(t)$ para determinar el valor de τ correspondiente. Esta constante puede estimarse alternativamente por el método gráfico (τ se define como el tiempo en el que la PA cae a un 37% del valor máximo comprendido entre $PA(t1)$ y $PA(t\infty)$).

d) Establecer si existe una relación entre el curso temporal (caracterizado por la constante de tiempo) y la magnitud absoluta de la PA , comparando los valores de τ para cambios de presión efectuados en niveles próximos a 0, intermedios y cercanos a los máximos alcanzados. Alternativamente puede comparar los cursos temporales de las relajaciones normalizando y superponiendo los trazados correspondientes.

e) Establecer si el curso temporal de la relajación depende de la velocidad con la que se efectúa el cambio de presión. Para ello, establezca un valor inicial y un valor final de PA , realizando el cambio primero lentamente y luego a mayor velocidad, pero alcanzando siempre el mismo valor final. Consigne los cambios de volumen provocados en cada caso.

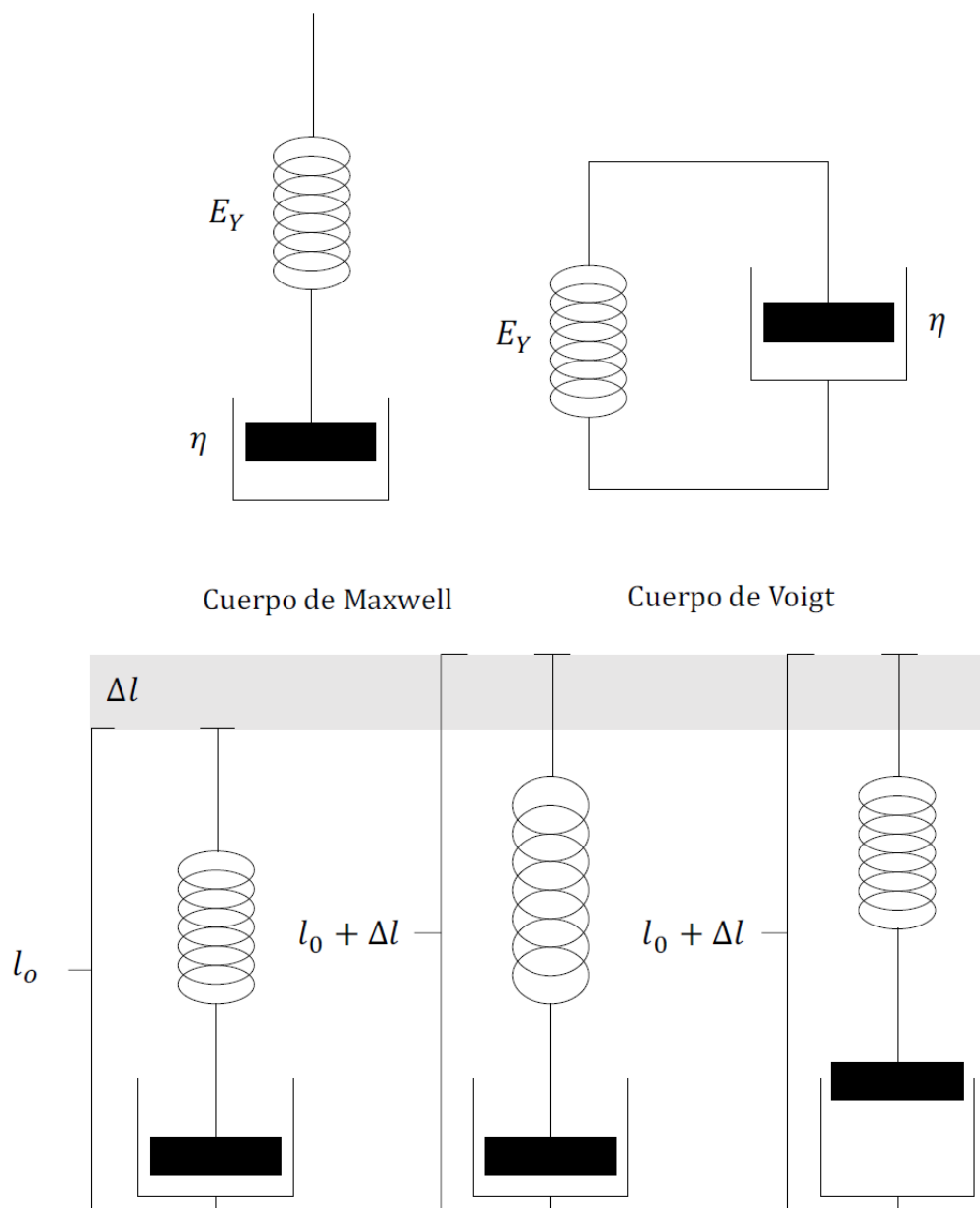


Fig. 16. Arriba: Modelos de Maxwell y de Kelvin-Voigt. Abajo: proceso de relajación en un cuerpo de Maxwell. Explicación en el texto.

D. CALIBRACIÓN DEL TRANSDUCTOR DE PRESIÓN

La calibración del sistema de registro se efectúa aplicando presiones conocidas (medidas con la columna de agua) y registrando los cambios de voltaje resultantes. Conecte el dispositivo según el esquema de la **Fig. 17**.

- Abra el sistema a la atmósfera, estableciendo el nivel de referencia.
- Cierre el sistema y aplique presiones positivas en pasos discretos.
- Consigne el valor de presión en cmH_2O medido en la columna para cada paso. Recuerde alcanzar valores superiores a los niveles máximos de presión aplicados al pulmón, a los efectos de confirmar el comportamiento lineal del sistema de adquisición en el rango de trabajo ensayado.
- Realice el mismo procedimiento, pero aplicando presiones negativas.
- Construya una tabla con los valores de presión medida (x) y los correspondientes voltajes medidos (y).
- Represente los valores gráficamente.
- Ajuste una recta ($y=ax+b$) y establezca si el sistema de adquisición presenta un comportamiento lineal en el rango explorado.
- Halle el valor de “a” (en Volts/ cmH_2O). Empleará este dato para la conversión de las medidas de presión.

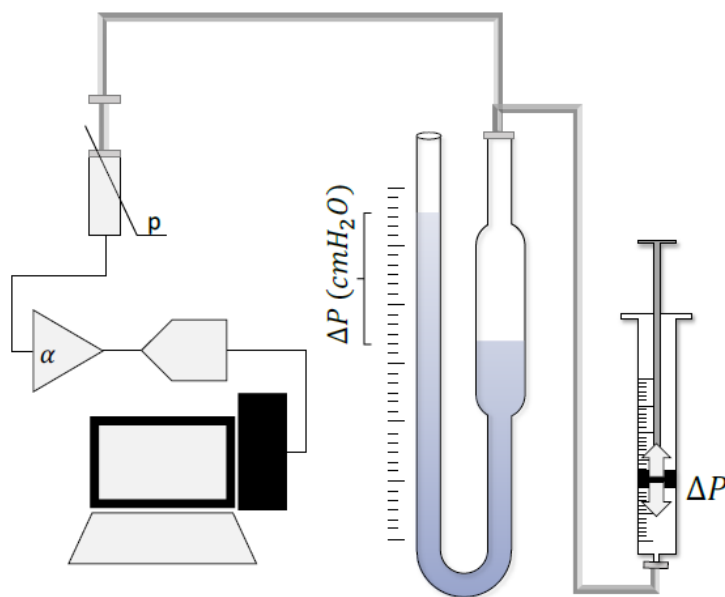


Fig. 17. Calibración.
Ver explicación en el texto.



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



(2) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DEL NERVIIO CIÁTICO AISLADO

Esteban Pino

APLICACIÓN: El diseño experimental presentado en esta sección permite la obtención, descripción y análisis del registro extracelular bitópico (diferencial) de un potencial de acción compuesto (PAC) en respuesta a la estimulación extracelular bipolar del *nervio ciático in vitro*. Específicamente, a través de este diseño experimental se podrá:

- Identificar y describir los componentes de las respuestas obtenidas (artefacto y respuesta biológica).
- Caracterizar la relación entre la intensidad del estímulo aplicado y la amplitud de la respuesta biológica obtenida.
- Determinar si la respuesta biológica satisface la *ley del todo o nada* que caracteriza a las respuestas activas de las fibras excitables.
- Poner de manifiesto la existencia de *refractoriedad* de la respuesta biológica, como corolario de la fenomenología que subyace a su generación.
- Poner de manifiesto el carácter *no decremental* de la propagación de la respuesta biológica y cuantificar la velocidad de conducción del PAC, considerando las limitaciones impuestas por el diseño experimental a tales efectos.



- Poner de manifiesto la *acción de anestésicos locales* en la conducción de la respuesta biológica, discutiendo las bases iónicas y moleculares que sustentan su efecto.

1. MÉTODOS

1.1. MODELO EXPERIMENTAL

Se empleará un modelo *in vitro*, aislando un segmento del *n. ciático* de un animal de experimentación. Se llevará a cabo su estudio electrofisiológico mediante el dispositivo experimental que se detalla en el apartado 3.6.

Los estudios *in vitro* se realizan sobre **componentes** de un **organismo** (células, tejidos u órganos) **aislados de su entorno biológico habitual**. Este tipo de estudio permite sortear ciertas dificultades inherentes al estudio de los mecanismos fisiológicos en organismos enteros (dada la complejidad que caracteriza a los sistemas biológicos), reduciendo el número de interacciones posibles entre los múltiples componentes y niveles de organización. Asimismo, permiten **controlar variables ambientales** (tales como **temperatura, composición hidroelectrolítica** del medio en que son mantenidos estos componentes, **pH, concentraciones** de ciertas **moléculas de señalización**, etc.), permitiendo la **simplificación y análisis riguroso** de las relaciones de correlación y causalidad entre las **variables** analizadas.

Se señala sin embargo la necesidad de una cuidadosa interpretación de los resultados obtenidos en este tipo de estudios cuando se pretende generalizar las conclusiones al organismo entero, restricción que puede considerarse como una de las principales desventajas de este tipo de abordajes. Finalmente, la **preservación** del preparado biológico en estas condiciones supone la implementación de un conjunto de estrategias, tales como el control de las variables fisicoquímicas antes señaladas.

1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El *n. ciático* será obtenido de ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* adultas (pesos entre 250 y 350 g) provistas por la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina.



1.3. ANESTESIA

Los animales serán anestesiados con URETANO por vía intra-peritoneal (IP), empleando una dosis de 1,5 g/Kg de peso corporal, en dosis única o en dos dosis secuenciales del 50% del total c/u.

1.4. SOLUCIONES

Se empleará solución fisiológica artificial conteniendo buffer CO_2/HCO_3^- (pH = 7,4) con la siguiente composición: NaCl 124 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, glucosa 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM. La solución será barbotada hasta el momento en que el preparado sea montado en la caja para nervio (ver DISECCIÓN) con carbógeno (95% O_2 - 5% CO_2).

Nota: Debe disponerse de un volumen de aproximadamente 20 ml previamente congelado en un vaso de Bohemia de 50-100 ml, al que se agregará solución a $\sim 4^\circ C$ y donde se dispondrá del preparado extraído (ver DISECCIÓN).

1.5. DISECCIÓN

Aspectos Anatómicos

- El *nervio ciático* de la rata se origina de los segmentos espinales L4-L6, dando luego origen (5-6 mm distalmente al *trocánter del fémur*) a dos fascículos: el fascículo *tibial* (del que se originan los nervios **sural** y **tibial**) y el fascículo *peroneal* (que da origen a los nervios **peroneo** y una rama cutánea que inerva la cara próximo-lateral de la pantorrilla); ver parte **C** de **Fig. 1**.
- En la parte **B** de la **Fig. 1** se presenta una vista lateral de los grupos musculares de la rata. El *n. ciático* se extiende a través de los músculos profundos del muslo; puede ser observado si se refleja el *gluteus superficialis* y el *bíceps femoris* sobre la cara lateral del muslo.
- En la parte **A** de la misma figura (tomada de **SUAID, C. A, et. al., Aspects of the Macro and Microscopic Anatom of the Sciatic Nerve in Wistar Rats**. Int. J. Morphol., 34(3):877-884,2016.) se indican los extremos proximal (**p**) y distal (**d**) del nervio ciático. El primero se identifica en la emergencia del nervio a través del *foramen ciático*, mientras que el distal se reconoce como el sitio en el que la ramificación terminal tiene lugar.

Recomendaciones

- Durante la disección del *nervio* debe mantenerse la región (y específicamente al n. ciático) humedecidos con solución fisiológica a 4 °C.
- Disponer de un vaso de Bohemia con 20 ml congelados de solución fisiológica, sobre los que se agregarán ~30 ml de solución enfriada a ~4°C en el momento de extraer el preparado, barbotando con carbógeno. El nervio será colocado en esta solución una vez extraído y se dejará a temperatura ambiente hasta que se alcance el equilibrio térmico, durante aproximadamente 30 minutos, antes de ser transferido a la **caja para nervio**.
- Para la extracción del *n. ciático* proceda a ligar los extremos distal y proximal. Identifíquelos adecuadamente (por ejemplo utilizando hilos de ligadura de longitudes diferentes).

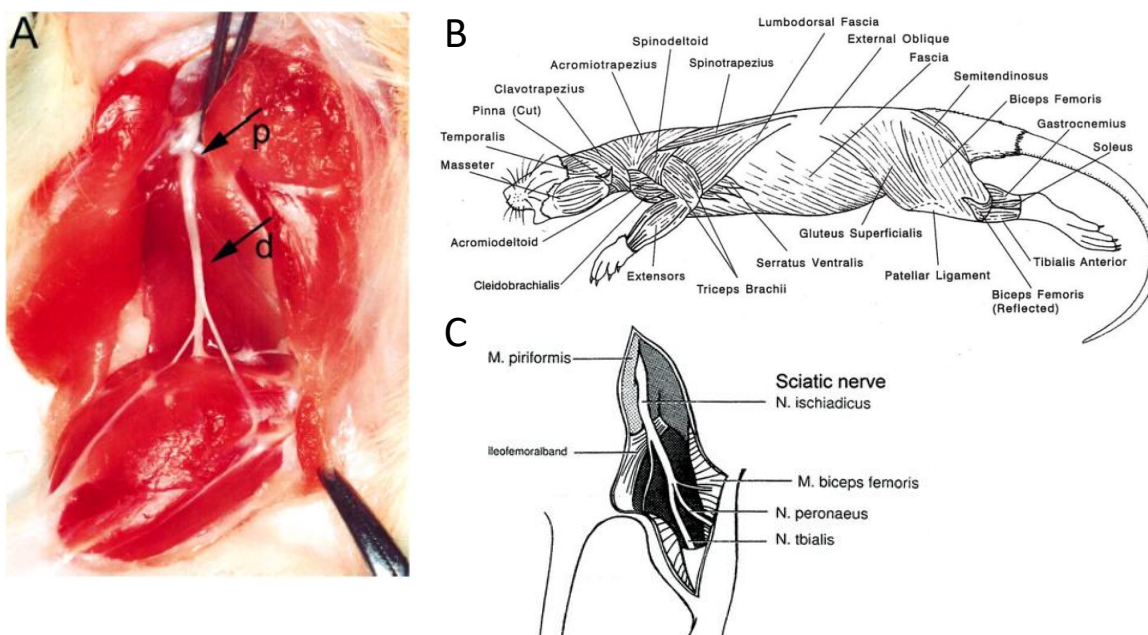


Fig. 1

1.6. ESTIMULACIÓN, REGISTRO Y ADQUISICIÓN DE DATOS

En la **Fig.1** se representan los componentes del **dispositivo experimental** que será empleado. Una descripción en mayor detalle de las características de los componentes, así



como comentarios respecto del proceso de digitalización, adquisición y almacenamiento de datos, se encuentran en los ANEXOS.

CAJA PARA NERVIO

Una vez extraído del animal, y tras el tiempo de permanencia en la solución fisiológica descrita en “DISECCIÓN” el preparado será montado en una **caja para nervio** como la presentada en la **Fig.1**. Esta caja contiene una serie de **electrodos** paralelos de **plata clorurada (Ag/AgCl)**, separados entre sí por 0,5 cm. La caja debe ser cubierta luego con un **portaobjetos de vidrio**, a los efectos de evitar la desecación del preparado. La caja para nervio asegura la no existencia de cortocircuitos extracelulares entre los electrodos de estimulación y registro, por lo que el volumen de solución hidroelectrolítica que mantiene el preparado una vez retirado de la incubación y colocado sobre los electrodos de Ag/AgCl debe ser minimizado.

ESTIMULADOR

Los estímulos eléctricos serán generados por un **estimulador GRASS mod. SD9** y consistirán en **pulsos rectangulares de voltaje**. Para una descripción en mayor detalle de las características del estimulador empleado véase el ANEXO correspondiente. El **cátodo** y el **ánodo** de estimulación se dispondrán en el **extremo DISTAL** del nervio, colocando inicialmente el cátodo por fuera y el ánodo por dentro (véase **Fig.1**). De este modo, se efectuará la **estimulación extracelular bipolar del preparado**. Se controlará la **frecuencia** a la que se aplique la estimulación (pulsos por segundo) y el **intervalo** entre pulsos (en los casos en los que se aplique **pulsos pareados**) según objetivos específicos.

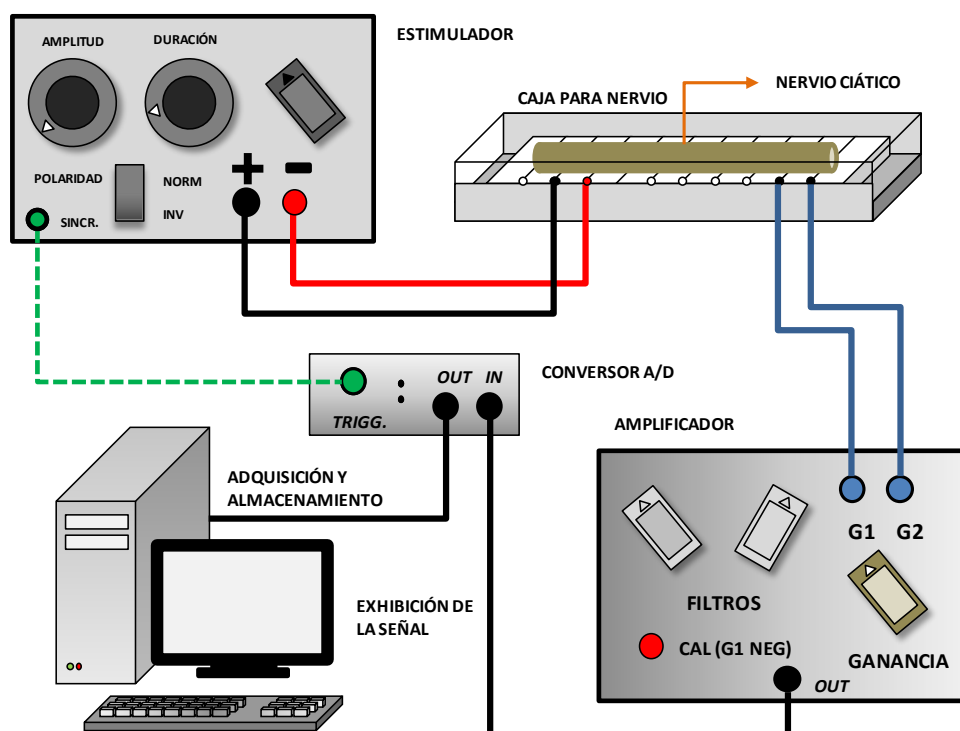


Fig. 2. Dispositivo experimental. Explicación en el texto.

CONVERSIÓN A/D, ADQUISICIÓN, VISUALIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO

El registro de la actividad bioeléctrica se llevará a cabo a través de la **medida diferencial del potencial eléctrico extracelular** mediante un **PRE-AMPLIFICADOR GRASS mod. p55** (ver ANEXOS). Los electrodos de registro designados por **G1** y **G2** se situarán en el **extremo PROXIMAL** del preparado. La señal será **amplificada** de acuerdo con los requerimientos de resolución del CAD (ver ANEXOS) y **filtrada** analógicamente. La señal analógica generada por el PRE-AMPLIFICADOR será digitalizada por el **CAD NI USB-6009** (ver ANEXOS). La **adquisición**, almacenamiento y visualización de la señal se efectuará mediante el programa **WinWCP V. 5.7.2.** (ver ANEXOS). Este programa será igualmente utilizado para el **procesamiento** y **análisis** ulterior de los datos.

2. MANIOBRAS EXPERIMENTALES PROPUESTAS

Se propone a continuación una serie de maniobras experimentales (designadas “Experimentos 1, 2, 3”, etc.). Para los Experimentos 1 y 2 se propone un cuestionario guía para el **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS** obtenidos.

2.1. EXPERIMENTO #1

El objetivo de este experimento es el de proporcionar una primera aproximación a los aspectos fundamentales de la estimulación del preparado y del registro del PAC.

En la Fig. 3 se esquematiza la **disposición** de los **electrodos de estimulación y registro** relativa a los extremos **DISTAL** y **PROXIMAL** del preparado.

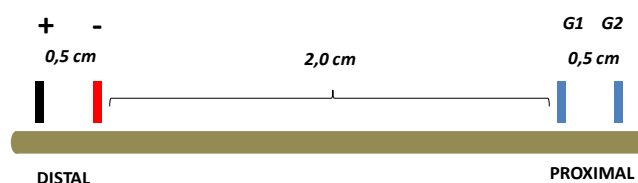


Fig. 3

La disposición de los electrodos de estimulación del modo presentado es referida como “**estimulación catódica**”.

a) Configure el **amplificador GRASS p55** de acuerdo a los siguientes parámetros:

Ganancia	X 1000
Filtros (LOW, -6 dB)	0.1 Hz
Filtros (HIGH, -6 dB)	10 KHz

- b) Realice la **calibración** del dispositivo de adquisición para la ganancia seleccionada, obteniendo como dato el **factor de escala (V/Units)** que será empleado en la **configuración de la adquisición** en WinWCP.
- c) Configure la **estimulación** con los siguientes parámetros (consulte los ANEXOS para mayor detalle); los parámetros controlados se representan en el esquema de la Fig. 4:

Amplitud del Estímulo	0.5 Volts (*)
Duración del Estímulo	0.05 ms
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms



Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple
Polaridad	Normal (Estimulación catódica)

(*) La amplitud del estímulo puede incrementarse, de ser necesario, hasta que se observe una respuesta con dos componentes, siendo bifásico y de mayor duración el segundo.

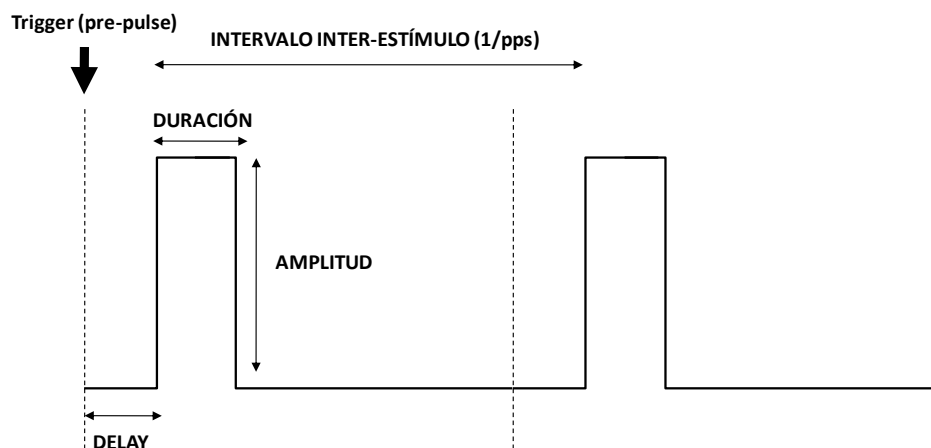


Fig. 4. Explicación en el texto.

d) Configure la **adquisición** en WinWCP con los siguientes parámetros (consulte los ANEXOS para mayor detalle):

Nº de Canales	1
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	5×10^{-5} s (20 KHz)
Duración del Trazado	12.8 ms
Nº de Trazados	256
V/ Units	Según calibración
Nº de Trazados	20



Nota: En WinWCP deberá asignar un nombre de archivo para guardar los datos obtenidos en cada experimento. Consulte en ANEXOS para mayor detalle.

