Universidad de Alcalá

Introducción a la farmacología experimental

Dra. Sara Rodríguez Martín / Dra. Eva María Domínguez Martín
Prof. Federico Gago Badenas
Área de Farmacología
Departamento de Ciencias Biomédicas
Curso académico 2023–2024

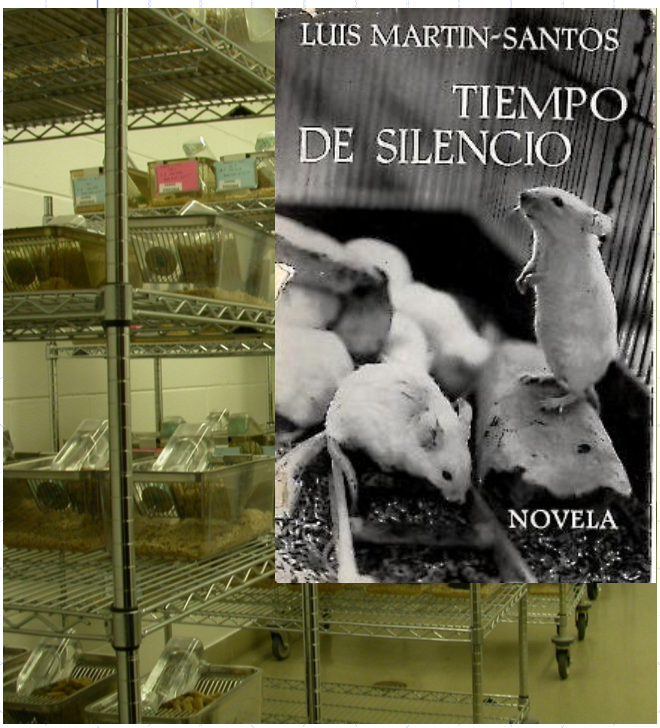
Animales de laboratorio tradicionales (1/2)

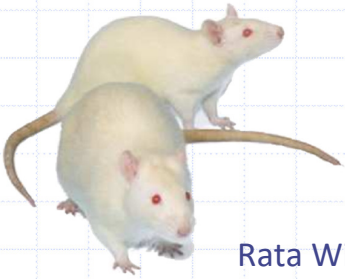
Mus musculus

Ratón Swiss

Ratón BALB/c atímico ("desnudo")

Ratón C57BL/6NHla





Rata Wistar

Rata Lewis

Rattus norvegicus

Hamster sirio
Mesocricetus auratus

Hamster chino
Cricetulus griseus

Cobaya Hartley (*guinea pig*)
Cavia porcellus

Animales de laboratorio tradicionales

(2/2)

Perro (Beagle)
Canis lupis familiaris

Gato
Felis catus

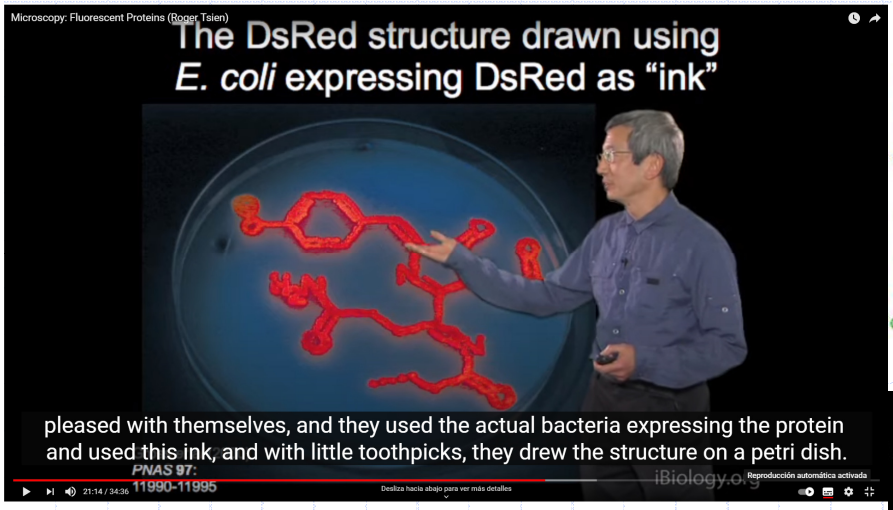
Conejo
Oryctologus cuniculus

Cangrejo herradura
Limulus polyphemus

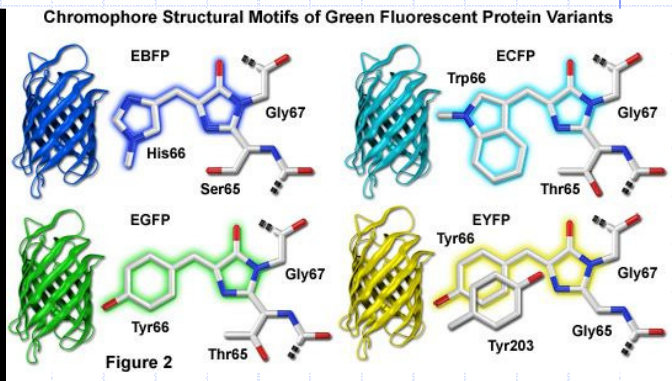
Cerdo
Minicerdo
Sus scrofa

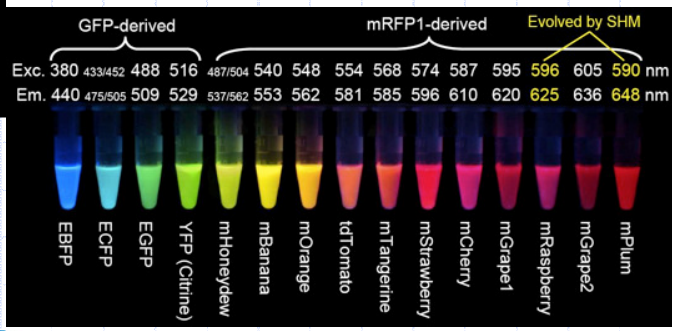
"Mono" Rhesus
(macaco)
Macaca mulatta

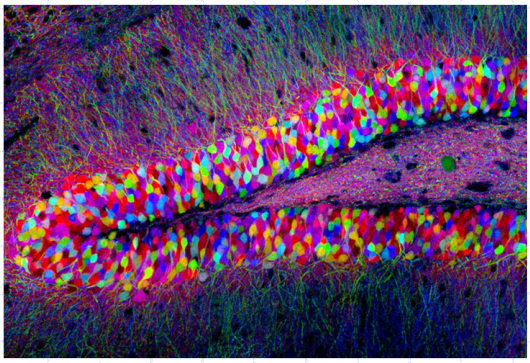
Proteínas (intrínsicamente) fluorescentes

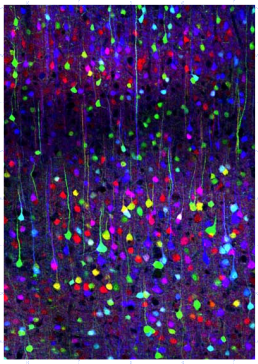


https://www.youtube.com/watch?v=qK9aYnkIr3w









HARVARD
BRAIN TOUR

A showcase of people, technologies, ideas – past and present – that contribute to our growing understanding of the brain and what makes us who we are.

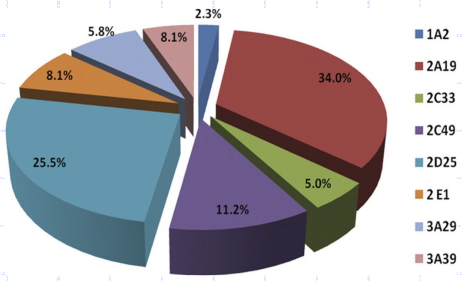
Ventajas y desventajas de varios modelos animales en investigación biomédica.

Disadvantages
- Organ structure
- Life span
- Sequential sampling
- Body weight
- Genetic homology

Rodents

Minipigs

Advantages
- Costs
- Breeding time
- Housing and handling
- Ethical consideration



Porcine	Human
CYP2A19	CYP2A13, CYP2A6
CYP2C33v4	CYP2C9
CYP2C49	CYP2C18
CYP2D25	**CYP2D6**
CYP3A29	**CYP3A4**
CYP3A39	CYP3A5
CYP1A2	CYP1A2
CYP2E1	CYP2E1

- Genetic homology
- Metabolism
- Body weight
- Sequential sampling
- Life span
- Organ structure

Advantages

Canines

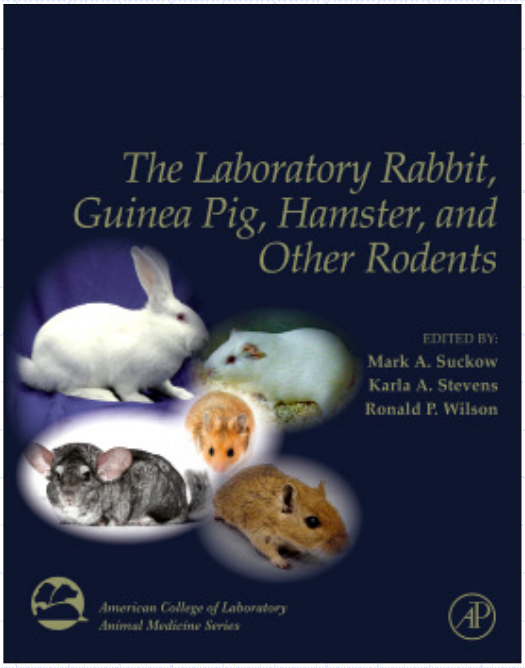
Nonhuman Primates (NHPs)

- Ethical consideration
- Housing and handling
- Breeding time
- Costs

Disadvantages

Manejo de animales de laboratorio: consideraciones éticas y normativa europea

- **Sociedad Española de Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL):** http://www.secal.es
- **International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS):** http://www.lasa.co.uk/



Russell, W.M.S. and Burch, R.L.
The Principles of Humane Experimental Technique.
Methuen, London, 1959.

1. http://www.understandinganimalresearch.org.uk/
2. http://www.buscaalternativas.com/

Informe sobre las estadísticas relativas a los animales para experimentación animal u otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea:

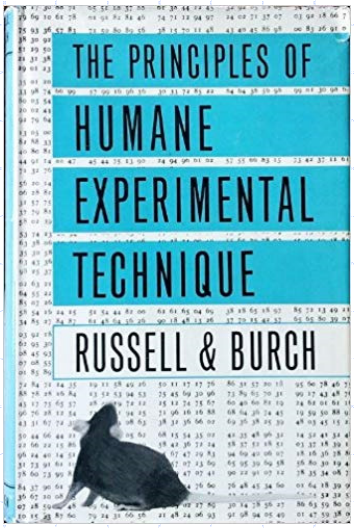
http://www.derechoanimal.info/bbdd/Documentos/1308.pdf

Recuerda las **tres R's** referentes al uso de animales en experimentación biomédica:

- **Reemplazar**: buscar alternativas, entre las que se incluyen los ensayos bioquímicos *in vitro*, los cultivos celulares, los órganos perfundidos, las rebanadas de tejido y las simulaciones por ordenador.

- **Reducir**: emplear cualquier estrategia que resulte en la utilización del menor número posible de animales para obtener la misma cantidad de información o para maximizar la información que se obtiene por animal.

- **Refinar**: evaluar el impacto de cualquier procedimiento o condición sobre el bienestar del animal y desarrollar estrategias para minimizar ese impacto.



[1959]

Desde 1986, los modelos alternativos están apoyados por leyes en la Unión Europea

https://www.ema.europa.eu/en/regulatory-acceptance-3r-replacement-reduction-refinement-testing-approaches

Técnicas básicas en farmacología experimental

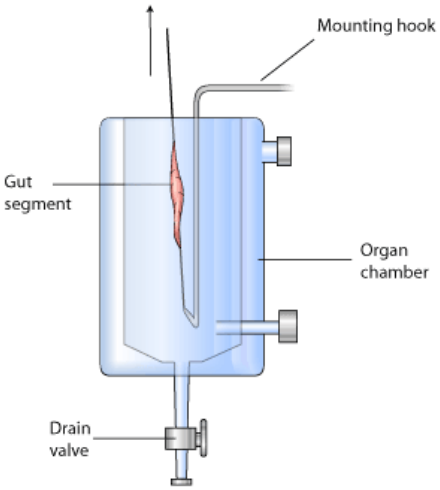
- Los estudios sobre animales intactos siguen siendo esenciales para los ensayos de toxicidad aguda, subaguda y crónica a los que debe someterse una nueva sustancia que se desarrolla como posible fármaco.

- También son necesarios para ensayos de teratogenia y carcinogenicidad.

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

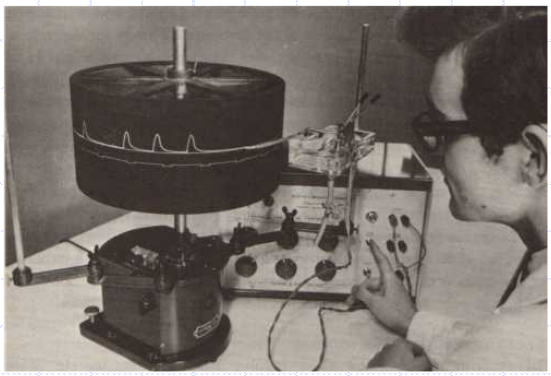
- Otras pruebas se pueden realizar sobre órganos o tejidos extraídos ("órgano aislado").

Técnicas básicas en farmacología experimental

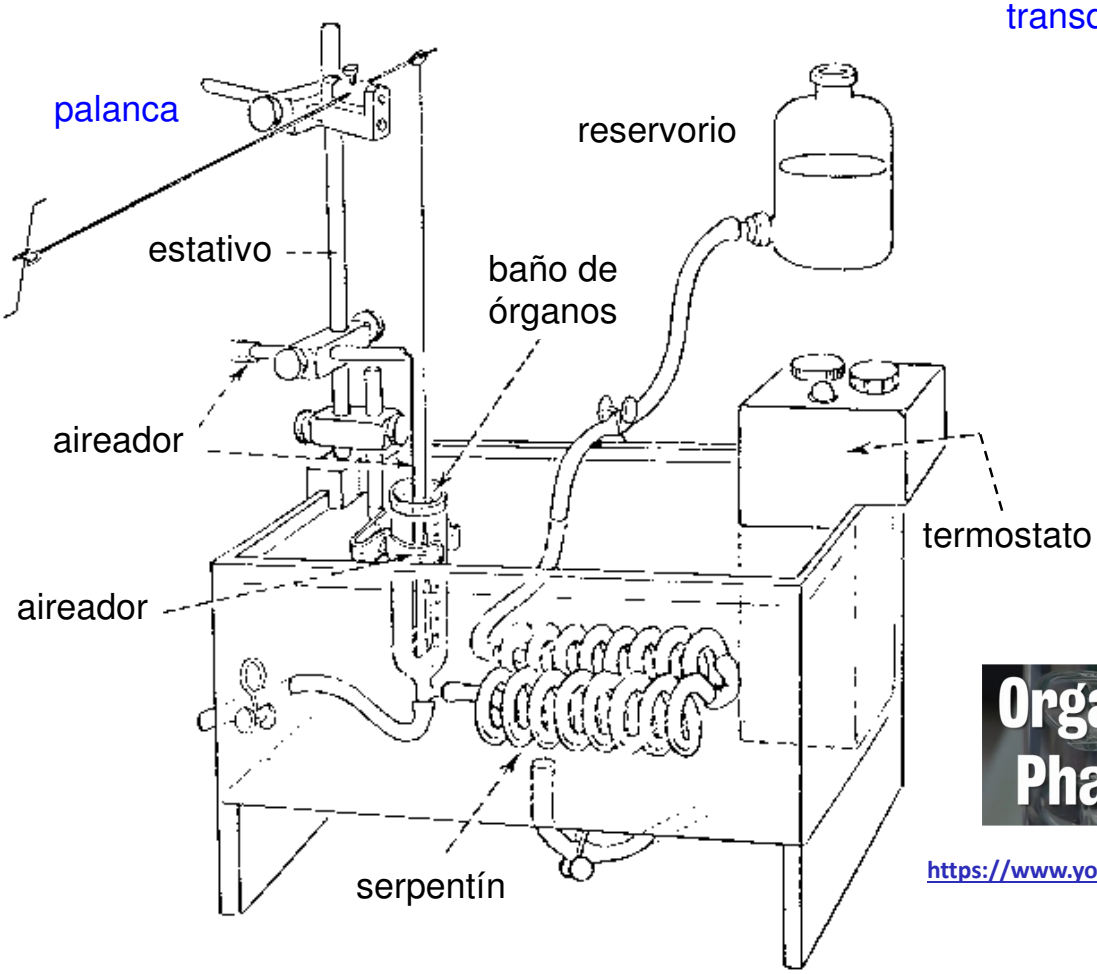


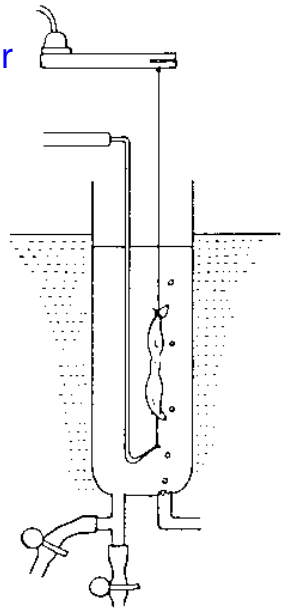
➢ Órgano aislado: Puede permanecer funcional durante varias horas suspendido en un baño que contenga una solución fisiológica de sales y a través de la cual se borbotea carbógeno (90-95% O_2 + 5-10% CO_2).

- **Henrick Magnus** (1802–1870) fue el primero en aplicar este método a una tira de intestino delgado.
- La contracción o relajación se transmitía mecánicamente a un estilete que inscribía sobre un tambor cubierto con papel ahumado que giraba a una velocidad constante (quimógrafo).
- El registro permitía visualizar y cuantificar el efecto del fármaco a lo largo del tiempo.

