



PRÁCTICAS DE FARMACOLOGÍA GENERAL

GUÍA DE EJERCICIOS

3º CURSO

Grado de Farmacia y
Doble Grado de Farmacia - Nutrición Humana
y Dietética

*Departamento de Farmacología, Farmacognosia y
Botánica, Facultad de Farmacia*



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

Autores: *Luis García-García, Francisca Gómez Oliver, Elena González Burgos, Luis Miguel Bedoya del Olmo, Alba Garcimartín Álvarez, María Soledad Fernández Alfonso, Aránzazu Bocanegra de Juana, Ana García Aguilar, Sagrario Martín Aragón, Paloma Bermejo Bescós.*

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LAS PRÁCTICAS

- Las prácticas se realizarán de manera **presencial**.
- La asistencia a las prácticas es **OBLIGATORIA**.
- La duración de las prácticas es de **2 semanas**.
- **NO se pueden realizar cambios de grupo** a menos que esté plenamente justificado.
- La evaluación de las prácticas se realizará mediante un **EXAMEN** que tendrá lugar el último día de las prácticas.
- Para **APROBAR**, es necesario obtener una **calificación igual o superior a 5**.
- En caso de suspender el examen, el/la alumno/a tendrá la posibilidad de acceder a un examen de **RECUPERACIÓN**.
- La nota obtenida en las prácticas constituye el 15% de la nota final de la asignatura.
- **IMPORTANTE:** *Es imprescindible **aprobar las prácticas** para poder **aprobar la asignatura**.*



PRÁCTICA 1

ESTUDIO DE LA UNIÓN FÁRMACO-RECEPTOR *Ensayos de "binding"*

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISICIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

- Conocer y comprender los conceptos de afinidad, especificidad y selectividad de la unión fármaco-receptor, y los parámetros que los definen.
- Conocer la mecánica básica de los estudios de fijación de radioligandos (*"binding"*).
- Diferenciar los diferentes tipos de estudios de radioligando, los parámetros que de ellos se obtienen, la información que proveen y su utilidad.
- Saber representar gráficamente los datos obtenidos de los diferentes tipos de experimentos de radioligando.
- Calcular a partir de ellos los parámetros indicativos de afinidad y densidad receptorial (K_d , pK_d , B_{max} , CI_{50} , K_i y pK_i).
- Conocer la utilidad y relevancia de estos parámetros y cómo pueden variar en función de las condiciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas.
- *De manera transversal aprender a utilizar el programa Excel como hoja de cálculo y herramienta de representaciones gráficas.*

EJERCICIOS

En el Campus Virtual se adjunta la hoja de cálculos "Excel" con los datos de los ejercicios de esta práctica (HOJA DE CÁLCULO PRÁCTICA 1)

EJERCICIO 1

ENUNCIADO: Se quiere determinar la afinidad de la morfina por su receptor μ -opioide, así como la densidad de receptores en un homogenizado de cerebro de rata que no ha sido sometida a ningún tratamiento farmacológico. Para ello los investigadores utilizaron concentraciones crecientes de morfina tritiada (^3H -morfina), con una **actividad específica** de **43 dpm/fmol**. La **concentración de proteína** de la muestra utilizada fue de **0,5 mg/ml** y el **volumen de incubación** fue de **1 ml**. Los resultados obtenidos para la unión total y la unión inespecífica se muestran en la siguiente tabla:

APARTADOS PARA RESOLVER

- Calcule la unión específica para cada concentración de ^3H -morfina utilizada expresándola en unidades de fmol/mg.
- Haga la representación gráfica de las curvas correspondientes a la unión total, inespecífica y específica.
- A partir de los datos de la unión específica represente la recta de Rosenthal-Scatchard.
- Calcule los valores de K_D y B_{\max} a partir de la ecuación de la recta de Rosenthal-Scatchard y expréselos en sus unidades correspondientes. Compare estos valores con los extrapolados a partir de la curva de saturación.
- Expresé la afinidad también como pK_D .
- Los investigadores han realizado el mismo ensayo de saturación, pero esta vez utilizando el cerebro de ratas que han sido tratadas crónicamente con **metadona**. Busque el mecanismo de acción de la metadona y compare con el de la morfina. Se obtienen una B_{\max} de 95 fmol/mg y un valor de $K_D = 0,274$ nM. Compare estos valores con los obtenidos en cerebro de ratas no tratadas farmacológicamente con metadona. Explique qué observa, cómo se conoce este fenómeno farmacológico y razone qué consecuencias clínicas puede tener.
- En base a todo lo anterior busque información sobre la metadona y diga por qué se utiliza la metadona para el tratamiento de la deshabituación a opioides.

^3H -morfina (nM)	Unión total (dpm)	Unión inespecífica (dpm)
0,03	306	5
0,1	956	10
0,2	1310	20
0,35	1760	40
0,8	2316	80
3	3095	300
5	3420	420
10	3989	850
30	5118	1850

EJERCICIO 2

ENUNCIADO: La **adrenalina** (A) es una hormona secretada por las glándulas suprarrenales que es ligando endógeno de los receptores adrenérgicos. Para calcular la afinidad de la A por sus receptores, ésta se ha marcado con el isótopo radioactivo tritio (^3H). Se han llevado a cabo dos experimentos de fijación de radioligandos utilizando concentraciones crecientes de la adrenalina tritiada (^3H -A) en dos tejidos diferentes:

- a) En un homogeneizado de músculo cardíaco
- b) En un homogeneizado de músculo liso bronquial

Los resultados correspondientes a la “unión específica” obtenida en unidades de fmol/mg de proteína para cada concentración de ^3H -A ensayada se muestran en la siguiente tabla:

MÚSCULO CARDÍACO		MÚSCULO LISO BRONQUIAL	
^3H -A (μM)	UNIÓN ESPECÍFICA (fmol/mg)	^3H -A (μM)	UNIÓN ESPECÍFICA (fmol/mg)
0,1	0,7	0,1	1.1
1	5,4	1	6.0
10	15,5	10	11.2
100	20,7	100	12.3
1000	22,1	1000	12.5
2000	22,3	2000	12.8

1. Represente las curvas de saturación y haga la representación de las rectas de Rosenthal-Scatchard.
2. Calcule, a partir de la ecuación de la recta, los valores de K_D y B_{\max} para la ^3H -A en los dos experimentos expresando los resultados en sus unidades correspondientes.
3. Exprese la afinidad también como pK_D .
4. Compare los valores de K_D y B_{\max} obtenidos en los dos experimentos y razone qué información deduce de estos resultados en referencia a la *especificidad* y *selectividad biológica* de la adrenalina.
5. Compare los valores obtenidos con los indicados en la Web de la Unión Internacional de Farmacología IUPHAR (<http://www.guidetopharmacology.org/>)
6. ¿Qué tipo de receptores adrenérgicos se están detectando en estos estudios?
7. Revise en la ficha técnica las indicaciones terapéuticas de la adrenalina y su mecanismo de acción.
8. Calcule y compare la ocupación fraccional de receptores que obtendría en músculo cardíaco y en músculo liso bronquial si utilizase una concentración de ^3H -A de $25 \mu\text{M}$.
9. Revise la información que se presenta en la siguientes tabla (valores según la IUPHAR)

	Ki para β_1	Ki para β_2
Adrenalina	1 μM	2,2 μM
Noradrenalina	3,1 μM	0,01 mM
Carvedilol	110 nM	60 nM

- a. Ordene los ligandos de mayor a menor afinidad para cada uno de los receptores.
- (1) β_1 :>.....>.....
- (2) β_2 :>.....>.....
- b. ¿Qué conclusiones puede sacar en términos generales de *especificidad receptorial y selectividad biológica*?
10. Se realizó otro estudio de “binding” de saturación de la adrenalina en músculo bronquial de ratas, pero esta vez, los animales habían sido tratados crónicamente, durante 15 días, con **budesonida**. Se obtuvieron los siguientes resultados: $K_D = 1.1 \mu\text{M}$ y $B_{\text{max}} = 20 \text{ fmol/mg proteína}$.
- a. Compare estos valores con los obtenidos en cerebro de ratas no tratadas farmacológicamente. Explique qué observa, ¿cómo se conocen estos fenómenos farmacológicos? Razone qué consecuencias clínicas puede tener.
- b. ¿A qué grupo farmacológico pertenece la budesonida?

EJERCICIO 3

ENUNCIADO: La plitidepsina (Aplidin®, PharmaMar) es un depsipéptido cíclico aislado de la ascidia *Aplidium albicans*, que crece en bahías de las Islas Baleares. Tras su aislamiento y caracterización, comenzó a obtenerse por síntesis química. Los primeros experimentos realizados en cultivos celulares mostraron un potencial pro-apoptótico interesante. Su eficacia antitumoral fue reconocida por la Agencia Australiana del Medicamento como medicamento de primera elección para el tratamiento del mieloma múltiple. La autorización solicitada a la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para esta indicación fue rechazada aludiendo a motivos de seguridad.

En la siguiente tabla están recogidos los datos de un experimento realizado en el año 2015 (Suarez et al. 2015) en el que se analiza la actividad antitumoral de la plitidepsina en células humanas de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), y su unión a posibles dianas farmacológicas. Para ello, los investigadores marcaron la plitidepsina con ^{14}C y realizaron un ensayo de "binding" de saturación para estudiar las características de la unión del fármaco a moléculas presentes en dichas células. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

$[^{14}\text{C}]\text{APL}$ (μM)	UNIÓN ESPECÍFICA (fmol/mg prot)
0,007	2,45
0,012	3,82
0,024	6,23
0,042	8,57
0,063	10,41
0,141	13,84
0,175	17,04
0,308	22,86
0,560	40,62
1,05	62,56
2,52	77,45

En 2020, la plitidepsina saltó a las portadas de muchos informativos por su posible utilidad antiviral frente al SARS-Cov-2. En 2021, la prestigiosa revista científica "Science" publicó un artículo ([White et al., 2021](#)) mostrando los resultados de su actividad antiviral, inhibiendo el factor de elongación 1-alfa 1 (eEF1a1), diana farmacológica de este fármaco, mecanismo por el cual interfiere en la replicación del virus.

APARTADOS PARA RESOLVER

- Haga la representación gráfica de la curva de saturación y de la recta de Rosenthal-Scatchard.
- ¿Qué observa en la representación de Rosenthal-Scatchard? ¿Qué deduce de la misma?
- Calcule los valores de K_D y B_{max} correspondientes.
- Expresa la afinidad también como $\text{p}K_D$.
- Interprete los resultados obtenidos, y compárelos con los resultados publicados en el artículo original que encontrará en el campus virtual.