- e) Inicie la adquisición en *WinWCP* pulsando el botón “RECORD” de la ventana “*Record to disk*” y llevando el selector “MODE” del ESTIMULADOR a la posición “Repeat”.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Una vez obtenido el registro en las condiciones especificadas, discuta los resultados y responda a las siguientes preguntas:

A – ADQUISICIÓN DE LA SEÑAL

- a) Realice el promedio *off-line* de los 20 trazados obtenidos (consulte el MANUAL de USUARIO de WinWCP para detalles sobre el procedimiento)
b) ¿Qué diferencias advierte entre el promedio y cada uno de los trazados? ¿Qué ventajas aporta promediar una señal?
- ¿Es adecuada la GANANCIA seleccionada para el registro de la señal efectuado? Fundamente su respuesta.
- ¿Considera que es adecuada la relación **señal/ruido (SNR)** del registro? ¿Podría incrementarla? ¿Cómo?
- a) ¿Es adecuada la FRECUENCIA DE MUESTREO seleccionada? Fundamente.
b) Repita el procedimiento pero empleando frecuencias de muestreo de 100 Hz y 1KHz (consulte en ANEXOS la forma de efectuar estos cambios manteniendo constante la **duración del trazado**). Compare los resultados obtenidos en cada caso y con los obtenidos a 20 KHz. Discuta la implicancia de la selección de la **frecuencia de muestreo** en el proceso de digitalización de una señal.
c) ¿Cómo puede determinarse la frecuencia de muestreo óptima para la digitalización de una señal?

B – COMPONENTES DE LA RESPUESTA

- Identifique los componentes de la respuesta obtenida: ¿a qué corresponde cada uno? Fundamente.
- Describa los componentes identificados.** Puede completarse la siguiente tabla introduciendo algunos de los parámetros que usted entienda capaces de



caracterizar y comparar cuantitativamente a las componentes (*por ejemplo: amplitud de la señal, duración, latencia, polaridad, etc.*). Se recomienda incluir para cada parámetro una breve DEFINICIÓN (por ejemplo: para el parámetro **AMPLITUD** podría corresponder la **DEFINICIÓN** “*diferencia entre los valores máximo y mínimo alcanzados por la señal*”). La **cuantificación** de los parámetros puede realizarse mediante las herramientas de procesamiento de *WinWCP* (consulte el MANUAL DE USUARIO para más detalles).

3. Proponga **experimentos complementarios** para contrastar la hipótesis interpretativa planteada en la pregunta **B.1**, con respecto al origen de los componentes identificados.

Parámetro	Definición	Valor (unidades)	
		Componente “1”	Componente “2”
		()	()
		()	()
		()	()
		()	()
		()	()
		()	()
		()	()



2.2. EXPERIMENTO #2

En este experimento se caracterizará la relación entre la amplitud del estímulo aplicado y la amplitud de la respuesta provocada.

Una vez definidos los parámetros de adquisición adecuados (dispone de un cuadro a continuación que puede utilizar para llevar un registro de los mismos), se realizará la estimulación del preparado (empleando la configuración del dispositivo mostrada en la Fig.3) pero variando la **amplitud del estímulo** en saltos de magnitud constante (mV).

ADQUISICIÓN

Nº de Canales	1
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	
Duración del Trazado	12.8 ms
Nº de Trazados	
V/Units	
Nº de Trazados	10

ESTÍMULO

- Establezca un estímulo inicial de 0 mV de amplitud y 0.05 ms de duración. Fije un valor para el incremento mV (por ejemplo 0.1 V).
- Obtenga **10 trazados por cada amplitud de estímulo empleada**. El siguiente cuadro puede utilizarse para resumir las características del estímulo. *En WinWCP deberá asignar un nombre de archivo para guardar los datos obtenidos en cada experimento. Consulte en ANEXOS para mayor detalle.* Inicie la adquisición en WinWCP pulsando el botón “RECORD” de la ventana “Record to disk” y llevando el selector “MODE” del ESTIMULADOR a la posición “Repeat



Archivo (*.wcp):			
Amplitud del Estímulo	Inicial	Incremento ^[2] (mV)	Final
Duración del Estímulo	0.05 ms		
Frecuencia de estímulo	1 pps		
Delay	1 ms		
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple		
Polaridad	Normal (Estimulación catódica)		

- c) Reitere el procedimiento hasta que el SEGUNDO COMPONENTE de la respuesta alcance una amplitud estable.

En el ANEXO se indica un método para monitorizar la **corriente** aplicada al preparado, medida a través de una resistencia conocida colocada en serie con uno de los electrodos de estimulación. Puede agregarse un canal de registro en WinWCP para obtener simultáneamente las señales procedentes del amplificador p55 y la corriente inyectada. En ese caso, la amplitud del estímulo puede **medirse** directamente en el registro, a los efectos de construir la curva *amplitud de la respuesta* en función de la *intensidad del estímulo* (ver ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS). Discuta las ventajas de aplicar este procedimiento en comparación con la estimación de la amplitud del estímulo mediante la lectura del **voltaje de salida** del estimulador en el panel frontal del dispositivo.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

A - ANÁLISIS MÍNIMO SUGERIDO

1. Construya un gráfico en el que se represente la **amplitud de la respuesta biológica** (V_{PAC}) en función de la **intensidad del estímulo aplicado** (I_{Est}). En el mismo par de ejes, represente la **amplitud del artefacto** en función de la **misma variable independiente** ⁽⁴⁾. Puede realizarlo con las herramientas de procesamiento de

⁴ Tenga en cuenta que para medir adecuadamente la amplitud del artefacto de estimulación, la **frecuencia de muestreo** de la señal debió seleccionarse de acuerdo a las características de este componente.



WinWCP o exportando los datos (por ejemplo en formato “*.txt”) para su procesamiento con otro programa.

2. Discuta los resultados aportados por este gráfico. Compare el comportamiento de ambas variables (respuesta biológica y artefacto) en función de la I_{Est} ¿Qué conclusiones extrae?
3. Elabore al menos una hipótesis interpretativa capaz de dar cuenta de los resultados surgidos del análisis precedente.
4. Proponga experimentos complementarios para contrastar sus hipótesis.

B- ANÁLISIS COMPLEMENTARIO

A) Se propone como ejemplo un análisis de carácter formal de la relación entre la **amplitud de la respuesta biológica** y la **intensidad del estímulo aplicado**. El objetivo de este análisis es el de obtener evidencias electrofisiológicas indirectas que sustenten la hipótesis de que el n. ciático constituye una estructura compuesta por una población heterogénea de fibras axonales. La heterogeneidad de esta población puede definirse de modo simplificado en términos de las diferencias en los diámetros de las fibras axonales, la existencia de sub-poblaciones de fibras mielínicas y amielínicas, etc. u otros elementos que determinen la existencia de sub-poblaciones de fibras que difieran en su excitabilidad, velocidad de conducción, etc. Para ello:

1. Realice un ajuste de los datos en el gráfico $V_{PAC} = f(I_{Est})$ a una **curva sigmoidea** de tipo

$$y(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}}$$

donde y corresponde a V_{PAC} y x corresponde a I_{Est} . Este ajuste puede realizarse en programas tales como **Sigma Plot** o **Clampfit** u otras hojas de cálculo disponibles.

2. Analice las características de la curva obtenida. Describa los resultados. ¿Qué conclusiones puede extraer?



3. Plantee elementos que permitan un análisis **cuantitativo** de la curva $y(x)$. Por ejemplo, determine la I_{Est} a la que se obtiene una respuesta igual al 50% de la respuesta máxima (I_{E50}). ¿Qué significado tiene este parámetro?
 4. Estime la I_{Ees} correspondiente al “umbral” (I_0) y la I_{Ees} a la que se alcanza una respuesta “máxima” ($I_{máx}$). Halle y compare las diferencias
 - i) $I_{máx} - I_{E50}$
 - ii) $I_{E50} - I_0$¿Son iguales estas diferencias? ¿Qué comentario le merece?
 5. Obtenga la derivada primera ($y'(x)$) de la curva. Realice una descripción de carácter cualitativo de esta curva. ¿Qué significado tiene?
 6. Elabore al menos una hipótesis interpretativa capaz de dar cuenta de los resultados surgidos del análisis precedente.
 7. Proponga experimentos complementarios para la contrastación de sus hipótesis.
- B)** Otro elemento de análisis que puede ser aplicado constituye el de la **variabilidad** de la amplitud de la respuesta biológica en función de la intensidad del estímulo. Bajo la hipótesis de que en las condiciones de estimulación empleadas las fibras reclutadas con intensidades de estimulación más bajas son las de mayor diámetro (siendo asimismo éstas las que aportan un componente mayor al PAC), podría plantearse que la **variabilidad** del PAC diferirá según el rango de estimulación considerado. Se sugiere entonces la discusión en torno a este aspecto, el planteamiento de los resultados esperados y el diseño de un análisis de este carácter, empleando los datos proporcionados tanto por el experimento anterior (o por modificaciones en el diseño del mismo), así como por experimentos diseñados *de novo*.

2.3. EXPERIMENTO #3

Esta maniobra experimental consiste en la **inversión de la polaridad del estímulo**.

- a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.



Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

- b) Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener posteriormente su promedio.
- c) Modifique la posición del interruptor “POLARITY” del estimulador, llevándola de “NORMAL” a “REVERSE” y obtenga **10** trazados nuevamente.

2.4. EXPERIMENTO #4

Esta maniobra experimental consiste en la estimulación del preparado estableciendo una **ligadura entre los electrodos de estimulación**.

- a) Defina la **amplitud y duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

- b) Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener posteriormente su promedio.
- c) Modifique la posición del interruptor “POLARITY” del estimulador, llevándola de “NORMAL” a “REVERSE” y obtenga **10** trazados nuevamente para obtener posteriormente su promedio.
- d) Vuelva a la posición “NORMAL” para la polaridad del estímulo.

- Efectúe una ligadura en una posición intermedia entre los electrodos de estimulación, como se indica en la **Fig. 5**.
- Obtenga **10** trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.
- Modifique la posición del interruptor “POLARITY” del estimulador, llevándola de “NORMAL” a “REVERSE” y obtenga **10** trazados nuevamente para obtener ulteriormente su promedio.

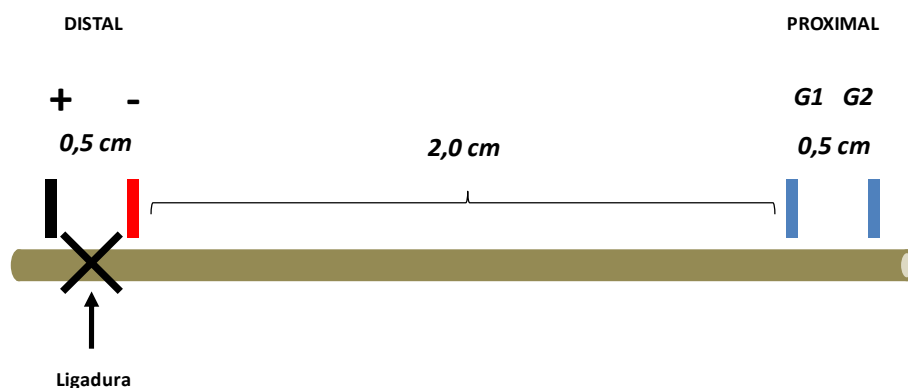


Fig.5

2.5. EXPERIMENTO #5

En este experimento se obtendrá un **PAC monofásico**, incrementando la distancia entre los electrodos de registro y efectuando una ligadura entre ambos.

- Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo (“*.wcp”):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Modalidad de la estimulación (simple o pares)	Simple

- Incremente la distancia entre los electrodos de registro **G1** y **G2**, aproximando el primero (alrededor de 1 cm) a los electrodos de estimulación.

- c) Obtenga 10 trazados en estas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.
- d) Efectúe una ligadura entre los electrodos de registro, tal como se indica en la Fig. 6.
- e) Obtenga 10 trazados en estas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.

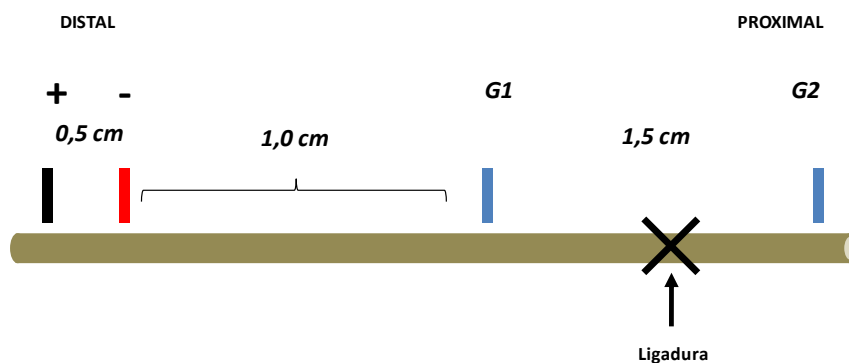


Fig. 6

2.6. EXPERIMENTO #6

En este experimento se obtendrá registros utilizando la configuración representada por la Fig. 3 (estímulo en el extremo **distal**) e invirtiendo luego la posición de los electrodos de estimulación y registro (**estimulación proximal**), tal como se presenta en la Fig. 7.

- a) Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.
- b) Obtenga 10 trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.
- c) Modifique la configuración del dispositivo experimental **sin modificar la distancia que separa a los electrodos de estimulación y registro** entre sí, en concordancia con lo esquematizado en la parte inferior de la Fig. 7
- d) Obtenga 10 trazados en esas condiciones para obtener ulteriormente su promedio.



Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Localización de los electrodos de estimulación	Prox. ☐ Dist. ☐
Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	0.05 ms
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
Localización de los electrodos de estimulación	Prox. ☐ Dist. ☐

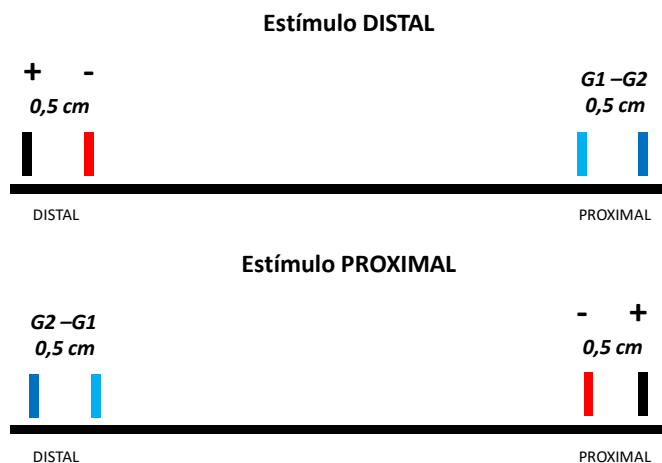


Fig.7.



2.7. EXPERIMENTO #7

En este experimento se obtendrá el registro del PAC en dos localizaciones, separadas por una distancia conocida.

- Defina la **amplitud** y **duración** de un **estímulo supramáximo**.
- Obtenga 10 trazados en esas condiciones, con los electrodos de registro localizados a la máxima distancia posible de los de estimulación (representada por X_1), como se muestra en la parte superior de la **Fig. 8**.

Archivo ("*.wcp"):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	1 pps
Delay	1 ms
X_1	
X_2	

- Aproxime los electrodos de estimulación y registro a una nueva distancia (representada por X_2), como se muestra en la parte inferior de la **Fig. 8**.
- Obtenga 10 trazados en esas condiciones

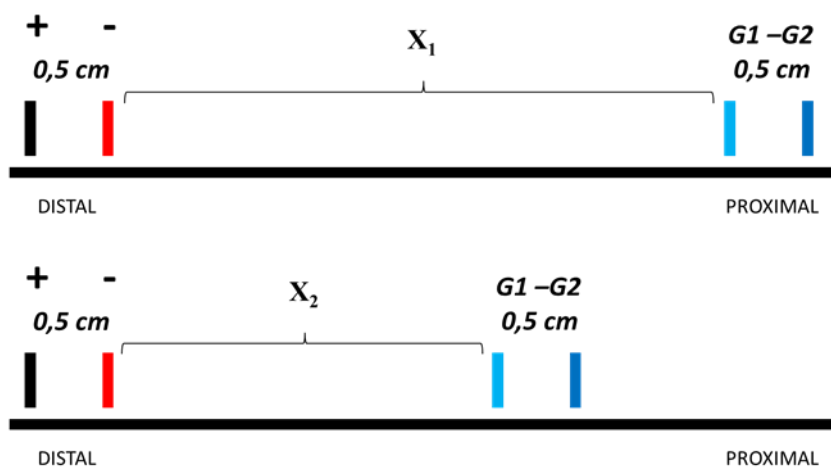


Fig. 8.



4.8.1. EXPERIMENTO #8a

En este experimento se aplicará **pares de pulsos de igual amplitud y duración** a intervalos definidos.

- a) Defina la **amplitud y duración** de un **estímulo supramáximo**.

Archivo (“*.wcp”):	
Amplitud del Estímulo	
Duración del Estímulo	
Frecuencia de estímulo	
Delay (intervalo inter-pulso, t_{E1E2}) INICIAL	
Cambio en el intervalo interestímulo (Δt_{E1E2})	

- b) Configure la **adquisición** en WinWCP a los efectos de tener una **duración total** del trazado de aproximadamente **40 ms**.
- c) Seleccione la modalidad “Twin Pulses” en el **estimulador**. En la **Fig. 9**. se muestra que los parámetros **DELAY** y **Frecuencia (pps)** determinan el **intervalo entre pulsos del par (t_{E1E2})** y la **frecuencia de aplicación del par** respectivamente (consúltese además el ANEXO).
- d) Establezca un **intervalo entre pares (=1/pps)** de 2 segundos.
- e) **Establezca in DELAY inicial de 30 ms**.
- f) Obtenga 10 trazados empleando la configuración del dispositivo representada en la **Fig. 3** con la aplicación de estímulos de iguales características.
- g) Reduzca sucesivamente (cada 10 trazados) el DELAY en pasos de 1 o 2 ms (Δt_{E1E2}). Observe los cambios en el curso temporal de las respuestas obtenidas.

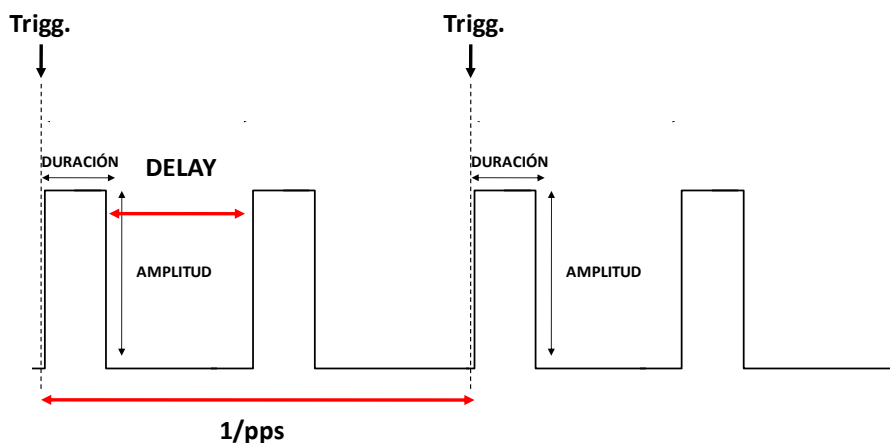


Fig. 9.

4.8.2. EXPERIMENTO #8b

Puede repetir el procedimiento detallado en 4.8.1., pero seleccionando **estímulos submáximos** o **apenas umbrales**.

4.9. EXPERIMENTO #9

En este experimento se obtendrá **potenciales de acción compuestos** de igual amplitud como resultado de la aplicación de “estímulos equivalentes” que difieren en sus características de duración y amplitud.

- a) Defina la **amplitud** (A_1) y **duración** (D_1) de un estímulo capaz de producir un PAC cuya amplitud sea aproximadamente un 50% de la amplitud máxima.

Archivo (“*.wcp”):	
Amplitud del Estímulo (A_1)	
Duración del Estímulo (D_1)	

- b) Obtenga 10 trazados en estas condiciones.
- c) Reduzca la **amplitud** del estímulo en $\sim 10\%$ (A_2) e incremente la **duración** (D_2), verificando que la respuesta biológica obtenida sea idéntica a la anterior.

- d) Repita el procedimiento con reducciones de $\sim 10\%$ de la amplitud, obteniendo en cada caso 10 trazados para su ulterior promedio. Obtendrá un conjunto de pulsos como el esquematizado en la **Fig. 10**.

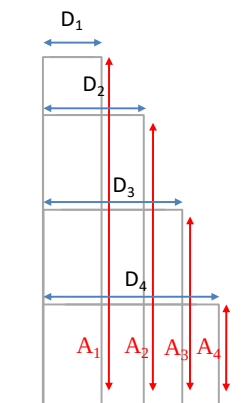


Fig. 10.

Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo (A_2)	
Duración del Estímulo (D_2)	
Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo (A_3)	
Duración del Estímulo (D_3)	
Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo (A_4)	
Duración del Estímulo (D_4)	
Archivo (*.wcp):	
Amplitud del Estímulo (A_5)	
Duración del Estímulo (D_5)	



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



(3) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DEL ÚTERO AISLADO

Marcela Alsina

APLICACIÓN: El diseño experimental presentado en esta sección permite caracterizar la actividad contráctil espontánea del útero in vitro y algunos de los mecanismos que subyacen a ésta. Asimismo, esta preparación permite

- Evidenciar el papel de la concentración extracelular del calcio en la actividad contráctil uterina.
- Evidenciar el papel del acoplamiento intercelular en actividad contráctil uterina.
- Determinar los efectos de diversos reguladores hormonales de la actividad contráctil uterina, tales como oxitocina, prostaglandina, adrenalina
- Determinar en algunos casos los receptores involucrados y la dosis-dependencia del efecto farmacológico evidenciado.

1. JUSTIFICACIÓN PARA EL USO DE ESTE DISEÑO: AUTOMATISMO MUSCULAR LISO EN EL ÚTERO

1.1. MUSCULO LISO

Existen dos tipos básicos de tejidos musculares lisos conocidos como músculo liso multiunitario y unitario. En el **músculo liso multi-unitario** cada célula recibe aferencias sinápticas, pero el acoplamiento eléctrico intercelular es escaso (es decir, hay pocas uniones



en hendidura o uniones GAP). Como resultado, cada célula del músculo liso puede contraerse independientemente de sus vecinas. De este modo, el término multiunitario describe al músculo liso que se comporta como múltiples células independientes o como grupos de células. Este tipo de músculo se observa en el iris y en el cuerpo ciliar del ojo, así como en los músculos piloerectores de la piel.

El **músculo liso unitario o mono-unitario** por su parte, es un grupo de células que trabaja como un **sincitio funcional**, ya que las uniones en hendidura o GAP proporcionan la comunicación eléctrica y química entre células. El acoplamiento eléctrico mecanismo permite una contracción coordinada de muchas células. Estas uniones permiten también que los iones y las moléculas pequeñas difundan entre las células, lo que da lugar a fenómenos como la propagación de ondas de Ca^{2+} entre las células acopladas. El músculo liso unitario es el tipo de músculo liso predominante en el interior de las paredes de vísceras orgánicas como los sistemas gastrointestinal y urinario, muchos vasos sanguíneos y el útero. Por tanto, al músculo liso unitario se le conoce a veces como músculo liso visceral.

1.2. PROPIEDADES DEL MUSCULO LISO

Muchas de las células del músculo son capaces de iniciar una **actividad eléctrica espontánea**, lo que determina el **automatismo**. Esta actividad espontánea se debe a **corrientes marcapasos** en células especializadas (como, por ejemplo, las células intersticiales de Cajal identificadas en el intestino) que modifican el potencial de membrana (V_m). La actividad eléctrica de marcapasos o automatismo se origina a partir de propiedades tiempo- y voltaje-dependientes de canales iónicos que producen espontáneamente corrientes despolarizadoras de entrada (p. ej., corrientes de Ca^{2+} voltaje-dependientes) o un descenso en las corrientes hiperpolarizadoras de salida (p. ej., corrientes de K^{+} voltaje-dependientes). La actividad eléctrica espontánea da lugar a oscilaciones, regulares y repetitivas del V_m que aparecen con una frecuencia de varios ciclos por minuto que se conocen como ondas lentas. Si las variaciones del V_m alcanza el umbral se disparará un potencial de acción que iniciará la contracción ⁵. Por tanto, las oscilaciones lentas inician y controlan las contracciones rítmicas o **actividad contráctil** del músculo liso.

⁵ Algunos músculos lisos, principalmente el multiunitario, se contraen en ausencia de potenciales de acción.