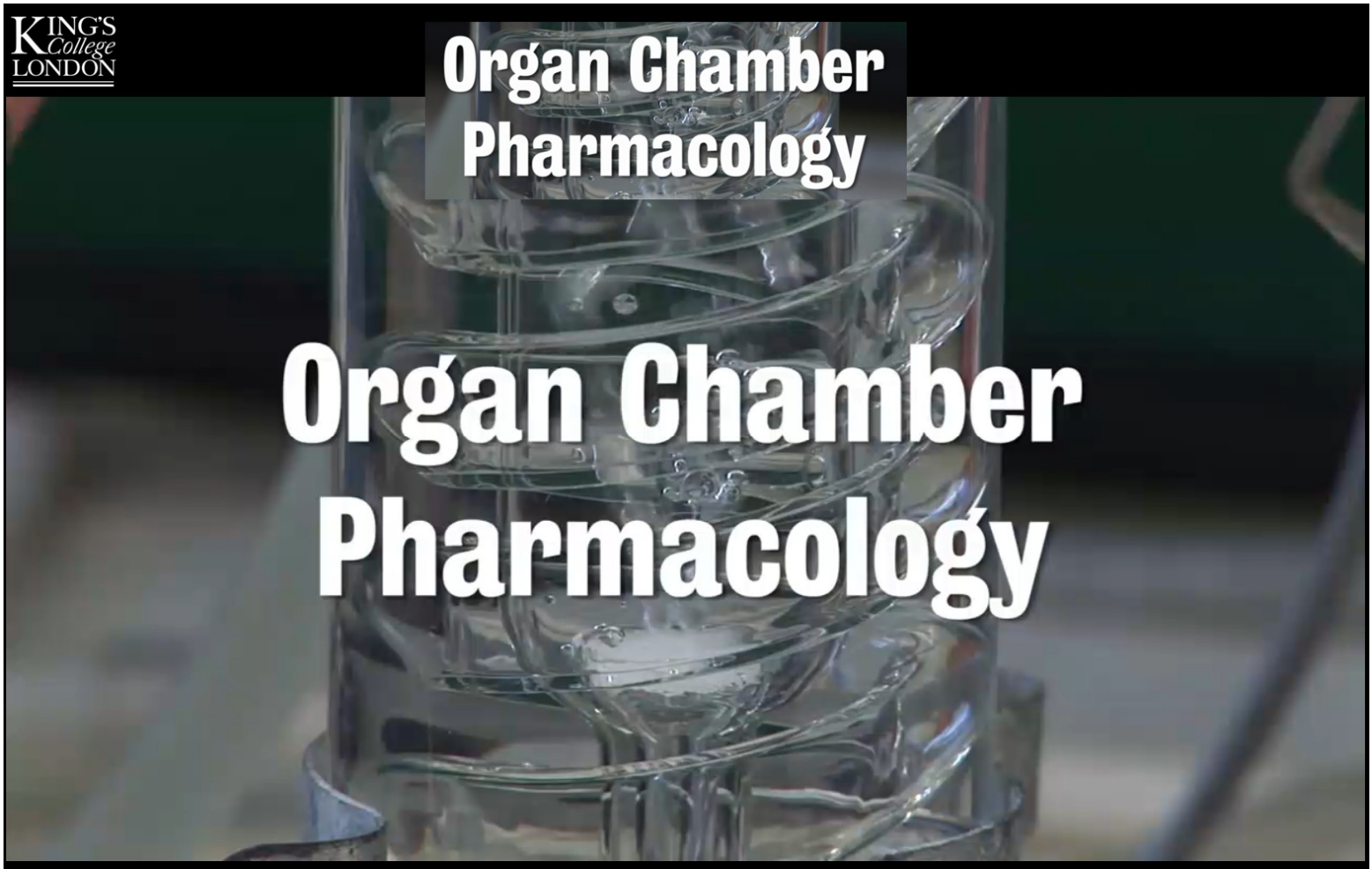


Aparato típico para experimentos con órganos aislados



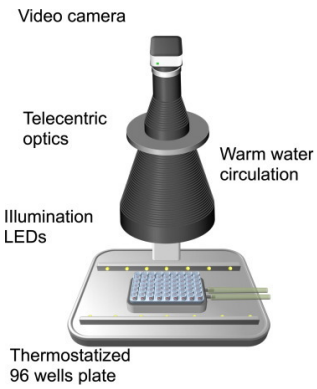


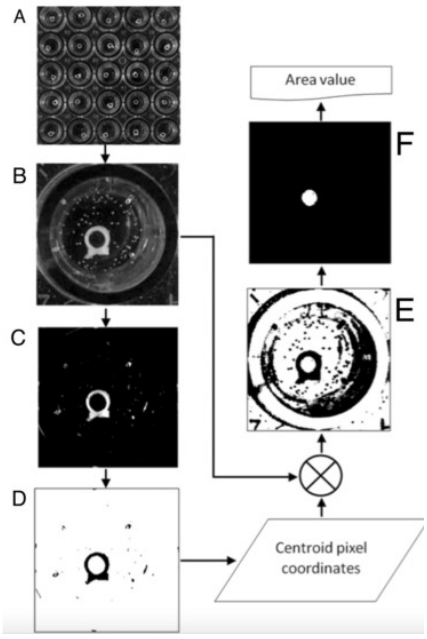
https://www.youtube.com/watch?v=RcGOaUIFo5I

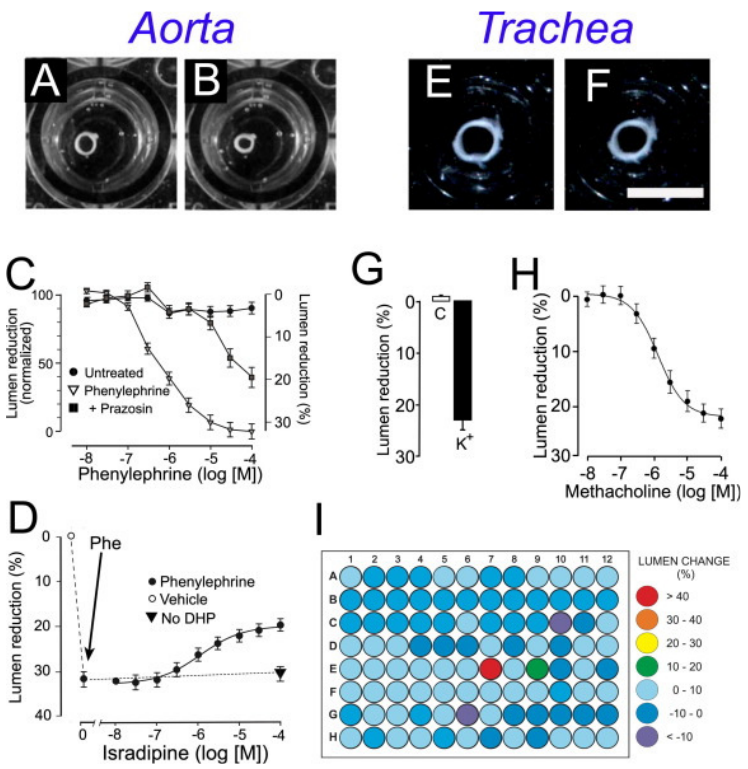


https://www.youtube.com/watch?v=RcGOaUIFo5I

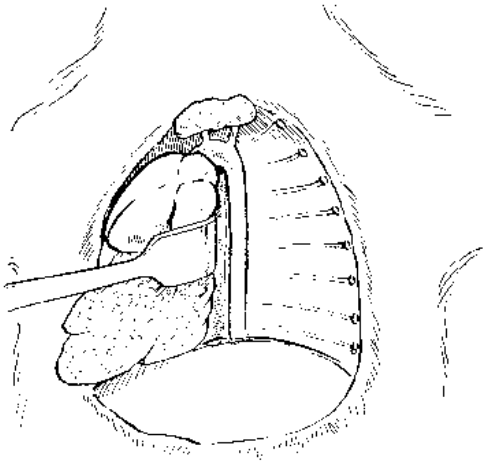
The rebirth of isolated organ contraction studies for drug discovery and repositioning



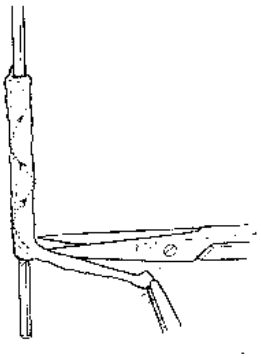




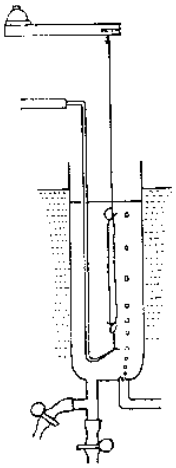
Borges R.
The rebirth of isolated organ contraction studies for drug discovery and repositioning.
Drug Discov Today 27(4):1128-1131 (2022)



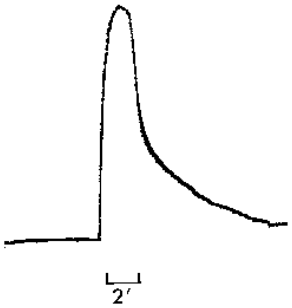
TIRA EN ESPIRAL DE
AORTA DE CONEJO

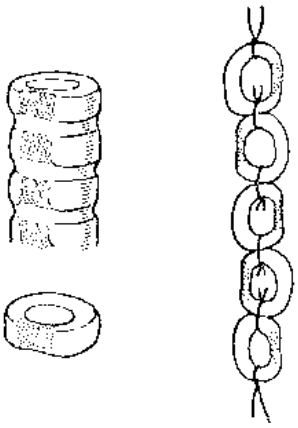


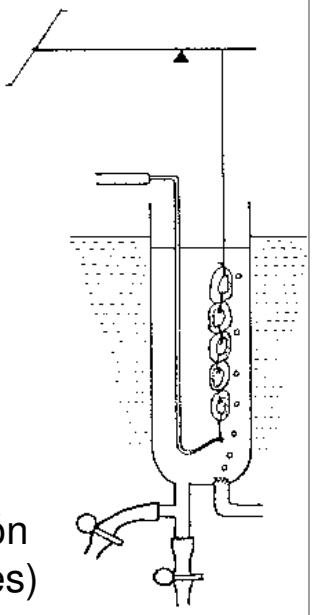
AURÍCULA
AISLADA DE COBAYA



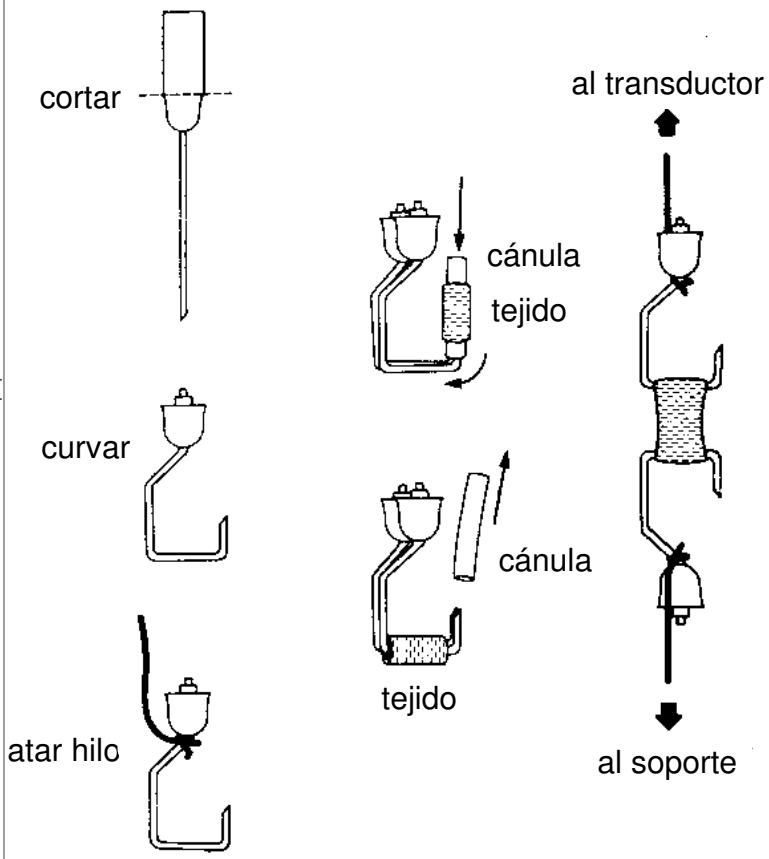
contracción de la aorta producida por la noradrenalina







ANILLOS DE TRÁQUEA
(obsérvese la disposición de las partes musculares)



ANILLO DE ARTERIA

Farmacología *in vitro*: preparaciones corrientes de tejidos aislados

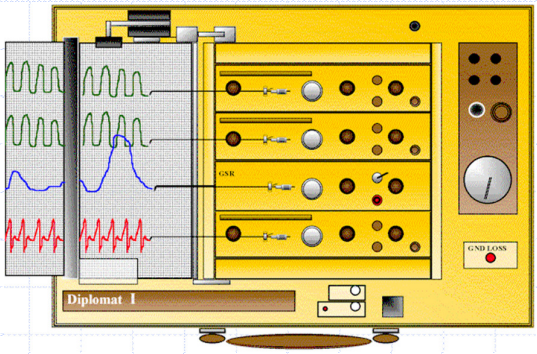
Preparación	Receptores estudiados habitualmente	Solución para el baño *
Recto abdominal de rana	Acetilcolina (nicotínico, tipo muscular)	Ringer (rana)
Colon ascendente de cobayo	Serotonina $5HT_{(4)}$	Krebs
Ileon de cobaya	Acetilcolina (muscarínico $M_{(3)}$), histamina $H_{(1)}$ y $H_{(3)}$, serotonina $5HT_{(3)}$, bradikinina $B_{(2)}$, neurokinina $NK_{(1)}$, $CCK_{(A)}$, $CCK_{(B)}$, angiotensina $AT_{(2)}$	Krebs o Tyrode
Ileon de cobaya (estimul. campo)	Opioides mu y kappa, adrenoceptores $alpha_{(2)}$	Krebs o Tyrode
Conducto deferente de cobayo	Prostanoides $EP_{(3)}$	Krebs
Conducto deferente de ratón (estimul.campo)	Opioides mu, kappa y delta, dopamina $D_{(2)}$	Krebs (menos Mg^{2+})
Yeyuno de conejo	Adrenoceptores $alfa_{(2)}$	Tyrode
Corazón de conejo Langendorff	Adrenoceptores $beta_{(1)}$	Ringer-Locke
Anococcígeo de rata	Adrenoceptores $alfa_{(1)}$, $GABA_{(B)}$	Krebs
Aorta de rata o conejo	Adrenoceptores $alpha_{(1)}$, serotonina $5HT_{(2)}$, neurokinina $NK_{(1)}$, bradikinina $B_{(1)}$, angiotensina $AT_{(1)}$, péptido rel. gen. con calcitonina $CGRP_{(1)}$	Krebs
Aurícula de rata	Adrenoceptores $beta_{(1)}$, acetilcolina (muscarínico) $M_{(2)}$	Krebs
Colon de rata	Neurokinin $NK_{(2)}$	Krebs
Nervio frénico/diafragma de rata	Acetilcolina (nicotínico)	Krebs
Vena porta de rata	Neurokinina $NK_{(3)}$	Krebs
Útero de rata	Adrenoceptores $beta_{(2)}$, histamina $H_{(2)}$, bradikinina $B_{(2)}$	De Jalón
Conducto deferente de rata (estimul. campo)	Adrenoceptores $alfa_{(2)}$, opioide mu, prostanoide $EP_{(3)}$, bradikinina $B_{(2)}$, péptido rel. gen. con calcitonina $CGRP_{(2)}$	Krebs (menos Mg^{2+})

* Utilizada de forma habitual aunque no exclusiva

Técnicas básicas en farmacología experimental

- Órgano aislado:

  - Las palancas fueron eventualmente sustituidas por transductores y los kimógrafos fueron reemplazados por polígrafos y otros dispositivos electrónicos.



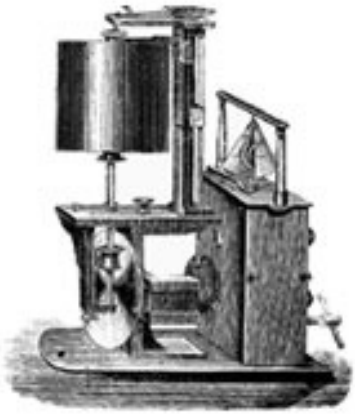
BAÑOS DE ÓRGANOS COMERCIALES (INDIVIDUAL, CUATRO, OCHO)

transductor isotónico
(desplazamiento)

transductor isométrico
(fuerza)