EJERCICIO 4

ENUNCIADO: Se quiere determinar el orden relativo de afinidad de una serie de compuestos (agonistas del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}) con potencial terapéutico como agentes neuroprotectores en infarto cerebral. Para ello, se lleva a cabo un ensayo de competición (desplazamiento o inhibición) utilizando como ligando de referencia el 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) marcado radioactivamente. El 8-OH DPAT es considerado un agonista prototipo del 5-HT_{1A}. La **concentración utilizada de ligando agonista prototipo es 1 nM y su K_D es de 4,1 nM**. Los resultados de los ensayos de competición correspondientes a cada compuesto de estudio se muestran en la siguiente tabla. **Nótese: en rojo, se muestra la unión del 8-OH-DPAT en ausencia de ligando competidor.**

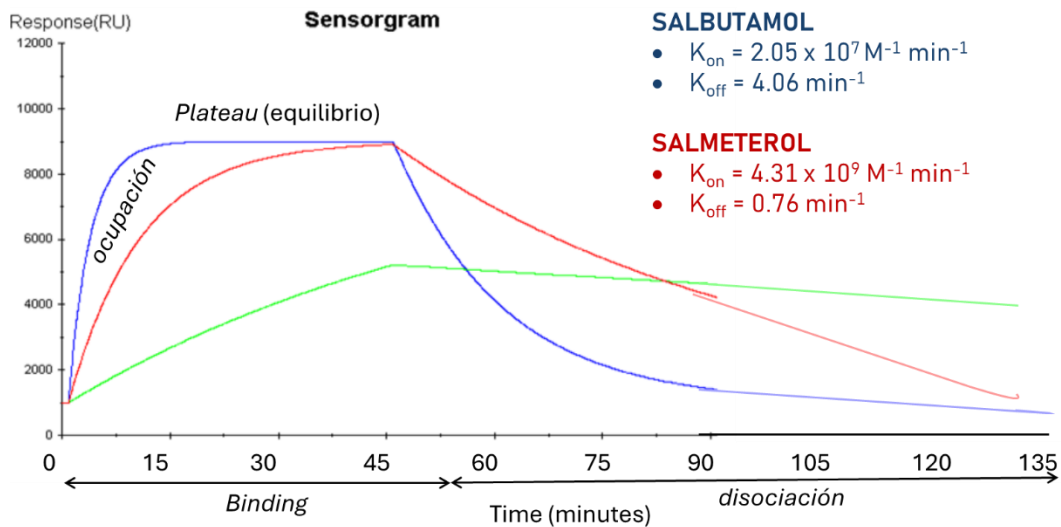
APARTADOS PARA RESOLVER

1. Calcule la ocupación fraccional de receptores 5-HT_{1A} por el 8-OH-DPAT en ausencia de compuestos competidores.
2. Represente las curvas de inhibición de cada compuesto de estudio.
3. Calcule la CI₅₀.
4. Calcule la K_i y la pK_i para cada uno de los compuestos de estudio, expresándolas en cada caso en sus unidades correspondientes.
 - a. ¿Qué nombre recibe la ecuación que ha utilizado para calcular la K_i?
5. Ordene los compuestos de estudio de mayor a menor afinidad.

	Concentración (M)	dpm
8-OH-DPAT	1,00E-09	82000
Compuesto A	1,00E-11	80360
	5,00E-11	77900
	1,50E-10	68880
	3,00E-10	47560
	6,40E-10	24600
	1,20E-09	6560
	5,00E-09	2460
	1,00E-08	1640
Compuesto B	5,00E-11	81180
	1,50E-10	79540
	4,00E-10	75440
	8,50E-10	63960
	1,80E-09	45100
	3,40E-09	18860
	1,00E-08	6560
	5,00E-07	2460
Compuesto C	4,00E-10	81180
	8,50E-10	78720
	1,30E-09	77080
	2,70E-09	67240
	5,20E-09	53300
	1,20E-08	22140
	1,00E-07	8200
	5,00E-07	4920
	5,00E-06	1640

EJERCICIO 5

ENUNCIADO: Se han calculado las características de la unión de dos fármacos “salbutamol” (azul) y “salmeterol” (rojo) por su receptor β 2-adrenérgico en músculo liso bronquial. Para ello se han realizado ensayos de binding **CINÉTICOS** utilizando la técnica SPR (*Surface plasmon resonance*: vea la *introducción teórica correspondiente a la práctica*). Para ello hemos utilizado una preparación de receptores y diferentes concentraciones de fármacos obteniendo los siguientes datos y sensorgramas:



APARTADOS PARA RESOLVER:

- ¿Cuál es la principal diferencia que existe entre los ensayos de saturación y de inhibición cuando los comparamos con los ensayos cinéticos?
- Calcule la K_D de los dos fármacos.
 - ¿Cuál tiene mayor afinidad?
 - Sabiendo que ambos fármacos son agonistas de los receptores β 2-adrenérgicos
 - ¿Cuál de ellos tardará más tiempo en actuar?
 - ¿Cuál de ellos tendrá una mayor duración de acción?
- Revise la ficha técnica de estos dos fármacos y razone, en términos generales, si las consecuencias clínicas que se derivan de estas diferencias cinéticas tienen sentido.



PRÁCTICA 2

ESTUDIO DE LA ACCIÓN Y EFECTO

Ensayos biofuncionales

Baño de órganos

Curvas Dosis- Respuesta (CDRs)

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISICIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

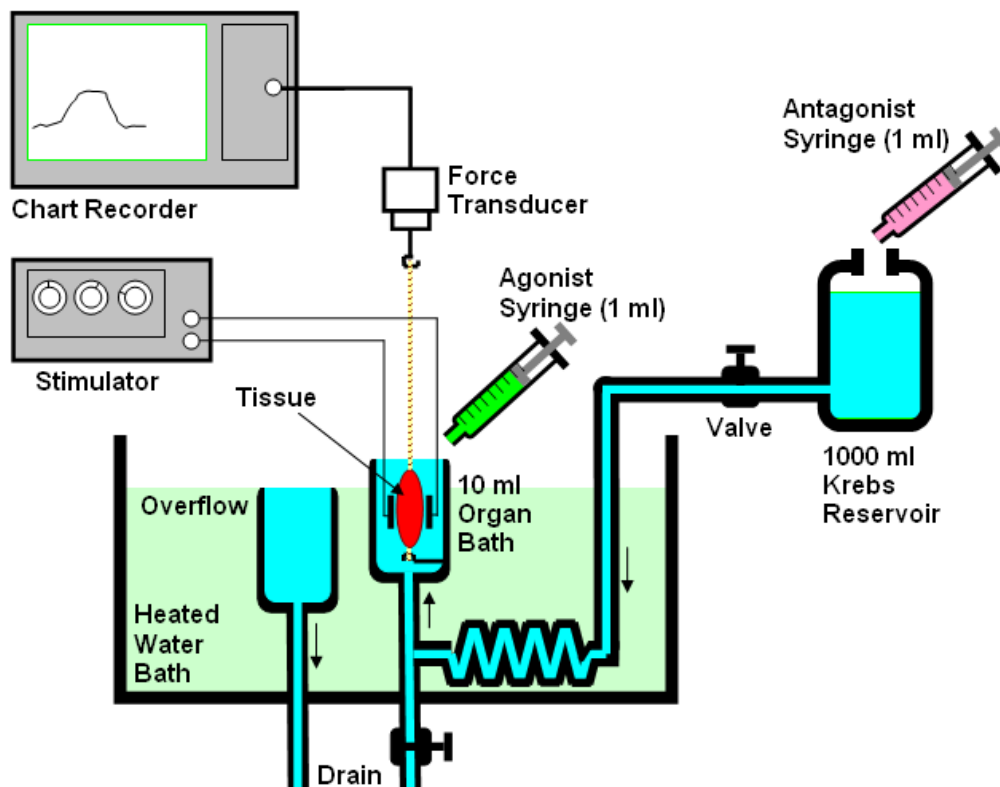
- Comprender los conceptos de agonista (puro, parcial, inverso) y antagonista (competitivo y no competitivo), así como los conceptos de potencia y eficacia.
- Conocer la técnica de baño de órgano aislado y cómo se obtienen de ellos las curvas dosis respuesta (CDRs).
- Representar las CDRs y deducir de ellas el mecanismo de acción de un fármaco.
- Obtener, a partir de las CDRs, los parámetros de potencia (CE_{50}) y eficacia (E_{max}) de un agonista (expresados en las unidades apropiadas).
- Representar la recta de Schild y calcular los parámetros indicativos de la potencia de un antagonista competitivo (K_b , pK_b) y expresarlos en las unidades apropiadas.
- Familiarizarse con el sistema colinérgico y adrenérgico y su papel en la regulación de la contracción del músculo liso.
- Reconocer la importancia clínica y la utilidad práctica de estos conocimientos
- *De manera transversal aprender a utilizar el programa Excel como hoja de cálculo y herramienta de representaciones gráficas.*

INTRODUCCIÓN AL USO DEL PROGRAMA DE SIMULACIÓN "VIRTUAL ORGAN BATH"

Programa de simulación farmacológica Virtual organ bath (University of Stathclide)

http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/showPage.php?page=software_sims

Consiste en la simulación de un baño de órganos en el que se puede realizar un registro gráfico de la respuesta (en este caso contracción) de diversas preparaciones en respuesta a diferentes agonistas y cómo el efecto se ve afectado por la adición a la preparación de agentes antagonistas.



El programa dispone de 4 preparaciones (y por tanto 4 tipos de tejidos):

1. **Íleon de cobayo:** El músculo liso intestinal es capaz de contraerse en respuesta directa a la acción de diferentes agonistas. Además, presenta terminaciones nerviosas que se pueden estimular eléctricamente.
 - a. Agonistas: histamina, carbacol, morfina y loperamida.
 - b. Antagonistas: mepiramina, atropina y naloxona.
2. **Anillo de arteria de conejo.**
 - a. Puede contraerse con KCl o mediante la adición de agonistas como la noradrenalina (NA).
 - b. Antagonistas: prazosina, propranolol, U73122 (inhibidor de PLC).
3. **Yeyuno de conejo.** Presenta contracciones espontáneas que:
 - a. Se pueden inhibir por la administración de agonistas adrenérgicos o por estimulación del nervio simpático.
 - b. Agonistas: fenilefrina, isoprenalina.

- c. Antagonistas: prazosina, propranolol.
4. **Músculo biventer cervicis de pollo**, que es un músculo esquelético del cuello del pollo. Se prepara junto con el nervio.