2. MÉTODOS

2.1. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El dispositivo experimental se esquematiza en la **Fig. 1**. Consiste en un Baño de Dale, el cual contiene dos cámaras de vidrio concéntricas: una cámara interna y otra externa. Se coloca una resistencia con termostato en la cámara externa con el objetivo de mantener el agua contenida en ésta a una temperatura de 37° C y mediante equilibrio térmico mantener constante la temperatura de la cámara interna donde se ubicará el preparado. En la cámara interna se coloca una solución fisiológica, denominada Tyrode, la cual proporcionará los sustratos y nutrientes que se requieren para mantener la viabilidad del tejido. Esta solución es equilibrada con una mezcla de gases denominada carbógeno el cual está conformado por un 95% de O₂ y un 5% de CO₂. El carbógeno es aportado desde un tanque, a través de un sistema de tubuladuras y un tubo de vidrio denominado anza. El anza, a la vez es el soporte físico del preparado. El Tyrode cumple a su vez la función de buffer o solución amortiguadora por medio del aporte de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) que, junto con un ácido débil, en nuestro caso el ácido carbónico que proviene del CO₂ del carbógeno, forman el sistema de tamponamiento encargado de ajustar continuamente el pH.

El sistema de registro y adquisición consta de un transductor de tensión isométrica Grass modelo FT03. El transductor de tensión es el encargado de transformar la energía mecánica en energía eléctrica (expresada en milivoltios: mV). Esta señal es amplificada por medio de un amplificador mecánico, y la señal (del tipo analógica) es adquirida en la computadora a través de un conversor Análogo/Digital (**VER ANEXOS**). La adquisición y procesamiento de la señal se llevará a cabo mediante los softwares DASyLab y Spike respectivamente.

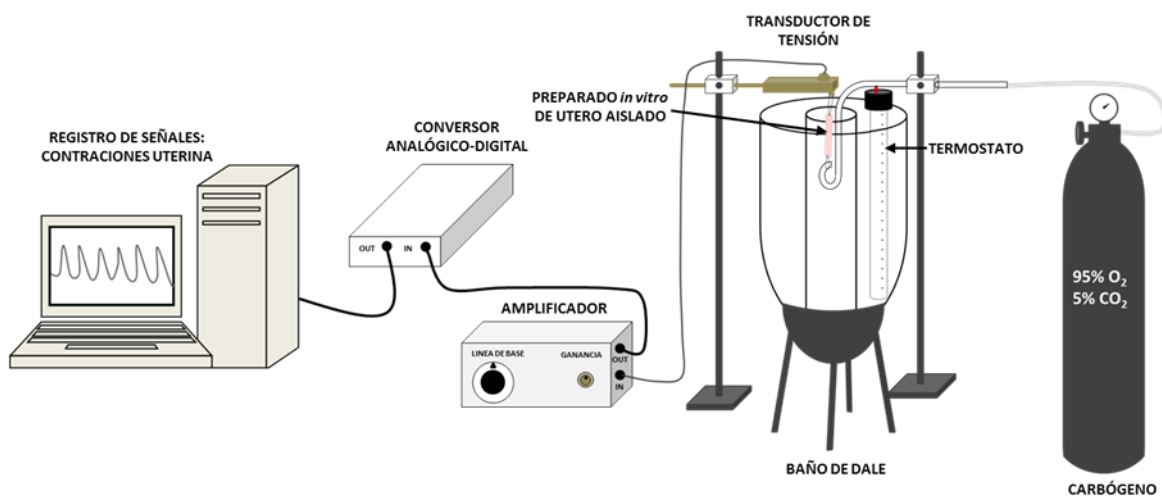


Fig. 1. Representación del dispositivo experimental, sistema de registro y adquisición.

2.2. CALIBRACION

Para poder cuantificar variaciones en la tensión, se debe realizar la calibración del sistema. Para esto, se utilizan pesas con un valor pre-establecido de 1, 2, 3 y 4 gramos. Estas pesas se cuelgan del transductor de tensión y se observan las variaciones de voltaje (mV) correspondientes a la fuerza o tensión en gramos ejercida en el transductor por cada pesa. Inmediatamente después, las pesas son retiradas del transductor una a una.

Con el fin de determinar el correcto funcionamiento del sistema de registro y adquisición, así como para establecer un rango de amplificación apropiado, es conveniente realizar la calibración al inicio del práctico. En el caso de que sea necesario modificar la amplificación durante el transcurso del práctico, la misma debe repetirse al finalizar el mismo.

La relación entre la tensión ejercida en el transductor y el voltaje debe ser tabulada y graficada. Como se puede observar en el ejemplo de la Figura 2, ambas variables se modifican de forma directamente proporcional. La relación entre ambas variables sigue una relación lineal y puede representarse mediante una ecuación de la función $y=ax+b$. En esta ecuación "a" representa la pendiente o el factor de conversión, "b" (la ordenada en el origen o término independiente) es igual a cero ya que la recta pasa por el origen. El valor de "a",

el factor de conversión nos permitirá expresar y convertir todos los datos obtenidos en la computadora como unidad de voltaje, a una unidad de tensión: gramos

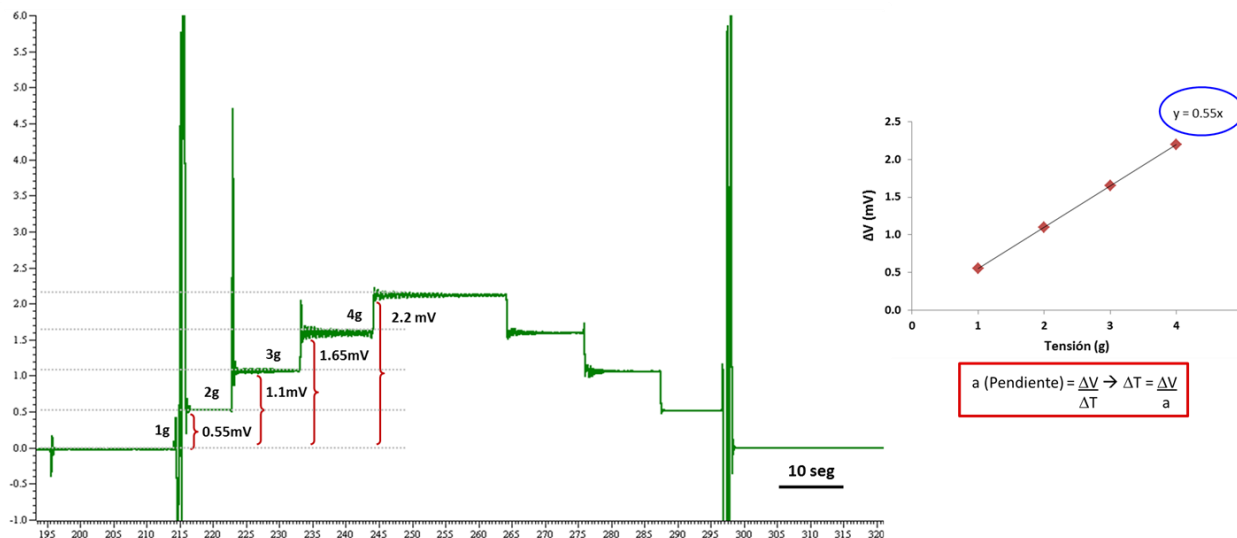


Fig. 2. Calibración

2.3. OBTENCIÓN DEL PREPARADO

Se utilizará un modelo *in vitro*, el cual consiste en aislar componentes celulares, tejidos u órganos del organismo entero. Este tipo de estudio reduccionista permite eliminar la interacción con otros órganos y sistemas, facilitando el control de las variables a estudiar. Este modelo requiere controlar y mantener variables fisiológicas como composición electrolítica, osmolaridad, pH, Temperatura, aporte energético y oxigenación de modo de mantener la viabilidad del preparado.

El preparado a utilizar se trata de un segmento de útero de una rata adulta de la cepa Wistar (250-300 g). Para la obtención del útero, se procede a realizar la eutanasia de la rata mediante dislocación cervical luego de anestesarla por inhalación de CO₂.

Para la disección se dispone el animal en una plancha de corcho en posición decúbito dorsal y se realiza una incisión mediana en la piel abdominal. Se reclinan las vísceras abdominales y se identifican el útero por su anatomía bicornue y los ovarios (Figura 3).



Fig. 3. Útero bicornue de una rata.

A continuación, se procede a cortar un segmento de uno de los cuernos uterinos (de aproximadamente 1.5 cm) y el mismo es colocado en una caja de Petri conteniendo una solución fisiológica fría (-4°C) equilibrada con carbógeno. Una vez extraído el segmento de útero, su interior es lavado con Tyrode mediante un catéter conectado a una jeringa. Luego se pasa un hilo perforando la pared del órgano en cada extremo, evitando cerrar la luz del órgano lo cual podría llevar a una acumulación de sustancias y secreciones. A continuación, el segmento de útero se introduce en la cámara interna del baño de Dale quedando totalmente sumergido en el Tyrode. Desde su extremo distal se lo ancla al anza, el cual está sostenido por un soporte. Luego se suspende el preparado desde su extremo proximal al transductor de tensión.

2.4. OBTENCIÓN DEL REGISTRO BASAL

En condiciones basales, se obtiene un registro de tensión en función del tiempo. El registro obtenido presenta ondas monofásicas, positivas, de forma irregular y con un ritmo determinado. Estas ondas representan ondas de contracciones fásicas. También podemos observar que entre cada contracción fásica el registro de tensión no cae a cero, esta línea de base de la tensión representa el **tono** muscular.

El tono consiste en el grado mínimo de desarrollo de tensión muscular que presenta el preparado; podemos observar que se mantiene relativamente estable entre contracciones consecutivas. El tono va a estar determinado no sólo por la tensión desarrollada por el órgano, sino también por la tensión ejercida mediante el estiramiento del preparado, el peso de este, así como por la tensión y el peso del hilo. Sin embargo, a lo



largo de la actividad práctica asumiremos que las diferentes maniobras no modifican estas últimas variables, por lo que los resultados observados pueden ser atribuidos a variaciones en la tensión desarrollada por el órgano. Para cuantificar variaciones en el tono muscular tomamos el valor de la línea envolvente inferior que une los valles de las ondas fásicas.

El registro obtenido presenta características medibles de amplitud y duración de la onda contráctil, así como de la frecuencia con la que se contrae. La amplitud de la onda representa la intensidad máxima que alcanza cada contracción y en el registro queda representada por la diferencia entre el pico de la onda y el valle, es decir, el tono basal. La duración de una contracción se mide desde que comienza la fase ascendente de la onda hasta el final de la fase descendente, el punto en el que alcanza nuevamente el tono basal. Por último, la frecuencia representa el número de veces que el órgano se contrae en un determinado período.

El desarrollo de tensión por el miometrio nos permite inferir que el órgano presenta la propiedad mecánica de **Contractilidad**. Asimismo, el hecho de que dicha actividad contráctil se presente en un preparado aislado constituye una evidencia indirecta de la existencia de un sistema de control intrínseco, independiente del sistema nervioso central. Este sistema de control, como se mencionó anteriormente, está formado por células marcapasos, las cuales le otorgan al preparado la propiedad eléctrica de **Automatismo**. Sin embargo, para confirmar la presencia de estas células marcapasos deberíamos realizar un registro electrofisiológico de las mismas.

2.5. MANIOBRAS EXPERIMENTALES

A) REGISTRO DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL UTERO AISLADO

Se recomienda dejar estabilizar el registro 5-10 min, y luego de este tiempo registrar la actividad contráctil espontánea durante 30 min.

- Describa el registro basal
- Analice y cuantifique el registro (frecuencia, duración, amplitud, área debajo de la curva y regularidad de las contracciones). Se sugiere dividir el registro en ventanas de 5 min para su procesamiento.



B) MANIOBRAS FARMACOLÓGICAS

Luego de la obtención del registro basal de la actividad contráctil espontánea, se procederá a realizar las maniobras farmacológicas correspondientes a los objetivos específicos planteados.

Se sugiere recordar:

- En relación con la actividad contráctil, recuerde el mecanismo general de la contracción muscular y el principal determinante del acoplamiento excito-contráctil.
- Con respecto a las propiedades del músculo liso, recuerde el concepto de sincitio funcional y su principal determinante.
- Recuerde los principales sistemas de regulación involucrados en el control de la contractilidad uterina y su rol en las diferentes etapas del ciclo sexual reproductor. ¿De qué depende la prevalencia o participación de los diferentes sistemas de regulación?
- Recuerde la regulación hormonal estrogénica sobre el miometrio. ¿Qué rol tienen los estrógenos?
- Revise e hipotetice sobre los efectos uterotónico o tocolíticos de la/s sustancia/s a utilizar.
- Recuerde el mecanismo de acción de la/s sustancia/s a utilizar.

En cada maniobra, la concentración de cada sustancia en la cámara interna será obtenida a partir de utilizar la ecuación de dilución, la cual establece que $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Para esto se debe conocer la concentración de la solución inicial o solución madre (C_i), la concentración a la cual se quiere llegar o concentración final (C_f) y el volumen final (V_f), en nuestro caso el volumen de la cámara interna. Así podemos calcular qué volumen (V_i) debemos tomar de una solución madre, para que una vez colocada en la cámara interna, alcance la concentración deseada.

Se recomienda analizar el registro en ventanas de 5 min.

- Analice y cuantifique los resultados obtenidos (frecuencia, duración, amplitud, área debajo de la curva y regularidad de las contracciones).



- Cuantifique variaciones en el tono muscular y en las fases de ascenso y de descenso de las contracciones fásicas.
- Calcule la latencia al efecto máximo.

3. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Como insumo para las posibles manipulaciones farmacológicas, en la tabla presentada a continuación, se detallan las concentraciones finales en el baño recomendadas

- Oxitocina: 6.5×10^{-4} UI/ml y 1.3×10^{-3} UI/ml.
- Prostaglandina F₂ : 1.9×10^{-4} M.
- Adrenalina: 1.3×10^{-6} M.
- Metilergonovina: 1.7×10^{-5} M.
- Fenoterol: 0.007 g/ml, 1×10^{-6} M.
- Nifedipina: 1.0×10^{-9} M.
- Carbenoxolona: 0.2×10^{-3} M.

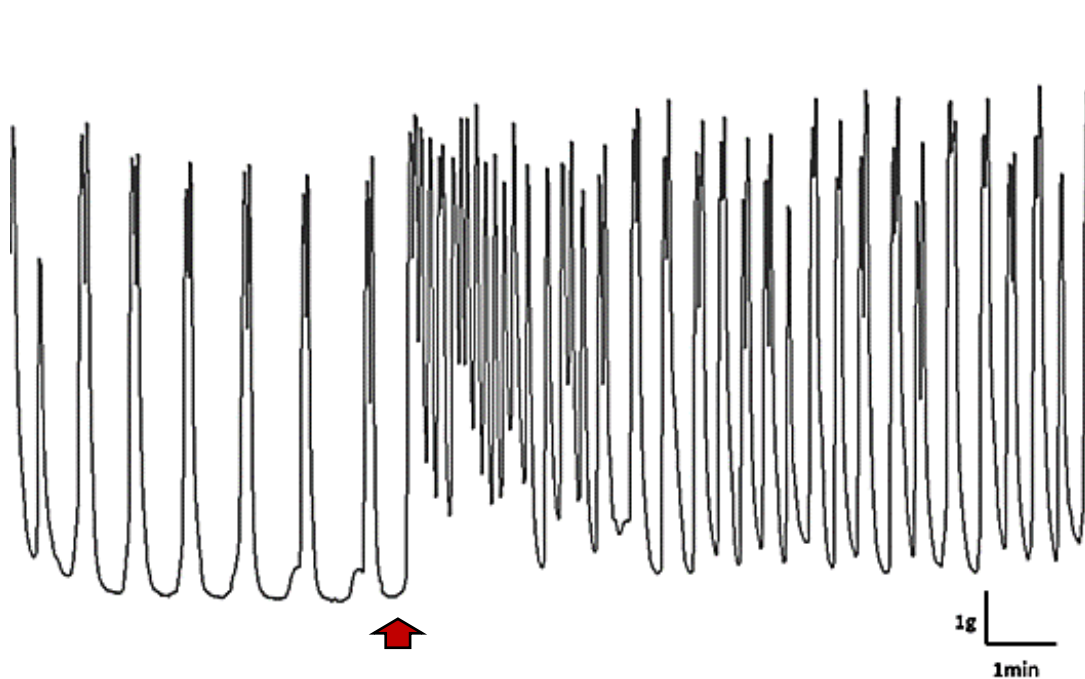
En el caso de utilizar más de un fármaco, recuerde realizar al menos dos lavados del baño con un nuevo Tyrode luego de la utilización una sustancia de modo de obtener un registro en las nuevas condiciones para tomar como referencia (registro control).

El orden de las sustancias no se corresponde a un orden de administración sugerido.

-

4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: CONSIDERACIÓN DE UN EJEMPLO

El registro presentado a continuación muestra la actividad contráctil del preparado antes y luego del agregado de una determinada sustancia a la cámara interna del baño de Dale. El instante en el que dicha sustancia es agregada se indica por la flecha vertical. Observe las características del registro, prestando particular atención al formato de presentación del resultado. Note por ejemplo el uso de barras de calibración para la variable tensión y tiempo.



De modo característico, algunas de los elementos fundamentales que deberá considerarse al presentar el análisis de los resultados obtenidos mediante una maniobra de características similares a la presentada corresponden a:

- Una descripción general del resultado obtenido, considerando elementos de carácter cualitativo, indicando el momento preciso en el que se realizó la maniobra correspondiente.
- Análisis cuantitativo de los cambios introducidos por la maniobra experimental en la actividad contráctil del preparado. Por ejemplo:



1. Cuantifique la frecuencia, la amplitud y la duración de las contracciones fásicas en la situación control y luego de la realización de la maniobra.

2. Cuantifique las variaciones en el tono muscular y en las fases de ascenso y de descenso de las contracciones fásicas; discuta acerca del significado funcional de estos parámetros.

3. Determine la latencia al efecto máximo.

c. Considere los mecanismos implicados en el establecimiento de los efectos observados. Discuta su participación y proponga experimentos adicionales (que podrá o no llevar a cabo) para confirmar o rechazar su propuesta.

NOTA: Los elementos detallados previamente NO CONSTITUYEN un listado exhaustivo de los puntos que deberá considerar, sino que simplemente ilustran un ejemplo general de algunos de los elementos a analizar tras la realización de un experimento dado.



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



(4) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DEL INTESTINO AISLADO

Lucía Zubizarreta

APLICACIÓN: El diseño experimental presentado en esta sección permite caracterizar la actividad contráctil espontánea del intestino *in vitro* y algunos de los mecanismos que subyacen a ésta. Asimismo, esta preparación permite

- Evidenciar el papel de la concentración extracelular del calcio en la actividad contráctil intestinal espontánea.
- Evidenciar el papel del acoplamiento intercelular en actividad contráctil del intestino.
- Determinar los efectos de diversos reguladores neuro-humorales de la actividad contráctil del intestino.
- Determinar en algunos casos los receptores involucrados y la dosis-dependencia del efecto farmacológico evidenciado.

1. MÉTODOS

1.1 Materiales

- 1 rata adulta con 12 hs de ayuno alimenticio.
- Material de disección
- Plancha de corcho



- Hilo y aguja
- Placa de Petri
- Jeringa con catéter
- Tubos para aireación con carbógeno
- Tanque de carbógeno
- Baño de Dale
- Anza
- Resistencia termostatzada
- Termómetro
- Transductor de tensión
- Amplificador mecánico
- Conversor análogo/digital (A/D)
- PC

Sustancias y soluciones

- Solución fisiológica Tyrode [NaCl 113.8mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 2.0mM, MgCl₂ 1.0mM, NaHCO₃ 25.0mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, Glucosa 10.0mM]
- Mezcla gaseosa con 95% de O₂ y 5% de CO₂: carbógeno.
- Acetilcolina. Solución madre 3.5 exp⁻⁴ M
- Adrenalina. Solución madre 5 exp⁻⁴ M
- Atropina (antagonista competitivo de receptores muscarínicos). Solución madre 3.5 exp⁻⁴ M

1.2 Modelo experimental

Para esta práctica se utiliza un modelo *in vitro*, el cual consiste en aislar componentes celulares, tejidos u órganos del organismo entero. Este tipo de estudio reduccionista permite eliminar la interacción con otros órganos y sistemas, facilitando el control de las variables a estudiar. Este modelo requiere controlar y mantener variables fisiológicas como composición electrolítica, osmolaridad, pH, temperatura, aporte energético y oxigenación de modo de mantener la viabilidad del preparado. El preparado a utilizar se trata de un segmento de duodeno de rata.



1.3. Dispositivo experimental

El dispositivo experimental consta de un Baño de Dale, que consiste en dos cámaras de vidrio concéntricas: una cámara interna y otra externa. Se coloca una resistencia con termostato en la cámara externa con el objetivo de mantener el agua contenida en ésta a una temperatura de 34° C (unos grados por debajo de la temperatura corporal de la rata) y mediante equilibrio térmico mantener constante la temperatura de la cámara interna donde se ubicará el preparado. En la cámara interna se coloca una solución fisiológica, denominada Tyrode, la cual proporcionará los sustratos y nutrientes que se requieren para mantener la viabilidad del tejido. Esta solución es equilibrada con una mezcla de gases denominada carbógeno el cual está conformado por un 95% de O₂ y un 5% de CO₂. El carbógeno es aportado desde un tanque, a través de un sistema de tubuladuras y un tubo de vidrio denominado anza. El anza, a la vez es el soporte físico del preparado. El Tyrode cumple a su vez la función de buffer o solución amortiguadora por medio del aporte de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) que junto con un ácido débil, en nuestro caso el ácido carbónico que proviene del CO₂ del carbógeno, forman el sistema de tamponamiento encargado de ajustar continuamente el pH.

El sistema de registro y adquisición consta de un transductor de tensión isométrica Grass modelo FT03. El transductor de tensión es el encargado de transformar la energía mecánica en energía eléctrica (expresada en milivoltios: mV). Esta señal es amplificada por medio de un amplificador mecánico, y la señal (del tipo analógica) es adquirida en la computadora a través de un conversor Análogo/Digital (**VER ANEXOS**). La adquisición y procesamiento de la señal se llevará a cabo mediante software específico disponible en el salón de clases prácticas.

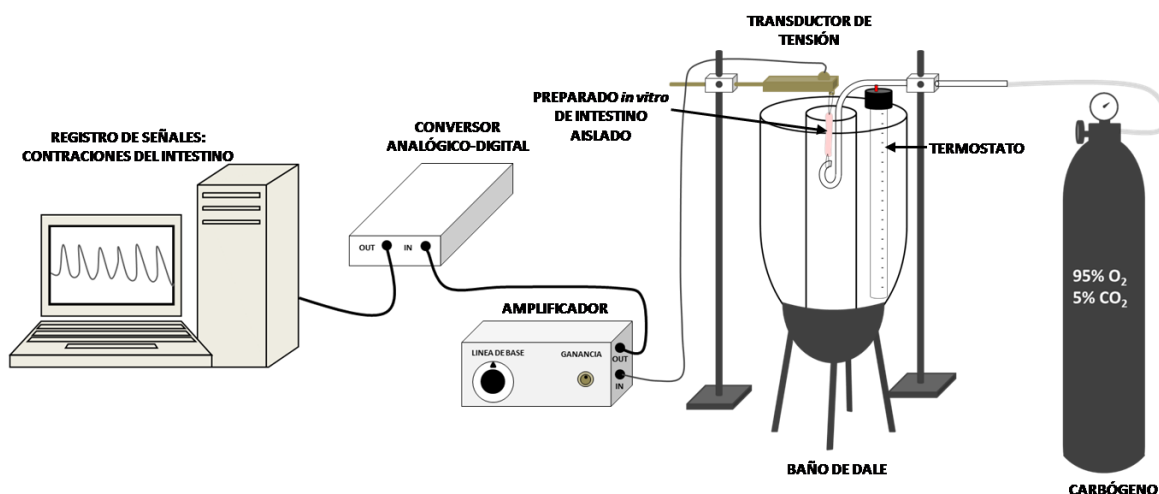


Figura 1. Representación del dispositivo experimental, sistema de registro y adquisición.