Registradores

1890s

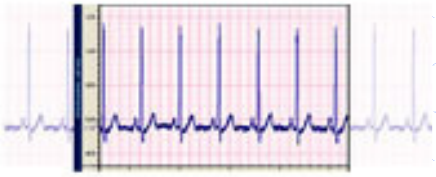


Quimógrafo de tambor

1960s

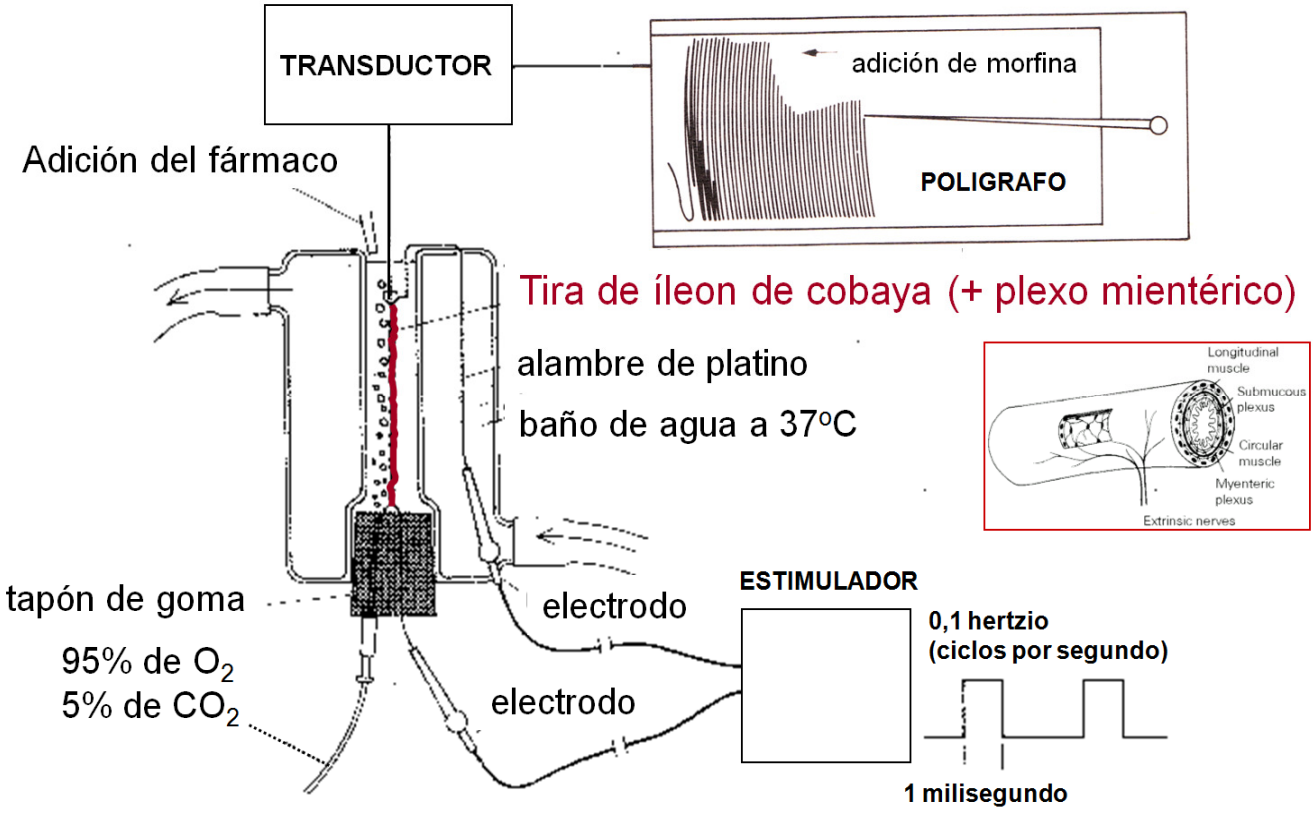
Polígrafo Grass

2010s



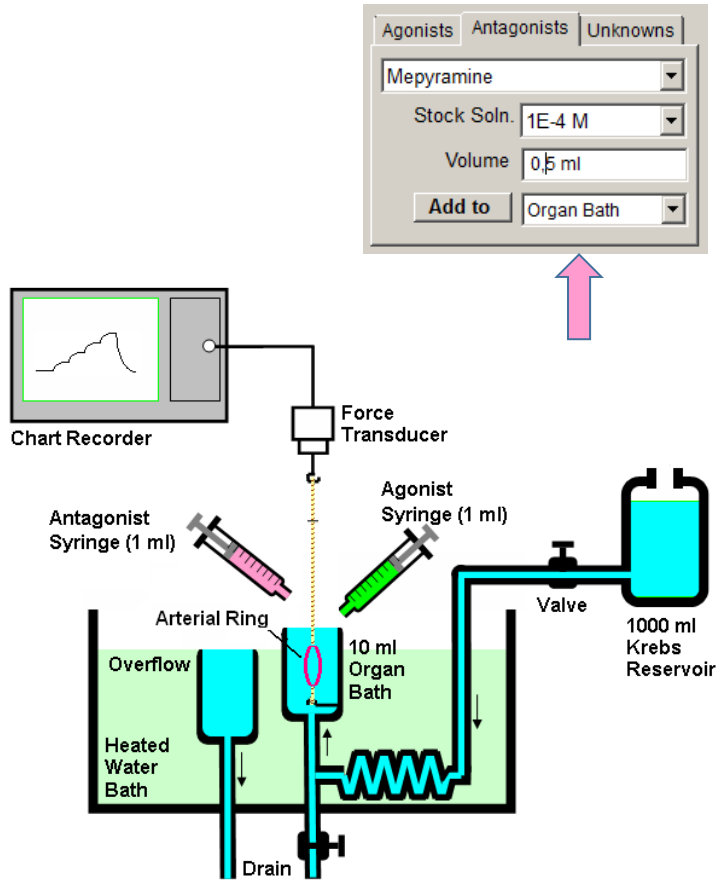
PowerLab / LabTutor
para estudiantes

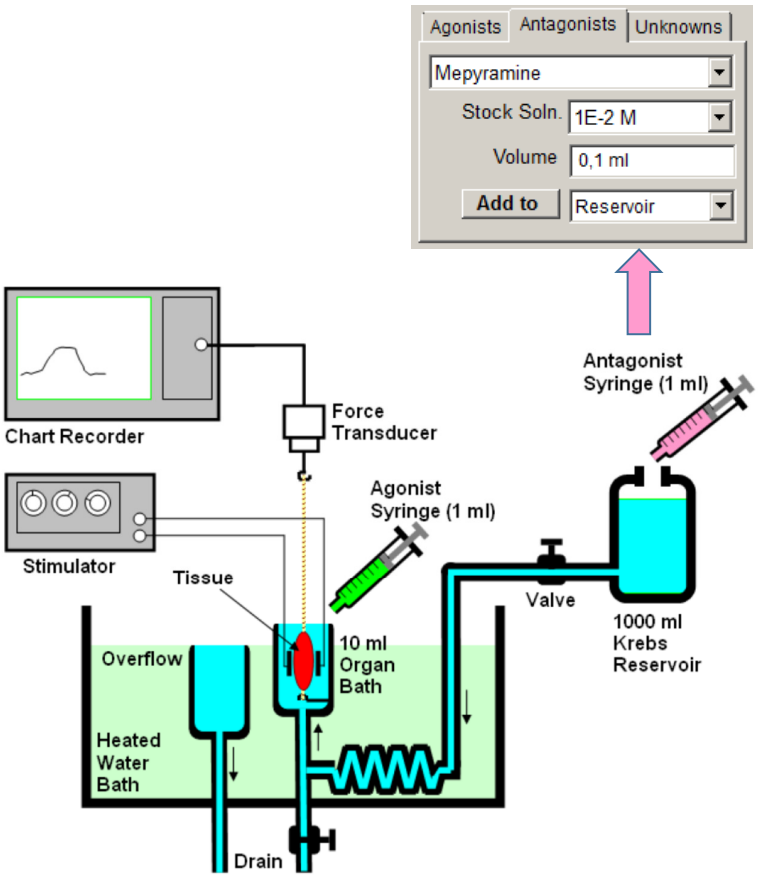
BIOENSAYO



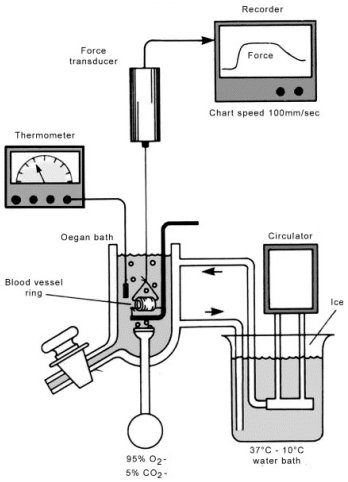
"A pharmacologist is a jack of all trades, borrowing heavily from other disciplines, such as physiology, biochemistry, pathology, microbiology and statistics, but he has developed one technique of its own, and that is the method of bioassay." (J.H. Gaddum)

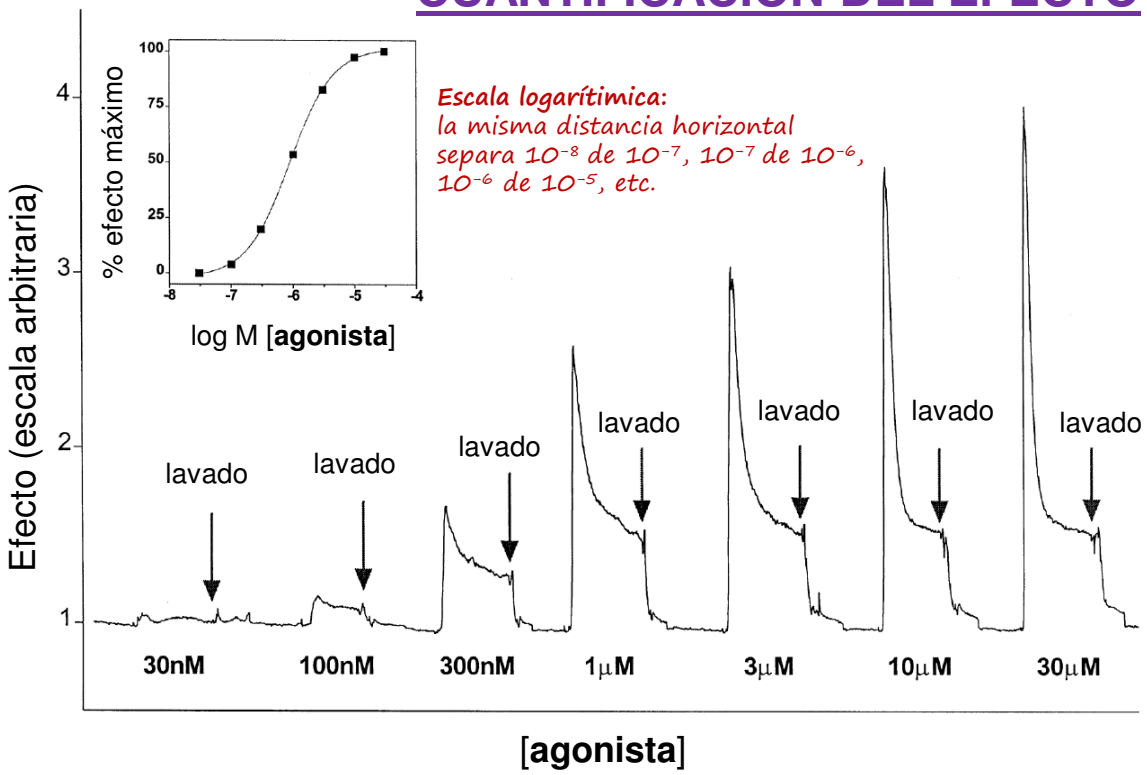
SIMULACIONES DE BAÑO DE ÓRGANOS



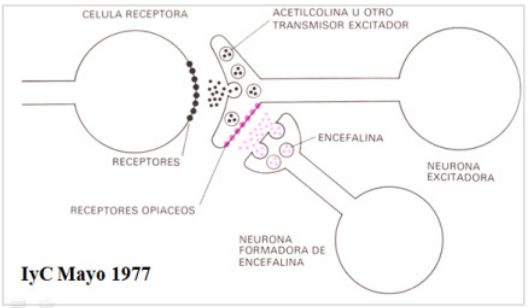


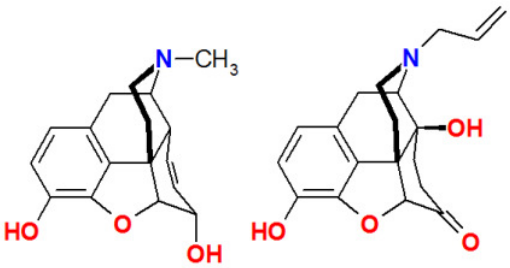
CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO

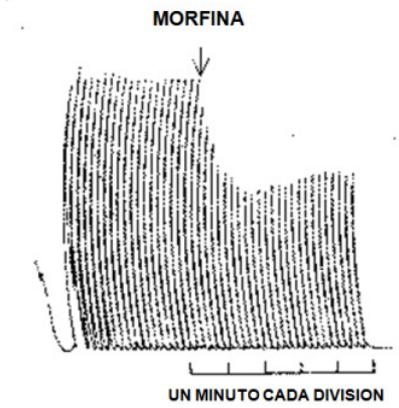


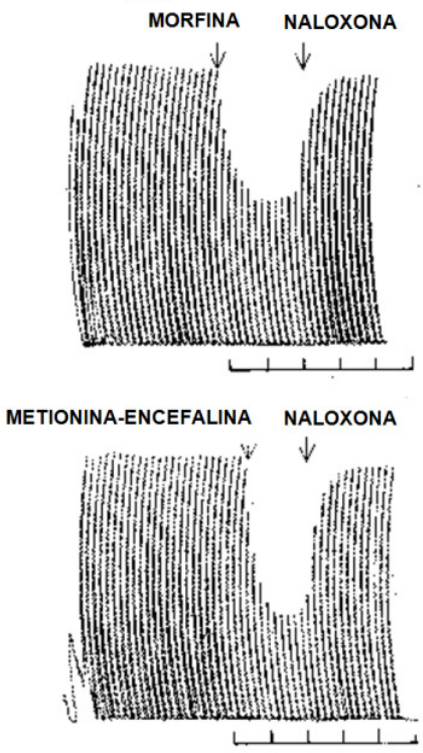


Resultados de un típico experimento farmacológico en el que se mide la dependencia de un efecto biológico (por ejemplo, contracción, secreción, cambios de conductancia a iones, o producción de un segundo mensajero) con la concentración de agonista añadida. Entre adiciones sucesivas de agonista existe un período de lavado de varios minutos. La **curva sigmoidea** de la gráfica representa cada respuesta individual como **porcentaje del efecto máximo** en función del logaritmo de cada concentración de agonista utilizada.

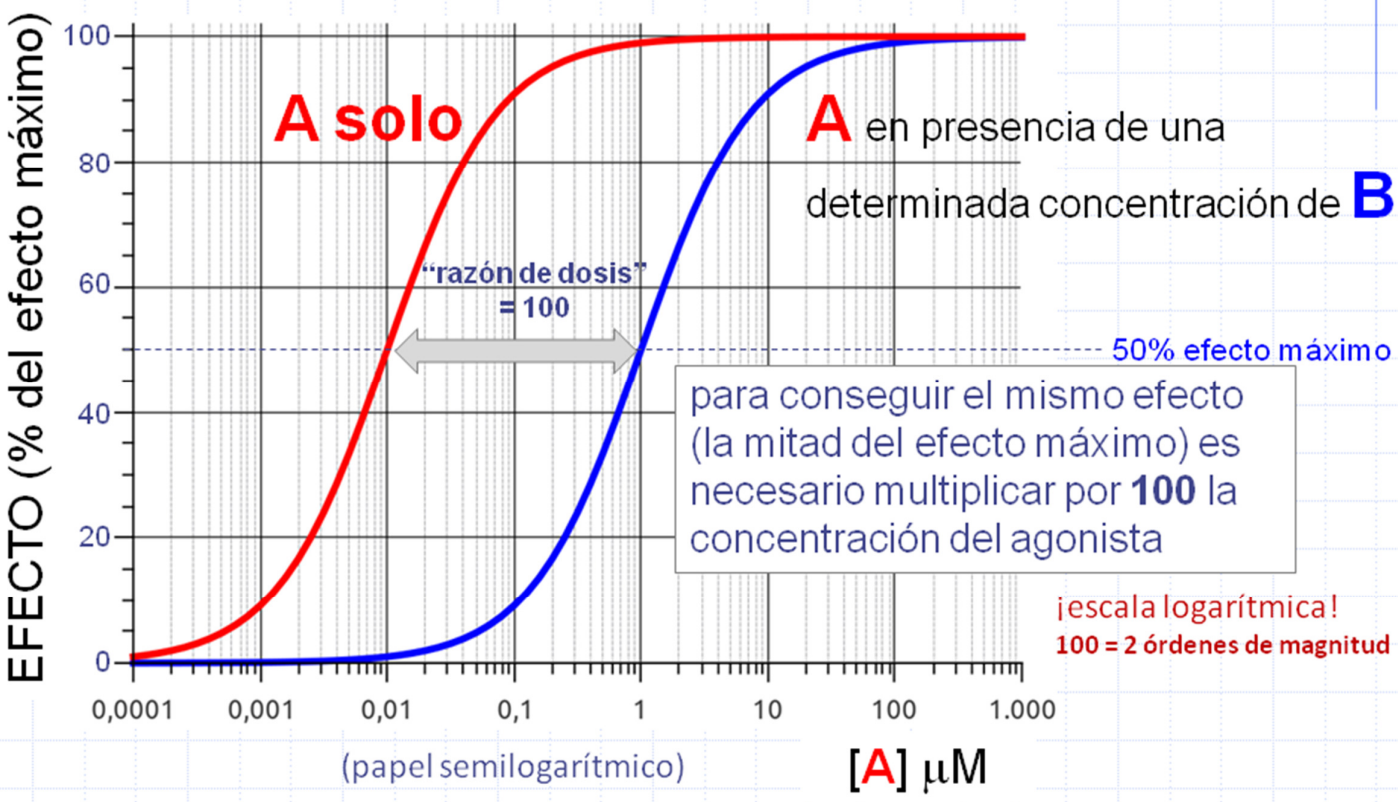


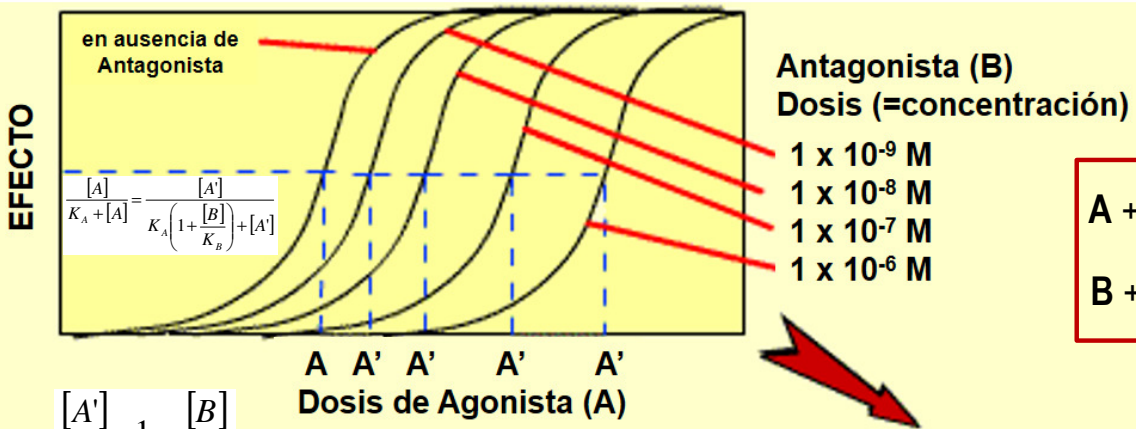






Desplazamiento a la derecha de la curva concentración-efecto de un agonista **A** por parte de un antagonista competitivo reversible **B** ("antagonismo superable")





A: agonista
B: antagonista competitivo reversible

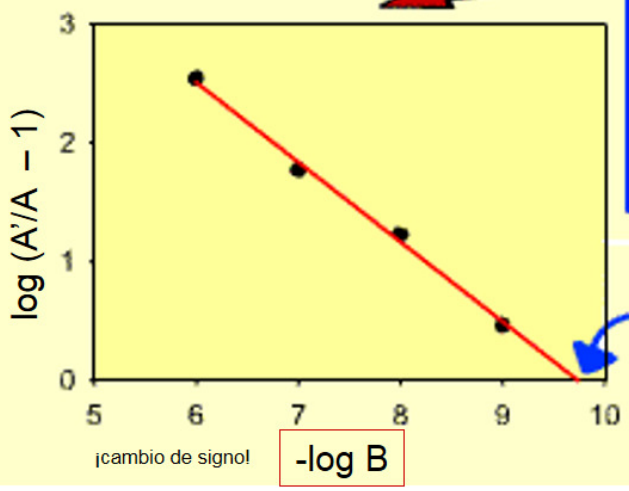
$$A + R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AR \longrightarrow \text{efecto}$$

$$B + R \rightleftharpoons BR$$

A'/A = razón de dosis

$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

Dosis de Antagonista	A'/A	-log B	log (A'/A – 1)
1 x 10^{-9} M	4	9	0,47
1 x 10^{-8} M	18	8	1,23
1 x 10^{-7} M	60	7	1,77
1 x 10^{-6} M	350	6	2,54

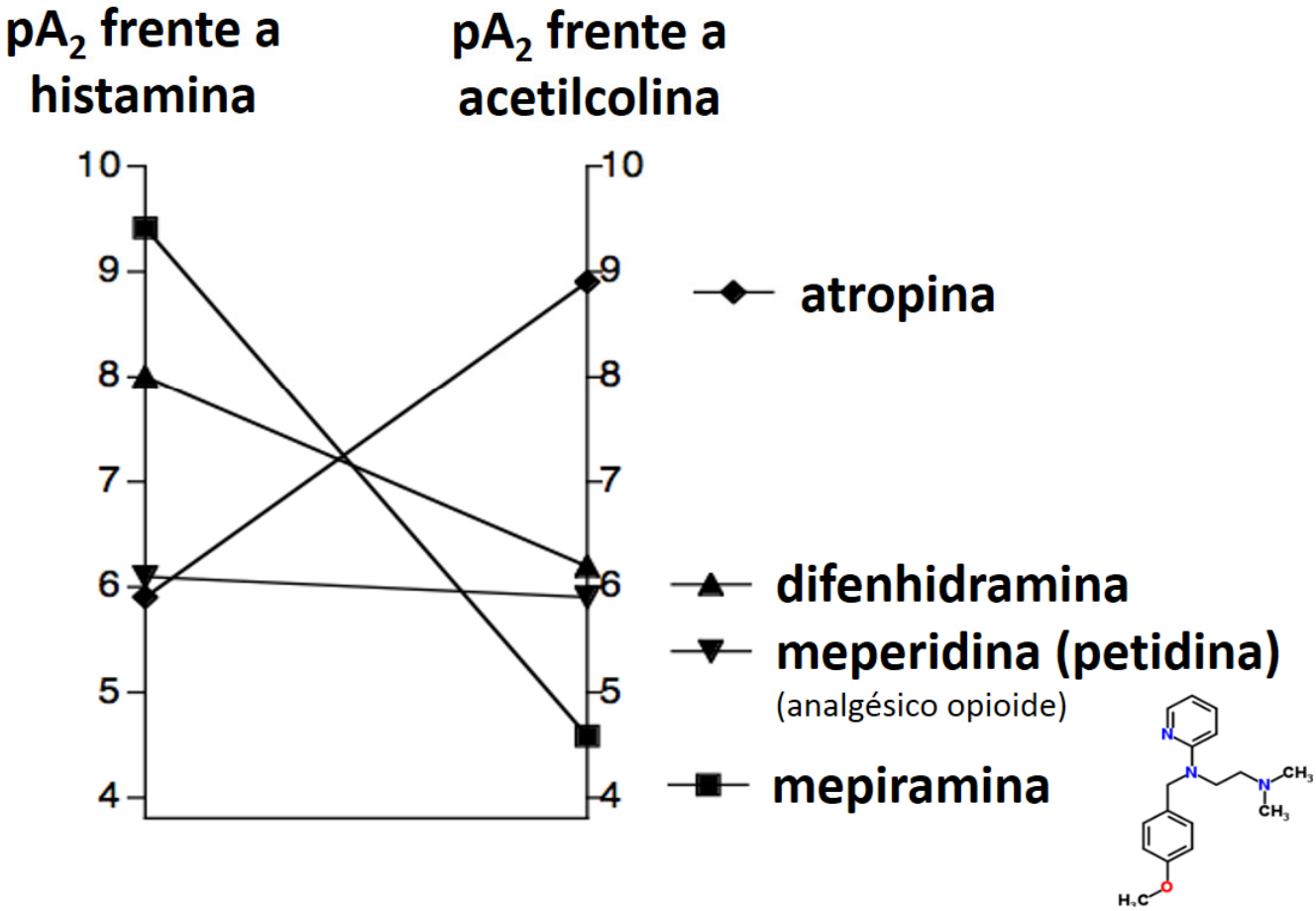


pA_2
(por extrapolación)

pA_2: logaritmo del inverso de la concentración molar de antagonista (B) que hace necesario <u>multiplicar por 2</u> la concentración de agonista (A) para producir el mismo efecto que cuando B no está presente (A' = 2A; A'/A = 2)