CÓMO EMPEZAR:

1. Seleccionar el tipo de tejido de la lista desplegable "Tissue Type list".
2. **Clicar** en el botón "New Experiment".
3. **Clicar** en "Record button" para que empiece a registrar.
4. Seleccionar el fármaco de la lista de Agonistas y Antagonistas.
5. Añadir el compuesto al baño de órganos o al reservorio.

ADICCIÓN DE AGONISTAS:

1. Seleccionar el agonista de la lista.
2. Seleccionar la concentración de la solución desde la lista "Stock Soln"
 - a. **Cálculo de las concentraciones:** Hay que tener en cuenta que el volumen de la copa del baño de órganos es de 10 ml y el del reservorio es de 1000 ml. Así, si se añade 1 ml de histamina a una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ a la copa, la concentración efectiva es de $1 \times 10^{-7} \text{M}$. Es decir, aplicamos la conocida fórmula de $V \times C = V' \times C'$. De todas formas, el programa indica la concentración final en la base del registro en el momento de añadirlo "Add to Organ Bath". Compruebe que está trabajando a las concentraciones que le indican en los ejercicios.
3. Introducir el volumen (entre 0 y 1 ml). Para facilitar los cálculos se recomienda añadir siempre 1ml.
4. Añadir al baño de órganos haciendo click en el botón correspondiente.
5. Esperar que se produzca y estabilice la respuesta y registrar el valor obtenido.
 - a. Para obtener el efecto obtenido pulse el ratón en la línea vertical de color verde que atraviesa el registro y abajo aparece el valor de la contracción. Puede registrar los valores a medida que los va obteniendo. También puede pulsar STOP y se puede desplazar a lo largo del registro. Una vez anotado el valor pulse de nuevo *Record* para seguir registrando.
6. A continuación, se retira el fármaco de la preparación. Para lavar la copa (eliminar el agonista para añadir la siguiente concentración de este) clicar en el botón "Flush Reservoir to Bath".
7. Hacer la curva concentración-respuesta.

ADICIÓN DE ANTAGONISTAS:

Dado que los antagonistas no tienen actividad intrínseca, su efecto solamente se puede evaluar de manera indirecta, en base a cómo modifican la acción y efecto de un agonista. Por ello, en estos estudios se evalúa como la presencia

de un antagonista modifica la CDR de un agonista. Para ello se realizan las CDR de un agonista en presencia de una concentración fija de antagonista.

A nivel práctico, lo más eficiente es **añadir el antagonista al reservorio (volumen de 1 litro)**. Así, cada vez que se lava para ensayar una nueva concentración de agonista, con cada lavado se repone automáticamente el antagonista, evitando así tener que añadirlo al baño manualmente. Se puede añadir al baño, pero en este caso, cada vez que se lave, se elimina el antagonista y hay que añadirlo de nuevo para ensayar la siguiente concentración, lo que además de llevar más tiempo puede dar lugar a más errores. Lo único es que cuando se lave habrá que volver añadir antagonista, proceso que se tendrá que repetir tantas veces como concentraciones de agonista se quieren evaluar. Por eso es más cómodo añadir el antagonista al reservorio y no al baño.

EJERCICIOS

En el Campus Virtual se adjunta la hoja de cálculos "Excel" con los datos de los ejercicios de esta práctica (HOJA DE CÁLCULO PRÁCTICA 2)

EJERCICIO 1. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS MUSCARÍNICOS – ESTUDIO DE LA ACCIÓN

CASO 1.1. EFECTO DE LOS AGONISTAS MUSCARÍNICOS EN *ILEON DE COBAYO*, COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA *ACETILCOLINA*, Y DE LOS AGONISTAS COLINÉRGICOS *PILOCARPINA* Y *CARBACOL*

ILEON DE COBAYO: *El íleon aislado de cobayo es una preparación muy útil y económica para la cuantificación del efecto farmacológico. A diferencia del intestino de otras especies, muestra poca actividad espontánea y tiene una viabilidad en el baño superior a 12 horas. Además del sistema nervioso entérico, el íleon posee ganglios parasimpáticos, neuronas post-ganglionares, receptores colinérgicos, nicotínicos y muscarínicos, y otros tipos de receptores. En este órgano, la acetilcolina (ACh) produce contracción inmediata e intensa al unirse directamente al receptor muscarínico. También actúa a nivel de receptores nicotínicos ganglionares; esta acción promueve la liberación de acetilcolina de la neurona postganglionar. Por lo anterior, la contracción producida por la ACh representa una acción de tipo muscarínico y otra de tipo nicotínico, siendo la predominante la primera, al mostrar la ACh una mayor afinidad por los receptores muscarínicos.*

1. Haga la CDR de la ACETILCOLINA (ACh) utilizando concentraciones entre 10^{-9} - 10^{-4} M.
 - a. Para cada concentración anote el valor obtenido en la tabla adjunta.
 - b. Haga la representación gráfica.
 - c. Calcule la potencia y la eficacia de la ACh.

2. Haga una CDR de la PILOCARPINA (PILO) utilizando concentraciones entre 10^{-9} y 10^{-4} M.
 - a. Para cada concentración anote el valor obtenido en la tabla adjunta.
 - b. Haga la representación gráfica.
 - c. Calcule la potencia y la eficacia de la PILO.
3. Haga una CDR del CARBACOL (CAR) utilizando concentraciones entre 10^{-9} y 10^{-4} M.
 - a. Para cada concentración anote el valor obtenido en la tabla adjunta.
 - b. Haga la representación gráfica.
 - c. Calcule la potencia y la eficacia de la CAR.

ACh (M)	RESPUESTA (g de tensión)	PILO (M)	RESPUESTA (g de tensión)	CAR (M)	RESPUESTA (g de tensión)
1,00E-09		1,00E-09		1,00E-09	
1,00E-08		1,00E-08		1,00E-08	
1,00E-07		1,00E-07		1,00E-07	
1,00E-06		1,00E-06		1,00E-06	
1,00E-05		1,00E-05		1,00E-05	
1,00E-04		1,00E-04		1,00E-04	

4. Discuta los resultados en base a mecanismo de acción, potencia y eficacia.
5. ¿Sobre qué tipo de receptor actúan? Describa el mecanismo de transducción de la señal en el músculo liso intestinal.

CASO 1.2.
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ATROPINA SOBRE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR CARBACOL EN ILEON DE COBAYA

1. Obtenga las CDR del CARBACOL (CAR) sólo (sin atropina) y en presencia de concentraciones crecientes de atropina (ATR).
2. Anote los valores obtenidos en la siguiente tabla.
3. Represente gráficamente las CDR obtenidas.

CAR (M)	RESPUESTA (g de tensión)	RESPUESTA (g de tensión)	RESPUESTA (g de tensión)	RESPUESTA (g de tensión)
	No ATR	ATR 10 ⁻⁸ M	ATR 10 ⁻⁷ M	ATR10 ⁻⁶ M
1,00E-09				
1,00E-08				
1,00E-07				
1,00E-06				
1,00E-05				
1,00E-04				
1,00E-03				

5. ¿Qué tipo de fármaco es la atropina? Razone la respuesta.
6. Calcule la CE₅₀ del CAR sólo y las CE_{50'} del CAR en presencia de ATR y calcule las razones de dosis. Interprete en cada caso el significado de la relación de dosis.
7. Haga la representación gráfica de la recta de Schild y calcule la potencia de la ATR expresándola como Kb y como pKb.
8. Consultando la ficha técnica (<http://www.aemps.gob.es/>) de la atropina, ¿qué indicaciones podría relacionar con el mecanismo estudiado en esta práctica?

EJERCICIO 2.

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS – ESTUDIO DE LA ACCIÓN EN ANILLO ARTERIAL DE CONEJO

CASO 2.1.

ESTUDIO DEL EFECTO DE AGONISTAS ADRENERGICOS ADRENALINA Y NORADRENALINA EN ANILLO ARTERIAL DE CONEJO

ANILLO ARTERIAL: *constituido desde el exterior al interior por la túnica adventicia, capa de fibras conjuntivas con sistema de vasos “vasa vasorum” que irrigan las paredes vasculares y sistema de nervios autónomos simpáticos “nervi vascularis” que regulan la contracción del músculo liso vascular; Túnica media: capa de músculo liso, lámina elástica interna y túnica interna, lámina basal interna, capa subendotelial y endotelio. El sistema circulatorio está regulado mayoritariamente por inervación directa del SNA simpático, mediada por neuronas postganglionares noradrenérgicas que liberan el neurotransmisor noradrenalina (NA) y por la acción endocrina de la adrenalina (A) liberada por la médula de las glándulas suprarrenales. Por el contrario, el SNA parasimpático no inerva directamente al sistema circulatorio, aunque la ACh puede actuar en músculo liso vascular.*

Utilizando la **preparación anillo de arteria de conejo** se han obtenido los datos correspondientes a las curvas concentración-respuesta con noradrenalina (NA) y adrenalina (A). Los datos se muestran en la siguiente tabla:

NA (M)	Respuesta (g de tensión)	A (M)	Respuesta (g de tensión)
1,00E-07	0	1,00E-07	0
5,00E-07	1,573	5,00E-07	0,586
1,00E-06	4,035	1,00E-06	1,5144
2,00E-06	7,0054	2,00E-06	4,045
3,00E-06	9,2623	3,00E-06	6,2325
4,00E-06	10,99	6,00E-06	9,702
5,00E-06	11,7	1,00E-05	11,431
1,00E-05	12,9	2,00E-05	13,2
2,00E-05	13,38	3,00E-05	13,8
5,00E-05	13,796	5,00E-05	14,167
5,00E-04	14,275	5,00E-04	14,28

1. Represente gráficamente las CDRs de la NA y de la A.
2. Indique la potencia y la eficacia de ambas y compárelas.
3. ¿Sobre qué tipo de receptor actúan en músculo liso vascular (arteria) para producir contracción?
4. Describa el mecanismo de transducción de la señal.