1.4 Calibración

Para poder cuantificar variaciones en la tensión, se debe realizar la calibración del sistema. Para esto, se utilizan pesas con un valor pre-establecido de 1 gramo. Estas pesas se cuelgan del transductor de tensión una a una de forma acumulativa (hasta cubrir el rango dinámico registrado durante la práctica) y se observan las variaciones de voltaje (mV) correspondientes a la fuerza o tensión en gramos ejercida en el transductor por cada pesa. Inmediatamente después, las pesas son retiradas del transductor una a una.

La relación entre la tensión ejercida en el transductor y el voltaje deber ser tabulada y graficada. Como se puede observar en el ejemplo de la Figura 2, ambas variables se modifican de forma directamente proporcional. La relación entre ambas variables sigue una relación lineal y puede representarse mediante una ecuación de la función $y=ax+b$. En esta ecuación “a” representa la pendiente o el factor de conversión y “b” (la ordenada en el origen o término independiente) es igual a cero ya que la recta pasa por el origen. El valor de “a”, el factor de conversión, nos permitirá expresar y convertir todos los datos obtenidos en la computadora como unidad de voltaje, a una unidad de tensión: gramos.

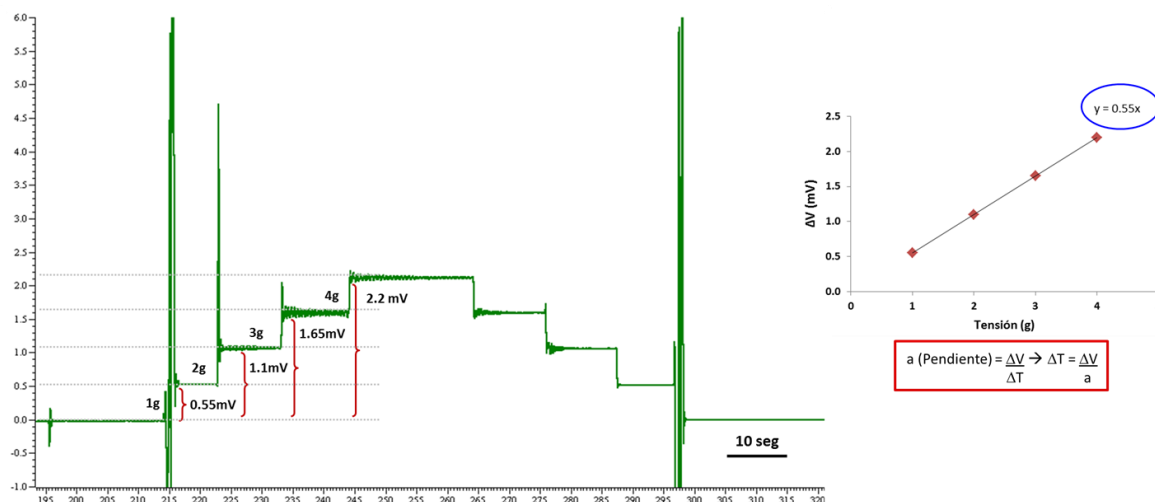


Figura 2. Calibración

1.5. Obtención del preparado

Para la obtención del preparado, se procede a realizar la eutanasia de la rata mediante dislocación cervical luego de anestesiarse por inhalación de CO_2 .

Para la disección se dispone el animal en una plancha de corcho en posición decúbito dorsal y se realiza una incisión mediana en la piel abdominal. Se identifica el estómago y la primera porción del intestino (duodeno), la cual será seccionada. Cortar un segmento de duodeno de 6 cm (Sharp y Villano, 2012), y transferir a la Placa de Petri conteniendo una solución fisiológica equilibrada con carbógeno. Una vez en la Placa de Petri retirar el mesenterio con una tijera, seccionar en segmentos de aproximadamente 1.5 cm, y lavar el contenido del interior de las secciones con Tyrode utilizando un catéter conectado a una jeringa. Luego se pasa un hilo perforando la pared del órgano en cada extremo, evitando cerrar la luz del órgano lo cual podría llevar a una acumulación de sustancias y secreciones, e impedir el acceso de las sustancias que se aplicarán. A continuación, el segmento de intestino se introduce en la cámara interna del baño de Dale quedando totalmente sumergido en el Tyrode. Desde un extremo se lo ancla al anza, y posteriormente, desde el otro extremo al transductor de tensión.

Recomendaciones:

- Realizar la disección con cuidado, evitando tironear el preparado.



- Durante el lavado del contenido intestinal procurar no raspar mucho el interior del órgano.
- Controlar que el preparado esté debidamente carbogeneado una vez sumergido en la cámara interna.
- Para asegurar la viabilidad de las secciones de intestino que no se cuelgan, controlar el correcto carbogeneado de la Placa de Petri.

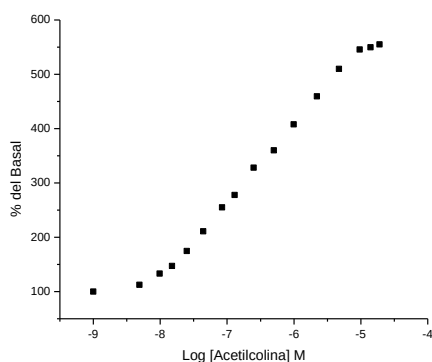
1.6. Manipulaciones farmacológicas

En cada maniobra, calcular la concentración de la sustancia que desea administrarse en la cámara interna y tomar el volumen necesario de la solución madre calculado por la ecuación de dilución. Para orientarse sobre cuál podría ser esta concentración en la cámara interna ver la sección **INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA**. Si se plantea hacer dos maniobras diferentes en el mismo preparado, recuerde realizar al menos dos lavados del baño con un nuevo Tyrode luego de la utilización de cada uno de los fármacos y obtener un registro en las nuevas condiciones basales para tomar como referencia (registro control).



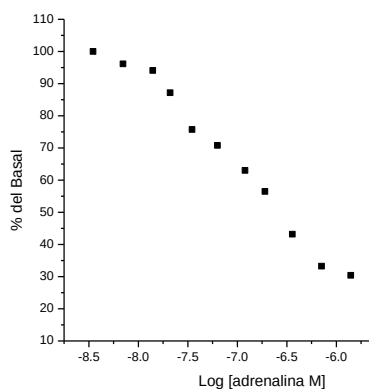
2. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Como insumo para las posibles manipulaciones farmacológicas que se planteen de acuerdo a los objetivos específicos, a continuación, se muestran las curvas dosis-respuesta de acetilcolina y adrenalina disponibles en el SCP.



[Acetilcolina] M	Log [Acetilcolina, M]
1 E-9	
4.9 E-9	-9
9.8 E-9	-8.3
1.5 E-8	-8.0
2.5 E-8	-7.8
4.4 E-8	-7.6
8.4 E-8	-7.4
1.3 E-7	-7.1
2.5 E-7	-6.9
5 E-7	-6.6
9.9 E-7	-6.3
2.2 E-6	-6.00
4.7 E-6	-5.7
9.6 E-6	-5.3
1.4 E-5	-5.0
1.9 E-5	-4.9
	-4.7

Figura 3: Curva dosis respuesta de Acetilcolina. En el gráfico se muestra el efecto de dosis crecientes de acetilcolina sobre la tensión (expresada como porcentaje de la tensión basal del preparado sin acetilcolina). La concentración de acetilcolina (M) fue transformada mediante el Log. A la derecha se muestra una tabla con las concentraciones de acetilcolina (M) utilizadas en el baño y la correspondiente transformación con Log.



[Adrenalina] M	Log [Adrenalina M]
3.5 E-9	-8.5
7 E-9	-8.2
1.4 E-8	-7.9
2.1 E-8	-7.7
3.5 E-8	-7.5
6.3 E-8	-7.2
1.2 E-7	-6.9
1.9 E-7	-6.7
3.6 E-7	-6.4
7.1 E-7	-6.2
1.4 E-6	-5.9

Figura 4: Curva dosis respuesta de Adrenalina. En el gráfico se muestra el efecto de dosis crecientes de adrenalina sobre la tensión (expresada como porcentaje de la tensión basal del preparado sin adrenalina). La concentración de adrenalina (M) fue transformada mediante el Log. A la derecha se muestra una tabla con las concentraciones de adrenalina (M) utilizadas en el baño y la correspondiente transformación con Log.



Referencias

The Laboratory Rat, Second Edition. Patrick Sharp y Jason S. Villano. 2012. CRC press.

Bibliografía recomendada

Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles S. M. WARD, K. M. SANDERS* & G. D. S. HIRST. Neurogastroenterol Motil (2004) 16 (Suppl. 1), 112–117.

Teaching a changing paradigm in physiology: a historical perspective on gut interstitial cells. Bernard T. Drumm and Salah A. Baker. Adv Physiol Educ 41: 100–109, 2017.

Autonomic modulation of intestinal smooth muscle contractility. Montgomery, L., Tansey, E., Johnson C., Roe S., Quinn J. Adv Physiol Educ (2016) 40:104-109.



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



(5) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA NEUROMUSCULAR

Santiago Castro – Matías Cavelli

APLICACIÓN: El diseño experimental presentado en esta sección permite el estudio de las características básicas de la transmisión sináptica neuro-muscular en la rata

1. MÉTODOS

1.1. Elección y características del reactivo biológico

Para esta práctica hemos elegido estudiar la unión neuromuscular del nervio ciático con el músculo gastrocnemio de la rata albina adulta (Cepa: Wistar o Sprague Dawley) utilizando una preparación *in vivo*. *In vivo* (latín: *dentro de lo vivo*) significa "que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo". En ciencia, *in vivo* se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo, por oposición a uno parcial? o muerto. Pruebas con animales y los ensayos clínicos son formas de investigación *in vivo*.

La rata albina es reactivo biológico estándar ampliamente utilizado en la experimentación animal. Tenemos un amplio conocimiento de su anatomía y fisiología además de ser de fácil acceso, manipulación y bajo costo. Por otra parte, los roedores son mamíferos (homeotermos) por lo que, durante la práctica, varias de sus variables fisiológicas deben ser controladas (temperatura, respiración, etc.)



La rata la obtendremos de la URBE (Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación) de la Facultad de Medicina. Todos los protocolos de experimentación utilizados en el salón de clases prácticas del Departamento de Fisiología han sido previamente aprobados por la CHEA (comisión honoraria de experimentación animal) y de acuerdo con la reglamentación vigente (Ley: 18611).

1.2. Preparación y disección

Antes de anestesiarse al animal debe corroborar que la mesa de registro y todos los dispositivos estén funcionales y en posición adecuada para la realización de la práctica. Antes de comenzar con la práctica, recomendamos al estudiante consultar el material de **Anexos** referentes al funcionamiento de los dispositivos utilizados en el salón de clases prácticas. En la **Figura 1A** se muestra un ejemplo de arreglo de la mesa de registro adecuado para la realización de esta práctica.

Comenzaremos con anestesiarse al animal con una dosis de uretano (1.5 g/Kg i.p.; 0.5 g/ml). Previo a la anestesia se debe comprobar que el animal se desplace normalmente dentro de los confines de la caja de hospedaje. Al momento de cargar la dosis en la jeringa debe corroborar que la solución sea transparente y límpida (el uretano tiende a formar cristales a esa concentración). La anestesia puede administrarse una única vez o en dosis sucesivas separadas por un intervalo constante de tiempo (ejemplo: dos dosis consecutivas de 0.75 g/Kg cada 10 minutos), esto último sirve para evitar la sobredosis de anestésico debido a la heterogeneidad en la sensibilidad a los anestésicos que presenta cada animal. Al completar la inyección, asegúrese de dejar al animal en un lugar oscuro y tranquilo por 15 minutos.

Antes de comenzar se debe corroborar que el efecto anestésico es el adecuado para proceder con la cirugía. Tomaremos como referencia la abolición del reflejo corneal. El reflejo corneal, es un parpadeo involuntario provocado por la estimulación sobre la córnea. Durante la cirugía se debe contar con una jeringa con 1/4-1/5 de la dosis de anestésico, la cual debe aplicarse en caso de que existan indicios de que la anestesia aún no es suficiente. Indicios de bajo nivel de anestesia pueden ser la persistencia del reflejo corneal, movimiento de los bigotes o la reactividad a las maniobras durante la cirugía.

Una vez que el animal esté en condiciones, se lo coloca en decúbito dorsal para realizar una traqueotomía. Para detalles sobre este procedimiento ver **ANEXO 6**



Terminado este procedimiento colocamos al animal en decúbito ventral sobre una planchuela de disección (Figura 1B). Para facilitar el acceso a la cánula podemos poner una pequeña almohadita de corcho que mantenga elevada la cabeza del animal de 1 a 2 centímetros. Las extremidades del animal deben fijarse a la planchuela a efectos de evitar desplazamientos durante la práctica (cinta adhesiva y alfileres sobre la plancha de corcho estabilizando principalmente las articulaciones del miembro a disecar). Para facilitar la cirugía, se puede cortar o afeitar el pelo de la parte dorsal de las extremidades inferiores llegando hasta la línea media dorsal a la altura de dicha extremidad. Con la utilización de cremas depilatorias se obtienen mejores resultados.

Comenzamos con una incisión en la piel a nivel de la articulación de la rodilla extendiéndola proximalmente por el miembro y continuándola hasta el dorso del animal. Dicha incisión debe formar una línea recta que vaya hasta la columna vertebral y perpendicular a esta (**Figura 1C**). Por último, se disea la piel desde la rodilla hasta el extremo distal del miembro de manera de exponer el músculo gastrocnemio. Luego, con mucho cuidado y evitando la rotura de cualquier vaso, se disecan los planos musculares para exponer el nervio ciático. Es necesario intentar exponer al nervio lo más proximalmente posible de la médula espinal, así como lo más proximal al músculo gastrocnemio. En todo este trayecto, el nervio debe ser separado de la vasculatura que lo acompaña para luego colocar un hilo por debajo de este, lo más proximal posible a la médula espinal.

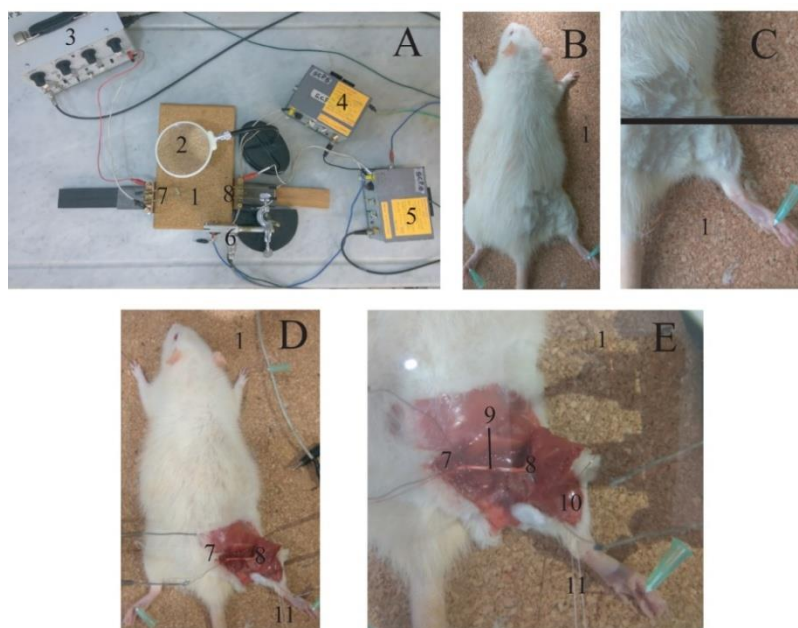


Figura 1. Mesa de registro, preparado y dispositivos. **A.** Mesa de registro y dispositivos. **B.** Animal en decúbito ventral sobre la planchuela de disección. **C.** Miembro posterior derecho. El trazado negro representa la línea imaginaria por donde se debe realizar la primera incisión. **D.** Cirugía de exposición del nervio ciático y músculo gastrocnemio. **E.** Ampliación de la disección y colocación de los electrodos de estimulación y registro. 1. Planchuela de disección; 2. Lupa; 3. Estimulador; 4. Amplificador diferencial para registro de electromiograma (EMG); 5. Amplificador diferencial para registro de nervio; 6. Transductor de tensión; 7. Electrodos colgantes de estimulación del nervio; 8. Electrodos colgantes de registro del nervio; 9. Nervio ciático; 10. Músculo gastrocnemio; 11. Hilo que conecta el tendón con el transductor de tensión.

1.3. Estimulación y Registro

Para la estimulación y registro de la actividad eléctrica del nervio ciático *in vivo*, utilizaremos dos pares de electrodos. Puede utilizarse electrodos de canaleta o electrodos colgantes. En ambos casos es importante que cada electrodo entre en contacto solo con el nervio y que se encuentre bien aislado del resto de los tejidos. El par de electrodos de estimulación debe colocarse proximal a la médula espinal mientras que el par de electrodos de registro debe colocarse lo más distal a la médula espinal y lo más proximal posible al músculo en cuestión sin hacer contacto con este. Se debe intentar obtener la máxima separación posible entre electrodos de estimulación y registro a efectos de obtener una separación óptima entre el registro de la actividad bioeléctrica y el artefacto del estímulo (las maniobras necesarias y el conocimiento teórico para el reconocimiento del origen biológico o artefactual de las señales registradas debe ser adquirido previamente en la



práctica de **Nervio Aislado**). Los electrodos de estimulación y registro deben estar separados entre sí y en contacto con el nervio. El electrodo de estimulación más proximal a la médula debe conectarse al ánodo del estimulador (+) mientras que el distal debe conectarse al cátodo (-) del estimulador (ver **Anexo 1** y protocolo de **Nervio Aislado** para entender las razones de dicho arreglo). En cuanto a los electrodos de registro, el electrodo proximal a la médula debe ser conectado a la entrada G1 del amplificador diferencial, mientras que el distal se conectará a la entrada G2 (ver **Anexo 2** y protocolo de **Nervio Aislado** para entender las razones de dicho arreglo).

Para el registro de la actividad eléctrica del músculo o electromiograma (EMG) un par de electrodos deben ser colocados dentro o sobre el músculo en cuestión. Para el registro dentro del músculo, un par de cables aislados con un diámetro no mayor a 300 μm deben ser enhebrados dentro de una aguja hueca grande (aguja de calibre igual o mayor a 21G). La punta del cable debe sobresalir 2-4 mm sobre la punta de la aguja para luego doblarse sobre si misma ≈ 150 grados.

Para colocar el electrodo se debe pinchar el músculo y una vez dentro retirar con cuidado la aguja. La curvatura en la punta del electrodo generará que el mismo se quede dentro del músculo. Para registrar el EMG del músculo se puede utilizar electrodos de pabilo (electrodos de algodón embebidos en solución salina fisiológica) colocados sobre la superficie del músculo en cuestión. Ambos tipos de electrodos (lanza o pabilo) deben ser conectados a un amplificador diferencial similar al utilizado para el registro de nervio (**Anexo 2**).

Para registrar la tensión generada por el músculo luego de la estimulación del nervio, atravesaremos el tendón distal del músculo gastrocnemio con aguja e hilo para luego conectar los extremos del hilo al sensor de un transductor de tensión. En este caso el transductor de tensión lo colocamos perpendicular a la dirección en la cual genera tensión el tendón de modo que el hilo acompañe la dirección del tendón en cuestión. Debemos alejar de a poco el transductor de tensión del tendón hasta que corroboremos que el hilo presenta una tensión constante pero no muy alta para poder observar las variaciones en la tensión generadas sobre el tendón por la actividad muscular (ver **Anexo 5**).

Todas las señales bioeléctricas serán acondicionadas en frecuencia, amplificadas (nervio y EMG X100-1000, ver **Anexo 2**; Tensión, ver **Anexo 5**) y digitalizadas (tarjeta A/D National Instrument de 2^{14} Bits, ver **Anexo 3**) para poder ser adquiridas y analizadas en el



computador mediante el software Win-WCP que utilizamos en el salón de clases prácticas (ver **Anexo 4**, sobre el funcionamiento del software de adquisición y análisis de datos).

2. MANIOBRAS EXPERIMENTALES

Las maniobras sugeridas pueden dividirse en 4 grandes pasos.

- 1- Estimulación del nervio ciático y registro de la actividad bioeléctrica y mecánica (Comprobación del origen biológico o artefactual de las señales registradas).
- 2- Estimulación del músculo, registro del nervio y actividad mecánica (prueba de direccionalidad del impulso)
- 3- Estimulación del nervio ciático a altas frecuencias, fatiga sináptica (prueba de origen químico o eléctrico de la sinapsis neuromuscular).
- 4- Estimulación del nervio ciático y registro de la actividad bioeléctrica y mecánica durante la aplicación intravenosa o intramuscular de drogas tipo “Curare” (Identificación del neurotransmisor involucrado).

*(Nota: Sugerimos al estudiante que intente plantearse otras maniobras experimentales que pongan a prueba la hipótesis del origen químico o eléctrico de la **sinapsis neuromuscular**)*

2.1. Estimulación del nervio ciático y registro de la actividad bioeléctrica y mecánica (Comprobación del origen biológico o artefactual de las señales registradas).

Se estimulará al nervio ciático próximo a su origen en la columna dorsal con pulsos cuadrados de voltaje de amplitud variable y de 0.05 ms de duración (ver **Anexos**), mientras se registra la actividad eléctrica en el nervio ciático ubicado cercano al músculo y en el músculo gastrocnemio mediante electrodos de laza. Concomitantemente se registra la actividad mecánica del músculo a través de la tensión que le ejerce este sobre el hilo en cada contracción. Antes de empezar debemos configurar el amplificador GRASS p55 (ganancia X100-1000; filtros entre 0.1 Hz y 3 KHz). Antes de comenzar el experimento debe calibrar su dispositivo de adquisición para la ganancia seleccionada, obteniendo un factor de



conversión que puede utilizar en la configuración de la adquisición en WinWCP (ver **Anexos**). Antes de adquirir debe configurar la adquisición en WinWCP con los siguientes parámetros:

N° de Canales	3
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	6.25×10^{-5} s (16 Kz)
Duración del Trazado	32-64 ms
Puntos del Trazado	512-1024 puntos
V/Units (WinWCP)	Depende de la calibración de cada amplificador
Numero de trazados	Variable
registro	Ext. Trigger

*Nota: 1. Las tarjetas A/D del salón de clases prácticas presentan un máximo de 50 KS/Seg. en la suma de todos los canales lo cual limita la máxima frecuencia de muestreo por canal cuando utilizamos múltiples canales. 2. El filtro pasa bajo de 3KHz es un poco bajo para esta clase de registros y puede modificar levemente la forma de onda de las señales registradas, sin embargo, es el único acorde a la máxima frecuencia de muestreo que podemos obtener para 3 canales (ver **Anexos**). 3. En WinWCP deberá asignar un nombre de archivo para guardar los datos obtenidos en cada experimento. Consulte en **Anexos** para mayor detalle.*

A efectos prácticos, puede disponer de otra configuración del programa WinWCP para realizar la calibración:



N° de Canales	3
Intervalo de Muestreo (1/frecuencia de muestreo)	(1024 Hz)
Duración del Trazado	10 segundos
Puntos del Trazado	10240 puntos
V/Units (WinWCP)	Es lo que vamos a obtener con la calibración
Numero de trazados	Variable
registro	Continuo

En la computadora debemos ver los tres registros de actividad biológica en simultáneo (ejemplo: **Figura 3**). Realice la maniobra de inversión de polaridad de estímulo y describa de manera minuciosa los resultados obtenidos. ¿Qué resultados le brindan evidencia a favor de la hipótesis de un origen biológico o artefactual de las señales registradas? Cuantifique amplitudes y latencias:

Sugerimos al aspirante realizar las curvas de estímulo-respuesta de las señales registradas. Para esta maniobra debemos comenzar configurando el estimulador. Para estimular el nervio utilizaremos pulsos cuadrados de voltaje de amplitud creciente (0.05 ms de duración) y registraremos la amplitud de las respuestas obtenidas:

Grafique las relaciones entre estímulo y las respuestas de las cuatro amplitudes registradas. Registre las latencias existentes entre el instante cero (estímulo) y la aparición de las respuestas biológicas. Discuta sobre el orden de aparición de las tres señales registradas y sus retrasos. Basado en su conocimiento previo formule qué secuencia de acontecimientos podrían explicar el orden de aparición de las señales registradas.