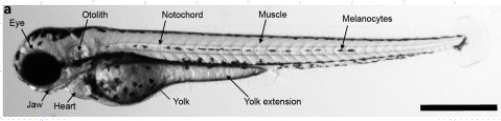
N.B.: explicación detallada en `http://www3.uah.es/farmamol/Public/PDF_files/Bases_inter_FR.pdf`

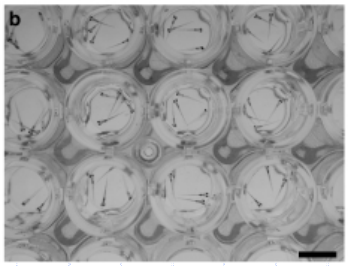
Valores de pA_2 de algunos fármacos clínicamente útiles



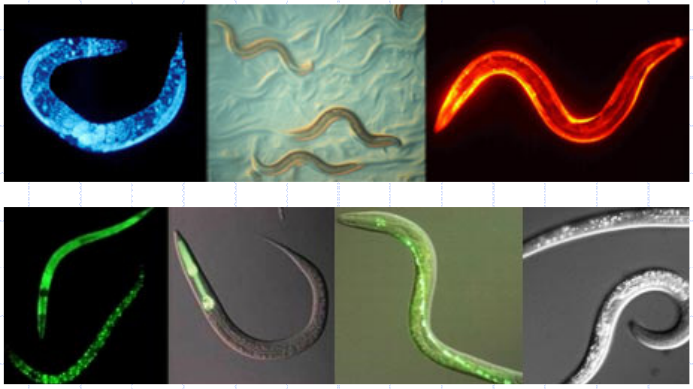
Animales de laboratorio no tradicionales

Pez cebra *(Danio rerio)*

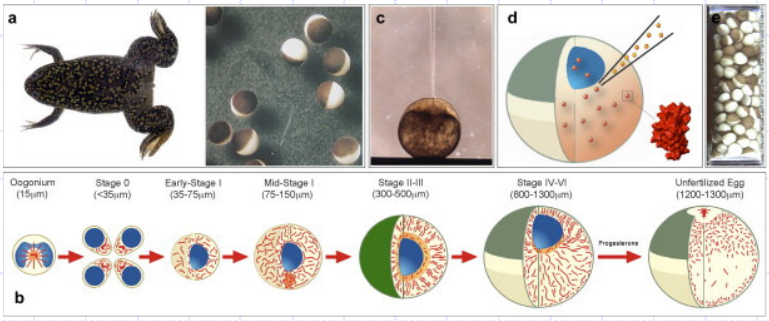




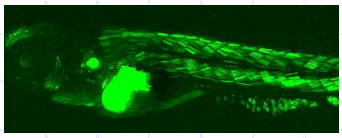
Caenorhabditis elegans



Xenopus laevis (ovocitos, melanóforos, etc)



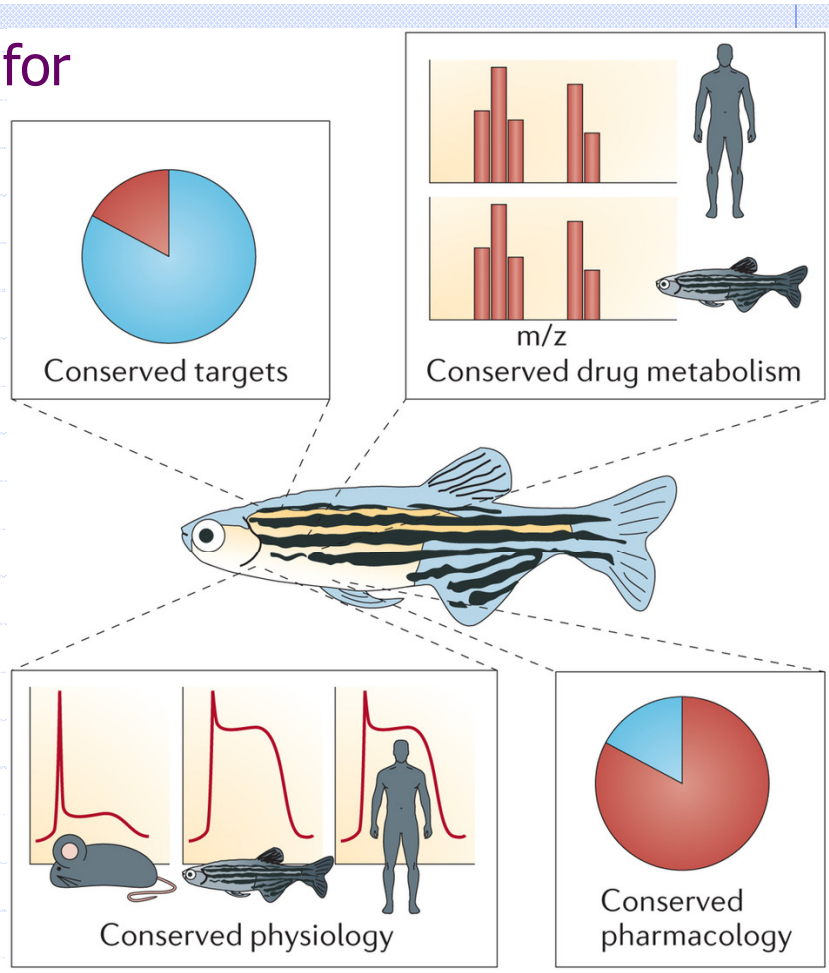
Henry Krause está desarrollando peces cebra portadores de genes humanos que codifican receptores nucleares: los peces transparentes **brillan en verde** cuando un fármaco que se está probando afecta a un determinado órgano.

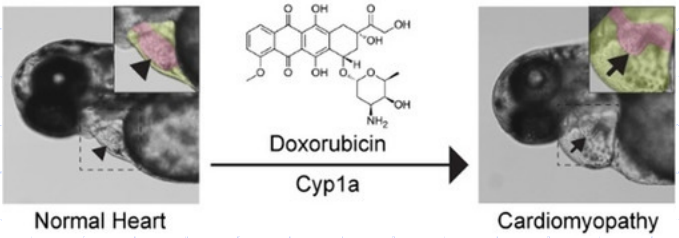


Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research (University of Toronto)

https://www.nature.com/articles/nrd4627
https://www.thestar.com/news/insight/2015/11/09/see-through-fish-offer-clear-advantage-to-drug-researchers.html

How suitable are zebrafish for discovering human drugs?



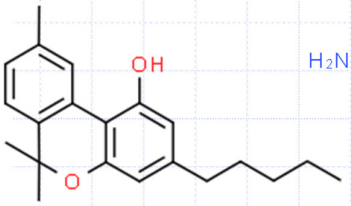


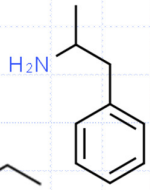
https://doi.org/10.1002/cbic.201900741

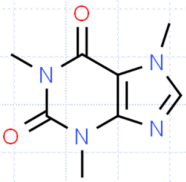
Zebrafish as tools for drug discovery
Calum A. MacRae & Randall T. Peterson
Nature Reviews Drug Discovery 14, 721–731 (**2015**) DOI:10.1038/nrd4627

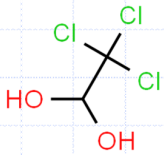
La NASA administró distintas sustancias psicoactivas a arañas de jardín para ver cómo afectaban a sus telas (**1995**)

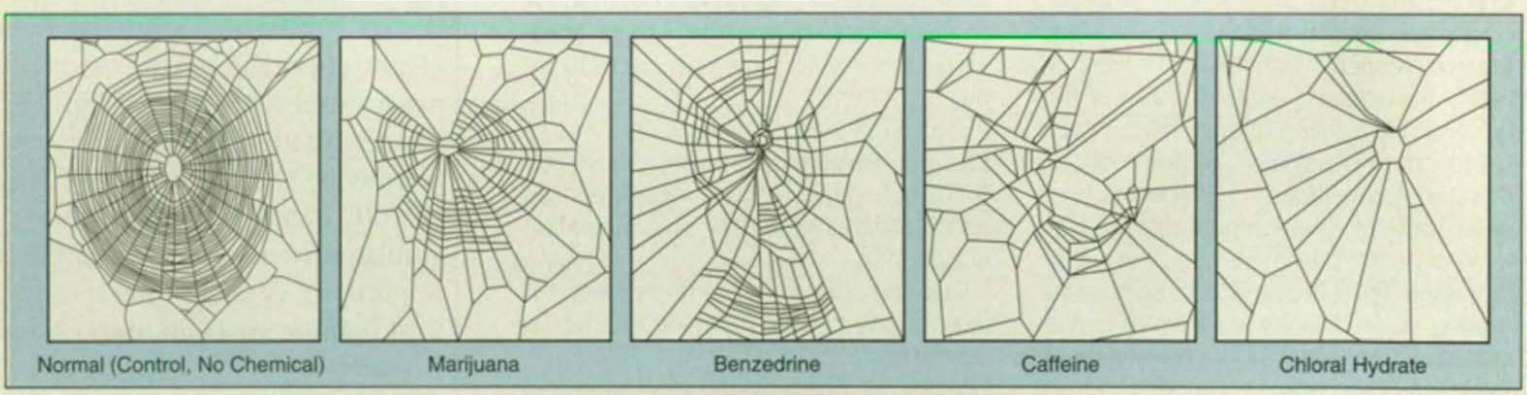
Araneus diadematus









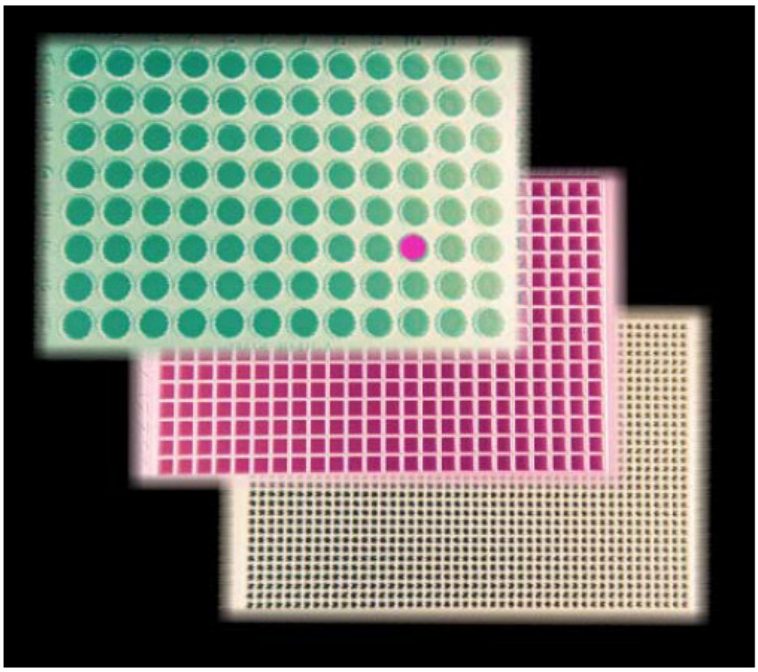


The Web Spun by an Araneus diadematus (House Spider) is altered when the spider is exposed to chemicals. The alterations can be quantified and used as measures of toxicity.

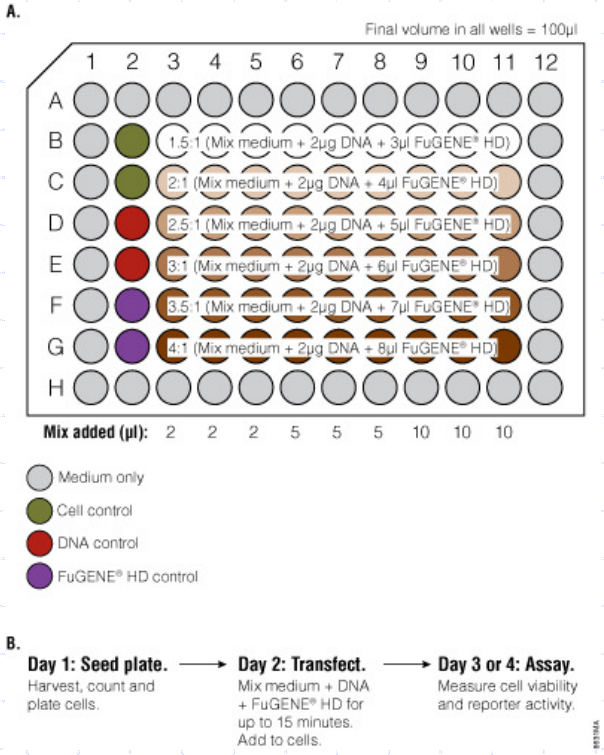
https://rarehistoricalphotos.com/nasa-spiders-drugs-experiment/

Volúmenes y potencial de prestaciones

Densidad y volumen de los pocillos	Potencial de rendimiento
96 (0.05 to 0.3 ml)	10^4 per day
384 (0.025 to 0.1 ml)	10^5 per day
1536 (0.001 to 0.01 ml)	10^6 per day



Ensayos en placas de micropocillos



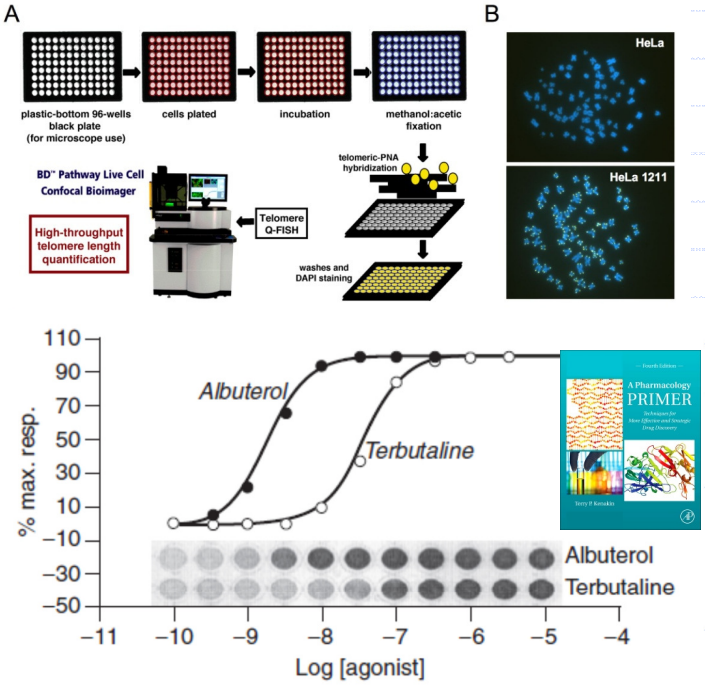


FIGURE 5.5 Melanophores, transfected with human β-adrenoceptors, disperse melanin to become opaque when stimulated with β-adrenoceptor agonists such as albuterol and terbutaline. Inset shows light transmission through a melanophore cell monolayer with increasing concentration of agonist. Light transmission is quantified and can be used to calculate graded responses to the agonists.

ELISA Virtual Lab

"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"

https://blog.praxilabs.com/2021/09/20/elisa-principle/

https://youtu.be/FN65qr4G0TA

FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL

MODELOS *IN VIVO* (ANIMAL ENTERO)

MODELOS FISIOLÓGICOS

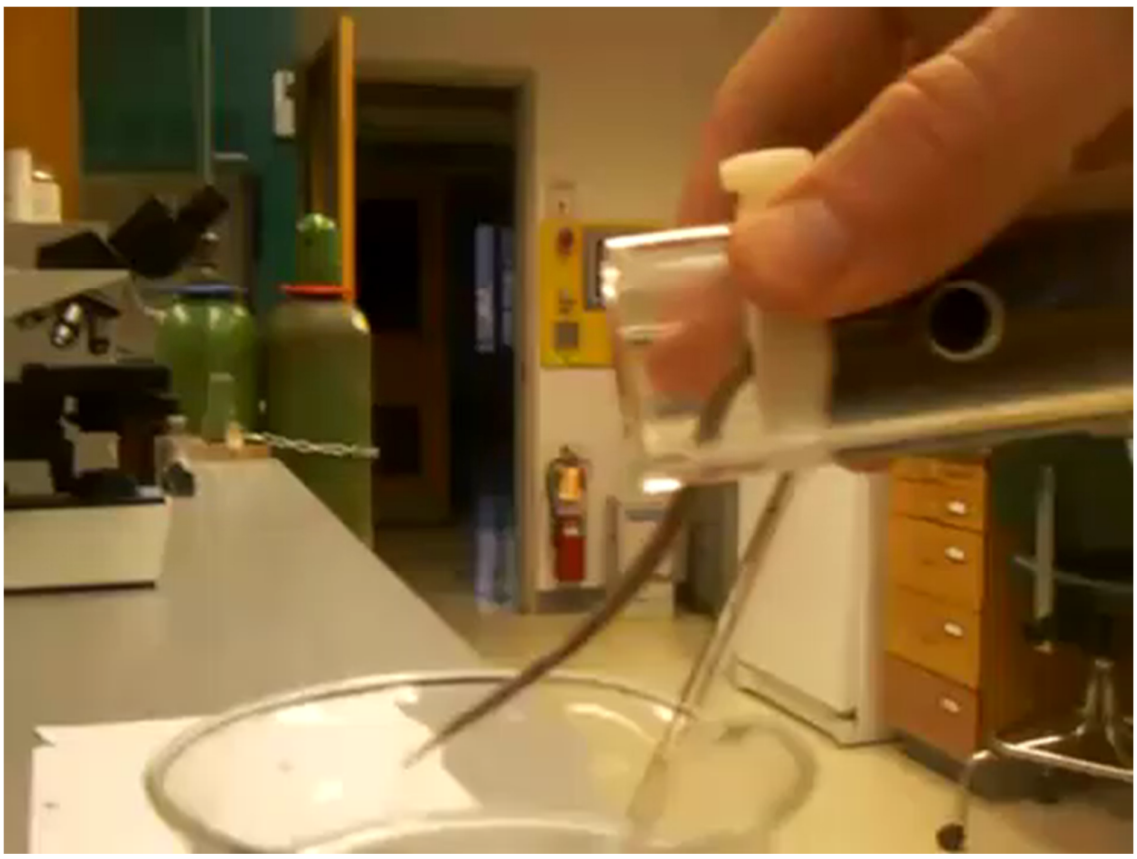
MODELOS DE DOLOR (para evaluación de analgésicos):

- Coletazo *(tail flick)* en ratón: agua caliente
- Coletazo *(tail flick)* en rata: foco de calor
- Placa caliente (*hot plate*)
- Método de Randall-Selitto: presión en la pata de la rata

MODELO DE INFLAMACIÓN:

- Edema inducido por inyección de carragenina (rata y ratón): **pletismometría**

"COLETAZO" (*TAIL FLICK*) EN RATÓN (1/2)
AGUA CALIENTE A 52º



"COLETAZO" (*TAIL FLICK*) EN RATA (2/2)
FOCO DE CALOR

CURRENT PROTOCOLS in Pharmacology

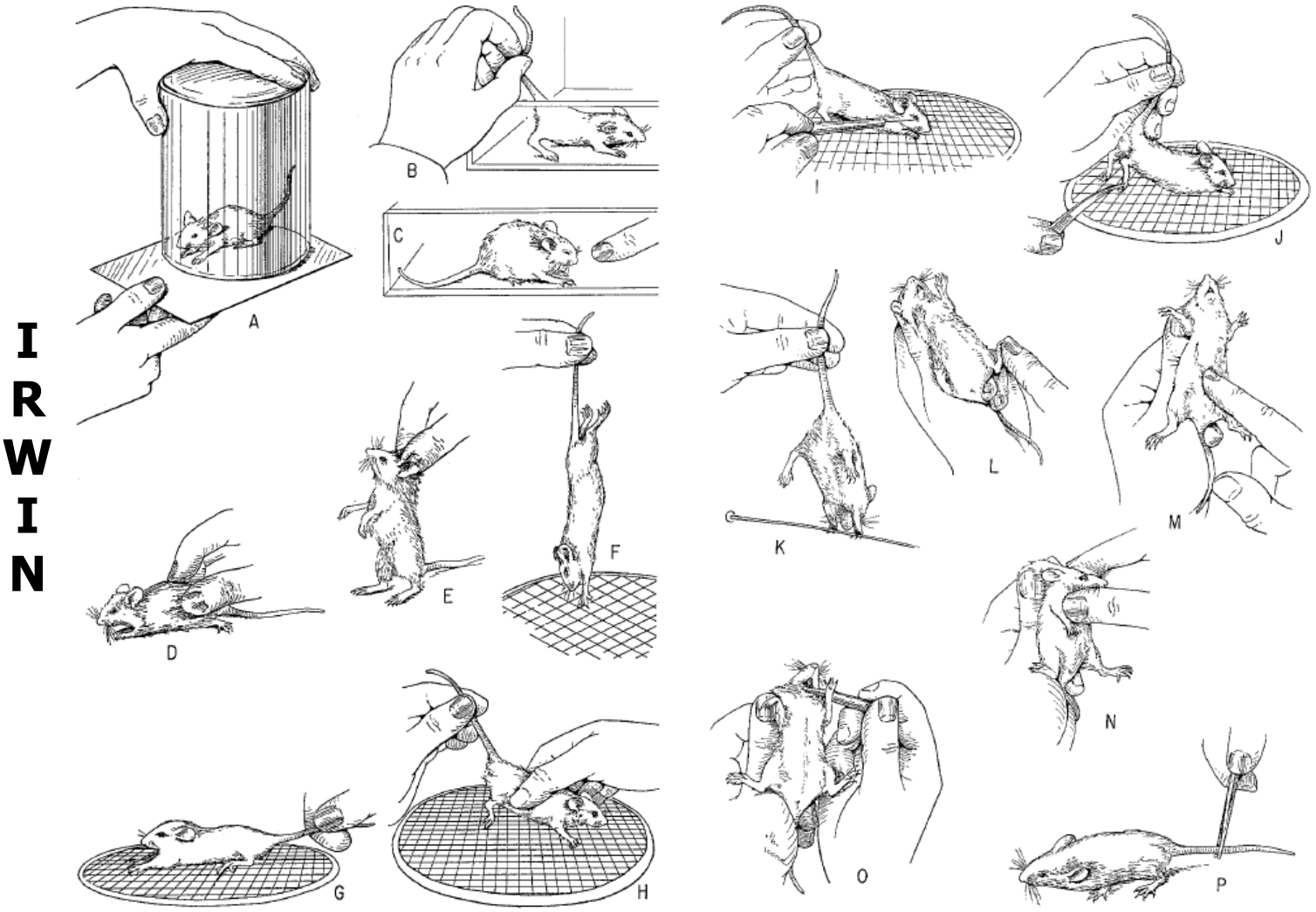
Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function

The Irwin observation test is commonly used to evaluate the effects of a new substance on behavior and physiological function. The results of the Irwin test are used to determine potential toxicity and to select doses for specific therapeutic activity. The Irwin test can also be used in a safety approach for detecting untoward effects of a new compound on general behavior and for evaluating its acute neurotoxicity. In particular, data obtained in the Irwin Test can help to determine the dose range to be tested in other safety tests. Furthermore, the Irwin Test can furnish a first but pertinent orientation towards a specific therapeutic indication, a specific mechanism of action or a specific physiological function.

El **ensayo observacional de Irwin** se utiliza habitualmente para:

- evaluar los efectos de una nueva sustancia sobre el comportamiento y varias funciones fisiológicas
- determinar posibles toxicidades de tipo agudo
- detectar efectos indeseables de un compuesto nuevo (en una aproximación a la seguridad)
- ayudar a seleccionar las dosis necesarias para una actividad terapéutica determinada
- ayudar a determinar el intervalo de dosis que se debe emplear en otras pruebas de seguridad
- orientar en cuanto a posibles indicaciones terapéuticas y mecanismo(s) de acción.

NOTA IMPORTANTE: *Todos los protocolos que utilizan animales vivos deben ser revisados y aprobados, en primer lugar, por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de los Animales y/o debe cumplir los requisitos gubernamentales de cuidado y uso de los animales de laboratorio.*



Test de Irwin:

Batería de pruebas en roedores para una primera evaluación de un candidato a fármaco

ENSAYO		RESULTADO Y OBSERVACIONES	Prot. nº
PSICOACTIVIDAD	ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE	M. E. S.	
		Pentetr.	
		Estricn.	
	ACTIVIDAD MOTORA	Actividad restringida	
		Actividad locomotora	
	TONO MUSCULAR		
	TEMPERATURA		
	POTENC. HEXOBARBITAL		
	ANTAGº. BENZOQUINOLIZINAS		
	ACTIVIDAD FRENTE AMFETAMINA		
	CATATONIA		
	COMPORTAMIENTO CONDICIONADO (RATA)		
	ACTIV. FRENTE ANIMALES AGRESIVOS	Aislamiento	
	ANTAGº OXOTREMORINA		
ACTIVIDAD ANESTESICA LOCAL			
ACTIVIDAD ANOREXICA			

ENSAYO		RESULTADO Y OBSERVACIONES	Prot. nº
SISTEMA CARDIOVASCULAR Animal ..... Anestesia	Presión arterial		
	Ritmo cardíaco		
	Flujo sanguíneo		
	Efectos adrenérgicos		
	Efectos colinérgicos		
	Efectos ganglionicos		
ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSORA			
RESPIRACION			
M. NICTITANTE	Estím. eléctrico		
	Estím. químico		
PREP. N. M.	Tibial-sóleo		
REFLEJOS ESPINALES			
ANALGESIA	Estím. térmico		
	Estím. químico		
	Dolor inflamatorio		
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	Eritema U. V.		
	Edema		
	Granuloma		
	Permeab. capilar		
ACTIV. ANTIPIRETICA			

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 13(3):222-57 (**1968**)

PRODUCTO nº .....

Disuelto en .....

Suspendido en .....

Vía .....

Peso ratones .....

Fecha .....

Hora .....

Experimentador .....

Observ.			Suspensión por la nuca							Suspensión por la cola							Sit. libre			Pasaje			Sit. libre						Bocal								Dosis Tiempo
	Mort. inmed.	Mort. retard.	Orina-Defec.	Vocaliz.	Resp. dolor	Refl. enderez.	Pupila	Lagrimación	Ataque prov.	Salivación	Tono abdom.	Tono miembros	Diarrea	Color piel	Pasividad	Lucha	Refl. flexor ips.	Refl. corneal	Refl. auricular	Hipotermia	Tono corporal	Fuerza presa	Resp. visual	Caract. mov.	Posic. patas	Ataxia	Irritabilidad	Elev. cola	Retir. dedo	Aprox. dedo	Desplaz.	Sobresalto	Piloerección	Ab. palpebral	Transferencia	Convulsiones	Sacudidas	Temblores	Resp.	Cond. anormal	Act. locom.	Ab. palpebral	Postura	
			1	6	6	0	4	4	4	4	4	4	4	4	0	6	6	6	6	4	4	6	6	4	0	4	4				cm	4	0	4	4	0	0	0	4		4	4	4	Normal
																																																Media
																																																Media
																																																Media
																																																Media

Esquema de Irwin

	Tiempo en h.		Experiencia n.º Realizado Fecha	
		Dosis		*Especie*
	4	Alerta	Percepción Conciencia	
	0	Estereotipia		
	0	Pasividad		
	4	Aseo	Disposición de ánimo	*Sexo*
	0	Intranquilidad		
	0	Irritabilidad, agresión		
	4	Actividad espontánea	Actividad motora	
	4	Reactividad		
	4	Respuesta al tacto		
	0	Cola de Straub	Excitación SNC	*Vía*
	0	Temblores		
	0	Convulsiones		
	0	Voltereta, enderezamiento	Incoord. mot.	
	4	Tono extremidades	Tono muscular	*Peso*
	4	Aprehensión		
	4	Tono del cuerpo		
	4	Tono abdominal		
	4	Reflejo pineal	Reflejos	
	4	Reflejo corneal		
	4	RIF (reflejo ipsilateral flexor)		
	4	Abertura palpebral	Esquema autónomo	
	0	Exoftalmos		
	0	Salivación		*Disolvente*
	0	Signo de retroceso		
	0	Piloerección		
	0	Hipotermia		
	4	Ritmo respiratorio		
Observaciones:				
Vocalización				*Fármaco*
Postura del cuerpo				
Postura extremidades				
Andar inseguro				
Andar anormal				
Orina				
Color de la piel				

½ 1 6 12 24

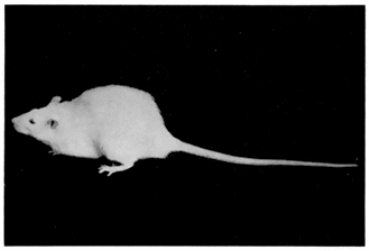


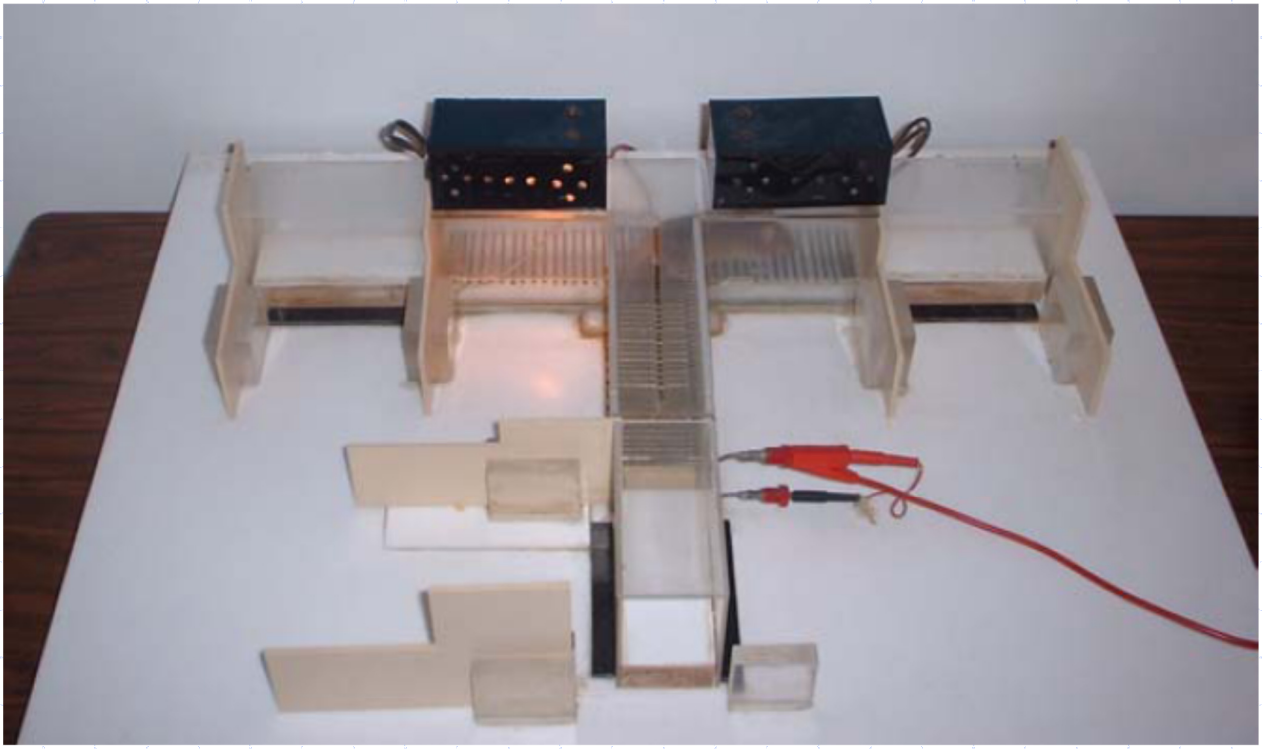
Fig. 1.—Normal rat R/1/11 weight 360 g

Fig. 2.—R/1/11 1 h after 10 mg/kg Morphine sulphate subcutaneously. Note curling up tail and open eyes

"Cola de Straub" tras administración de morfina

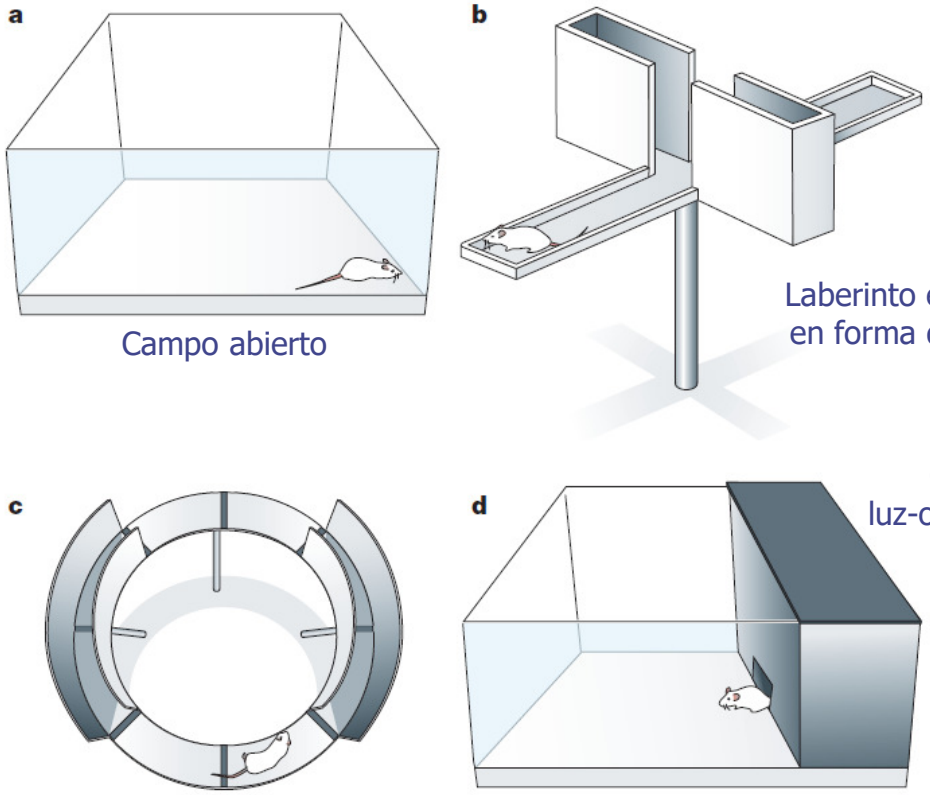
COLA DE STRAUB Y COMPORTAMIENTO ESTEREOTIPADO EN RATA PROVOCADOS POR APOMORFINA

Estudios tradicionales de comportamiento en animales de experimentación (ejemplos)



Laberinto en forma de T con posibilidad de elegir luz/oscuridad

Experimentos para probar respuestas de ansiedad en ratones

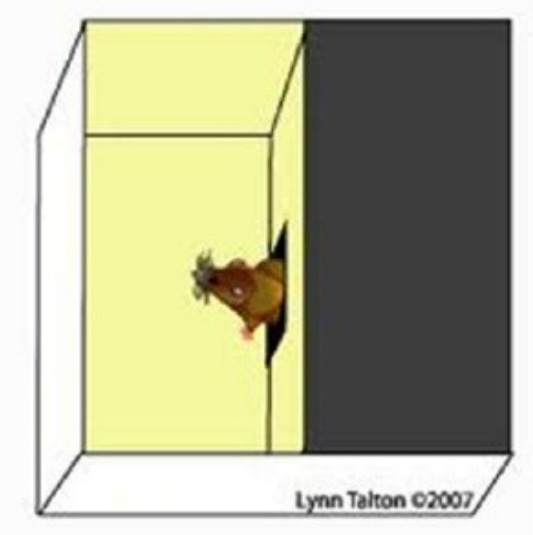


COMPARTIMENTO DE LUZ-OSCURIDAD (1/2): modelo para estudio de ansiolíticos

COMPARTIMENTO DE LUZ-OSCURIDAD (2/2): modelo para estudio de ansiolíticos

Light Dark Test

- Dependent Measure: % time in lit area
- Anxiolytic: increased % time in lit area
- Anxiogenic: decreased % time in lit area



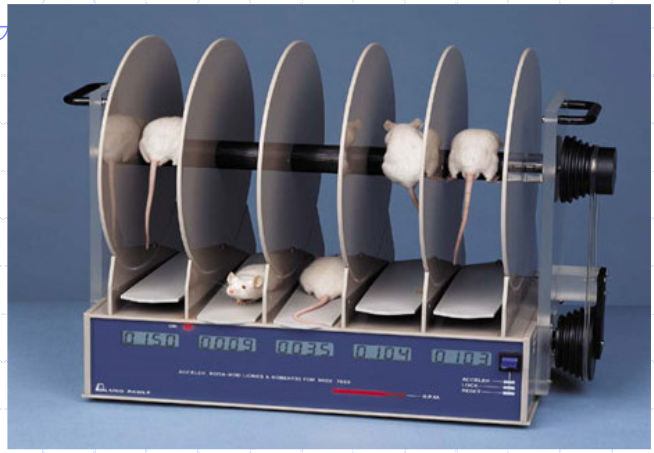
LABERINTO ELEVADO en forma de +: modelo para estudio de ansiolíticos

LABERINTO ELEVADO en forma de O: modelo para estudio de ansiolíticos

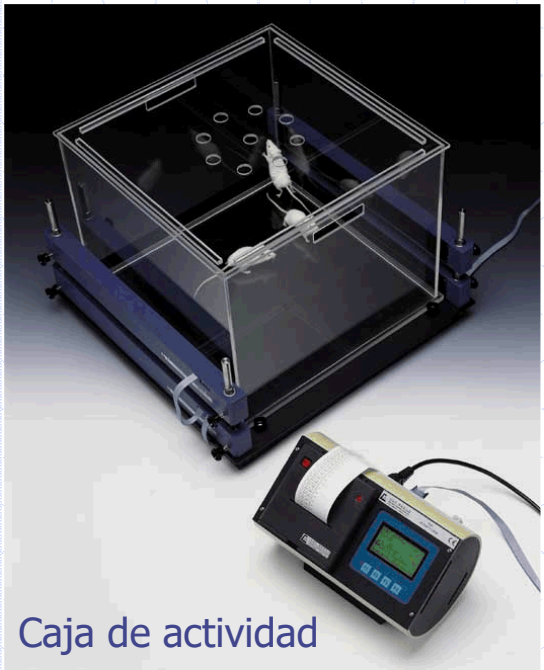
Nota: el nombre correcto del fármaco psicoestimulante es "Methylphenidate" (metilfenidato, Ritalin®)

https://www.youtube.com/watch?v=dCfVrClzqSc

Estudios tradicionales de comportamiento en animales de experimentación (ejemplos)