CASO 2.2.**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ANTAGONISTA ADRENÉRGICO PRAZOSINA SOBRE LA CONTRACCIÓN EJERCIDA POR NORADRENALINA EN ANILLO ARTERIAL DE CONEJO**

Se quiere determinar la acción de la prazosina (PRAZ) sobre la contracción del músculo liso vascular. Para ello se obtienen las CDRs de la NA sola y en presencia de tres concentraciones de PRAZ en anillo arterial de conejo. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

NA (M)	RESPUESTA (g tension)	NA (M)	Respuesta (g tension)	NA (M)	Respuesta (g tension)	NA (M)	Respuesta (g tension)
	SIN PRAZ		PRAZ (10 ⁻⁷ M)		PRAZ (10 ⁻⁶ M)		PRAZ (10 ⁻⁵ M)
1,00E-07	0	1,00E-07	0	1,00E-06	0	5,00E-05	0
5,00E-07	1,57	1,00E-06	0,61	5,00E-06	0,48	1,00E-04	0,8
1,00E-06	4,04	2,00E-06	1	1,00E-05	1,01	2,00E-04	1,92
2,00E-06	7,01	3,00E-06	1,70	2,00E-05	2,02	3,00E-04	3,42
3,00E-06	9,26	4,00E-06	3,18	5,00E-05	7,22	4,00E-04	4,76
4,00E-06	10,99	6,00E-06	5,88	1,00E-04	10,42	5,00E-04	6,56
5,00E-06	11,70	1,00E-05	9,05	3,00E-04	13,40	6,00E-04	7,61
1,00E-05	12,90	2,00E-05	12,23	4,00E-04	13,70	1,00E-03	10,04
2,00E-05	13,38	5,00E-05	13,63	5,00E-04	13,79	2,00E-03	11,65
5,00E-05	13,80	1,00E-04	14,18	6,00E-04	13,99	3,00E-03	12,56
5,00E-04	14,28	2,00E-04	14,24	1,00E-03	14,24	5,00E-03	14,05

- 1) En base a las CDRs:
 - a) ¿Qué tipo de fármaco es la PRAZ?
 - b) Razone la respuesta.
- 2) Calcule las razones de dosis e interprete el significado.
- 3) Calcule la potencia de la PRAZ expresándola como Kb y como pKb.
- 4) ¿Qué efecto tendría la administración de PRAZ sobre los efectos de un agonista colinérgico en la preparación de la práctica anterior? Para comprobarlo, use una única concentración suficientemente elevada de PRAZ y posteriormente añada el agonista colinérgico.
- 5) Consulte la ficha técnica de la [prazosina](#). ¿Qué indicaciones podría relacionar con el mecanismo estudiado en esta práctica?

CASO 2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL U73122 EN ANILLO ARTERIAL

Se quiere determinar la acción del compuesto U73122 sobre la contracción del músculo liso vascular. Para ello se obtienen las CDR de la NA sola y en presencia de dos concentraciones de U73122 en anillo arterial de conejo. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

NA (M)	RESPUESTA (g tension)	RESPUESTA (g tension)	RESPUESTA (g tension)
	Sin U73122	U73122 (10^{-8} M)	U73122 (5×10^{-8} M)
1,00E-07	0,00	0,00	0,00
5,00E-07	1,57	0,65	0,39
1,00E-06	4,04	1,51	0,60
2,00E-06	7,01	3,43	1,47
3,00E-06	9,26	4,73	2,13
4,00E-06	10,99	5,42	2,69
5,00E-06	11,70	6,45	3,19
1,00E-05	12,90	8,75	4,78
2,00E-05	13,38	10,00	6,09
5,00E-05	13,80	11,00	6,57
5,00E-04	14,28	11,21	7,47

- 1) Represente las CDRs.
- 2) En función de las curvas obtenidas, razone qué tipo de antagonista es el U73122.
- 3) Busque el mecanismo de acción del U73122. Explica brevemente por qué este compuesto antagoniza el efecto de la NA.



PRÁCTICA 3

FARMACOLOGÍA DE LA PLACA MOTORA

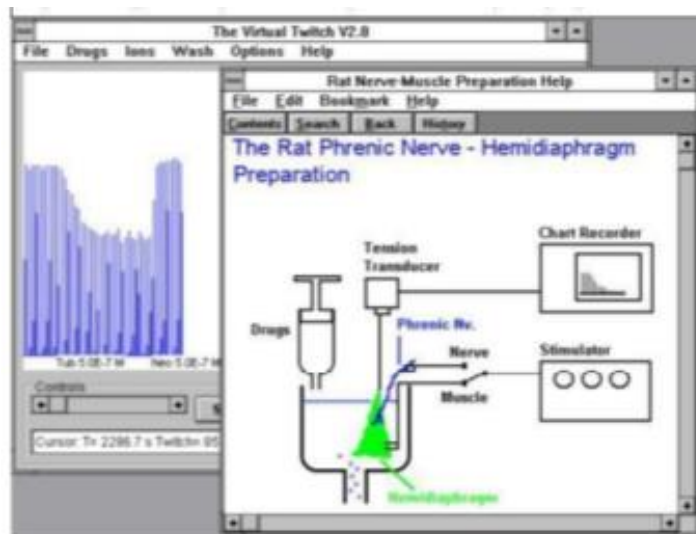
Bloqueantes neuromusculares (BNM), tipos, mecanismos y usos terapéuticos

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

- Conocer la estructura y regulación fisio-farmacológica de la unión neuromuscular (proceso de acoplamiento estímulo-contracción, mecanismos y dianas implicadas).
- Identificar, mediante el uso de un programa de simulación:
 - el efecto de la estimulación eléctrica del nervio frénico sobre la respuesta contráctil del diafragma y los procesos implicados.
 - el efecto de la estimulación eléctrica directa del músculo del diafragma y los procesos implicados.
 - cómo diferentes fármacos modifican la respuesta contráctil del diafragma a la estimulación eléctrica del nervio frénico o a la estimulación directa del músculo, identificando los diferentes mecanismos de acción.
- Conocer la utilidad y relevancia clínica de los BNM así como de la de otros fármacos utilizados en la práctica.
- Saber interpretar y discutir de manera crítica los resultados.

INTRODUCCIÓN AL USO DEL PROGRAMA DE SIMULACIÓN "THE VIRTUAL TWITCH® V.2.1.8"

En esta práctica utilizaremos el Programa de simulación farmacológica **THE VIRTUAL TWITCH® v.2.1.8** (John Dempster, Universidad de Strathclyde, Glasgow, Reino Unido) que nos permitirá estudiar de manera virtual la farmacología de la unión neuromuscular mediante una **preparación del nervio frénico-músculo diafragma de la rata**. El **diafragma** es un músculo respiratorio de gran tamaño compuesto de fibras musculares esqueléticas de tipo rápido, que está inervado por el nervio frénico. La estimulación eléctrica del nervio frénico produce contracciones musculares rápidas y de corta duración.



Siga los siguientes pasos:

1. En el menú **"File"** seleccionar **"New Rat"** para iniciar un nuevo experimento.
2. Pulsar el botón **"Start"** para iniciar el registro.
3. Para añadir un fármaco al baño:
 - a. Seleccionar un fármaco del menú **"Drugs"**.
 - b. Seleccionar la dosis escogida a partir de la lista de dosis.
 - c. Pulsar **"Inject Drug"** para añadir el fármaco al baño de órganos.
4. Se pueden realizar medidas cuantitativas moviendo el cursor sobre el registro deseado y anotando los valores (tiempo y tensión) que aparecen en la parte inferior de la pantalla.
5. Se pueden añadir tantas dosis como se desee y/o fármacos como sean necesarios. Para el lavado de los fármacos selecciona **"Wash"**.
6. Cuando haya finalizado un experimento, pulse **"Stop"** para parar el registro.
7. Para imprimir una copia del registro mostrado en la pantalla, seleccione **"Print"** en el menú **"File"**.
8. Cuando haya completado un experimento puede guardarlo en un fichero seleccionando **"Save Rat"** en el menú File (para descargar un experimento, seleccione **Load Rat**).
9. Para salir del programa de simulación, seleccione **"Exit"** en el menú **File**.

FÁRMACOS DISPONIBLES PARA LA SIMULACIÓN	
FÁRMACO	GRUPO FARMACOLÓGICO Y MECANISMO DE ACCIÓN
Atropina	Anticolinérgico. Antagonista competitivo no selectivo de receptores M de ACh
Neostigmina	Inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa
Suxametonio	BNM despolarizante de acción corta
Tetrodotoxina (TTX)	Toxina bloqueante de canales de Na _v , a nivel nervioso y de la placa motora
Tubocurarina	BNM no despolarizante, antagonista competitivo de R. N _M , de acción larga
4-aminopiridina (4AP)	Bloqueante de los canales de K _v , promoviendo la liberación presináptica de ACh

EJERCICIOS

EJERCICIO 1.

EFFECTO DEL PROCESO FISIOLÓGICO DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIIO FRÉNICO MEDIANTE EL USO DE FÁRMACOS

- 1) Comience el registro con **estimulación del nervio** (seleccionar).
 - a) Registre durante unos segundos.
 - b) Comente el resultado.

- 2) **Lave la preparación con solución Krebs sin calcio**
 - a) ¿Cuál es el efecto producido por la retirada del ion Ca^{2+} del medio?
 - b) ¿Por qué?
 - c) Haga un esquema del registro.

- 3) **Añada Ca^{2+} a las siguientes concentraciones:** (10^{-4} , 2×10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} y $2 \times 10^{-3} \text{M}$).
 - a) Realice la curva dosis respuesta.
 - b) Comente los resultados y revise que concentración de Ca^{2+} contiene la solución de Krebs normal.
 - c) Razone usted los resultados.

- 4) ¿Qué fármaco(s) utilizaría para confirmar que el efecto de la ACh en la placa motora está mediado por **receptores nicotínicos**?
 - a) Razone la respuesta.
 - b) Haga un esquema del registro observado.

- 5) ¿Qué fármaco(s) utilizaría para descartar que el efecto de la ACh en la placa motora está mediado por **receptores muscarínicos**? Razonar la respuesta y hacer un esquema del registro observado.

- 6) La ACh tiene una vida media ($t_{1/2}$) muy corta, ya que es metabolizada rápidamente por la enzima acetilcolinesterasa.
 - a) ¿Cuál es el efecto producido por la adición de **neostigmina** ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) sobre las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica del nervio frénico?
 - i) Esquematice el registro observado.
 - ii) Explique el resultado y el mecanismo.

EJERCICIO 2.

EFFECTO DE LA **TUBOCURARINA** SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO *EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL NERVI* FRÉNICO

- 1) Añada las siguientes concentraciones de **tubocurarina** y registre la respuesta obtenida al estimular el nervio frénico. Antes de estudiar los efectos de la siguiente concentración, lave y espere a que se establezca la respuesta.