2.2. Estimulación del músculo, registro del nervio y actividad mecánica (prueba de direccionalidad del impulso)

Discuta acerca de la relevancia y limitaciones que esta maniobra puede tener a la hora de poner a prueba la unidireccionalidad del impulso nervioso a nivel de la sinapsis neuromuscular:



Para realizar esta prueba utilizar los mismos electrodos de lanza o pabito que utilizamos para registrar el EMG solo que debe desconectarlos del amplificador de EMG y conectarlos al estimulador, de esta forma los electrodos de registro del EMG se convertirán en electrodos de estimulación del músculo. En este caso veremos solo dos registros en simultáneo (eléctrico en nervio y de tensión del músculo). Debe comenzar a estimular con voltajes pequeños y aumentar de a poco la intensidad del estímulo hasta observar contracciones del músculo en cuestión y que estas también se observen en el registro de tensión. ¿Observa potenciales de acción a nivel del nervio cuando la amplitud del estímulo es capaz de generar contracción del músculo?

Basado en la información obtenida ¿sus resultados apoyan la hipótesis de un origen mecánico o eléctrico de la sinapsis neuromuscular?

2.3. Estimulación del nervio ciático a altas frecuencias, fatiga sináptica (prueba de origen químico o eléctrico de la sinapsis neuromuscular).

¿Qué es la fatiga sináptica y cuáles son sus mecanismos de acción? Para realizar la maniobra de fatiga sináptica debemos volver al arreglo de electrodos que utilizamos en la primera maniobra (estímulo de nervio y registro de nervio, EMG y tensión). Comenzaremos estimulando el nervio con estímulos de 0.05 ms de duración y amplitudes crecientes. Debemos buscar un voltaje apenas por encima del umbral que nos permita registrar claramente las tres respuestas biológicas en simultáneo pero que no reclute a todas las fibras del nervio ni todas las fibras del músculo (bastante por debajo de los estímulos supra máximos). Comenzaremos la maniobra estimulando el nervio con una frecuencia de 0.3 Hz durante 2 minutos y luego pasamos a estimular a 30 Hz durante 2 minutos para luego volver a una frecuencia de 0.3 Hz durante 2 minutos. Puede repetir la maniobra para varias combinaciones de frecuencias de estimulación:

Pre Fatiga (Hz X 2-4 min)	Fatiga (Hz X 2-4 min)	Post Fatiga (Hz X 2-4 min)
0.3	30	0.3
0.4	40	0.4
0.5	50	0.5
0.6	60	0.6



0.7	70	0.7
0.8	80	0.8
0.9	90	0.9

*Nota: 2. 1. La estimulación a alta frecuencia produce un tétano en el músculo, con gran aumento de tensión que puede modificar las condiciones de registro en caso de que la amplitud del estímulo sea muy alta (mayor número de fibras reclutadas) y que las articulaciones no se encuentren bien ancladas a la planchuela de corcho. 2.2. En el protocolo planteado multiplicamos por 100 a la frecuencia de estímulo **Pre Fatiga** dado que esto se realiza fácilmente con los estimuladores que utilizamos en el salón de clases prácticas (ver **Anexo 1**).*

Analice con cuidado las respuestas de los tres registros antes (pre fatiga), durante (fatiga) y después (post fatiga) de la fatiga sináptica. Es importante describir los cambios dinámicos de las respuestas durante y luego de la estimulación a alta frecuencia:

Nervio	EMG	Registro de tensión

Figura 5. Registro simultáneo de nervio, EMG del músculo gastrocnemio y tensión generada sobre el tendón antes, durante y después de la maniobra de fatiga sináptica. Cada trazado representa el promedio de 12 barridos. V, voltios; mV, milivoltios; ms, milisegundos; UA, unidades arbitrarias.



2.4. Estimulación del nervio ciático y registro de la actividad bioeléctrica y mecánica durante la aplicación intravenosa o intramuscular de drogas tipo “Curare” (Identificación del neurotransmisor involucrado).

¿Qué es y para qué se utiliza el curare y similares? Para realizar esta maniobra debemos utilizar el mismo arreglo de electrodos que venimos utilizando durante la maniobra de **fatiga sináptica** (estímulo de nervio y registro de nervio, EMG y tensión). Antes de comenzar con esta maniobra debe conectar el equipo de ventilación asistida al adaptador de la traqueotomía y ventilar al animal con presión positiva de aire (menor a 20 cm de agua) y a una frecuencia entre 1 y 2 Hz. El ventilador del salón de clases prácticas presenta una unión en **Y** con una salida de menor resistencia. Dicha salida presenta un dispositivo que permite modificar la sección transversal de dicha tubuladura y por tanto la resistencia al flujo de aire. Modificando esta resistencia usted puede regular el flujo de aire generado por la presión positiva del ventilador hacia el pulmón o a la atmósfera **ANEXO 6**

Puede colocar un saturómetro en los miembros delanteros para monitorizar la correcta ventilación del pulmón. Una vez corroborado que el animal ventila correctamente, comenzaremos estimulando el nervio con estímulos de 0.05 ms de duración y amplitudes crecientes hasta tener un buen registro. En este caso podemos seleccionar una intensidad de estimulación mayor que en fatiga sináptica para obtener un mejor registro dado que esta maniobra no genera tétano sobre el músculo (apenas por debajo del estímulo supra máximo). Cuando tenga un buen registro debe realizar un registro control durante uno o dos minutos para luego inyectar una solución de curare intra venosa (Flaxedil. *galamina*. 1-2 mg/Kg, 20 mg/ml). La inyección de curare puede realizarse fácilmente en el par de venas dorsales de la cola de la rata. Estas corren de forma lateral y dorsalmente con respecto a la rata en decúbito ventral (45 grados con respecto al plano horizontal a ambos lados de la cola) y llevan la sangre con sentido hacia el cuerpo del animal. Una jeringa con aguja de insulina (calibre 27G) funciona bien para estos casos. Para mejorar la visualización de la vena puede pasar alcohol en la cola y presionar en la base de esta hasta que las venas se distiendan y sean más visibles. Una vez terminada la inyección cronometre el tiempo y siga estimulando y registrando de igual forma durante varios minutos.

Compare los tres registros antes y después de la aplicación de curare y describa de manera minuciosa los resultados obtenidos. ¿Qué resultados le brindan evidencia a favor de la hipótesis del origen químico o eléctrico de la sinapsis neuromuscular?



Luego de esta maniobra, ¿qué experimentos control debería realizar para mostrar que el efecto del curare es específico sobre la sinapsis y no sobre la función eléctrica y/o contráctil del músculo?

Realice un resumen de las maniobras realizadas (incluyendo las planteadas por los estudiantes) y discuta de qué manera los resultados obtenidos apoyan o están en contra de la hipótesis de una naturaleza química o eléctrica de la **sinapsis neuromuscular**. Incluya en dicha discusión los alcances y limitaciones de las técnicas y maniobras realizadas durante la práctica:

En relación con lo planteado acerca de los alcances y limitaciones de las técnicas utilizadas: ¿qué otras maniobras, técnicas de registros y análisis más allá de las utilizadas en la práctica podrían implementarse para ir más a fondo y poner a prueba las hipótesis del origen químico o eléctrico de la **sinapsis neuromuscular**?



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



(6) PREPARACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MECÁNICA Y ELÉCTRICA CARDÍACA *IN SITU*

Juan Manuel Castro

APLICACIÓN: Esta preparación permitirá la obtención, caracterización y análisis del registro bioeléctrico de la actividad cardíaca en un modelo de mamífero. Asimismo, esta preparación permite

- Obtener un registro de la actividad eléctrica cardíaca desde la superficie corporal y/o mediante electrodos de registro dispuestos en la superficie cardíaca
- Poner de manifiesto el origen topográfico de las correspondientes ondas obtenidas en el registro.
- Poner de manifiesto el *automatismo cardíaco*.

1. JUSTIFICACIÓN PARA EL USO DE ESTA PREPARACIÓN

La contracción cardíaca sincronizada de las diferentes cámaras cardíacas, con el objetivo de asegurar un volumen minuto adecuado a las diferentes demandas fisiológicas, es precedido por la despolarización supraumbral de los miocitos cardíacos contráctiles. Es decir, de la generación de un potencial de acción a nivel de las células miocárdicas.

En los mamíferos, la generación espontánea de los estímulos eléctricos se lleva a cabo en células fenotípicamente especializadas ubicadas a nivel del nodo sinusal, estructura ubicada en la pared posterior de la aurícula derecha. Los estímulos que de aquí proceden son conducidos por el sistema cardionector (que conforman, junto con las células nodales, el miocardio específico) hacia las diferentes cámaras cardíacas. La activación de corrientes



despolarizantes voltaje-dependientes a nivel de los miocitos inespecíficos (contráctiles), activa a nivel celular los mecanismos de acoplamiento excitación- contracción, que transducen señales eléctricas (potenciales de acción transmembrana) en fuerza mecánica. El acoplamiento mecánico entre las células contráctiles permite que la contracción individual de cada una de las células se efectúe de forma coordinada y efectiva a efectos de generar energía cinética significativa para la eyección auricular y ventricular.

La despolarización miocárdica puede modelizarse mediante un dipolo en la superficie celular, que se genera al “avanzar” (regenerarse) el potencial de acción en la superficie de los miocitos. Podemos registrar el “movimiento” de este dipolo a medida que las cámaras cardíacas se despolarizan, desde el medio extracelular. Incluso, las propiedades de los tejidos de los mamíferos permiten el registro de los potenciales eléctricos cardíacos desde la superficie corporal. El registro estandarizado de la actividad eléctrica cardíaca en humanos, denominada Electrocardiograma, nos permite identificar, diagnosticar, y sospechar diferentes trastornos cardíacos eléctricos, hemodinámicos y estructurales.

Se propone en esta práctica el estudio del registro eléctrico del corazón de un mamífero, obteniendo de esta forma una correlación anatomo - funcional imprescindible para el estudio de los procesos normales de la activación eléctrica cardíaca.

2. MÉTODOS

2.1. MODELO EXPERIMENTAL

Escogemos como modelo experimental el estudio in situ. Esto nos permitirá obtener un registro eléctrico desde la superficie corporal del animal en estudio, además de la realización de diferentes maniobras experimentales, detalladas en el apartado *procedimiento*.

Las características electrofisiológicas pasivas y activas del músculo cardíaco permiten la obtención y el análisis de un registro electrocardiográfico –sic- obtenido desde sectores distales del corazón, y fuera del compartimento intratorácico de la rata. Mantener al órgano con su perfusión e inervación “nativa” reviste importancia en cuanto que nos permite ampliar nuestros objetivos específicos con el fin de identificar y caracterizar las señales eléctricas generadas por el miocardio registradas desde el medio extracelular.



2.2. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Materiales

Rata albina

Material de disección

Base de corcho, alfileres

Caja de Petri

Electrodos Aguja

Electrodos Pabilo

Estimulador Grass modelo SD9

Amplificador Grass modelo p55 (dos)

Cables BNC x 4

Computadora, Software de adquisición y análisis

Fármacos modificadores del Inotropismo, dP/dT , conducción y excitación miocárdica

Solución de Uretano

Solución *Tyrode* [NaCl 113.8 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 2.0mM, $MgCl_2$ 1.0 mM, $NaHCO_3$ 5.0 mM, NaH_2PO_4 1.2mM, Glucosa 10.0 mM].

Preparado Biológico

Se escoge a la rata albina (Cepa: Wistar o Sprague Dawley) como animal de experimentación. La rata albina es un preparado ampliamente utilizado en el campo de la experimentación animal. Esto nos asegura, bajo controladas condiciones experimentales, la reproducibilidad de nuestros experimentos y resultados. La experiencia en nuestro medio, sumado al relativo bajo costo del uso del animal lo hace idóneo para la realización de prácticas en el entorno académico en el cual nos encontramos.

Disección

En primer lugar, debemos asegurar una profunda sedación, sin bloqueo neuromuscular diafragmático, del animal. Para ello realizamos una inyección intraperitoneal de una solución de Uretano en dosis de 1,5 mg/kg de peso del animal. Las características farmacocinéticas del uretano nos permitirán una anestesia adecuada del



animal durante todo el tiempo previsto de realización de la práctica. Se pueden realizar hasta dos “bolos” de administración de uretano intraperitoneal durante la práctica, en caso de identificarse respuesta muscular somática del mismo, así como cualquier respuesta neurológica que atente contra los objetivos de la práctica.

Una vez inconsciente, verificamos la abolición del reflejo corneal de animal. Al ser el uretano un hipnótico basilar, la abolición de los reflejos del tronco encefálico indica una adecuada sedación.

Se coloca al animal en decúbito dorsal en la base de corcho, fijando las extremidades a la misma. Esto facilitará nuestro registro desde el medio extracelular, además de un fácil acceso al compartimento intratorácico del animal (véase más adelante).

2.3. MANIOBRAS EXPERIMENTALES

A) Registro de señales biológicas

El registro de la actividad cardíaca extracelular se realiza a través de la medida diferencial del potencial eléctrico extracelular. Utilizaremos dos electrodos de registro, de forma que el registro será bipolar. Se puncionan los miembros superiores con los electrodos aguja, conectándose los mismos a un **Amplificador Grass p55** (ver ANEXO).

B) Estimulación desde la superficie miocárdica

En el caso de plantear la estimulación externa en forma de marcapaseo desde la superficie epicárdica, la misma se lleva a cabo por el estimulador Grass modelos SD9. El mismo nos permite administrar pulsos rectangulares de voltaje, modificando amplitud y duración del mismo. Utilizaremos para la estimulación los electrodos de Pabilo.

C) Calibración

Comenzaremos el procedimiento con un registro de calibración del sistema de registro. Para ello, el amplificador nos permite aplicar un pulso cuadrado de corriente al sistema. Configuramos el mismo para ser de 1 mV de amplitud. La calibración nos permitirá la interpretación del registro obtenido en cuanto al signo de la señal y a la amplitud real de la misma.



d) Adquisición del registro

La configuración inicial de registro constará en la colocación de los electrodos aguja en la posición inicial, es decir puncionando el inicio de los miembros superiores del animal. Colocaremos los electrodos G1 y G2 (conectados a los electrodos aguja mediante pinzas de cocodrilo) en el miembro superior izquierdo y derecho, respectivamente, de la rata albina. Agregaremos un tercer electrodo en uno de los miembros inferiores, a modo de puesta a tierra. Nos referiremos a éste como al registro extratorácico de la actividad eléctrica cardíaca. La posición de los electrodos de registro podrá modificarse teniendo en cuenta los resultados y el planteo previo de los objetivos específicos por el aspirante.

e) Registro directo y estudio del corazón *in vitro*

Complementando el estudio extracelular del potencial eléctrica cardíaco, realizaremos un registro desde la superficie epicárdica del animal, utilizando electrodos de Pabulo previamente embebidos en solución fisiológica (se recomienda durante 12 horas previas a la práctica). Nos referiremos a éste como al registro intratorácico de la actividad eléctrica cardíaca.

Teniendo en cuenta la necesidad de abrir la cavidad torácica del animal, y perdiendo así la presión negativa intratorácica, debemos sustituir artificialmente la función ventilatoria del mismo con un ventilador mecánico.

Disección: en primer lugar, identificamos por palpación, a nivel cervical anterior medio, la tráquea del animal. Se disecan los planos superficiales, con especial cuidado de no seccionar ala glándula tiroides y los vasos del cuello. Colocamos un catéter dentro de la tráquea con la función de aportar aire oxigenado con una presión inspiratoria controlada.

El catéter es un tubo “en T” que se conecta a la tráquea y al ventilador por sus extremos. Posee una tercera salida que nos permite regular la presión inspiratoria máxima del aire. La misma no debe superar los 20 cm H₂O para no generar un barotrauma significativo en la vía respiratoria baja de la rata.

Una vez lograda una adecuada ventilación mecánica y una correcta adaptación por parte de la rata (ciclos ventilatorios aportados únicamente por el ventilador), procedemos a abrir el tórax. Para ello realizamos una incisión torácica paralela al eje esternal, del lado izquierdo. Utilizamos herramientas para separar las costillas, y abordar cómodamente el corazón. Disecamos con cuidado el pericardio, y exponemos el corazón.



El registro electromiográfico de superficie puede realizarse en las diferentes cámaras cardíacas, observando y registrando para posterior análisis las diferencias del registro entre las maniobras. Recomendamos conectar los electrodos de pabito a un sistema de registro paralelo, con un canal de registro diferente pero de forma simultánea al registro extratorácico. Esto nos permitirá realizar un adecuado y más sencillo análisis de correlación temporal entre los registros intra y extra torácicos.

f) Ligadura aurículo-ventricular

Otra posible maniobra para realizar es la ligadura aurículo – ventricular. El objetivo de esta es interrumpir la conducción eléctrica (al menos por las vías miocárdicas específicas) de los potenciales sinusales (es decir, provenientes del nodo sinusal) hacia los ventrículos del animal. Para ello, utilizamos un hilo simple, preferentemente de lino, para realizar una ligadura en el surco auriculo-ventricular. Observaremos las modificaciones del registro intra y extra torácico luego de la ligadura. Podemos, además, modificar la posición de los electrodos intra torácicos antes y después de la ligadura.

g) Estudio de la actividad electromiográfica cardíaca *in vitro*

Procederemos, por último, a registrar la actividad eléctrica del músculo cardíaco *in vitro*, es decir con el órgano extraído del animal, aislados de su entorno biológico habitual. Esto nos permite estudiar la actividad electromiográfica aislada de otras fuentes de actividad eléctrica potencialmente registradas (actividad muscular de los miembros del tórax, señales electroencefalográficas, etc.). Debemos, sin embargo, controlar las condiciones homeostáticas del medio de experimentación (temperatura, composición hidroelectrolítica del medio, pH).

En primer lugar, realizamos una ligadura a nivel de los grandes vasos, seccionando el corazón por encima de las mismas. El órgano extraído se coloca en una caja de Petri, que debe contener solución Tyrode pre-calentada a una temperatura entre 35 y 37 grados centígrados y con oxigenación eterna al menos 30 minutos previa a la colocación del preparado.

Para el registro electromiográfico, se colocan los electrodos de Pábilos embebidos en solución Tyrode y se registra la actividad eléctrica, hipotéticamente espontanea, desde la superficie epicárdica.



h) Otras maniobras experimentales

El registro extratorácico constituye un registro extracelular a distancia, por lo que puede ser de importancia la modulación farmacológica u homeostática durante la práctica de la actividad cardíaca. De esta forma, el análisis del cambio, a modo de ejemplo, de la frecuencia cardíaca, puede ayudarnos a cumplir nuestros objetivos.

La administración de fármacos debe estar justificada mediante el planteo de objetivos específicos. La administración intravenosa de los mismos puede requerir una disección abdominal del animal e identificación de las grandes estructuras vasculares a ese nivel. La administración tópica sobre la superficie epicárdica puede también ser efectiva. Al momento del análisis del efecto de sustancias cronotrópicas e inotrópicas se deben tener en cuenta los efectos vasoactivos de las mismas.

Pueden además generarse cambios en el volumen de retorno venoso del animal, íntimamente relacionados con la precarga cardíaca en un mamífero sano. Pueden realizarse maniobras que permitan un aumento del volumen intravascular total (por ejemplo, mediante administración intravenosa de solución salina) o aquellas que aumenten el retorno venoso del animal sin modificar el volumen intravascular (por ejemplo, aumentando el gradiente de presión venoso- aurícula derecha elevando los miembros del animal por encima del plano de decúbito de la rata).

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se propone aquí un esquema del análisis de los datos. El mismo podrá y deberá ser modificado por el estudiante/aspirante, teniendo en cuenta los objetivos específicos y maniobras experimentales planteadas.

1. Calibración: el análisis del registro obtenido luego de aplicado el pulso de calibración nos permitirá una adecuada interpretación de los componentes del registro obtenido.

2. Análisis del registro basal: identificación de los diferentes componentes de las ondas. Identificación y análisis de los cambios en el registro al modificar la ubicación de los electrodos intratorácicos.

3. Análisis del registro intratorácico: correlación temporal entre los diferentes componentes de los registros intra y extra torácicos.



4. Análisis de las modificaciones del registro al modificar la ubicación de los electrodos intratorácicos.

5. Análisis del registro electromiográfico in-vitro

Se recomienda la caracterización de los registros atendiendo a aspectos tales como las ondas que componen el mismo, su frecuencia y amplitud, así como la polaridad de las mismas en el contexto del sistema de registro y la(s) configuración(es) seleccionada(s).



Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina
PRÁCTICOS DE FISIOLOGÍA



ANEXOS



PRÁCTICAS DE FISIOLOGÍA - ANEXOS

*El presente material contiene algunas consideraciones generales sobre aspectos teórico-prácticos de la **estimulación eléctrica de preparaciones biológicas** y **sistemas de adquisición de señales biológicas** mediante los equipamientos de uso habitual en el Salón de Clases Prácticas de Fisiología. Constituye así un material complementario de los **Protocolos de los Prácticos de Fisiología**, elaborado en base a los **manuales** de los **equipamientos** y **programas** de adquisición de datos, sin pretender sustituir el empleo de estos últimos como herramienta necesaria para un adecuado manejo de dichos sistemas.*

ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DEL ESTIMULADOR GRASS SD9

En el **Salón de Clases Prácticas** la estimulación eléctrica de los preparados biológicos se realizará mediante el **estimulador Grass SD9** (Fig. 1.1.). El estimulador genera **pulsos cuadrados de voltaje**, i.e., una **diferencia de voltaje constante** (y que idealmente se alcanza de modo **instantáneo**) cuyo **módulo** corresponde a la diferencia de potencial entre el electrodo positivo (ánodo, “+”) y el negativo (cátodo, “-”), ver **Fig. 1.1.a**, permitiendo establecer su **duración** (el tiempo durante el cual se mantiene esa diferencia) y la **frecuencia** de estimulación (**pps**, pulsos por segundo; inversa del periodo constante **entre el comienzo de un estímulo y el comienzo del siguiente**). La **polaridad** del estímulo puede ser modificada en el panel frontal del estimulador (POLARITY: Normal/Reverse, **Fig. 1.1.b**). Los rangos permitidos por el estimulador para estas variables se resumen en la siguiente tabla:

Frecuencia	0.2 – 200 pps (pulsos por segundo)
Duración	0.02 – 200 ms
Voltajes de salida	0.1 – 100 V
Pre-pulso	5 V (TTL)

Este estimulador genera una señal previa a la aplicación del estímulo (**pre-pulso**) que permite **sincronizar la estimulación con la adquisición y visualización** de las señales que se registran en el computador u osciloscopio (**Fig. 1.1.c**). Por otra parte, este equipo también presenta un comando de “**delay**”. Este permite establecer el tiempo existente entre el **pre-pulso** de sincronización y el instante en el cual se genera el **pulso cuadrado de estimulación**, permitiendo así visualizar el instante de ocurrencia del estímulo un cierto tiempo conocido luego de iniciado el barrido.



Fig. 1.1. Estimulador Grass SD9, panel frontal

La fijación de la **frecuencia, duración, delay y voltaje** se lleva a cabo mediante los controles localizados en el panel frontal (**Fig. 1.1.d**). Estos combinan un **"dial"** continuo con un **switch multiplicador** (de 3 o 4 posiciones, x0.1, x1, x10, x100), ver **Fig. 1.1.c**. Así, por ejemplo, los valores de frecuencia (pps) pueden ser fijados dentro de los siguientes rangos:

0.2 a 2 pps (*switch* en x0.1)

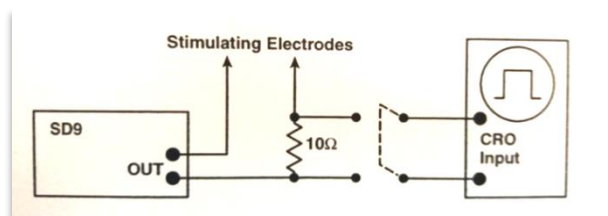
2.0 a 20 pps (*switch* en x1)

20.0 a 200 pps (*switch* en x10)

El estimulador también permite la generación de **pares** de pulsos de estimulación (**Fig. 1.1.e**); en este caso al modificar el comando **"Frecuencia"** lo que se define es la frecuencia de generación de **cada par** de pulsos, mientras que el tiempo entre los pulsos del par se determina modificando el comando de **"delay"**. De esta forma cuando se coloca al equipo en modo de **pulsos pareados ("twin pulses")**, el primer estímulo ocurrirá en el mismo instante en el que comience el registro (i.e., **estímulo y pre-pulso** son simultáneos) mientras que el tiempo de **"delay"** corresponderá al intervalo **entre los pulsos de cada par** de estímulos.