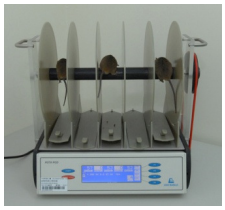
"Rotarod" o rueda de actividad



Caja de actividad

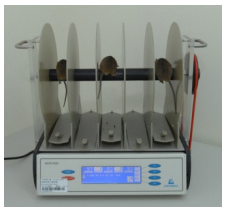
Plataforma perforada
(actividad exploratoria en entorno novedoso)

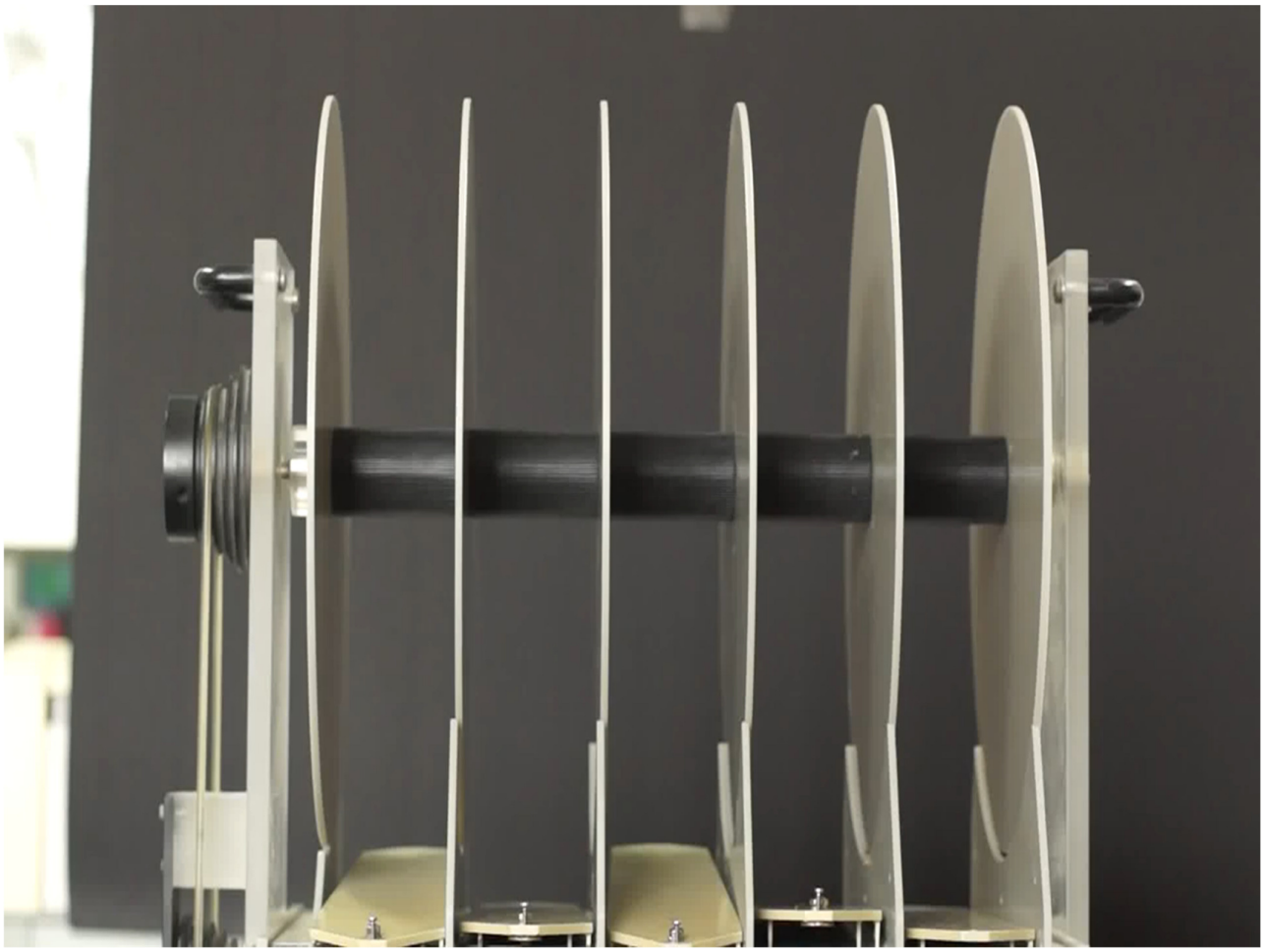
ROTAROD (1/3): ratón



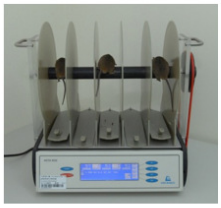
Evaluación de la coordinación motora y resistencia a la fatiga: afectación por fármacos, daños cerebrales o patologías.

ROTAROD (2/3): rata





ROTAROD (3/3)



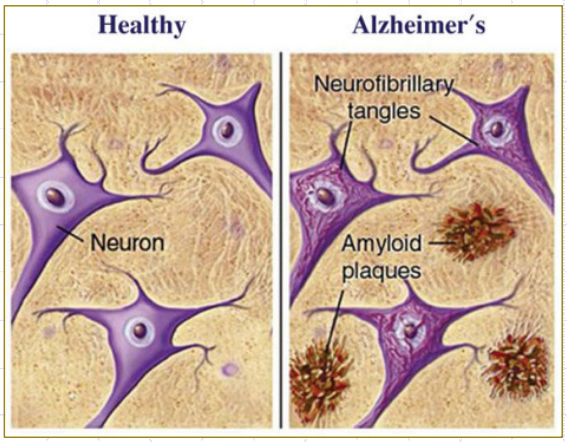
CURRENT PROTOCOLS in Pharmacology

Animal Models of Disease

First published: 27 December 2017
Last updated: 19 August 2022

https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19348290

This collection contains papers that provide methodological details on animal models for a variety of diseases.



- ✓ **Alzheimer's disease (AD)** is a devastating neurodegenerative disorder that causes progressive cognitive decline and is diagnosed postmortem by the presence of extracellular **amyloid-β (Aβ) plaques** and intraneuronal **tau neurofibrillary tangles** in the cerebral cortex.
- ✓ Currently there is no intervention that cures, prevents, or even slows disease progression.
- ✓ Its complex etiology and pathology pose significant challenges for animal model development, and there is no single model that faithfully recapitulates both the pathological aspects and behavioral phenotypes of AD.

- Nearly 200 transgenic rodent models of AD have been generated primarily based on mutations linked to Aβ protein misprocessing in the familial form of the disease.
- More recent models incorporate mutations in tau protein, as well as mutations associated with the sporadic form of the disease.
- While the translational utility of many of these models to assess the potential of novel therapeutics is in dispute, knowledge of the different models available and a detailed understanding of their features can aid in the selection of the optimal model to explore disease mechanisms or evaluate candidate medications.

RESEARCH MODELS

ALZFORUM
NETWORKING FOR A CURE

Alzheimer's Disease Commonly Used Mouse Models

PHENOTYPE SUMMARY

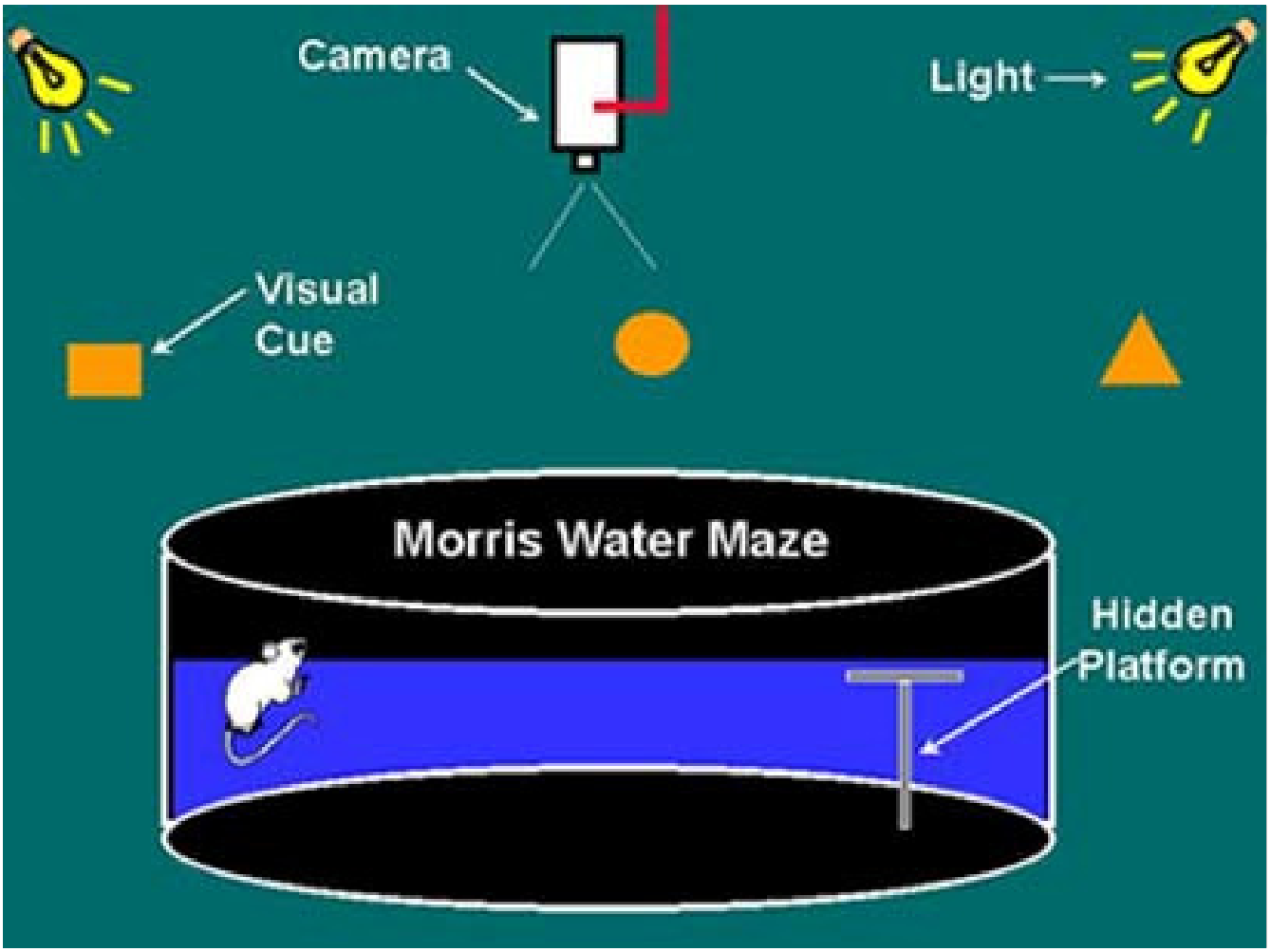
Selected Phenotypes of Commonly Used Mouse Models

INSTRUCTIONS

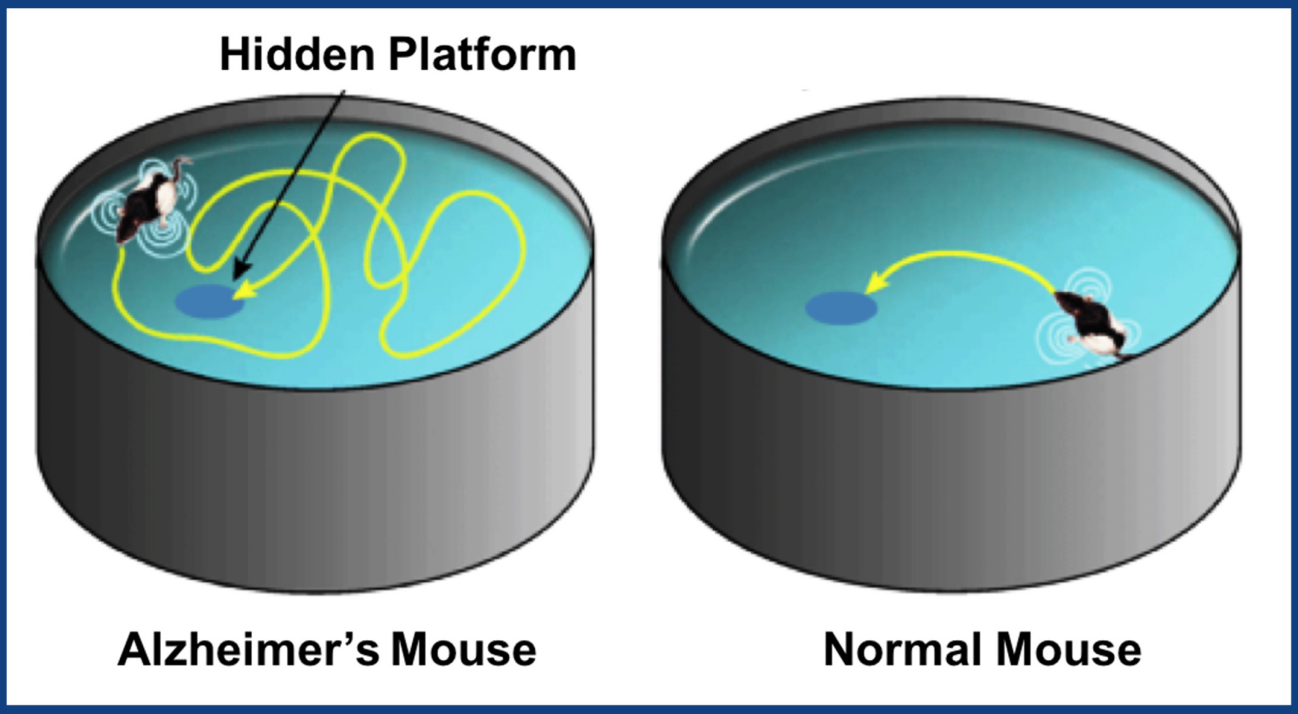
https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease/commonly-used

MEMORIA Y APRENDIZAJE (1/3): plataforma sumergida (rata)

Morris Water Maze

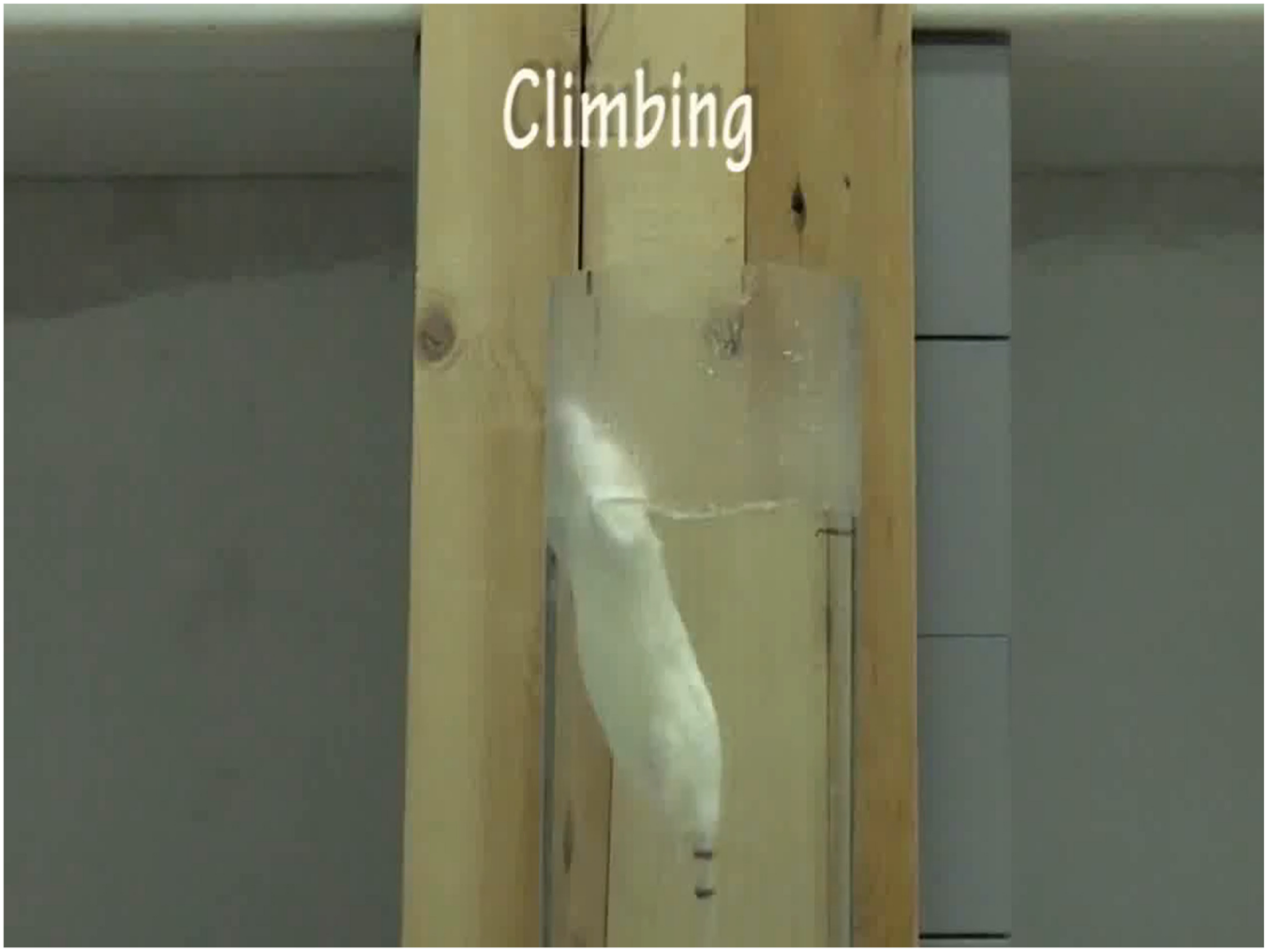


MEMORIA Y APRENDIZAJE (2/3): plataforma sumergida (ratón y modelo de Alzheimer)