TUBOCURARINA (M)	RESPUESTA (contracción en g de tensión)
0	
2×10^{-7}	
5×10^{-7}	
1×10^{-6}	

- a) ¿Cuál es el efecto producido por la adición de tubocurarina sobre las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica del nervio frénico?
- b) ¿Por qué? Razone la respuesta
- c) ¿Qué efecto produce el lavado de la preparación con solución Krebs con calcio?
- 2) Añada **tubocurarina** a una concentración de 5×10^{-6} M y registre la respuesta obtenida al estimular el nervio frénico. Cuando se haya estabilizado la respuesta añada sin lavar **neostigmina** a una concentración de 10^{-6} M.
- a) Describa y explique razonadamente la respuesta.

EJERCICIO 3.

EFEECTO DEL **SUXAMETONIO (SUCCINILCOLINA)** SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO EN RESPUESTA A LA *ESTIMULACIÓN DEL NERVIIO FRÉNICO*

- 1) Añada las siguientes concentraciones de **suxametonio (o succinilcolina)** y registre la respuesta obtenida al estimular el nervio frénico. Entre concentraciones lave y espere a que se establezca la respuesta antes de añadir la siguiente concentración.

SUXAMETONIO (M)	RESPUESTA (contracción en g de tensión)
0	
1×10^{-6}	
5×10^{-6}	
1×10^{-5}	

- a) ¿Cuál es el efecto producido por la adición de **suxametonio** (5×10^{-5} M) sobre las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica del nervio frénico?
- b) ¿Por qué? Razone la respuesta.
- 2) Añada **suxametonio** a la concentración de 10^{-5} M y registre la respuesta obtenida al estimular el nervio frénico. Cuando se haya estabilizado la respuesta añada sin lavar **neostigmina** a concentraciones crecientes desde 2×10^{-7} hasta 10^{-6} M.
- a) Describa y explique razonadamente la respuesta.

EJERCICIO 4. EFECTO DE LA **4-AMINOPIRIDINA** SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO *EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL NERVIIO FRÉNICO*

- 1) Añada **4-aminopiridina** a una concentración de 10^{-5} M.
 - a) Describa y explique razonadamente la respuesta.
- 2) Añada **tubocurarina** a una concentración de 10^{-6} M. Cuando se haya estabilizado la respuesta añadir sin lavar **4-aminopiridina** a una concentración de 10^{-5} M.
 - a) Describa y explique razonadamente la respuesta.
- 3) Busque en la ficha técnica los usos terapéuticos de la 4-aminopiridina ([fampridina](#)).

EJERCICIO 5. EFECTO DE LA **TUBOCURARINA** SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO *EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DIRECTA DEL MÚSCULO*

- 1) **Estimule directamente el músculo.** Añada tubocurarina en concentraciones crecientes.

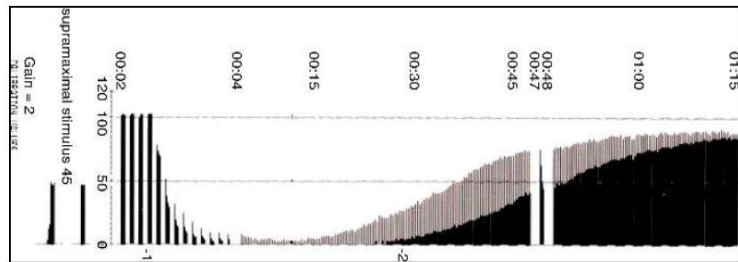
TUBOCURARINA (M)	RESPUESTA (contracción en g de tensión)
0	
2×10^{-7}	
5×10^{-7}	
1×10^{-6}	

- 2) Describa y explique razonadamente la respuesta comparándola con la obtenida en el ejercicio 2, en el cual la estimulación se realizó a través del nervio frénico.

EJERCICIO 6. EFECTO DE LA **TETRODOTOXINA** SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO *EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DIRECTA DEL MÚSCULO*

- 1) **Estimule directamente el músculo.** Añada **tetrodotoxina** a una concentración de 10^{-6} M.
 - a) Describa y explique razonadamente la respuesta.
 - b) Cuando se haya estabilizado la respuesta, añada sin lavar **neostigmina** a concentraciones desde 2×10^{-7} M hasta 10^{-6} M.
 - c) Describa y explique razonadamente las respuestas.

EJERCICIO 7. USO RACIONAL DE LOS BNM: CONSIDERACIONES CLÍNICAS



Los BNM son fármacos de uso hospitalario que se manejan por los anestesistas.

- 1) Revise las fichas técnicas de:
 - a) [Vecuronio](#)
 - b) [Suxametonio](#)
 - c) [Neostigmina](#)
 - d) [Sugammadex](#)
- 2) Si tiene en cuenta que el vecuronio, como la tubocurarina, produce un bloqueo de larga duración y el suxametonio un bloqueo de corta duración:
 - a) ¿qué diferencias de indicación puede haber para cada uno de ellos?

La monitorización neuromuscular es una práctica que debe utilizarse siempre que sea necesario un bloqueo neuromuscular.

Monitorización cuantitativa en el músculo abductor pollicis (AP); los electrodos estimulan el nervio cubital, con el electrodo negativo negro distal y el transductor de aceleración fijado con cinta adhesiva en la cara interna distal del dedo pulgar. Así, se puede hacer un registro electromiográfico del bloqueo NM. El punto 1 coincide con la administración de una dosis de intubación. Puede verse la recuperación espontánea tras la metabolización de este hasta valores normales.

- 3) ¿Qué puede ocurrir en el caso de que se administrase una dosis elevada de vecuronio o de cualquier otro BNM no despolarizante a un paciente?
 - a) ¿Qué fármaco(s) se podría(n) utilizar para revertir el bloqueo neuromuscular?
- 4) ¿Qué puede ocurrir en el caso de que se administrase una dosis elevada de suxametonio (o succinilcolina) a un paciente?
 - a) ¿Podría utilizarse neostigmina para revertir el bloqueo en este caso? Razone la respuesta.
 - b) ¿Qué puede ocurrir en el caso de que se administrase suxametonio (o succinilcolina) a un paciente con *colinesterasa atípica*? Razone la respuesta.



PRÁCTICA 4

ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FÁRMACOS SOBRE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR EN UN MODELO VIRTUAL DE RATA ANESTESIADA

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

- Conocer los mediadores endógenos y receptores involucrados en la regulación autonómica de la función cardiovascular (CV), así como los mecanismos de acción y vías de señalización intracelular responsables.
- Registrar y cuantificar los efectos de la estimulación de diferentes ramas del SNA simpático y parasimpático en la función CV, así como de los mediadores correspondientes.
- Identificar el mecanismo de acción de diferentes fármacos (agonistas y antagonistas) en base a como modifican la función CV.
- Conocer la utilidad y relevancia clínica de los fármacos estudiados en la farmacología CV.

INTRODUCCIÓN AL USO DEL PROGRAMA DE SIMULACIÓN “THE VIRTUAL RATCVS®”

En esta práctica utilizaremos el programa de rata virtual RATCVS de la Universidad de Strathclyde de Glasgow (http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/showPage.php?page=software_sims).

Este programa simula un modelo de experimentación animal muy utilizado para estudiar los efectos de fármacos sobre la función cardiovascular (CV) y sus mecanismos de acción, el modelo de rata descerebrada y desmedulada (pithed rat) (Figura 2).

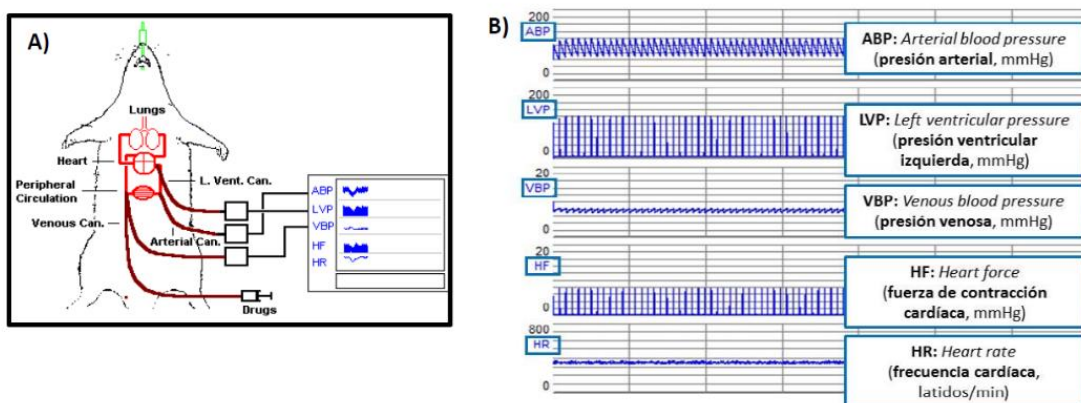


Figura 2. A) Representación del modelo experimental de rata descerebrada y desmedulada (pithed rat) para el estudio de los efectos de fármacos sobre la función cardiovascular. B) Ejemplo del registro que se obtiene mediante el programa de simulación por ordenador RATCVS.

La metodología es la siguiente:

- La rata es anestesiada y se le realiza una traqueotomía para mantener la respiración asistida.
- Se efectúa la descerebración y desmedulación con una varilla de descabello especialmente diseñada. *El objetivo es eliminar las conexiones nerviosas con el encéfalo, anulándose los reflejos centrales de presión arterial asociados a los barorreceptores de la arteria carótida. Así los resultados obtenidos serán consecuencia del efecto directo de los fármacos sobre corazón y/o vasos sin interferencia con los arcos reflejos.*
- Por último, se colocan tres cánulas:
 - en una arteria principal, conectada a un transductor de presión con el fin de registrar la presión arterial (ABP) y la frecuencia cardíaca (HR).
 - en el ventrículo izquierdo del corazón, conectada a un segundo transductor de presión y que se utiliza para obtener la presión ventricular izquierda (LVP) y la fuerza de contracción cardíaca (HF).

La vena femoral está conectada a un tercer transductor de presión y permite tanto monitorizar la presión sanguínea venosa (VBP) como administrar los fármacos en estudio por vía i.v.

USO DE LA SIMULACIÓN:

- 1) Iniciar un nuevo experimento (*File* → *new rat*)
- 2) En "*Options* → *display channels*", seleccionar exclusivamente presión arterial (ABP) (el primero) y frecuencia cardíaca (HR) (el último).
- 3) Comprobar que está seleccionada la preparación de rata desmedulada "*pithed*" (en la parte inferior derecha de la ventana de trabajo).
- 4) Pulsar "*start*" y dejar que se establezca el registro durante unos 20-25 segundos.
- 5) Pulsar "*stop*" para parar el registro.
- 6) Colocar el cursor sobre el punto del registro que se quiere cuantificar. El valor se mostrará en la barra inferior del programa.