1.1 MONITOREO DE LA CORRIENTE APLICADA

El estimulador SD9 opera como una **fuentes de voltaje** constante. Puesto que la estimulación de tejidos excitables depende de la **corriente** inyectada al preparado, usualmente es deseable conocer la **magnitud de la corriente aplicada**. Una técnica que permite monitorizar esta magnitud es la ilustrada por el siguiente esquema, conectando una **resistencia conocida** de baja magnitud (10 Ohm en el ejemplo) en **serie** con uno de los electrodos de estimulación.



La **división de la medida de la caída de voltaje** a través de dicha resistencia (que puede realizarse mediante una de las entradas analógicas del conversor A/D, véase más adelante, o mediante un **osciloscopio, CRO** en el esquema) **entre el valor de la resistencia**, corresponde de acuerdo a la Ley de Ohm a la corriente (I , *Amps*) aplicada.



1.2. ALGUNOS CONCEPTOS CLAVE

- La estimulación eléctrica establece la **circulación de corriente entre electrodos** por los compartimientos extra- (la mayor parte) e intracelular. ?
- **Estimulación con fuentes de voltaje:** se controla la diferencia de potencial eléctrico (V), estando la corriente determinada por la **resistencia** (R) del preparado de acuerdo a la ley de Ohm, que puede variar a lo largo del experimento.
- **Estimulación con fuentes de corriente:** se controla la corriente (I , *Ampers*), y la misma es constante independientemente de R (dentro de cierto rango).
- **Estímulo aislado de tierra:** asegura que la circulación de corriente ocurre entre los electrodos de estimulación y no contra un electrodo indiferente o tierra.
- La **duración del estímulo** es típicamente breve a los efectos de minimizar el **artefacto del estímulo** y separarlo temporalmente de la respuesta biológica.

NOTA: Para un manejo adecuado del equipamiento se recomienda la consulta del MANUAL DE USUARIO (versión impresa disponible en el Salón de Clases Prácticas). ES FUNDAMENTAL ATENDER A LAS RECOMENDACIONES DE SEGURIDAD DETALLADAS POR EL FABRICANTE

ANEXO 2: REGISTROS BIOELÉCTRICOS. AMPLIFICADORES DIFERENCIALES Y AMPLIFICADOR GRASS p55

Para el registro de la actividad eléctrica de tejidos excitables como del nervio ciático o el músculo tanto *in vivo* como *in vitro* se utilizan por lo menos un par de electrodos de registro conectados a un **amplificador diferencial** que **condiciona** en **amplitud** y **frecuencia** las señales que van a ser posteriormente adquiridas y visualizadas. Un **amplificador diferencial** mide la diferencia de voltaje (ΔV) que existe entre los dos electrodos de registro conectados a las entradas (denominadas G_1 y G_2 en el amplificador **GRASS p55** utilizado en el Salón de Clases Prácticas, i.e.: $\Delta V_{G_1-G_2} = V_{G_1} - V_{G_2}$). De este modo, si en un momento dado la señal que registran **ambos electrodos** es de $100 \mu V$ la diferencia de voltaje entre ambos ($\Delta V_{G_1-G_2}$) será cero.

PROBLEMA: Determinar el valor de $\Delta V_{G_1-G_2}$ si :

a) $V_{G_1} = 100 \mu V$ y $V_{G_2} = 200 \mu V$ $\Delta V_{G_1-G_2} = \underline{\hspace{2cm}}$



- b) $V_{G1} = 0,90 \text{ mV}$ y $V_{G2} = 0,10 \text{ mV}$ $\Delta V_{G1-G2} = \underline{\hspace{2cm}}$
c) $V_{G1} = 10000 \text{ } \mu\text{V}$ y $V_{G2} = 10000 \text{ } \mu\text{V}$ $\Delta V_{G1-G2} = \underline{\hspace{2cm}}$
d) $V_{G1} = -100 \text{ } \mu\text{V}$ y $V_{G2} = 200 \text{ } \mu\text{V}$ $\Delta V_{G1-G2} = \underline{\hspace{2cm}}$

2.1. ACONDICIONAMIENTO DE SEÑALES: AMPLIFICACIÓN

Gran parte de las señales bioeléctricas se caracterizan por sus bajos niveles de voltaje, como es el caso del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio ciático, así como el electromiograma (EMG) del musculo gastrocnemio o el ECG. Por esto, la resolución de la señal puede incrementarse mediante la amplificación de la señal antes de su adquisición u observación en el osciloscopio y/o computador. Este paso de acondicionamiento permite adecuar los niveles de potencial de la fuente o sensor a los niveles de entrada aceptados por el próximo bloque (conversor analógico/digital o conversor A/D).

La amplificación se puede realizar en pasos discretos (x1, x10, x100, x1000, x10000) o continuos; por tanto, luego de la amplificación el valor de voltaje registrado (V_s) será múltiplo del valor de amplificación (S) utilizado. La salida del amplificador diferencial p55 empleado en Clases Prácticas (V_s) corresponde así a la diferencia ΔV_{G1-G2} escalada por un factor de amplificación S (“ganancia” o “factor de escala”), que en este modelo de amplificador puede adoptar los valores **x1, x10, x100, x1000, x10000** (ver Fig. 2.1.d). Es decir:

$$V_s = S \cdot (\Delta V_{G1-G2})$$

Dividiendo a cada punto del registro por el valor de la amplificación podemos saber exactamente el **valor real de la señal registrada**. De acuerdo con la notación empleada anteriormente, el **valor real** de la señal registrada por el amplificador p55 corresponde a la diferencia ΔV_{G1-G2} , por lo que su determinación puede realizarse mediante

$$\Delta V_{G1-G2} = \frac{V_s}{S}$$

A los efectos de incrementar la relación señal/ruido (SNR, por *signal/noise ratio*), la amplificación de la señal se efectúa en la proximidad del sensor o transductor (ver Anexo 3).

2.2. CALIBRACIÓN. Pre-Amplificador GRASS modelo p55.

Este modelo presenta una perilla de comando donde se puede poner al amplificador en **modo de registro** o en **modo de calibración** (Fig. 2.1.a, indicada como “INPUT”). El modo de calibración (CAL.) a su vez presenta varias opciones referidas a la **amplitud del pulso de calibración a utilizarse**. Por debajo de la horizontal son valores en μV (de 20 a 500) y por encima los mismos valores, pero en mV (MV). Una vez elegidos uno de estos valores se debe generar y registrar el pulso de calibración presionando el botón rojo que se encuentra por debajo de la perilla de calibración (Fig. 2.1.b). Este



pulso de calibración establece una **diferencia de potencial conocida entre las entradas G1 y G2**, tornando a G1 negativo con respecto a G2. Como el voltaje de salida del amplificador es

$$V_s = S \cdot (\Delta V_{G1-G2}) = S \cdot (V_{G1} - V_{G2})$$

si se verifica $V_{G1} < V_{G2}$ (condición impuesta al presionar el botón rojo), la diferencia ΔV_{G1-G2} será < 0 (véase los ejercicios **a** y **d** del PROBLEMA propuesto arriba), observándose una *deflexión negativa* del registro en el *Display* del osciloscopio o PC (i.e., $V_s < 0$).

La calibración debe realizarse repitiendo el procedimiento para un **conjunto de valores de entrada que permitan explorar la linealidad del dispositivo en el rango de interés**. Deberá construirse una curva entrada-salida y ajustar los puntos a una recta cuya pendiente deberá corresponder a la **ganancia (S)** del dispositivo fijada en cada situación.

2.3. ACONDICIONAMIENTO DE SEÑALES: FRECUENCIA Y FILTROS

El Pre-Amplificador GRASS modelo P55 también permite acondicionar la señal en frecuencia a través de la utilización de **filtros**. Los filtros permiten **disminuir la amplitud de diversos componentes de frecuencia**, minimizando o descartando componentes de frecuencia que no son de interés. Existen múltiples métodos de filtrar en frecuencia una señal analógica o digital. De modo simplificado, los filtros pueden agruparse en las siguientes categorías: “*pasa bajo*”, “*pasa alto*”, “*pasa banda*” y “*suprime banda*”. Un filtro “*pasa bajo*” es un filtro que atenúa las amplitudes de los componentes de frecuencia que se encuentran por encima de un valor de frecuencia elegido (**Fig. 2.2.A**); un filtro “*pasa alto*” atenúa las amplitudes de frecuencias que se encuentren por debajo de cierto valor (**Fig. 2.2.B**); un filtro “*pasa banda*” atenúa por encima y por debajo de ciertos valores de frecuencia permitiendo que solo se registre una banda de frecuencia (**Fig. 2.2.C**); por último, un filtro “*suprime banda*” atenúa la amplitud de una banda de frecuencia, lo inverso al filtro “*pasa banda*” (**Fig. 2.2.D**).

El amplificador p55 dispone de tres tipos de filtros (**Fig. 2.1.c FILTERS**):

- 1) Filtros *pasa alto* (comando central izquierdo, LOW(Hz)),
- 2) Filtros *pasa bajo* (comando central derecho, HIGH (kHz))
- 3) Un filtro *suprime banda*.

En la **Fig.2.3** se muestran las curvas de respuesta en el dominio de las frecuencias (Diagramas de Bode) para los filtros del amplificador p55. El diagrama muestra, en **ordenadas** la relación salida/entrada del amplificador, en función del componente de **frecuencia de la señal de entrada (abscisas)**. Un valor de ordenadas del 100% significa que la señal **no ha sido atenuada** por el dispositivo, mientras que un valor de 0% significa que la señal ha sido completamente atenuada. Considérese por ejemplo el filtro *pasa alto* (LOW) de 0.3 Hz (esta frecuencia recibe el nombre de “*frecuencia de corte, f_{-6dB}* ”). Como puede observarse, para una señal de entrada con frecuencias

menores de 0.3, la curva correspondiente (segunda de izquierda a derecha) muestra una atenuación de la señal por debajo del 50%. Para señales de entrada con frecuencias mayores de ese valor, la atenuación es menor del 50%, mientras que para señales de entrada con frecuencias mayores de aproximadamente 2 Hz la atenuación es nula. Es decir, el filtro LOW con f_{-6dB} rechaza frecuencias bajas (más bajas que 0.3 Hz) y permite el pasaje de frecuencias superiores, por lo que corresponde a un filtro *pasa alto*. La *frecuencia de corte* seleccionada es aquella en la que la atenuación corresponde al 50% (o a -6 dB, unidades más frecuentemente utilizadas en este campo).

Es importante notar que el uso simultáneo de un filtro *pasa bajo* (de mayor frecuencia) y un filtro *pasa alto* (de menor frecuencia) genera un *filtro pasa banda*. A modo de ejemplo, en la **Fig.2.1**, ambos comandos generan un filtro pasa banda entre 0.3 y 3000 Hz (3 kHz).

El último filtro que utiliza este amplificador es el supprime banda de la “*alterna*” (LINE FILTER). La *alterna* constituye una señal que se introduce de forma espuria en los registros de señales bioeléctricas, originada por la alternancia periódica (senoidal) de los polos negativo y positivo que presenta el suministro de corriente eléctrica. Dicha alternancia oscila en torno a 50 Hz (i.e., el período de la oscilación es de 1/50, concepto que puede simplificarse considerando que ~50 veces por segundo se invierten los polos positivo y negativo de las terminales eléctricas a las que se conectan la mayor parte de los dispositivos que operan con 220V/AC. El filtro supprime banda (LINE FILTER) está específicamente diseñado para filtrar esta señal artefactual (**Fig.2.1.e**).

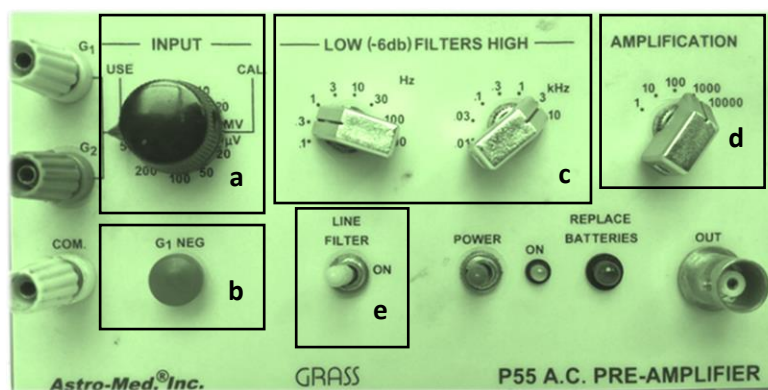


Figura 2.1. Pre-Amplificador GRASS modelo P55, panel frontal.

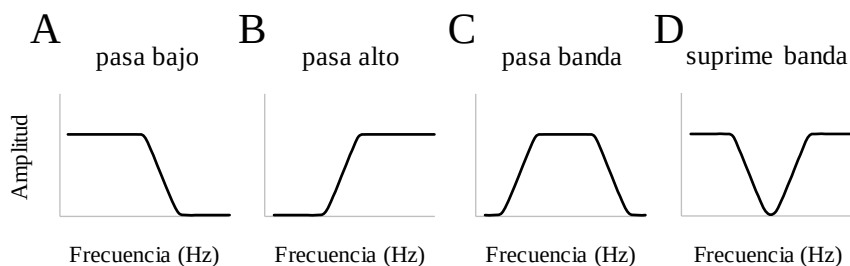


Figura 2.2. Clases de filtros. **A** Filtro pasa bajo. **B** Filtro pasa alto. **C** Filtro pasa banda. **D** Filtro suprime banda

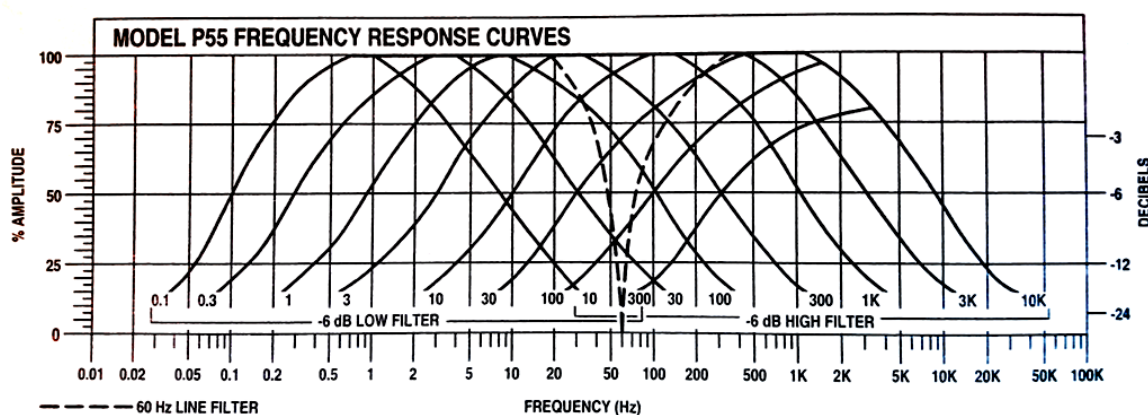


Figura 2.3. Curvas de respuesta en frecuencia para el amplificador Grass p55

NOTA: Para un manejo adecuado del equipamiento se recomienda la consulta del **MANUAL DE USUARIO** (versión impresa disponible en el Salón de Clases Prácticas). **ES FUNDAMENTAL ATENDER A LAS RECOMENDACIONES DE SEGURIDAD DETALLADAS POR EL FABRICANTE**

ANEXO 3: CONVERSIÓN ANALÓGICO-DIGITAL Y ADQUISICIÓN DE SEÑALES

Un **sistema de adquisición de datos (DAQ)** permite la medición de una magnitud física tal como la **temperatura**, la **presión** o la **intensidad de luz**, e incluye un conjunto de componentes y etapas de procesamiento que puede esquemáticamente resumirse en:

- Un **sensor o transductor**. En general, estos dispositivos generan una **señal eléctrica analógica** ($V = f(x, t)$), que varía proporcionalmente con los cambios en el nivel de una variable física



- (x). En el **Anexo 5** se revisa algunos de los aspectos fundamentales de los **transductores de fuerza**.
- b) Una **señal**, frecuentemente una **diferencia de potencial eléctrico** generada por el **sensor** o **transductor** frente a un cambio de estado consecuente con la modificación del nivel de la magnitud física medida.
 - c) El **acondicionamiento de la señal**. En el **Anexo 2** algunos aspectos relacionados al **acondicionamiento** de las señales son considerados.
 - d) Un dispositivo de **conversión analógico/digital (CAD)** que lleva a cabo la conversión de la señal analógica en una digital.
 - e) Un dispositivo para el **almacenamiento** y la **visualización** de la señal. Usualmente este componente es un computador que cuenta asimismo con programas de *procesamiento* que permiten el análisis y presentación ulterior de la señal adquirida. En el **Anexo 4** se presenta un instructivo para el manejo de un *programa* de adquisición y procesamiento de señales de naturaleza bioeléctrica.

En la **Fig. 3.1**. se esquematizan estos componentes, empleando como ejemplo la adquisición de una señal generada por cambios en la tensión de una preparación biológica.

En lo que sigue, se presentará algunos elementos generales para la configuración de la **conversión analógico/digital**. Las especificaciones del CAD NI-USB 6009 empleado en el Salón de Clases Prácticas se presentan al final de este Anexo.

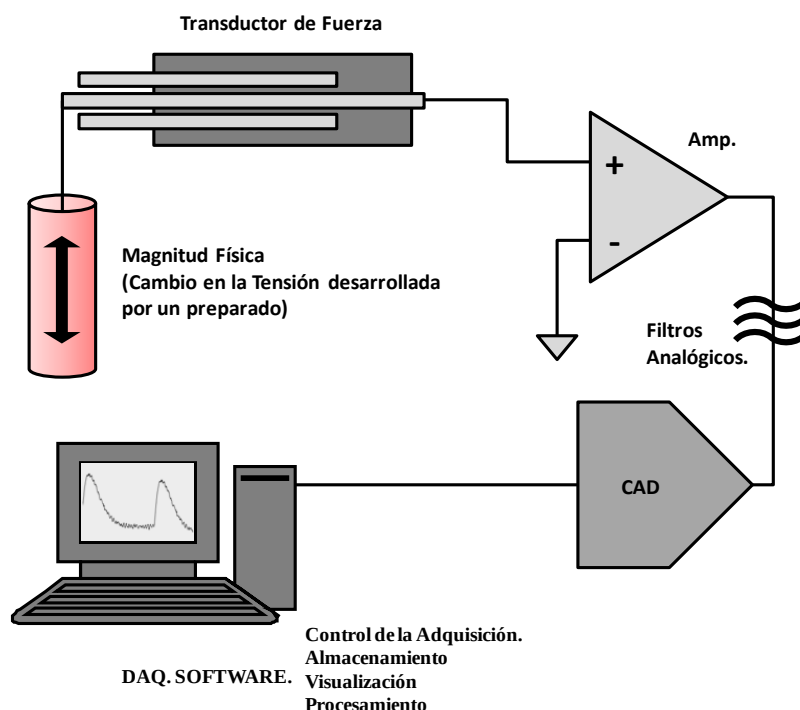


Fig. 3.1. Sistema de Adquisición de Datos

3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE UN SISTEMA DE MEDIDA: ALGUNAS DEFINICIONES

- EXACTITUD (en ing. "Accuracy"):** Capacidad de un instrumento de medida de proporcionar indicaciones que se aproximan al *verdadero valor* de la magnitud medida. Suele emplearse en español como sinónimo el término precisión. Se determina mediante la *CALIBRACIÓN ESTÁTICA*. Se emplea un *patrón de referencia* para la construcción de una *CURVA DE CALIBRACIÓN*.
- FIDELIDAD (en ing. "Precision"):** Capacidad de un instrumento de dar el mismo valor de la magnitud medida cuando se repite el proceso de medición en idénticas condiciones. Observación: esta cualidad es *INDEPENDIENTE* de la EXACTITUD.
- SENSIBILIDAD o FACTOR DE ESCALA:** Es la pendiente de la curva de calibración. Para un sensor cuya salida esté relacionada con la entrada x mediante $y = f(x)$, la *sensibilidad (S)* en un punto a cualquiera de la curva de calibración será:



$$S(x_a) = \frac{dy}{dx} \mid x = x_a$$

- d) **LINEALIDAD:** Constituye una medida de la constancia de la sensibilidad del dispositivo (i.e., un sistema es **lineal** si $S(x)$ no varía con x).
- e) **RESOLUCIÓN:** Cambio mínimo en la entrada para el cual se obtiene un cambio en la señal de salida.
- f) **HISTÉRESIS:** Diferencia en la salida para una misma entrada, según la dirección en la que esta se alcance (por ejemplo, un cambio de 0 a 1 Volts produce una salida de módulo (o valor absoluto) distinta del que produce un cambio de 1 a 0 Volts)
- g) **ERROR DINÁMICO:** Se define como la diferencia entre el valor indicado y el valor exacto cuando el error estático es 0. Describe la diferencia en la respuesta del sensor a una magnitud de entrada según que ésta sea constante o variable en el tiempo.
- h) **VELOCIDAD DE RESPUESTA:** Medida de la velocidad con la que el sistema responde a cambios en la variable de entrada.

3.2 SEÑALES ANALÓGICAS Y DIGITALES

Una señal $y = f(t)$ **continua en el dominio del tiempo** es aquella que adopta un valor “ y_i ” para **todos** los valores *reales* “ t_i ” en el eje del tiempo (i.e., el **dominio** corresponde al conjunto de los números *reales* $^+$). Una señal **discreta en el dominio del tiempo**, en cambio, adopta valores únicamente a **intervalos definidos** de tiempo (i.e, su **dominio** es un conjunto **contable**). Frecuentemente una señal **discreta** es obtenida mediante el muestreo (*sampling*) de una **continua**.

La distinción entre señales **analógicas** y **digitales** es similar a la distinción previa, pero en este caso la diferencia implica a los valores de la **función** o **codominio**: a una señal **analógica** corresponde un conjunto **continuo** de valores posibles y_i (i.e., una señal **analógica** puede adoptar cualquier valor y_i en cualquier instante t_i), mientras que a una señal **digital** corresponde un conjunto **discreto** de valores. La **información** contenida en una señal **analógica** puede corresponder al **nivel** de la variable en un instante determinado, a los valores máximo o mínimo, al promedio en un intervalo, al curso temporal, a los componentes de frecuencia o a la frecuencia en el caso de ser una señal periódica. El contenido de información de una señal digital difiere, así, del de una señal analógica; un ejemplo simple de una señal **digital** es una **secuencia binaria**, en la que los valores de aquella pueden ser únicamente 0 y 1. Una **señal digital** mencionada en el **Anexo 1** corresponde al pulso de sincronización

(pre-pulso). Esta señal posee únicamente dos estados posibles: ON (*logic high*, 2-5 Volts) y OFF (*logic low*, 0-0.8 Volts), y es frecuentemente referida como *transistor-transistor-logic* (TTL) *signal*.

3.3. CONVERSIÓN ANALÓGICO-DIGITAL (CAD)

Un **convertor analógico-digital** lleva a cabo la transformación de un **voltaje analógico** en un valor **digital** capaz de ser procesado por un computador, permitiendo la adquisición de señales y su procesamiento, compresión, codificación y análisis en el dominio temporal o en el dominio de la frecuencia, etc. La **conversión analógico digital** implica esquemáticamente tres procesos fundamentales, representados en la Fig. 3.2.:

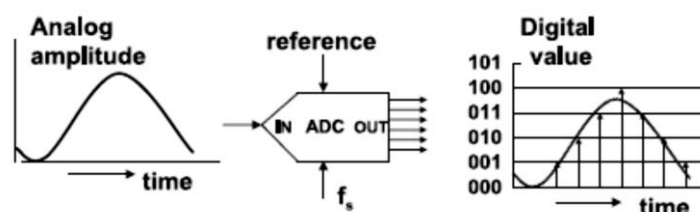


Fig. 3.2. CONVERSIÓN A/D

- La transformación de una señal **continua** en el **dominio del tiempo** en una señal **discreta** en ese dominio (*sampling o muestreo*)
- La **cuantificación** de la **amplitud** o **nivel** de la señal (o **retención**) y asignación de un valor digital a un **intervalo definido de valores de la variable real (analógica)**, proceso designado como **codificación**.
- El establecimiento de la **relación** entre el nivel de la **magnitud física** y su **valor numérico (referencia)**.

En el proceso de **codificación** se efectúa la traducción de los valores obtenidos durante la **cuantificación** al **código binario**. El **sistema binario** corresponde a un sistema en el que los números son representados mediante una **secuencia de dígitos binarios**, cada uno de los cuales puede tomar únicamente los valores de 0 o 1.