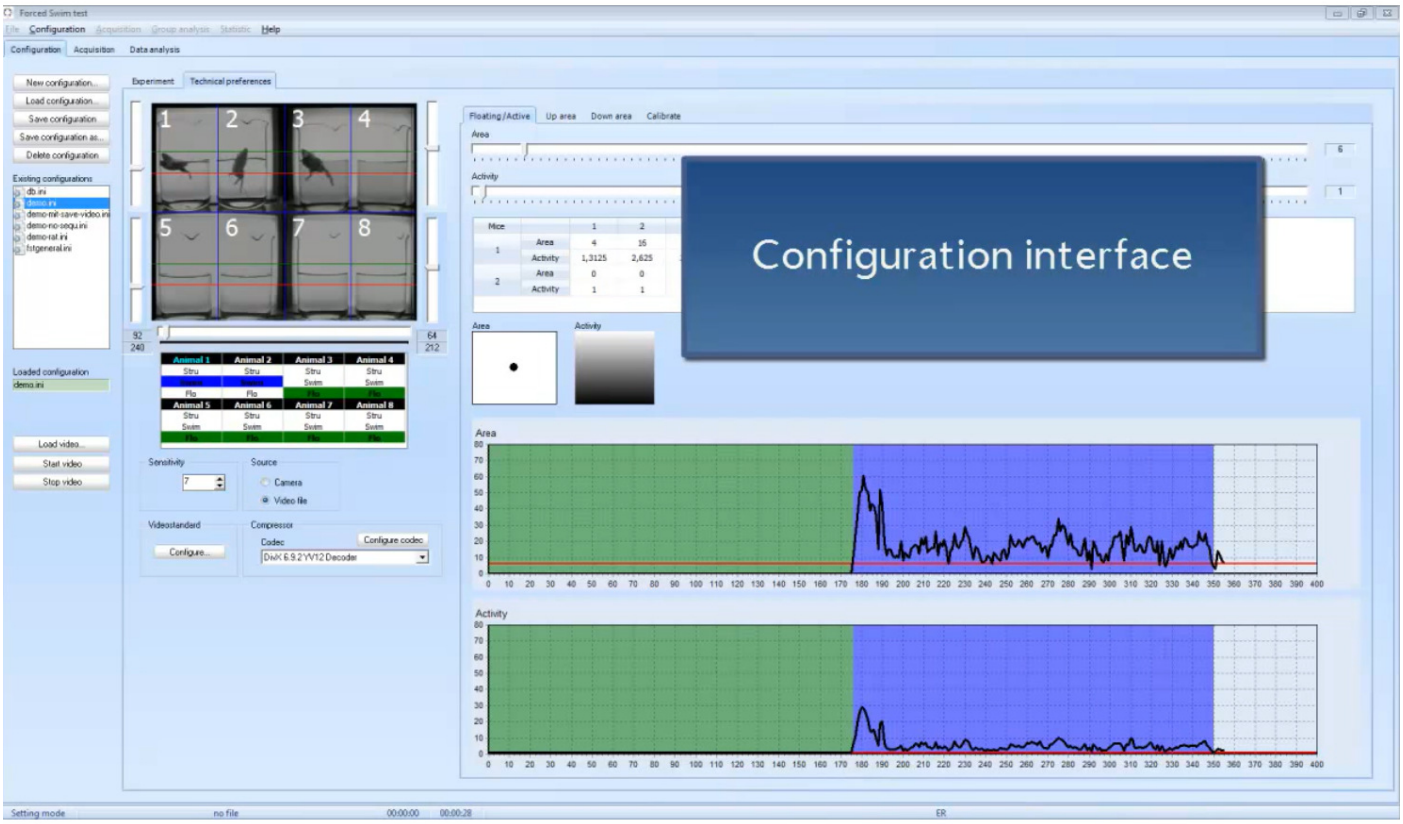


MEMORIA Y APRENDIZAJE (3/3)

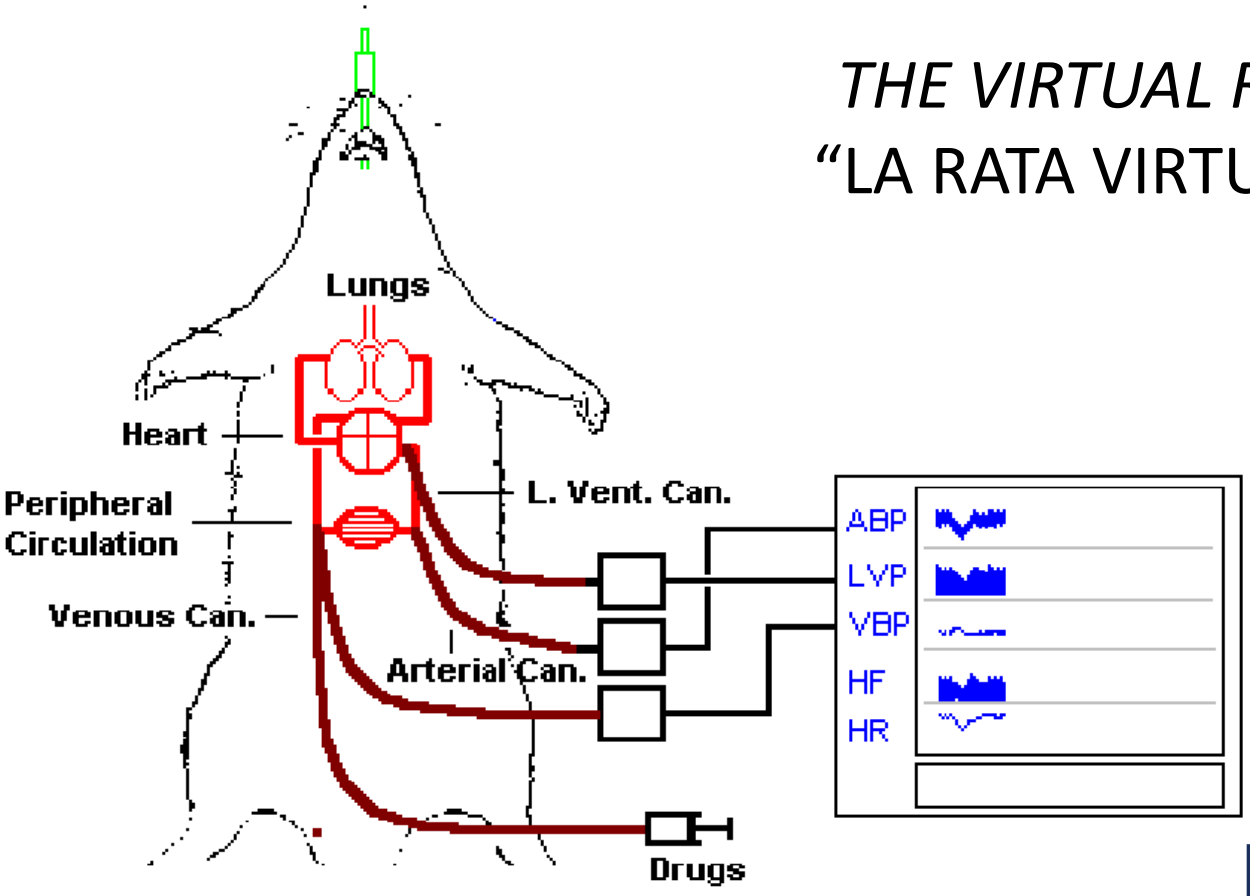
NATACIÓN FORZADA (1/2): modelo para estudio de antidepresivos



NATACIÓN FORZADA (2/2): modelo para estudio de antidepresivos



THE VIRTUAL RAT
"LA RATA VIRTUAL"



University of Strathclyde Glasgow

BCPT Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

An Observational Method Estimating Toxicity and Drug Actions in Mice applied to 68 Reference Drugs

Dag E. S. Campbell, Wolfgang Richter

Article first published online: 13 MAR 2009
DOI: 10.1111/j.1600-0773.1967.tb01443.x
1967 Nordic Pharmacological Society

Issue

Acta Pharmacologica et Toxicologica
Volume 25, Issue 3, pages 345–363, July 1967

ESTUDIOS TRADICIONALES DE TOXICIDAD EN ANIMALES

Safety Pharmacology ICH S7A Standard Battery
- CNS (rodent and non-rodent)
- Respiration (rodent and non-rodent)
- Cardiovascular telemetry
- Non-invasive DSI JET system assessments can be added to toxicology studies
- hERG assay via manual patch clamp

Non-GLP Cardiovascular Safety Screening Assays
- Rat telemetry (SHR, normotensive)
- Anesthetized guinea pig QT assay
- ECG and indirect BP in large animal
- hERG via automated patch clamp

METODO DE SCREENING EN RATONES (Campbell & Richter)

Fecha: Experimentado por:

Toxicidad aguda por vía Período de observación min. post administración

CUALQUIER SINTOMA OBSERVADO QUE NO SE DESVIA DE LOS CONTROLES = –

Compuesto: Temperatura ambiental ºC

Producido por: Presentado como: polvo ☐ tableta ☐ solución ☐

Vehículo:

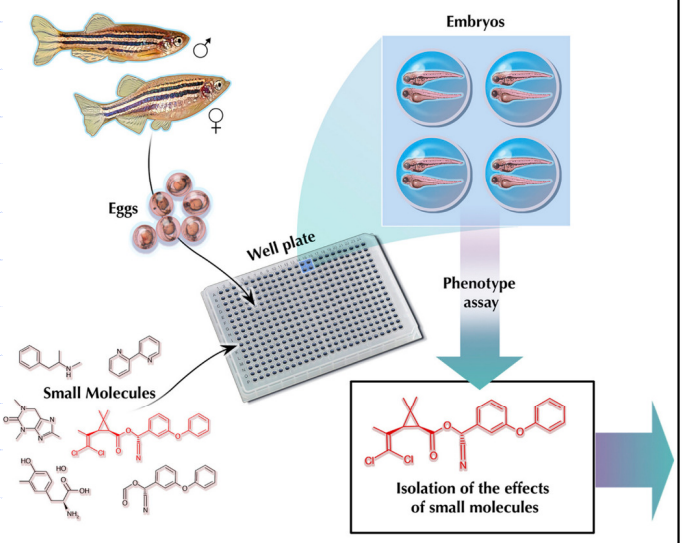
Fluido inyectado, líquido claro = x											DL_{50} y
Fluido inyectado, suspensión = x											resumen
Fluido inyectado, conc. mg/ml											de signos
Volumen inyectado, % del eq.peso corporal											expresados
Dosis en mg/kg											en orden
Esquema de dosis continua ( )mg/kg											de niveles
Nivel de dosis nº											de dosis
1 Muertes en 30 min. = 1										1	
1a Suma de muertes en horas = 1										1a	
2 Suma de muertes en 24 horas = 1										2	
7 Ptosis = 1, 2										7	
14 Salivación = 1										14	
15 Lacrimeo = 1										15	
16 Midriasis = 1, 2										16	
17 Piloerección = 1, 2										17	
31 Aumento de Temp. pata, 2 ºC = 1										31	
32 Disminución de Temp.rectal, 2 ºC = 1										32	
33 Aumento de Temp. rectal, 2 ºC = 1										33	
6 Abolición del reflejo de enderezamiento 30 seg. = 1										6	
10 Caida de la cabeza = 1										10	
12 No muerde la pinza del rabo = 1										12	
13 Rabo constantemente erecto = 1										13	
4 Disminución de actv. locomotora = 1, 2										4	
3 Aumento de actv. locomotora = 1, 2										3	
9 Ampliación base de sustentación = 1										9	
5 Marcha inestable = 1										5	
Otros signos, si aparecen: 20 Convulsiones = 1										20	
22 Contorsiones = 1										22	
23 Saltos repetidos = 1										23	
24 Temblor = 1										24	
25 Marcha erecta = 1										26	
29 Miosis = 1										29	

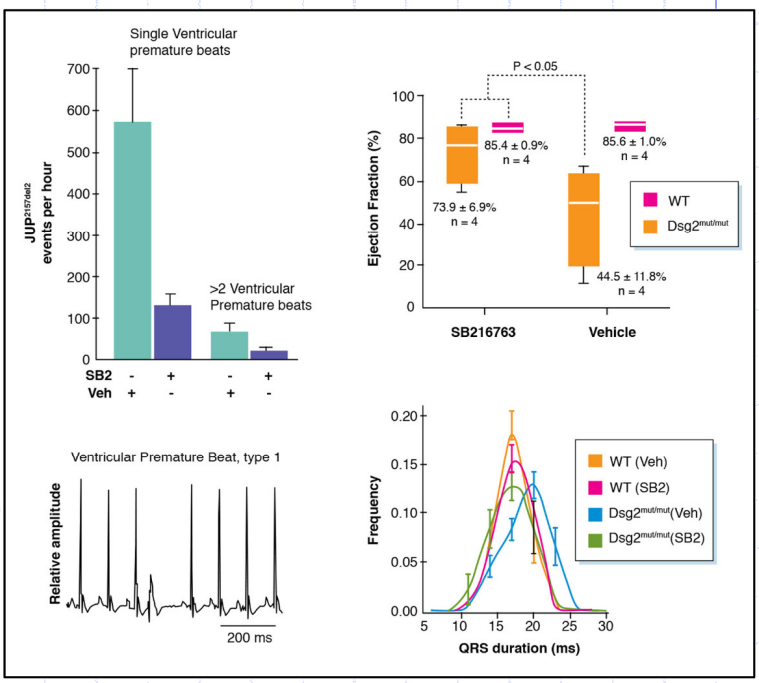
Métodos alternativos para los estudios ADME-Tox

- Un solo ensayo no puede sustituir la complejidad del sistema experimental "in vivo"
  - se sigue la estrategia de intentar validar métodos que puedan sustituir algunos aspectos o etapas de los estudios principales en el animal.
  - toda la aproximación "in vitro" a la predicción de la toxicidad debe de considerar una **batería de ensayos** diferentes tendentes a cubrir el mayor número de respuestas posibles y permitir la confirmación de los resultados.

- La incorporación de otros modelos animales alternativos a los mencionados, tales como **invertebrados** o pequeños vertebrados (**pez cebra**) a la investigación preclínica temprana, refuerza la tendencia a posponer los ensayos "in vivo" de validez regulatoria con mamíferos a la fase clínica.
  - si bien estos últimos ensayos, hoy por hoy, no tienen validez regulatoria, se consideran una herramienta de cribado (*screening*) muy útil para discriminar productos con distintos niveles de seguridad, permitiendo descartar aquellos no seguros.

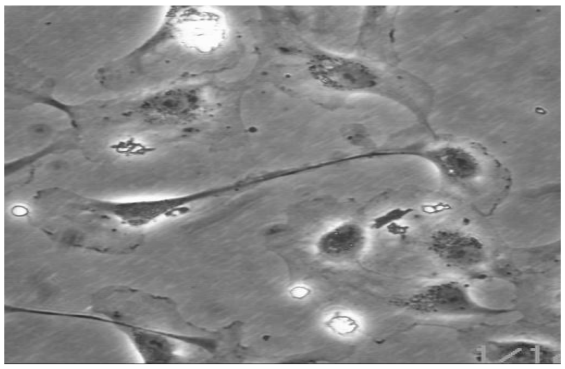
Cribados fenotípicos en el pez cebra: recapitulación de la biología humana fundamental



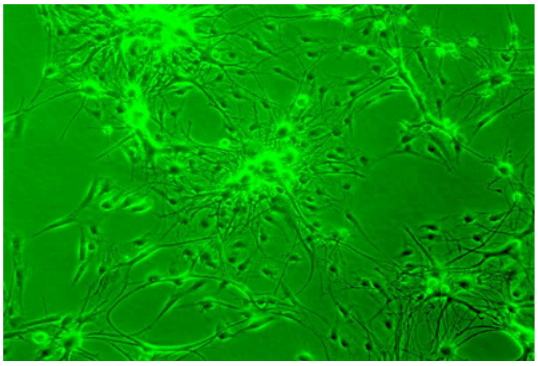


Kithcart A, MacRae CA.
Using Zebrafish for High-Throughput Screening of Novel Cardiovascular Drugs.
JACC Basic Transl Sci. 2(1):1-12 (**2017**)

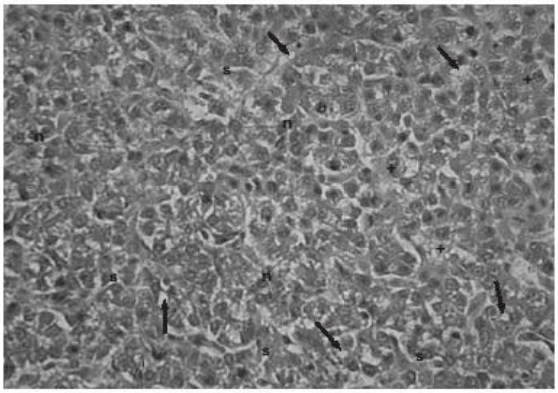
Cultivos celulares primarios



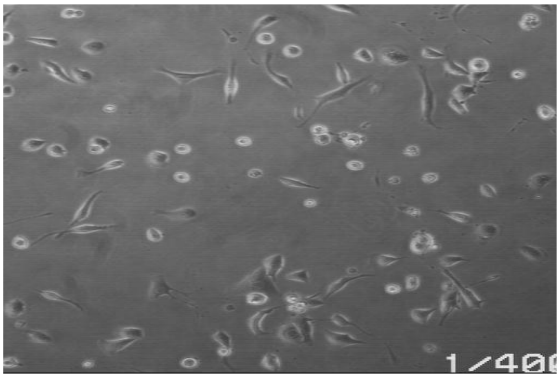
a) Cordón umbilical



b) Células nerviosas

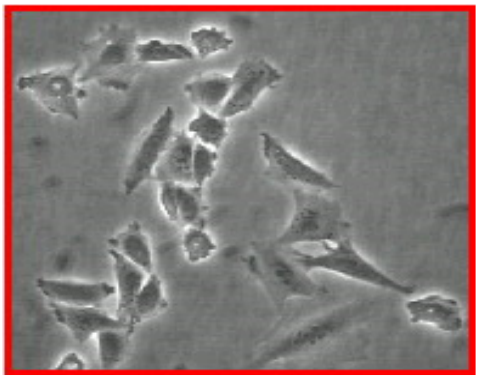


c) Hepatocitos

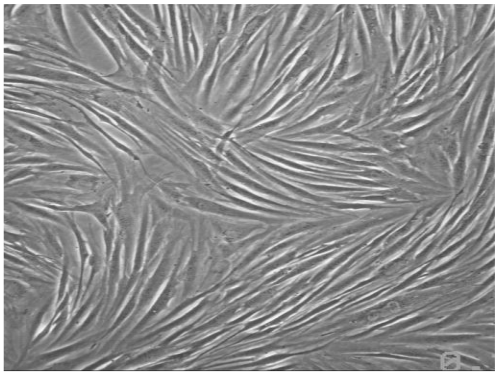


d) Queratinocitos

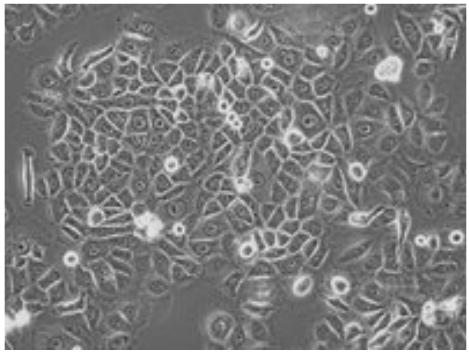
Cultivos celulares de líneas establecidas



CHO-K1 (ovario de hámster chino)



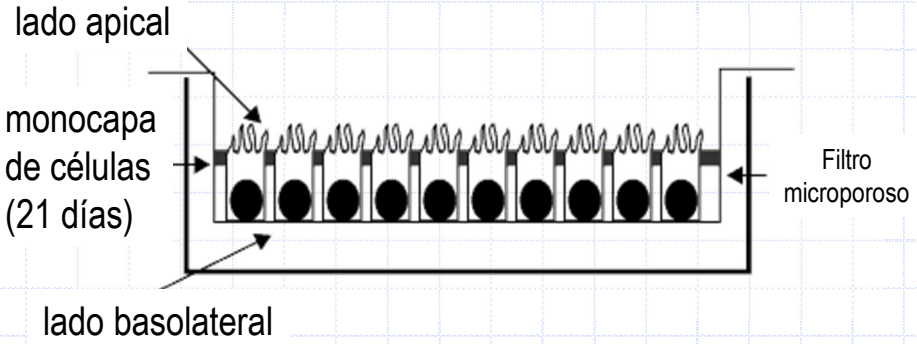
RTG-2 (trucha arco iris)



HeLa (cancerosas humanas)

Vero (riñón de mono)

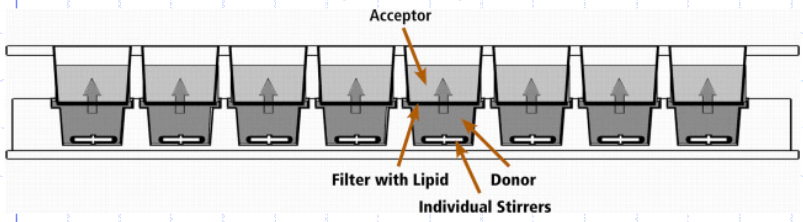
Ensayos de absorción: células Caco-2



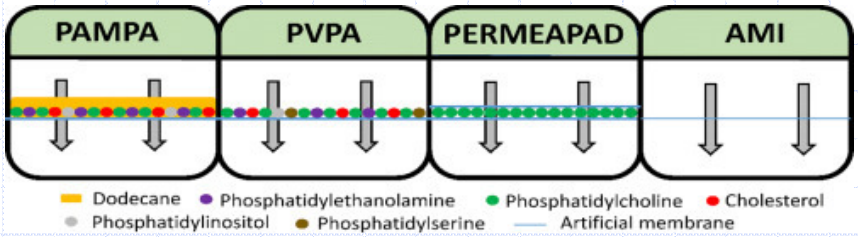
- Células humanas procedentes de cáncer de colon que, a diferencia de las células normales del epitelio gastrointestinal humano, dan lugar a monocapas celulares y presentan características morfológicas y bioquímicas similares a las de los enterocitos diferenciados, y algunas diferencias puntuales.
- Constituyen un buen modelo, especialmente para fármacos y sustancias xenobióticas susceptibles de absorberse únicamente por difusión pasiva.
- Existe una excelente correlación entre los coeficientes de permeabilidad en células Caco-2 y la biodisponibilidad oral en humanos de este tipo de fármacos.
- Los resultados obtenidos con Caco-2 se utilizan para la clasificación biofarmacéutica de principios activos.