EJERCICIOS

EJERCICIO 1. REPASO A LA FISIOLÓGÍA DEL SNA: MEDIADORES Y RECEPTORES

ENUNCIADO: Con la ayuda de la introducción la Fig. 1 y la información disponible en los siguientes enlaces

- Receptores α : <http://www.cvpharmacology.com/vasoconstrictor/alpha-agonist>
- Receptores β : <http://www.cvpharmacology.com/cardio stimulatory/beta-agonist>
- Receptores muscarínicos: <http://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/atropine>

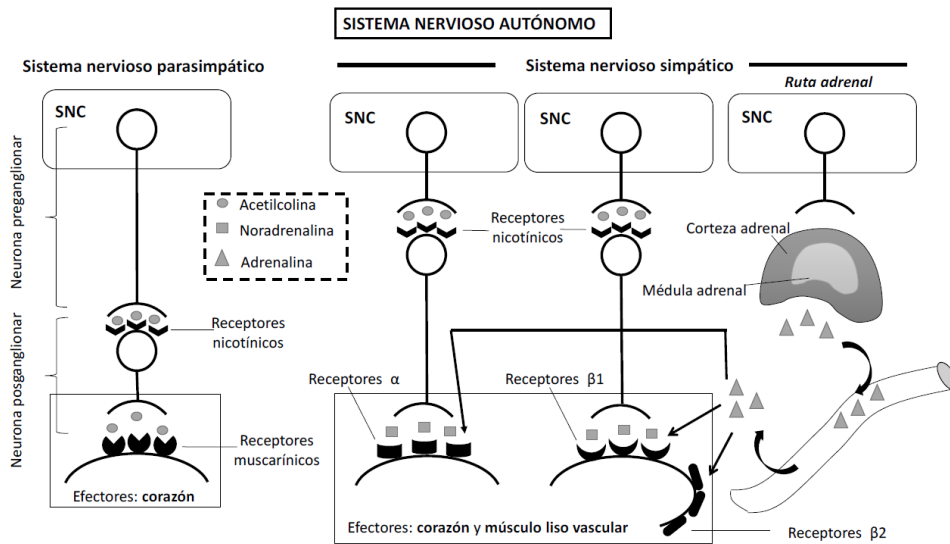


Figura 1. Representación esquemática del sistema nervioso autónomo en corazón y músculo liso vascular.

1) Complete la siguiente tabla:

RECEPTORES	LOCALIZACIÓN (corazón/mus. liso vascular)	MEDIADOR	EFECTO	MECANISMO DE ACCIÓN
ADRENÉRGICOS				
α				
β_1				
β_2				
MUSCARÍNICO				
M2				

EJERCICIO 2. ACTIVACIÓN SIMPÁTICA (EXCLUYENDO LA MÉDULA ADRENAL) Y FUNCIÓN CV: EFECTO DE FÁRMACOS

- 1) En el menú **“Nerve Stimulation”**, seleccionar **Symp. nerves (excl. adrenal)**.
 - a) Registre y cuantifique la respuesta.
 - b) Explique razonadamente qué mediador del SNA simpático y qué tipo de receptores son los responsables de los efectos observados en la presión arterial y en la frecuencia cardíaca.

- 2) En cuanto los valores retornen al nivel basal, administre **prazosina** (*para seleccionar la prazosina vaya a Menú→ Standard Drugs → Prazosin*). Seguidamente, estimule **Symp. nerves (excl. adrenal)**. Las concentraciones de prazosina a estudiar son las siguientes **(1, 5 y 10 mg/kg)**.
 - a) Registre y cuantifique la respuesta CV que obtiene al estimular Symp. Nerves (excl. adrenal) tras haber administrado cada una de las dosis de prazosina.
 - b) Interprete razonadamente los resultados obtenidos en base al mecanismo de acción de la prazosina. *“Recuerde: la prazosina es un fármaco que ya ha estudiado en las prácticas, ver Práctica 2, caso 2.2.”*
 - c) Consulte la ficha técnica de la [prazosina](#) e indique sus usos terapéuticos.

- 3) Seleccione rata nueva (**File, “new rat”**) y repita el registro con la estimulación **Symp. nerves (excl. adrenal)**. Administre **propranolol 20 mg/kg** (*menú Standard Drugs → Propranolol*) y vuelva a estimular Symp. Nerves (excl. adrenal).
 - a) Registre y cuantifique la respuesta CV que obtiene al estimular Symp. Nerves (excl. adrenal) tras haber administrado el propranolol.
 - b) Interprete razonadamente los resultados obtenidos.
 - c) En base a los resultados, ¿cuál es el mecanismo de acción del propranolol?
 - d) Consulte la ficha técnica del [propranolol](#) e indique sus usos terapéuticos.

EJERCICIO 3.

ACTIVACIÓN DE LA MÉDULA ADRENAL Y FUNCIÓN CV: EFECTO DE FÁRMACOS BETA-BLOQUEANTES

- 1) En el menú **“Nerve Stimulation”**, seleccionar **Symp. nerves (only adrenal)**.
 - a) Registre y cuantifique la respuesta.
 - b) Explique razonadamente qué mediador del SNA simpático y qué tipo de receptores son los responsables de los efectos observados en la presión arterial y en la frecuencia cardíaca.
 - c) Compare esta respuesta con la obtenida con la activación simpática excluyendo la adrenal, tanto en magnitud de respuesta como en patrón temporal.

- 2) Administre 20 mg/kg de **propranolol** (*menú Standard Drugs → Propranolol*) y vuelva a seleccionar Symp. nerves (only adrenal).
 - a) Registre y cuantifique la respuesta CV.
 - b) Interprete razonadamente la respuesta.
 - c) Compare el efecto obtenido con propranolol en este ejercicio con el obtenido con la activación simpática excluyendo la adrenal.

- 3) Seleccione rata nueva (File, “new rat”) y repita el registro con la estimulación Symp. nerves (only adrenal). Administre 200 mg/kg de **atenolol** (*menú Standard Drugs → Atenolol*) y vuelva a seleccionar Symp. nerves (only adrenal).
 - a) Registre, cuantifique e interprete razonadamente la respuesta.
 - b) En base a los resultados ¿cuál es el mecanismo de acción del atenolol?
 - c) Consulte la ficha técnica del [atenolol](#) e indique sus usos terapéuticos.

EJERCICIO 4. ACTIVACIÓN DEL NERVI VAGO (SN PARASIMPÁTICO) Y FUNCIÓN CV: EFECTO DE FÁRMACOS ANTICOLINÉRGICOS

- 1) En el menú "**Nerve Stimulation**", seleccionar **vagus nerve**.
 - a) Registre y cuantifique la respuesta.
 - b) Explique razonadamente qué mediador del SNA parasimpático y qué tipo de receptores son los responsables de los efectos observados.

- 2) Administrar a la misma rata **atropina** (0,5, 1, 2 y 5 mg/kg, respectivamente) (*menú Standard Drugs → Atropine*) y volver a seleccionar "Nerve Stimulation", vagus nerve.
 - a) Registre, cuantifique e interprete razonadamente las respuestas obtenidas.
 - b) En base a los resultados ¿cuál es el mecanismo de acción de la atropina?
 - c) Consulte la ficha técnica de la [atropina](#) e indique sus usos terapéuticos.

EJERCICIO 5. EFECTO DE FÁRMACOS EN AUSENCIA DE ESTIMULACIÓN DEL SNA

- 1) En el menú File seleccionar “**New Rat**”. Comprobar que la preparación está seleccionada como “pithed rat” y pulsar Start. Administre vía i.v. los siguientes fármacos a las dosis indicadas:

FÁRMACO	DOSIS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Adrenalina	20
Noradrenalina	20
Isoprenalina	10
Fenilefrina	50
Acetilcolina	50
Verapamilo	A la concentración más baja posible y siga aumentando

- a) Registre, cuantifique e interprete razonadamente las respuestas obtenidas.
- i) En el caso de la noradrenalina, adrenalina y acetilcolina compare las respuestas con las obtenidas cuando se estimulaba el nervio correspondiente (simpático sin adrenal, simpático solo adrenal y vago).
- b) Indique el mecanismo de acción de cada fármaco.
- c) Consulte las fichas técnicas e indique los usos terapéuticos de estos fármacos.



PRÁCTICA 5

INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS: RELEVANCIA DE LA INDUCCIÓN E INHIBICIÓN ENZIMÁTICA Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA FARMACOCINÉTICA, EFICACIA Y SEGURIDAD DE LOS FÁRMACOS

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISICIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

- Comprender los mecanismos implicados en los fenómenos de inducción e inhibición enzimática.
- Conocer las técnicas que se utilizan para evaluar el potencial inductor o inhibidor de los fármacos.
- Familiarizarse con algunos de los fármacos que son conocidos potentes inductores o inhibidores enzimáticos del sistema de CYP450.
- Ser capaz de interpretar y discutir de forma crítica las curvas temporales de las concentraciones plasmáticas de fármaco/metabolito en el contexto de las interacciones farmacológicas y su potencial relevancia clínica.
- Reconocer la importancia de los polimorfismos genéticos determinando la farmacocinética, eficacia y seguridad de los fármacos.
- *De manera transversal aprender a utilizar el programa Excel como hoja de cálculo y herramienta de representaciones gráficas.*

EJERCICIOS

En el Campus Virtual se adjunta la hoja de cálculos "Excel" con los datos de los ejercicios de esta práctica (HOJA DE CÁLCULO PRÁCTICA 5)

EJERCICIO 1. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CAPACIDAD INDUCTORA ENZIMÁTICA DE FÁRMACOS

ENUNCIADO: Una empresa farmacéutica está evaluando 4 compuestos (C1-C4) por su potencial terapéutico como fármacos antidepresivos. Realizan estudios para determinar si estos compuestos son inductores enzimáticos de la isoenzima del sistema microsomal de citocromos p450 "**CYP3A4**".

Para ello realizan estudios en muestras de **hepatocitos humanos** (n = 3 donantes). Las células son incubadas (por separado) con los compuestos de estudio cada 8 h durante 24 h. Para cada compuesto, las concentraciones utilizadas han sido 0,01, 0,1 y 1 μM .

Una vez finalizado el periodo de incubación, los investigadores cuantifican los **niveles de ARNm** que codifican la síntesis del CYP3A4.