Un *bit* (acrónimo de *Binary digit*), unidad mínima de información empleada en sistemas informáticos, corresponde a un **dígito del sistema binario**, que puede tomar únicamente los valores 0 y 1 (compárese con el **sistema decimal**, donde son empleados 10 dígitos o *símbolos*). Con un **bit (1 Bit)** pueden representarse (**codificarse**) únicamente **dos niveles** de una variable (“on” y “off”, “éxito” y “fallo” o “sí” y “no” por ejemplo). A través de una **secuencia de bits** puede codificarse cualquier valor

de una variable discreta. Por ejemplo con **2 Bits** pueden representarse cuatro valores o estados posibles:

Valores	Bit #1	Bit#2
Valor "A"	0	0
Valor "B"	0	1
Valor "C"	1	0
Valor "D"	1	1

En general, con un número n de Bits pueden representarse 2^n valores posibles. En el caso anterior $2^2 = 2^2 = 4$.

En la **Fig. 3.3.** (tomada de Pallás Areny, R. *Instrumentos electrónicos básicos*, 2006) se representa una variable $V = f(t)$ en función del tiempo, y su codificación por un sistema de $n = 8$ bits.

Nº de Bits (n)	Nº posible de valores codificables
2	4
3	8
...	...
14	16.384

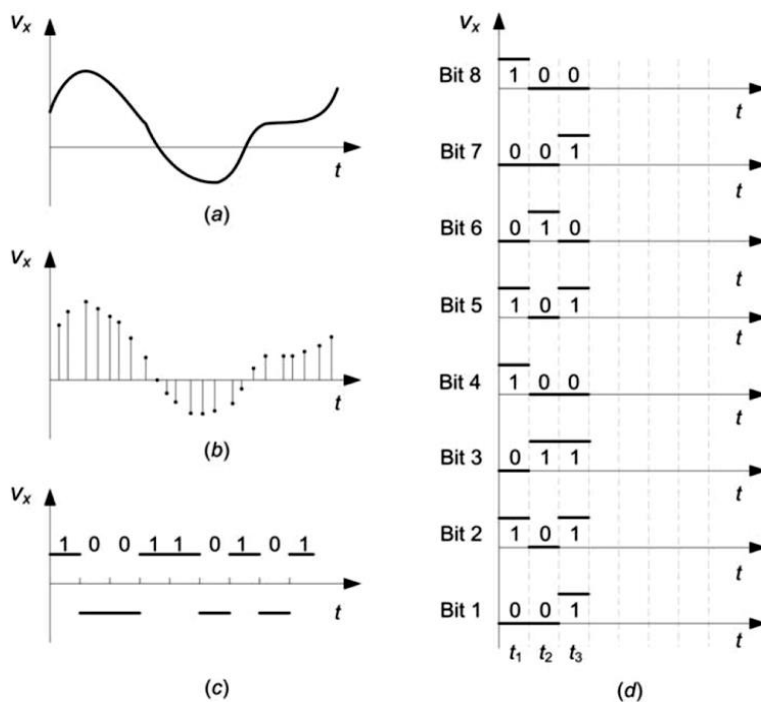


Fig. 3.3. Ver explicación en el texto.



En (a) se muestra la señal **continua en función del tiempo**; en (b) la señal muestreada (i.e., se ha medido el nivel de la variable a intervalos t definidos, obteniéndose una **variable discreta**); en (c) se codifica esa variable con un sistema de 1 Bit y en (d) se efectúa la codificación con un sistema de 8 Bits. Por ejemplo, el primer valor de la variable en (b) $V(t_1)$ es representado por 01011001, donde el primer dígito corresponde al Bit1, el segundo al Bit2 y así sucesivamente hasta el Bit8 (de abajo hacia arriba en el gráfico).

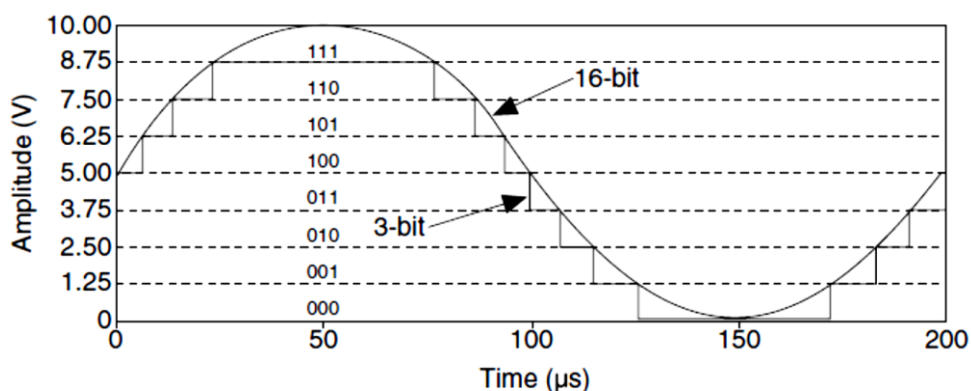
A continuación serán considerados algunos de los aspectos fundamentales de la configuración de la digitalización y adquisición de señales: la **resolución** y el **rango** del CAD y su relación con la **ganancia** seleccionada para el **amplificador** o **pre-amplificador** de la señal analógica antes de su conversión. Finalmente, algunas consideraciones sobre la **frecuencia de muestreo** en el proceso de *sampling* serán introducidas.

3.3.a. RANGO DEL CAD

El **rango** del CAD se define como la diferencia entre el nivel mínimo y el nivel máximo de la señal analógica que el CAD es capaz de digitalizar. Típicamente estos valores se encuentran entre 0 y 10 Volts o entre -10 y +10 Volts.

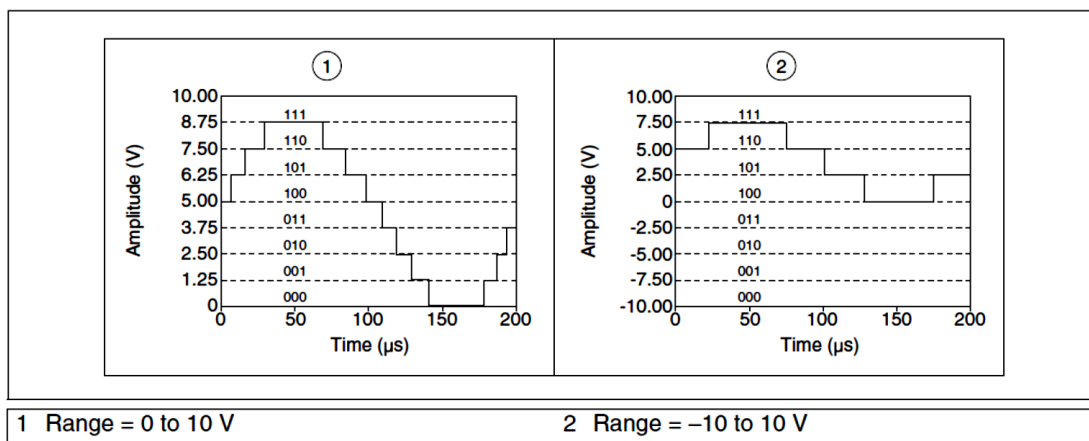
3.3.b. RESOLUCIÓN

El **número de bits** utilizado para codificar una señal analógica determina la **resolución** del **convertor analógico-digital** (CAD): cuanto **mayor** la **resolución**, mayor el **número de divisiones del RANGO** que el CAD puede efectuar, y por lo tanto **menor será la diferencia o cambio mínimo detectable**. Un CAD de 3 Bits puede efectuar 8 divisiones del rango (2^3). Una serie binaria entre 000 y 111 representa así a todos los valores posibles. El CAD transforma cada medida de la señal analógica en un valor digital comprendido en la serie binaria. En la siguiente figura se representa una señal sinusoidal de 5 Hz digitalizada por un CAD de 3 Bits y por un CAD de 16 Bits (capaz de dividir el rango en 65.536 o 2^{16}), mostrándose que la resolución de la señal es mayor para el segundo caso.



3.3.c. ADECUACIÓN DEL RANGO DE LA SEÑAL ANALÓGICA AL RANGO DEL CAD

El rango de valores que puede asumir la señal analógica que será digitalizada y el rango del CAD deben ser adecuados, a los efectos de optimizar al máximo la **resolución** del CAD. Por ejemplo, considérese un CAD de 3 Bits con un rango de 0 a 10 V y un segundo CAD de 3 Bits con un rango de -10 a 10 V. Ambos conversores pueden efectuar 8 divisiones del rango. Para el primero, cada división será de $10\text{ V}/8 = 1,25\text{ Volts}$, mientras que para el segundo será de $-10\text{ V} - 10/8 = 20\text{ V}/8 = 2.5\text{ Volts}$. Así, el segundo CAD es capaz de realizar una representación mucho menos precisa de la señal de 0-8 Volts que el primero (i.e, el conversor de 3 Bits y 20 V de rango **resuelve** peor una señal que el de 10 V de rango). La siguiente figura ilustra estas diferencias.





3.3.d. AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL ANALÓGICA ANTES DE SU DIGITALIZACIÓN

La **amplificación** de la señal antes de su digitalización incrementa la capacidad de **resolución** de dicha señal. Con este paso de **acondicionamiento** es posible adecuar el **rango de la señal analógica** al **rango del CAD**, a los efectos de que éste sea empleado en su totalidad, lo que significa a su vez que **será empleado el total de divisiones posibles del RANGO que el CAD puede realizar (su resolución) para representar la señal**. Por ejemplo, para el CAD de 3 Bits y con un rango de 0 a 10 Volts considerado en el apartado anterior, si se deseara digitalizar una señal analógica comprendida entre 0 y 1 Volts sin amplificar, la resolución sería extremadamente baja (cada división del rango del CAD es de 1,25 Volts, por lo que cambios de la señal entre 0 y 1 V no serán siquiera detectados). Si en cambio se **amplifica** la señal por 10, el rango efectivo de aquella se situará ahora entre 0 y 10, acoplándose al rango del CAD, que podrá así discriminar valores entre 0 y 1,25, entre 1,25 y 2,5, entre 2,5 y 3,75, etc.

3.3.e. ANCHO DE CÓDIGO (*Code Width*)

La **amplificación** de la **señal analógica**, el **rango** y la **resolución** del CAD determinan el menor cambio del nivel de la variable detectable (cambio mínimo del voltaje de entrada al CAD). Este cambio en voltaje es denominado *least significant bit* del valor digital, también denominado **ancho de código (*Q*)**.

El **ancho de código (*Q*)** es el **menor cambio en el nivel de una señal analógica capaz de ser detectado por un sistema de digitalización** y puede calcularse como

$$Q = \frac{\text{Rango del CAD (Volts)}}{A \times 2^n}$$

Siendo **A** la **amplificación** y **n** el número de Bits del CAD (i.e., **2ⁿ** corresponde a la **resolución**). La determinación de **Q** es importante en la selección del CAD. Por ejemplo, un CAD de 12 Bits con un rango de 0 a 10 V y una amplificación de 1x es capaz de detectar cambios de 2,4 mV, mientras que un CAD de 12 Bits con un rango de -10 a 10 V y una amplificación de 1x será capaz de detectar cambios de 4,8 mV de la señal analógica.

PROBLEMA

La siguiente tabla representa dos dispositivos de adquisición (DAQ 1 y DAQ 2), cada uno de los cuales puede presentar una de dos configuraciones (A o B). Se propone **seleccionar una de las 4 posibilidades para llevar a cabo un proyecto de medición en el laboratorio. Proyecto: Un transductor de presión genera una salida entre -2 y +2 V, para un rango lineal de presiones entre 20 y 105 kPa.**



Se desea detectar cambios de presión de por lo menos 1.5 Pa. ¿Cuál de las configuraciones (1A, 1B, 2A, 2B) es más adecuada? ¿Qué ganancia seleccionaría para pre-amplificar la señal del transductor?

	DAQ Device 1		DAQ Device 2	
	Config. A	Config. B	Config. A	Config. B
Resolution (Bits)	12 Bit	12 Bit	16 Bit	16 Bit
Range (Volts)	0 to 10	-10 to 10	0 to 10	-10 to 10
Amplification (choose one)	1, 2, 5, 10, 20, 50, 100			

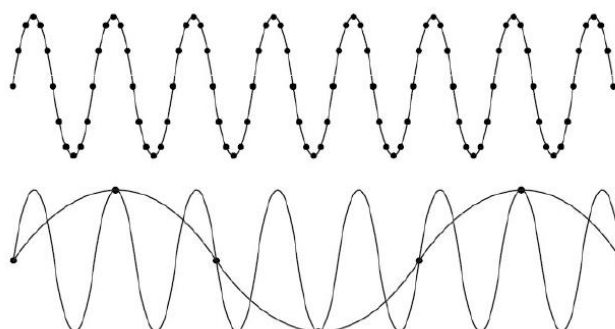
3.3.f. MUESTREO (*Sampling*)

Durante el muestreo de una **señal analógica** se realizan sucesivas conversiones A/D a intervalos Δt de valor fijo (intervalo de muestreo). La frecuencia de muestreo (f) queda definida como

$$f = \frac{1}{\Delta t}$$

La selección de la **frecuencia de muestreo** es uno de los elementos críticos en la adquisición de señales. Por ejemplo, una señal analógica sinusoidal de 1 Hz muestreada a 1000 S/s (muestras por segundo o 1 kHz) es representada de manera mucho más exacta que si el muestreo se realizara a 10 Hz.

Un muestreo a una frecuencia excesivamente baja produce un fenómeno denominado *aliasing*. El resultado de este efecto es que la señal adquirida aparece con una frecuencia distinta de la que en realidad tiene. En la figura de la derecha se muestra un ejemplo. Los **puntos (●)** representan las muestras de una señal senoidal con dos frecuencias de muestreo. Abajo, se observa que con una frecuencia de muestreo ~ 10 veces más baja, la señal es representada como una senoide de menor frecuencia que la señal original.





De acuerdo con el **Teorema de Nyquist** se debe muestrear con una frecuencia que sea el **doble** que la máxima componente de frecuencia de la señal de entrada. Si bien este Teorema provee un punto de partida para la determinación de la frecuencia óptima de muestreo, el valor que establece suele ser inadecuado en la práctica. Habitualmente, la frecuencia de muestreo se elige entre 5 y 10 veces la frecuencia máxima de la señal a medir.

3.4. DATOS TÉCNICOS DEL CAD NI-USB 6009

Entradas Analógicas Diferenciales	4
Rango	$\pm 10 \text{ V}$
Resolución	14 Bits
Máxima Frecuencia de Muestreo	48 KS/s (KHz)
Protección de sobrecarga	$\pm 35 \text{ V}$

ANEXO 4: ADQUISICIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SEÑALES BIOELÉCTRICAS CON WINWCP V 5.2.7



INSTRUCTIVO PARA WinWCP V5.2.7 (*Whole Cell Electrophysiology Analysis* Program - Strathclyde Electrophysiology Software)

WinWCP es un programa de **adquisición, almacenamiento y análisis** (*on-line* y *off-line*) de **señales bioeléctricas digitalizadas**. La siguiente guía está diseñada como primera aproximación al uso de esta herramienta en las **Prácticas de Fisiología** que emplean a las preparaciones de **sinapsis neuromuscular** (*in situ*) y **nervio aislado** (*in vitro*). La **Guía de Usuario** del programa se encuentra disponible

en http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/media/40/ses/WinWCP_User_Guide.pdf.

4.1. CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA PARA EL USO DEL DISPOSITIVO DE CONVERSIÓN ANALÓGICO-DIGITAL (CAD) NI USB-6009

WinWCP es compatible con múltiples dispositivos de conversión analógico-digital (A/D) fabricados por *National Instruments* (NI, series M, X y E, PC/1200 y USB). El **Salón de Clases Prácticas de Fisiología** cuenta con dispositivos USB (**NIDAQ USB-6009**). A los efectos de poder adquirir señales digitalizadas mediante estos dispositivos es necesario **configurar** el **programa de adquisición**, seleccionando en el menú **Setup** de la ventana principal de *WinWCP* la opción “**Laboratory Interface**”. En el cuadro de diálogo que se abrirá:

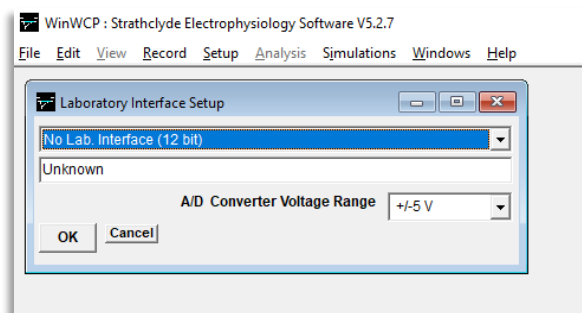
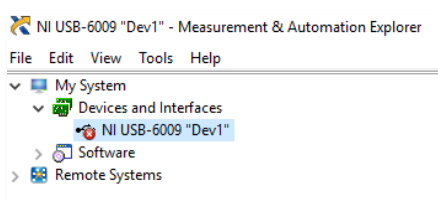


Fig. 4.1. Ventana principal de WinWCP y cuadro de diálogo Laboratory Interface

1. Seleccionar **National Instruments (NIDAQ-MX)** en el primer menú desplegable.
2. Seleccionar el **número de dispositivo** en el campo inferior (habitualmente **Dev1** si solamente hay instalada una tarjeta NI).
3. Seleccionar “**Differential**” en el menú **A/D Input mode**.



Nota: Para que pueda llevarse a cabo la configuración del conversor A/D (**CAD**), la tarjeta debe hallarse previamente instalada y conectada a la PC. Los drivers para los dispositivos NI son proporcionados en los discos de instalación o en la página web de soporte de National Instruments (<http://www.ni.com/es-cr.html>). Para verificar que la instalación sea correcta, debe accederse al programa **Measurement & Automation Explorer**. En el panel de la izquierda desplegar **My System » Devices and Interfaces** y seleccionar el nombre del dispositivo. Al hacer click derecho sobre el nombre, seleccionar la opción “**Self Test**”. Si el resultado de este es “**OK**”, el dispositivo se encuentra correctamente instalado. Las características generales de los conversores A/D así como los aspectos técnicos específicos de la tarjeta **NIDAQ USB-6009** son presentadas en otro apartado del material **anexo**.

4.2. ADQUISICIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LAS SEÑALES EN *WinWCP*

4.2.a. Configuración de los CANALES de entrada y AMPLIFICADORES

WinWCP despliega las señales adquiridas por cada canal (un total de 4 canales de entrada analógicos en el caso de los conversores **USB-6009**), permitiendo asignar a cada uno de estos un nombre, las unidades correspondientes y el factor de escala empleado (“*ganancia*” seleccionada en el pre-amplificador diferencial p55 por ejemplo). Estos parámetros pueden ser definidos por el usuario accediendo al cuadro de diálogo “*Input Channels & Amplifiers Setup*” (Fig. 2), seleccionando esta opción en el menú “*Setup*”:

1. En la pestaña “*Amplifiers*” seleccionar la opción “*None*”. Ello permitirá realizar la **configuración manual** de la calibración de los correspondientes canales.

2. En la pestaña “*Input Channels*” se dispone de cinco campos por cada canal organizados en una tabla (ver Fig. 3):

- **Name:** (admite 1 a 4 caracteres, por ejemplo “Im” para el canal 0 en la Fig. 3)

- **V/Units:** El **factor de escala** que relaciona el voltaje de entrada al CAD (en Volts) con los valores reales que adopta la señal para cada canal correspondiente (en las unidades definidas por el usuario en la columna “*Units*”). Por ejemplo: si la **ganancia** del pre-amplificador fue fijada en **x1000**, y las **unidades** de la señal son el **mV**, el valor que debe asignarse como factor de escala (V/Units) será igual a **1 V/mV**.

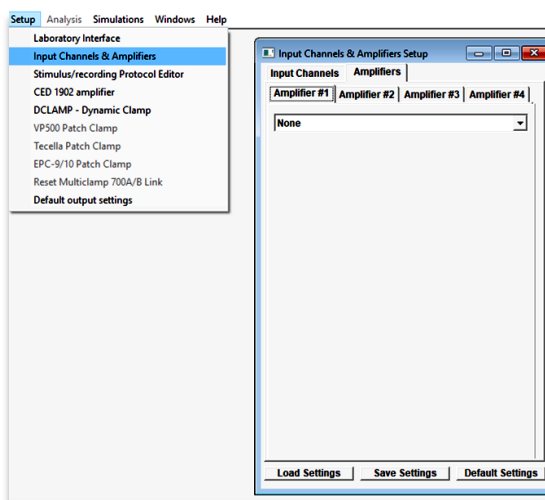


Fig. 4.2. Configuración de los Canales de Entrada y Amplificadores

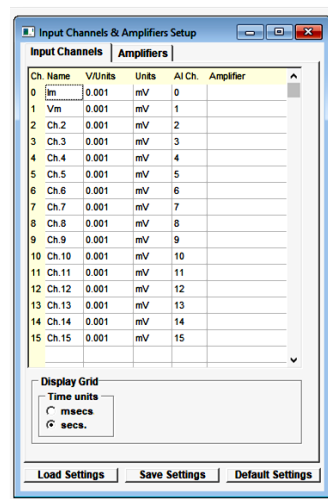


Fig. 4.3. Configuración de los Canales de Entrada



PROBLEMA: ¿Cuál será la el factor de escala “V/Units” apropiado si la **ganancia** del pre-amplificador es fijada en **x10** y las unidades seleccionadas son los **milivolts, mV**? ¿Cómo podría verificarse empíricamente que el factor de escala seleccionado es correcto?

- **Units:** Unidad de medida de la señal (e.g. μV , mV, V, pA, etc.)
- **AI Ch.:** Corresponde al número de canal del CAD que se emplea para adquirir una señal determinada.
- **Amplifier:** Indica si se encuentra o no configurado un amplificador específico. Para el uso con el equipamiento de **clases prácticas** es recomendable no seleccionar ningún amplificador de la lista correspondiente (ver más arriba).

En este cuadro de diálogo podrá asimismo seleccionarse las **unidades de tiempo** apropiadas. Es recomendable seleccionar **msecs**.

NOTA: La configuración establecida puede ser guardada haciendo click en el botón “**Save Settings**”, permitiendo la omisión de los pasos detallados en usos posteriores del programa.

4.2.b. Almacenamiento/visualización de señales.

- Almacenamiento de datos (archivos “.wcp”)

Antes de iniciar la **adquisición** de una señal, deberá crear un **archivo** con extensión “*.wcp” en el disco duro del computador, abriendo el cuadro de diálogo **New Data File** en el menú “**File**” de la ventana principal de **WinWCP**. El **nombre** del archivo tiene por defecto el formato *aammdd_001.wcp*. La carpeta que por defecto contiene a estos archivos es **WinWCPData**. Los archivos “*.wcp” creados podrán ser abiertos con el programa para el procesamiento posterior de los datos.

- Display/Visualización

Una vez configurados los canales de adquisición (2.a.) y luego de creado un nuevo archivo (e.g. *170101_001.wcp*), seleccione menú **Record** » **Record to disk**. La ventana que se abrirá a continuación corresponde al área de **display** del programa, comparable a un osciloscopio digital en el que se despliegan los trazados a medida que las señales son adquiridas. La casilla de verificación “**Save to file**” debe estar activada para que los registros sean almacenados en el archivo *170101_001.wcp* creado previamente.

- Modos de adquisición. *External Trigger*.

La **adquisición** en WinWCP puede efectuarse de cuatro formas alternativas, denominadas ***Free Run***, ***External Trigger***, ***Detect Events*** y ***Stimulus Protocol***. Para las prácticas de **sinapsis neuromuscular** y **nervio aislado** se utilizará la modalidad denominada ***External Trigger***, que deberá seleccionarse en el menú desplegable de la ventana.