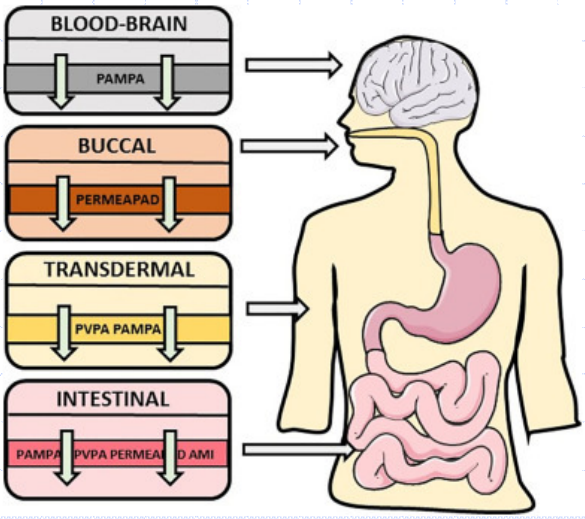
Sistemas de permeación libres de células para predecir el paso de fármacos a través de membranas

Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

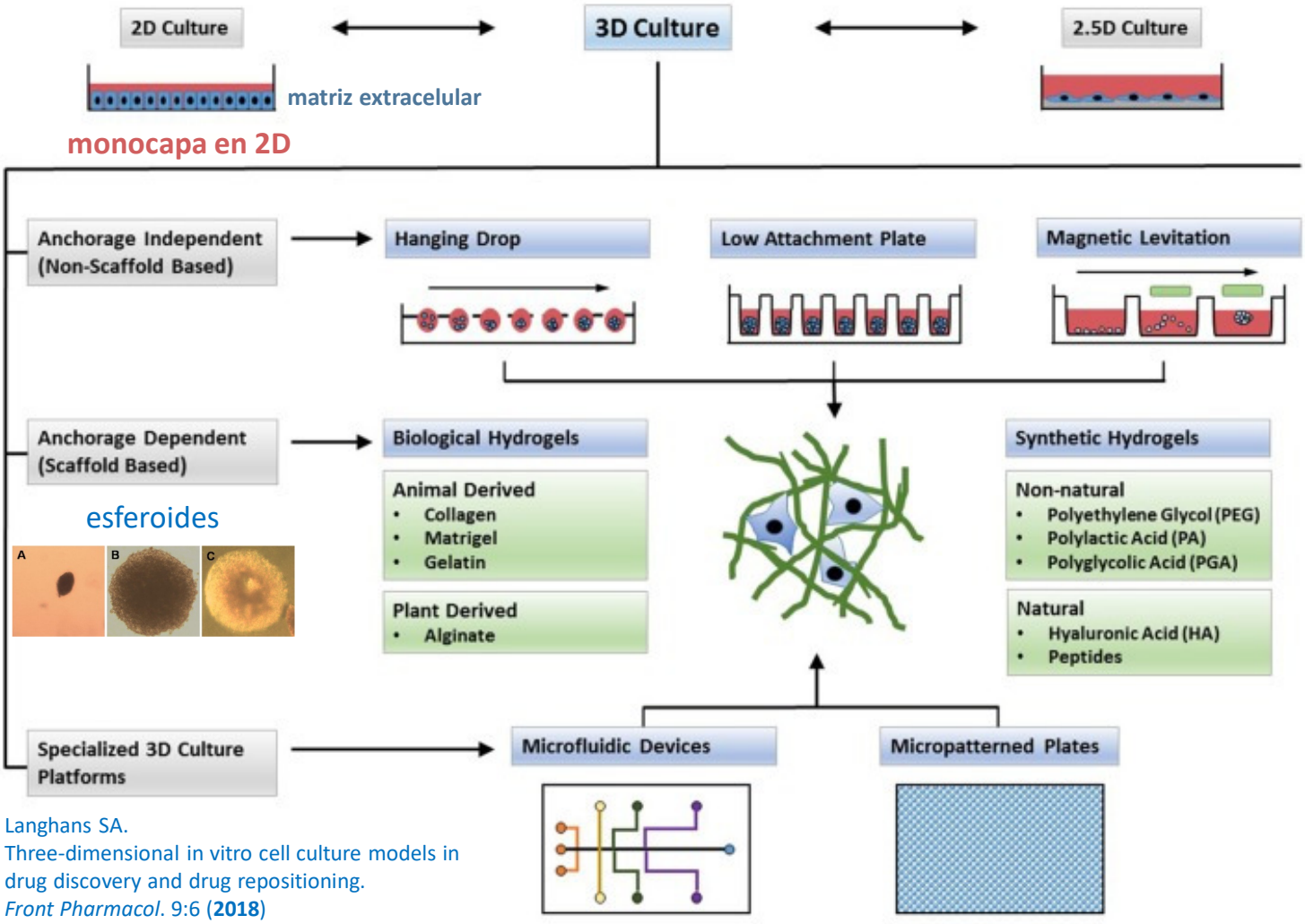


https://pion-inc.com/Contract_Research/Permeability





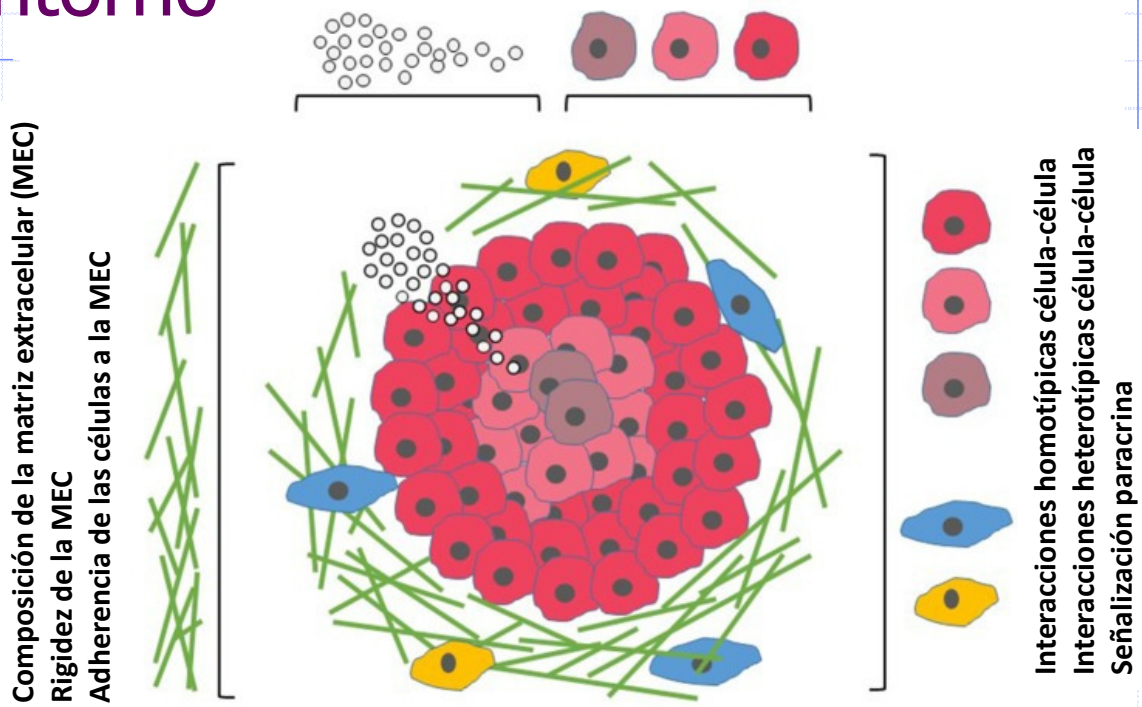
Berben P, Bauer-Brandl A, Brandl M, Faller B, Flaten GE, Jacobsen AC, Brouwers J, Augustijns P. Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. *Eur J Pharm Sci.* 119:219-233 (**2018**)



Langhans SA.
Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning.
Front Pharmacol. 9:6 (**2018**)

Células y su microentorno

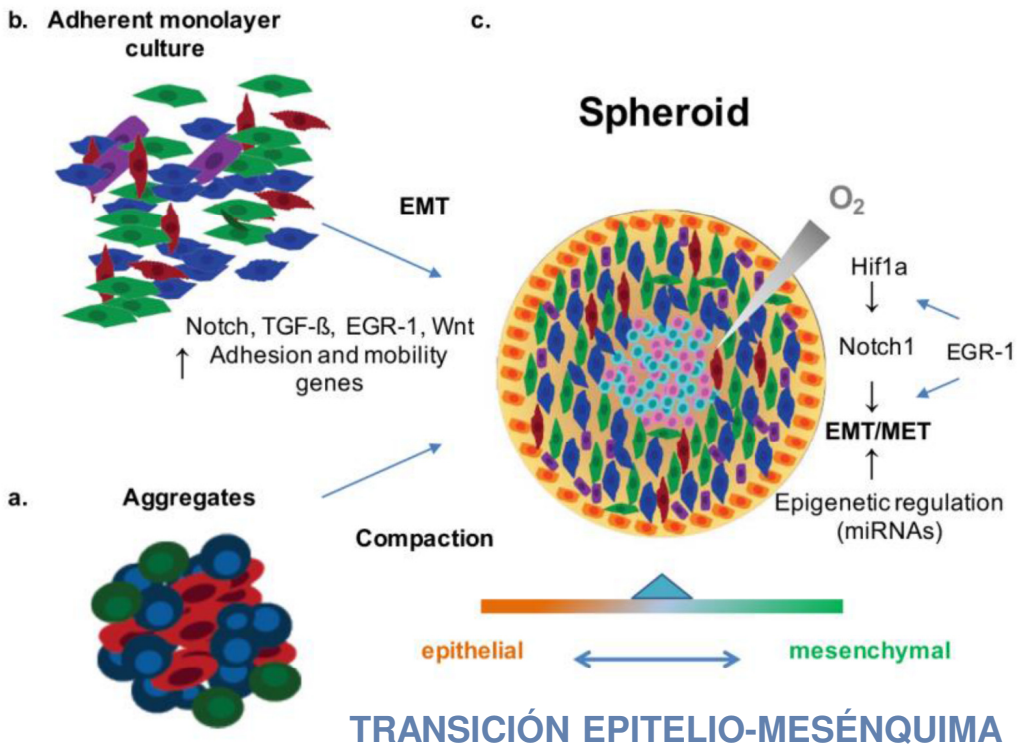
Gradiente de oxígeno
Gradientes de nutrientes
Gradientes factores solubles
Gradiente de proliferación



FENOTIPO CELULAR
RESPUESTA A FÁRMACOS

Langhans SA.
Three-Dimensional *in vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning.
Front Pharmacol. 9:6 (**2018**)

Esferoides como modelos *in vitro* de tumores



d. Normal tissue Spheroids

- Progenitors niche model;
- Enhanced diagnostic and therapeutic potential:
- ✓ paracrine secretion: angiogenic, pro-survival and anti-inflammatory factors
- ✓ broader differentiation
- ✓ resistant to senescence and apoptosis
- ✓ better in vivo engraftment,

e. Cancer Spheroids

- CSCs niche model;
- Ideal system for drug screenings:
- ✓ spontaneous spheroid formation indicative of metastatic properties of the tumor
- ✓ Model for:
- ischemia induced EMT and anoikis-resistance
- evasion from the autocrine and immune-mediated suppressive cross-talk
- inflammatory microenvironment promoting the EMT-linked cells invasion

E. Forte *et al.*
EMT/MET at the Crossroad of Stemness, Regeneration and Oncogenesis: The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids.
Cancers (Basel) 9:8 (**2017**)

Comparison of human organoids with other model systems

	2D cell culture	*C.elegans*	*D. melanogaster*	*D. rerio*	*M. musculus*	PDX	Human organoids
Ease of establishing system	✓/✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ease of maintenance	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Recapitulation of developmental biology	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✓
Duration of experiments	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Genetic manipulation	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓
Genome-wide screening	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓
Physiological complexity	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Relative cost	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Recapitulation of human physiology	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

✓ Best ✓ Good ✓ Partly suitable ✗ Not suitable

PDX = *patient-derived xenografts*

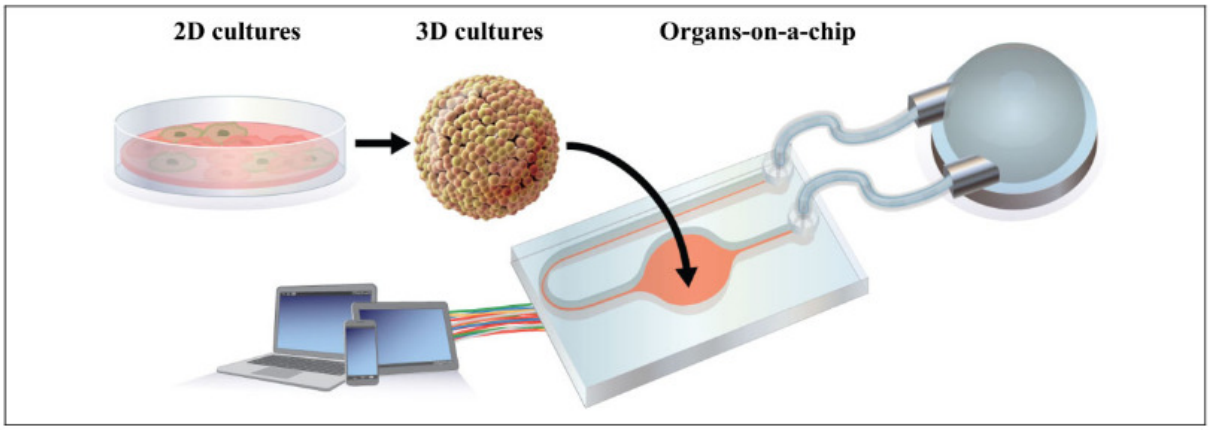
https://www.nature.com/articles/s41580-020-0259-3

Kim, J., Koo, B. & Knoblich, J.A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 571–584 (**2020**)

Órganos en un chip (*OoCs*): Un nuevo paradigma para la evaluación toxicológica y el desarrollo preclínico de fármacos

Lo siguiente: *Human-on-a-chip*

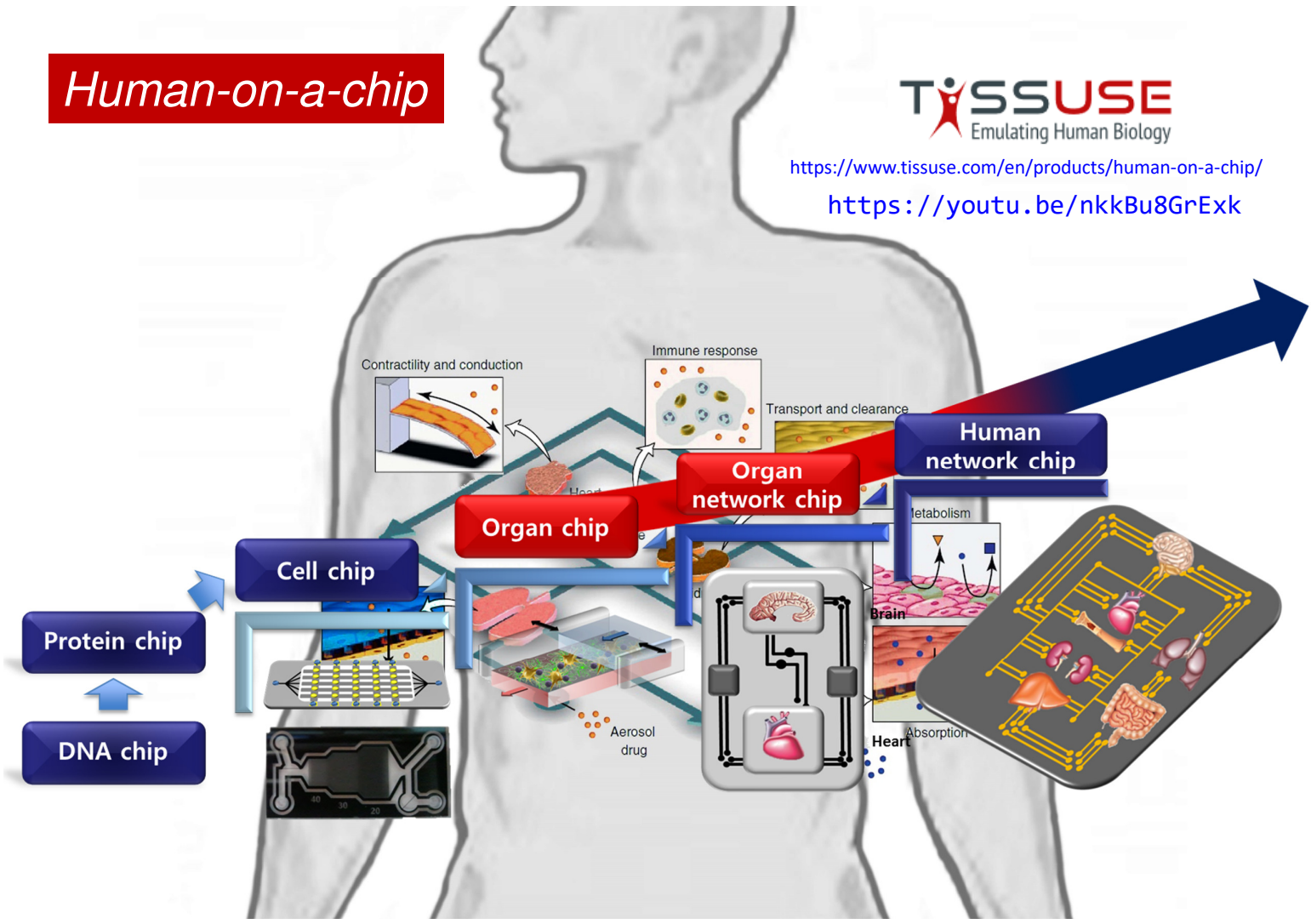
Evolución de los modelos *in vitro* desde los cultivos monocapa simples a los *OoCs*.



- El desarrollo de nuevos materiales y matrices ha permitido el crecimiento de modelos organotípicos tridimensionales con mejores características fisiológicas que los cultivos en monocapa.
- Los dispositivos de microingeniería, que incorporan tecnologías de fluidos y sensores, han permitido después la transferencia de estos tejidos tridimensionales a un entorno dinámico, creando órganos en un chip que se asemejan más a los órganos humanos *in vivo*.

Human-on-a-chip

TISSUSE
Emulating Human Biology

https://www.tissuse.com/en/products/human-on-a-chip/

https://youtu.be/nkkBu8GrExk