Como **control positivo** de inducción enzimática del CYP3A4, los investigadores utilizan dos fármacos ya conocidos y caracterizados como potentes inductores del CYP3A4:

- **Carbamazepina**
- **Rifampicina**

Los resultados obtenidos como niveles de ARNm del CYP3A4 en cada una de las muestras procedentes de cada uno de los donantes aparecen en la siguiente tabla:

Compuesto 1	Control positivo	Donante 1	Donante 2	Donante 3
0,01		0,75	0,87	0,79
0,1		0,92	0,92	0,75
1		0,92	0,75	0,78
	Carbamazepina	7,5	4,4	9,2
	Rifampicina	10	5,12	11,2
Compuesto 2	Control positivo	Donante 1	Donante 2	Donante 3
0,01		0,95	0,82	0,89
0,1		1,5	1,1	1,87
1		4	2,5	4,4
	Carbamazepina	7,5	4,4	9,2
	Rifampicina	10	5,12	11,2
Compuesto 3	Control positivo	Donante 1	Donante 2	Donante 3
0,01		2,5	3,1	2,9
0,1		6	5,8	6,1
1		8,5	8,9	9,2
	Carbamazepina	7,5	4,4	9,2
	Rifampicina	10	5,12	11,2
Compuesto 4	Control positivo	Donante 1	Donante 2	Donante 3
0,01		3,95	2,82	4,89
0,1		6,96	4,91	8,87
1		7,85	5,89	10,81
	Carbamazepina	7,5	4,4	9,2
	Rifampicina	10	5,12	11,2

APARTADOS A RESOLVER

- 1) Para cada concentración de compuesto de estudio:
 - a) Calcule la media de los valores obtenidos en los hepatocitos de los 3 donantes.
 - b) Exprese el resultado como porcentaje del valor obtenido con el control positivo más activo.

- c) Teniendo en cuenta que un compuesto se considera **inductor enzimático moderado** cuando, en comparación a la inducción alcanzada por el control positivo, éste es capaz de aumentar la expresión génica de la enzima en $\geq 40\%$, y es un **inductor potente** cuando el aumento es $\geq 80\%$,
- d) Indique si estos compuestos son o no inductores y si son moderados o potentes.
- 2) Teniendo en cuenta que en caso de que el compuesto muestre efecto inductor, la relevancia clínica de este efecto dependerá de:
- La concentración de compuesto necesaria para presentar efecto inductor.
 - La C_{max} plasmática alcanzada cuando se administra la dosis máxima recomendada.
- (1) Indique si estos compuestos tendrán relevancia clínica o no sabiendo que la C_{max} alcanzada a las dosis máximas recomendadas para cada compuesto de estudio son las siguientes:

COMPUESTO	C_{max} (μM)
1	1
2	30
3	1
4	250

Con los resultados marque con una X las casillas correspondientes:

COMPUESTO	POTENCIAL INDUCTOR		RELEVANCIA CLÍNICA	
	SI	NO	SI	NO
1				
2				
3				
4				

- 3) Responda a las siguientes preguntas:
- ¿Cuáles son las principales características de la inducción enzimática?
 - ¿Qué tipo de receptores nucleares han sido implicados en mediar el fenómeno de inducción enzimática?
 - ¿Por qué este tipo de estudio requiere que se realice en hepatocitos?
 - ¿Qué consecuencia clínica a largo plazo puede tener el fenómeno de inducción enzimática?

EJERCICIO 2.

DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA CAPACIDAD INHIBIDORA ENZIMÁTICA DE FÁRMACOS

ENUNCIADO: Un laboratorio farmacéutico está evaluando 4 compuestos (F1-F4) con el objetivo de determinar *in vitro* la capacidad de cada uno de ellos como inhibidores enzimáticos de la isoenzima **CYP2D6** en **microsomas hepáticos**. Además, estudian como el grado de inhibición de la actividad enzimática del CYP2D6 varía a **diferentes tiempos de incubación** (15 y 30 min, respectivamente) para mejor deducir, en su caso el tipo de inhibición enzimática que ejercen. Como **control positivo** se utilizan tres **conocidos y potentes inhibidores del CYP2D6: fluoxetina, paroxetina y quinidina**. Los resultados obtenidos como concentración de metabolito (indicador de la actividad metabólica del CYP2D6) en función de la concentración del compuesto de estudio (F1-F4) y del tiempo de incubación se muestran en las siguientes tablas:

F1 (μM)	[metabolito]	
	Incubación 15 min	Incubación 30 min
0,01	0,135	0,14
0,1	0,14	0,143
0,5	0,138	0,141
1	0,135	0,13
2,5	0,115	0,11
5	0,08	0,072
7,5	0,05	0,041
10	0,03	0,021
12,5	0,02	0,013
15	0,01	0,0075
17,5	0,007	0,0045
20	0,003	0,001
25	0,001	0,001
30	0,0007	0,0007
35	0,0005	0,0005
40	0,0001	0,0001
45	0,00001	0,00001
50	0,000005	0,000003

F2 (μM)	[metabolito]	
	Incubación 15 min	Incubación 30 min
0,01	0,127	0,13
0,1	0,133	0,135
0,5	0,128	0,129
1	0,12	0,126
2,5	0,084	0,122
5	0,045	0,096
7,5	0,025	0,072
10	0,012	0,056
12,5	0,005	0,04
15	0,0035	0,03
17,5	0,0025	0,025
20	0,0015	0,019
25	0,001	0,012
30	0,0005	0,008
35	0,0003	0,005
40	0,0001	0,0035
45	0,00001	0,0028
50	0,0000001	0,0015

F3 (μM)	[metabolito]	
	Incubación 15 min	Incubación 30 min
1	0,142	0,147
5	0,147	0,151
10	0,145	0,149
25	0,14	0,118
50	0,126	0,07
75	0,095	0,039
100	0,072	0,019
125	0,055	0,011
150	0,04	0,008
175	0,027	0,0005
200	0,017	0,0001
250	0,011	0,00008
300	0,007	0,000004
350	0,006	0,0000011
400	0,005	0,0000001
450	0,004	0,00000011
500	0,003	0,00000011

F4 (μM)	[metabolito]	
	Incubación 15 min	Incubación 30 min
1	0,158	0,162
5	0,165	0,164
10	0,165	0,161
25	0,162	0,157
50	0,155	0,148
75	0,136	0,13
100	0,121	0,115
125	0,105	0,1
150	0,087	0,078
175	0,071	0,061
200	0,057	0,047
250	0,035	0,026
300	0,016	0,011
350	0,008	0,0075
400	0,003	0,0023
450	0,0002	0,000199
500	0,0001	0,000012

- 1) Para cada compuesto de estudio:
 - a) Represente, en escala semilogarítmica, la curva de inhibición correspondiente a 15 y a 30 minutos de incubación (concentración metabolito vs concentración compuesto).
 - b) Calcule valor de la CI_{50} .
 - c) En base a los resultados indique si el compuesto estudiado es un inhibidor enzimático:
 - i) **Potente:** reduce de la actividad enzimática $> 80\%$.
 - ii) **Moderado:** reduce de la actividad enzimática del **50-80%**.
 - iii) **Leve:** disminución de la actividad enzimática del $< 50\%$.
 - d) Sabiendo que, en caso de que el compuesto muestre efecto inhibidor, la relevancia clínica de este efecto dependerá de:
 - i) La concentración de compuesto necesaria para presentar el efecto inhibidor.
 - ii) La C_{max} plasmática alcanzada cuando se administra la dosis máxima recomendada.
- (1) Indique si estos compuestos tendrán relevancia clínica o no sabiendo que la C_{max} alcanzada a las dosis máximas recomendadas para cada compuesto de estudio son las siguientes:

F	C_{max} (μM)
1	0,1
2	15
3	250
4	250

Con los resultados marque con una X las casillas correspondientes.

F	INHIBIDOR		TIPO/CARACTERÍSTICA			CLÍNICAMENTE RELEVANTE	
	SI	NO	REVERSIBLE	IRREVERSIBLE	SE DEGRADA	SI	NO
1							
2							
3							
4							

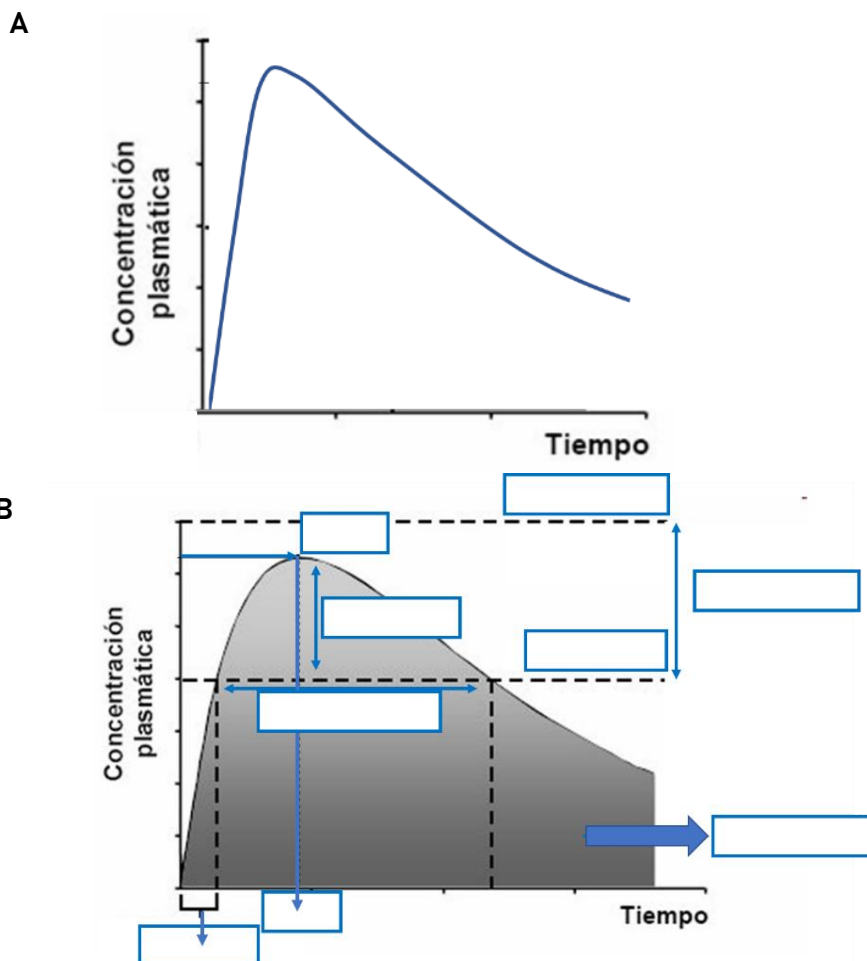
- 2) Responda a las siguientes preguntas:
 - a) ¿Cuáles son las principales características de la inhibición enzimática?
 - b) ¿Por qué este tipo de estudio se realiza en microsomas hepáticos?
 - c) ¿Qué consecuencia clínica a largo plazo puede tener el fenómeno de inducción enzimática?