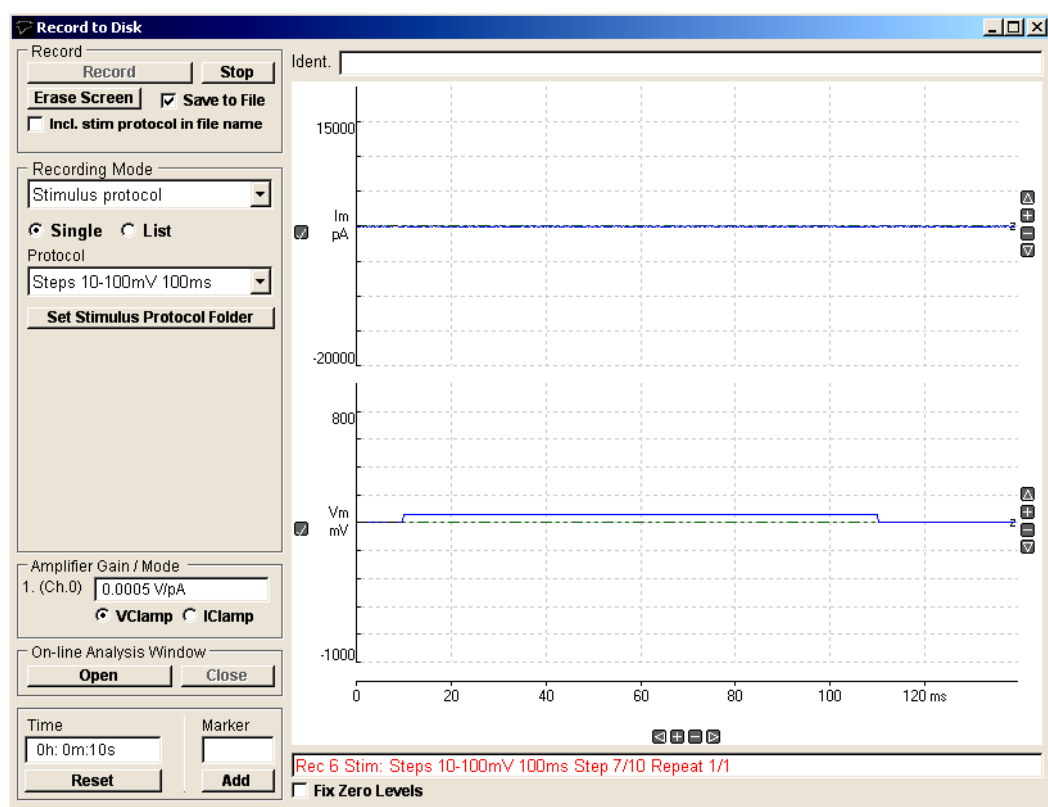


Fig. 4.4. Ventana ***Record to Disk***

- *Barridos (Sweeps)*

En la modalidad ***External Trigger***, el programa realiza la adquisición de un número de **barridos** (o ***sweeps***) de **duración constante**, cada uno de los cuales se inicia en respuesta a una **señal de sincronización** o ***trigger*** generada por el **estimulador** y entregada al canal **PFIO** o **Trigg.** del CAD. ***Nota:*** para el estimulador **GRASS SD9** disponible en el **Salón de Clases Prácticas** esta señal es generada en el output designado **"Pre-pulse"**.



Un barrido o “*sweep*” constituye una serie de medidas puntuales de la señal digitalizada (muestras o “*samples*”). El intervalo constante (T) entre una muestra y la siguiente corresponde a la inversa de la **frecuencia de muestreo** (f):

$$T = \frac{1}{f}$$

Configuración de la frecuencia de muestreo,
duración, número de barridos y número de canales

En el campo “**RecordingMode**” (Fig. 4.5), luego de seleccionar el modo “**External Trigger**” deberá configurarse:

1. El número de barridos (**No. records**) que será almacenado dentro de un mismo archivo. Será ajustado de acuerdo al objetivo específico de cada experimento. El programa generará un nuevo archivo de forma automática modificando los últimos tres dígitos del nombre asignado por defecto cada vez que se complete el número de barridos ingresado. Por ejemplo: si el **No. records = 10** el archivo *170101_001* contendrá 10 barridos, el *170101_002* los siguientes 10, y así sucesivamente.
2. Número de Canales (**No. input channels**). Los canales son mostrados en la secuencia Ch.0, Ch.1, etc. asignada en el cuadro de diálogo de configuración “**Input Channels & Amplifiers Setup**”.
3. **Ganancia del Amplificador (Amplifier Gain)**: Valen las mismas consideraciones que las realizadas en 2.a.

Los siguientes tres parámetros serán considerados en conjunto:

4. Duración del barrido (**Record duration**)
5. Número de muestras (**No. samples**)
6. Frecuencia de muestreo (**Sampling Interval**)

El **mínimo número de muestras** adquirido en cada barrido es de **256**, incrementándose en unidades de 256 muestras (256, 512, 768, etc.). El **máximo número de muestras** (**No. samples_{max}**) es de

$$No. samples_{max} = \frac{16.184}{No. input channels}$$

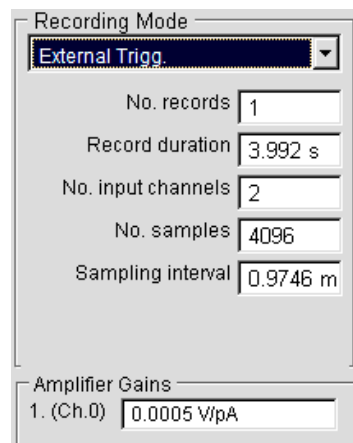


Fig. 4.5. Configuración del registro



o de

$$No. samples_{max} = \frac{1.048.576}{No. input channels}$$

según el CAD utilizado. La **duración** del barrido quedará fijada según la **frecuencia de muestreo** seleccionada y el **número total de muestras**. En la siguiente tabla se muestra un conjunto de combinaciones posibles, para un número de muestras entre 256 y 4864, con **frecuencias de muestreo** de 1 KHz, 5 KHz, 10 KHz, 20 KHz y 40 KHz.

Sampling Freq.	1 K	5 K	10 K	20 K	40 K
Sampling Interval (s)	0.001	0.0002	0.0001	0.00005	0.000025
Sampling Interval (ms)	1	0.2	0.1	0.05	0.025
N° of Samples	Record Duration				
256	256	51.2	25.6	12.8	6.4
512	512	102.4	51.2	25.6	12.8
768	768	153.6	76.8	38.4	19.2
1024	1024	204.8	102.4	51.2	25.6
1280	1280	256	128	64	32
1536	1536	307.2	153.6	76.8	38.4
1792	1792	358.4	179.2	89.6	44.8
2048	2048	409.6	204.8	102.4	51.2
2304	2304	460.8	230.4	115.2	57.6
2560	2560	512	256	128	64
2816	2816	563.2	281.6	140.8	70.4
3072	3072	614.4	307.2	153.6	76.8
3328	3328	665.6	332.8	166.4	83.2
3584	3584	716.8	358.4	179.2	89.6
3840	3840	768	384	192	96
4096	4096	819.2	409.6	204.8	102.4
4352	4352	870.4	435.2	217.6	108.8
4608	4608	921.6	460.8	230.4	115.2
4864	4864	972.8	486.4	243.2	121.6

Por ejemplo, si se desea obtener un trazado de aproximadamente **12 ms** con una frecuencia de muestreo de 40 KHz, deberá elegirse un **intervalo de muestreo (Sampling interval)** de 0.025 ms, y un número total de muestras (**No. samples**) igual a 512. Para frecuencias de muestreo que no aparecen en la tabla, los valores correspondientes al **número de muestras** para una duración dada pueden obtenerse según la relación



$$\text{Sampling Interval} = \frac{\text{Record Duration}}{N^{\circ} \text{ of Samples}}$$

recordando que el número de muestras deberá ser aproximado al valor más cercano a $256 \cdot x$ (con $x = 1, 2, 3 \dots$)

- Inicio de un registro

Una vez configurados los campos señalados anteriormente, el registro puede iniciarse haciendo *click* sobre el botón “**Record**”. En el modo “**External Trigger**” no se iniciará un barrido hasta tanto no ocurra una señal de sincronización. La casilla de verificación “**Save to file**” debe estar activada para que los registros sean almacenados en el archivo “*.wcp” creado previamente.

4.3. PROCESAMIENTO DE SEÑALES EN WinWCP

Se recomienda específicamente la lectura de los siguientes capítulos de la **Guía de Usuario** del programa (disponible en [http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/media/40/ses/WinWCP User Guide.pdf](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/media/40/ses/WinWCP%20User%20Guide.pdf)), a partir de los cuales puede adquirirse un conjunto de herramientas para un procesamiento inicial de las señales adquiridas con WinWCP.

- *Making Waveform Measurements (Pág. 94)*
- *Plotting Graphs of Measurements (Pág. 99)*
- *Signal Averaging (Págs, 131-133)*

Nota: WinWCP permite exportar archivos en formatos tales como “*.abf”, “*.dat”, “*.txt”, etc. Con ello, el procesamiento puede ser llevado a cabo en programas tales como Spike2, MATLAB, Clampfit, Hojas de cálculo, etc.

ANEXO 5: TRANSDUCTORES DE TENSIÓN GRASS FT03/FT10

Como concepto fundamental, los **transductores** son dispositivos que llevan a cabo la **conversión** de la **medida del nivel de una variable física** $x = f(t)$ (en **fisiología** habitualmente se desea medir **temperatura, presión, fuerza, flujo, etc.**) en una **señal eléctrica analógica**, frecuentemente una **diferencia de potencial eléctrico** ($V = f(x, t)$), que varía idealmente de forma lineal con x dentro de un determinado rango de valores de dicha variable. Los **transductores** están

constituidos por un **extensómetro** o **galga extensiométrica**, **sensor** cuya **deformación** en uno o más ejes -provocada por la aplicación de una **presión**, **carga**, o **fuerza**- provoca en éste un cambio en el valor nominal de su **resistencia eléctrica** (propiedad denominada **piezorresistividad**), consecuencia del cambio en la **longitud**, la **sección** o la **resistividad** del material piezorresistivo. A continuación, se detallarán algunas características del transductor de Tensión FT03/FT10 Grass utilizado en el salón de clases prácticas.

5.1. DISEÑO DE PUENTE PARA MEDICIONES DE TENSIÓN.

Tanto los transductores de **presión** como de **tensión** de uso habitual en el Salón de Clases Prácticas, se construyen empleando un dispositivo de medición de **voltaje** o **corriente continua** conectado a las terminales de un circuito eléctrico denominado **Puente de Wheatstone**. Una de las configuraciones corrientemente empleadas del **Puente de Wheatstone** se esquematiza en la **Fig. 5.1**. Como se muestra, éste se compone de **cuatro resistencias** que forman una malla cerrada, conectándose a los nodos **A** y **C** las terminales de una **fuerza de voltaje**, esquematizada en la parte izquierda, y midiéndose la diferencia de potencial eléctrico entre los nodos **D** y **B** del circuito (V_{SALIDA}).

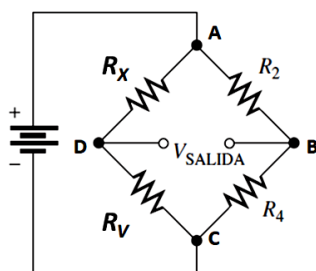


Figura 5.1 Circuito de puente de Wheatstone con amplificador

De las resistencias que componen al circuito, **dos poseen un valor fijo y conocido** (R_2 y R_4), mientras que una de ellas posee un valor **variable** (R_V), que puede ajustarse libremente. La **cuarta resistencia** (R_X) posee en esta configuración un **valor desconocido**. Dicha configuración del circuito puede emplearse para **determinar el valor de R_X** .

Se dice que el **puente se encuentra balanceado** o **en equilibrio** cuando la diferencia de potencial entre **D** y **B** es nula ($V_{\text{SALIDA}}=0$), independientemente del voltaje aplicado a los nodos **A** y **C**. Aplicando las leyes de *Kirchoffa* este circuito, puede demostrarse que esta situación ($V_{\text{SALIDA}}=0$) **se verifica cuando se cumple la siguiente relación entre las resistencias**:

$$\frac{R_X}{R_V} = \frac{R_2}{R_4}$$

Por lo que

$$R_X = R_V \left(\frac{R_2}{R_4} \right)$$

Así, ajustando el valor de R_V hasta que $V_{SALIDA}=0$ y resolviendo la ecuación anterior, puede determinarse R_X .

Una configuración alternativa se obtiene al **reemplazar una de las resistencias del circuito por un material piezorresistivo**, como se muestra en la Fig. 5.2.

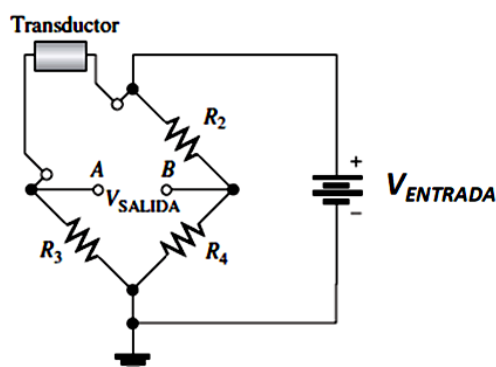


Fig. 5.2. Ver explicación en el texto.

La **resistencia del transductor** piezorresistivo ($R_{TRANSDUCTOR}$) cambia proporcionalmente a los cambios del parámetro o variable física (fuerza, tensión, etc.) que se está midiendo. Si el puente está equilibrado en un punto conocido en el que se verifica $R_{TRANSDUCTOR(0)} = R_2 = R_3 = R_4$, entonces el cambio en la resistencia del transductor ($R_{TRANSDUCTOR}$) inducido por la deformación mecánica del piezorresistivo provocará un cambio proporcional en la magnitud del voltaje de salida (V_{SALIDA}) de acuerdo con

$$\Delta V_{SALIDA} = \Delta R_{TRANSDUCTOR} \left(\frac{V_{ENTRADA}}{4 \cdot R} \right)$$

□

Así, el V_{SALIDA} constituye una medida lineal (dentro de un rango adecuado) del cambio en el nivel del parámetro físico que se pretende cuantificar.

Notas:

1. $R_{TRANSDUCTOR(0)}$ corresponde al valor nominal de la resistencia del sensor piezorresistivo **antes** de la aplicación de una deformación de dicho material



2. **VENTRADA** corresponde al **voltaje** aplicado por la **fuerza** de alimentación conectada al circuito.

5.2. APLICACIONES

El transductor de tensión Grass FT03/FT10 puede emplearse para medir las contracciones musculares isométricas (longitud constante). Posee un amplio rango de aplicabilidad ya que puede utilizarse en preparados que incluyen fibras únicas hasta preparados de órganos y músculos enteros. Aunque se utilizan básicamente para diseños isométricos, también pueden ser empleados para registros isotónicos (tensión constante) mediante la utilización de “*resortes isotónicos*”. En este tipo de diseño, la estrategia consiste en registrar el desplazamiento en vez de la fuerza.

5.3. CONEXIONES

Las **conexiones mecánicas** entre la preparación y el transductor deben realizarse mediante un cordón o hilo de material no elástico, o mediante un gancho con forma de “s” (provisto junto con el transductor). Estos deben ser enhebrados al orificio sujetador del transductor.

Por su parte, con respecto a las **conexiones eléctricas** no se debe exceder las especificaciones de voltaje máximo para la excitación del puente (correspondiente al voltaje de entrada en la **Fig. 5.2.**). Un voltaje de excitación menor da como resultado menos **sensibilidad**, especialmente importante cuando se miden fuerzas muy pequeñas que requieren una amplificación muy grande. Las conexiones eléctricas deben realizarse mediante cables de conexión de 8 pins (provistos junto con el transductor). Estos cables proporcionan el voltaje de excitación adecuada y la conexión a tierra para interactuar con los amplificadores Grass.

5.4. RANGOS

Una de las potenciales características del transductor es el uso de pequeños resortes helicoidales para así incrementar el máximo rango del transductor. Estos rangos máximos representan la fuerza requerida para desplazar el extensómetro en el transductor de tensión en una dirección hasta que ésta alcance el tope. Por lo tanto, un solo transductor con resortes intercambiables reemplaza varios transductores similares sin esta característica.

5.5. CALIBRACIÓN

Para obtener la calibración del transductor, se pueden colgar en el orificio sujetador del transductor pesas (gramos) y así utilizar la gravedad como fuerza de calibración. Se debe ser cuidadoso de modo desviar el extensómetro del transductor una dirección vertical verdadera.

5.6. DISPOSICIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL USO DE LOS TRANSDUCTORES FT03/10

Para una mayor exactitud y estabilidad en el registro de fuerzas pequeñas, es recomendable que el transductor sea montado en una base muy estable. En este sentido, las vibraciones del piso y/o el edificio son factores importantes de interferencia.

Adicionalmente, es importante considerar las ondas de resonancia de frecuencias mecánicas. Estas puede ser un factor importante a tener en cuenta para obtener buenos resultados, especialmente si las frecuencias están en el rango de frecuencia que se estudia. En este sentido, es deseable utilizar un transductor rígido con un amplificador de alta ganancia y bajo nivel de ruido. La frecuencia de resonancia del sistema está determinada en gran medida por el peso de la preparación y la constante de resorte del transductor. Por lo tanto, es importante mantener la frecuencia de resonancia muy por encima de la respuesta esperada de la preparación.

5.7. CONEXIONES Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AMPLIFICADOR P11T

El amplificador P11T del salón de clases prácticas se utiliza para amplificar y acondicionar señales de tensión provenientes del transductor de tensión FT03. El amplificador provee de energía eléctrica al transductor mediante una conexión específica (Fig 5.2A). La salida del amplificador es una conexión BNC ("OUT Fig. 5.3.B). Esta salida se conecta con el Conversor Análogo Digital. La entrada de corriente al amplificador se indica en el esquema (Fig. 5.3.C), así como la entrada del transductor al amplificador (Fig. 5.3.D).

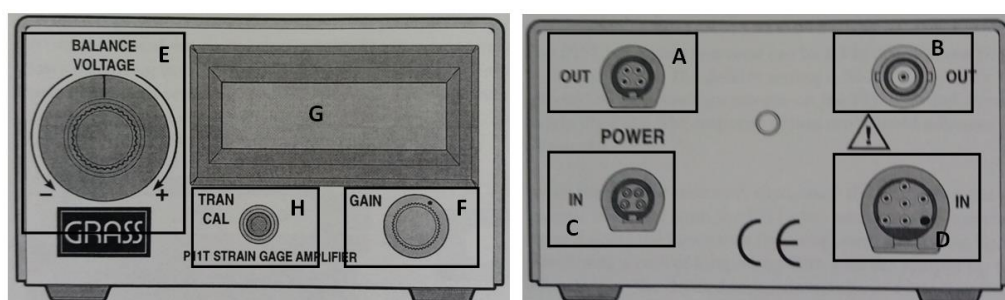


Figura 5.3. Amplificador P11T. A la izquierda se muestra la vista anterior, y a la derecha la vista posterior.



Desde el amplificador es posible **ajustar la línea de base del registro** modificando la salida del transductor FT03, utilizando la perilla “*Balance voltaje*” (Fig 5.2.E). Este ajuste no afecta la ganancia o sensibilidad del dispositivo, sino únicamente afecta el voltaje de equilibrio del puente, análogamente al ajuste de un *offset*. Siguiendo con la expresión empleada en el apartado 5.1., este **voltaje de balance** podría introducirse en la expresión empleada anteriormente para describir la salida del **transductor** como

$$\Delta V_{\text{SALIDA}} = \Delta R_{\text{TRANSDUCTOR}} \left(\frac{V_{\text{ENTRADA}}}{4 \cdot R} \right) + V_{\text{BALANCE}}$$

La perilla de “*gain*” (Fig 5.2.F) permite modificar la **amplificación de la señal biológica**. El rango de amplificación va de 100 a 30.000. En el *display* (Fig 5.3.G) se muestra la salida en voltaje del amplificador P11T. El botón de “TRAN CAL (Fig 5.2H)” simula 1 gramo de fuerza en el transductor, y puede ser utilizado para la calibración y chequeo de que el sistema esté funcionando correctamente.

La respuesta en frecuencia del amplificador puede ser configurada en 3 valores: 10, 30 o 100 Hz, siendo el valor por defecto 30 Hz. Para cambiar este valor hay que abrir el amplificador y posicionar el conector en otro valor de frecuencia (los valores están impresos en la placa de circuito en el interior del amplificador).

ANEXO 6: TRAQUEOSTOMÍA Y USO DEL RESPIRADOR

Los prácticos que utilizan animales in vivo (actividad eléctrica cardíaca y actividad neuromuscular) requieren la traqueotomía del animal y el uso del respirador.

Antes de proceder a la realización de la traqueotomía la rata debe anestesiarse.

Comenzaremos con anestesiarse al animal con una dosis de uretano (1.5 g/Kg i.p.; 0.5 g/ml). Previo a la anestesia se debe comprobar que el animal se desplace normalmente dentro de los confines de la caja de hospedaje. Al momento de cargar la dosis en la jeringa debe corroborar que la solución sea transparente y límpida (el uretano tiende a formar cristales a esa concentración).

Una vez que el animal esté en condiciones, se lo coloca en decúbito dorsal para realizar una traqueotomía. Para esta maniobra se debe realizar una incisión longitudinal medial a la altura de la unión entre la laringe y la tráquea. El cartílago tiroideo es fácilmente palpable desde la superficie de la piel lo cual servirá para tomar como referencia. Una vez hecha la incisión comenzamos a disecar los planos hasta visualizar la tráquea y continuaremos disecando a ambos lados de esta hasta individualizarla del resto de los tejidos. Es importante identificar la glándula tiroidea para no lesionarla, es necesario levantarla para poder acceder a la tráquea (Figura 0). Luego pasaremos un

hilo (10-15 cm de largo) por debajo de la tráquea y dejaremos libres ambos extremos del hilo. Una vez separada del resto de los tejidos, debemos realizar un corte transversal de la tráquea en el espacio comprendido entre los primeros anillos traqueales por debajo de la laringe. Dicho corte solo debe comprender la mitad de la tráquea y debe ser suficientemente grande para pasar una cánula traqueal en dirección a los pulmones, pero no lo suficientemente grande para desprender los anillos traqueales. Por otra parte, el largo de la cánula debe ser corto, ser suficientemente ancho, rígido y de paredes finas para no aumentar la resistencia al flujo de aire, pero lo suficientemente largo para ingresar a la tráquea y que sobre un trayecto de la cánula con una adaptación para que pueda ser conectado a un respirador (a través de un catéter que se conecta a la cánula) en caso de ser necesario (Figura 0). El catéter es un tubo en T que se conecta a la tráquea y al ventilador por sus extremos y tiene una tercera salida en la cual se puede regular su resistencia para así controlar la presión inspiratoria máxima que generamos con el ventilador (esta no debe superar los 20 cm de agua).

Terminada la traqueotomía debe observar oscilaciones respiratorias en la condensación de vapor de agua en la cánula (utilizar tubos transparentes) o puede tomar unas pocas fibras de algodón y corroborar que las mismas se mueven en consonancia a los esfuerzos respiratorios cuando son colocadas en el extremo libre de la traqueotomía.

Una vez corroborado que el animal respira normalmente debemos proceder a estabilizar la traqueotomía ligando el hilo que previamente pasamos por debajo de la tráquea sobre el tubo y la propia tráquea. El hilo sobrante puede ser atado sobre la adaptación estabilizadora de la cánula traqueal.

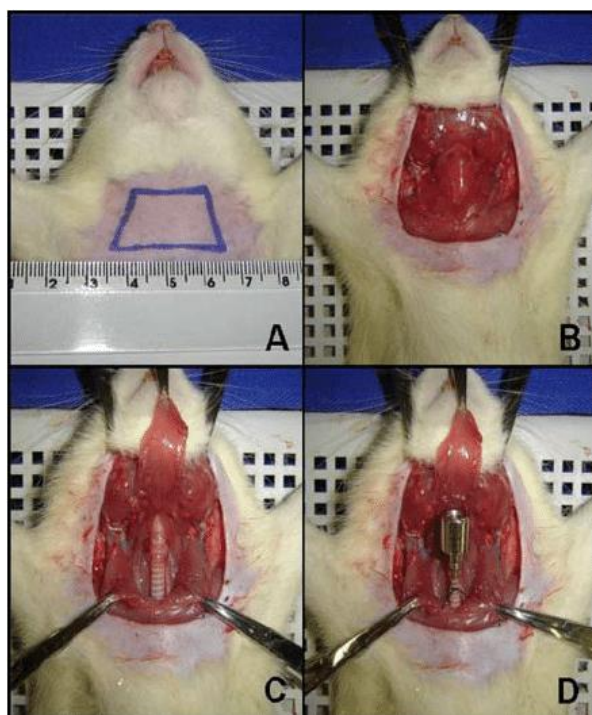


Figura 6.1. Técnica quirúrgica para la colocación de una cánula endotraqueal en la rata. Tomada de Locali, Rafael Fagionato, Almeida, Marcos de, & Oliveira-Júnior, Itamar Souza de. (2006). Use of the histopathology in the differential diagnosis of drowning in fresh and salty water: an experimental model establishment in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21(4), 203-206.