EJERCICIO 3. CURVAS TEMPORALES DE LAS C_p DE FÁRMACO/METABOLITO COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS

Los parámetros farmacocinéticos describen el movimiento de los fármacos en el organismo y la velocidad con la que un principio activo puede alcanzar su lugar de acción. Se puede establecer una relación entre la dosis administrada, la concentración de fármaco en plasma (C_p) y su efecto farmacológico. En la práctica, se realiza la administración del medicamento o principio activo a un sujeto y se van tomando muestras de plasma a distintos tiempos. Se cuantifica el principio activo (fármaco o metabolito) en las muestras obtenidas y se hace una representación de la variación de la C_p frente al tiempo (**curvas de niveles plasmáticos**).

EJERCICIO 3.1. En las curvas de niveles plasmáticos:

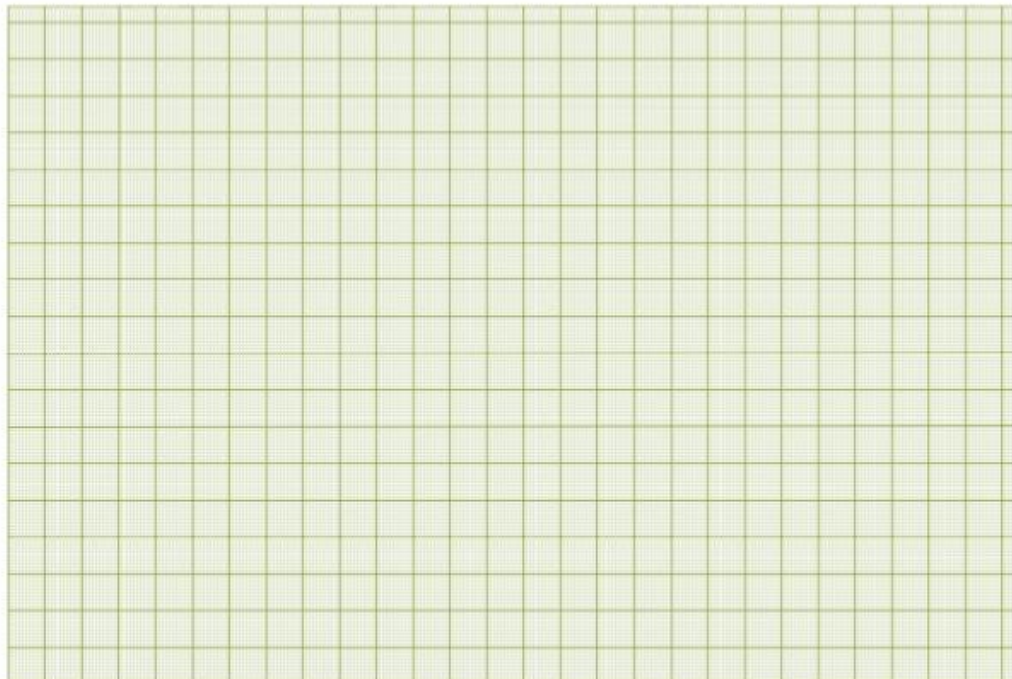
- 1) Indique, en la gráfica A, las partes que se relacionan con la absorción, la distribución y la eliminación.
- 2) Rellene los espacios de la gráfica B con los parámetros que se pueden obtener en relación con el efecto farmacológico.



EJERCICIO 3.1. Se administran dos fármacos por vía oral. Para ambos fármacos la CME = 60 $\mu\text{g/ml}$ y la CMT = 90 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones plasmáticas tomadas a diferentes tiempos fueron las siguientes:

FÁRMACO A		FÁRMACO B	
Tiempo (h)	Cp ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo (h)	Cp ($\mu\text{g/ml}$)
0	0	0	0
2	30	2	60
4	50	4	100
8	75	8	70
12	50	12	30
18	20	18	5
24	10	24	0

- a) Representar las curvas de concentración plasmática en función del tiempo para ambos fármacos.



- b) Indicar de forma aproximada el periodo de latencia y la Tmax para ambos fármacos. ¿A partir de qué tiempo aproximadamente deja de observarse el efecto terapéutico?

EJERCICIO 3.3. En la siguiente gráfica se muestran las Cp del fármaco **selumetinib** cuando éste se administra solo o junto con **rifampicina**. En base a las curvas, deduzca qué tipo de interacción está teniendo lugar. Razone su respuesta en el contexto de interacciones farmacocinéticas y consecuencias sobre la eficacia y seguridad.

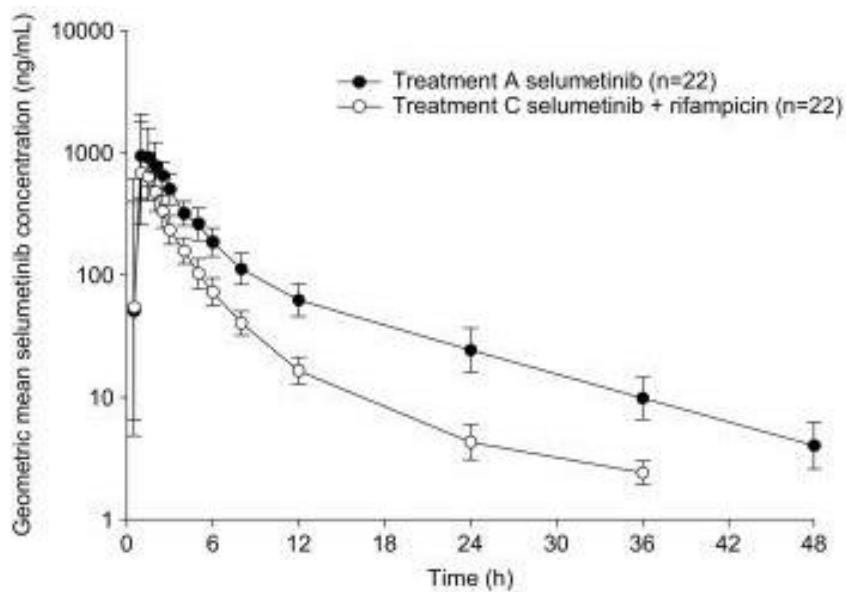


Figura obtenida del artículo: "Effects of cytochrome P450 (CYP3A4 and CYP2C19) inhibition and induction on the exposure of selumetinib, a MEK1/2 inhibitor, in healthy subjects: results from two clinical trials" por Dymond AW et al. Eur J Clin Pharmacol. 2017 Feb;73(2):175-184. DOI: 10.1007/s00228-016-2153-7.

EJERCICIO 3.4. En la siguiente gráfica se muestran las Cp de la hidromorfina (metabolito de hidrocodeína) cuando la **hidrocodeína** se administra sola o con **paroxetina**. En base a las curvas y a la información de las fichas técnicas, deduzca que tipo de interacción está teniendo lugar. Razone su respuesta:

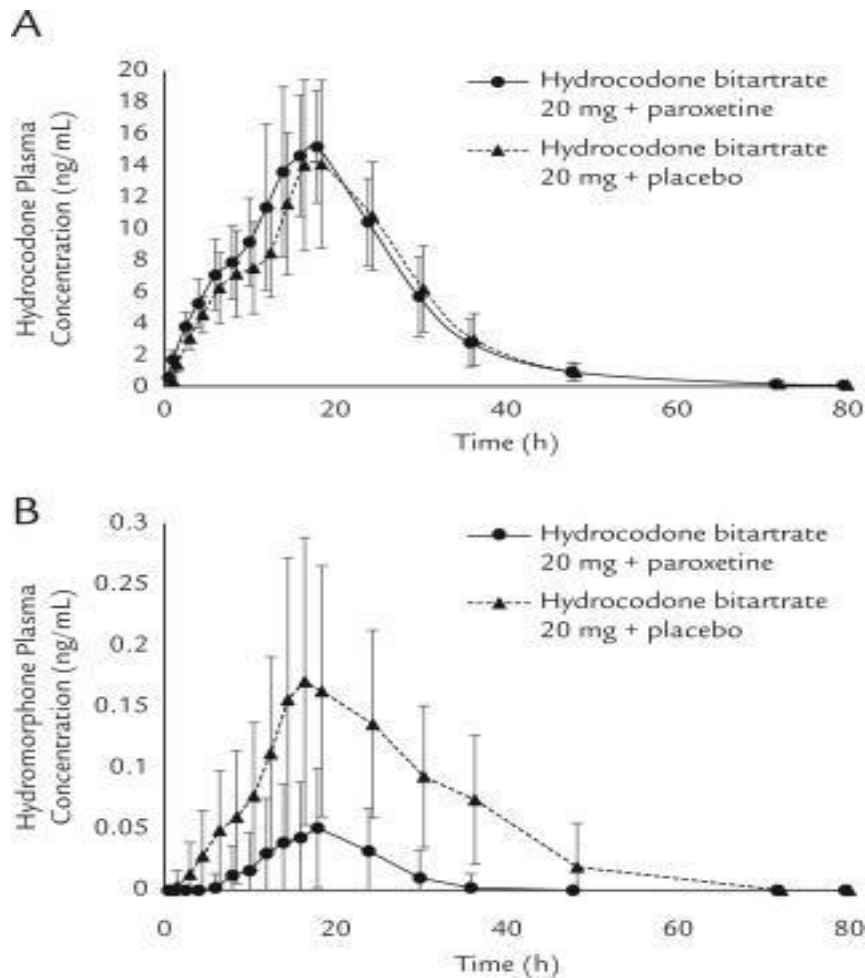


Figura obtenida del artículo: "Effects of paroxetine, a CYP2D6 inhibitor, on the pharmacokinetic properties of hydrocodone after coadministration with a single-entity, once-daily, extended-release hydrocodone tablet" por Kapil RP et al. *Clin Ther.* 2016 Jan 1;38(1):232. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.08.007

EJERCICIO 3.5. El clopidogrel se utiliza como antiagregante plaquetario y antitrombótico. En la siguiente figura se muestran las Cp en función del tiempo del metabolito del clopidogrel cuando éste se toma vía oral con agua o con zumo de pomelo (GFJ). Revise las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas del clopidogrel en la ficha técnica e interprete los resultados en el contexto de interacciones farmacocinéticas y consecuencias sobre la eficacia y seguridad.

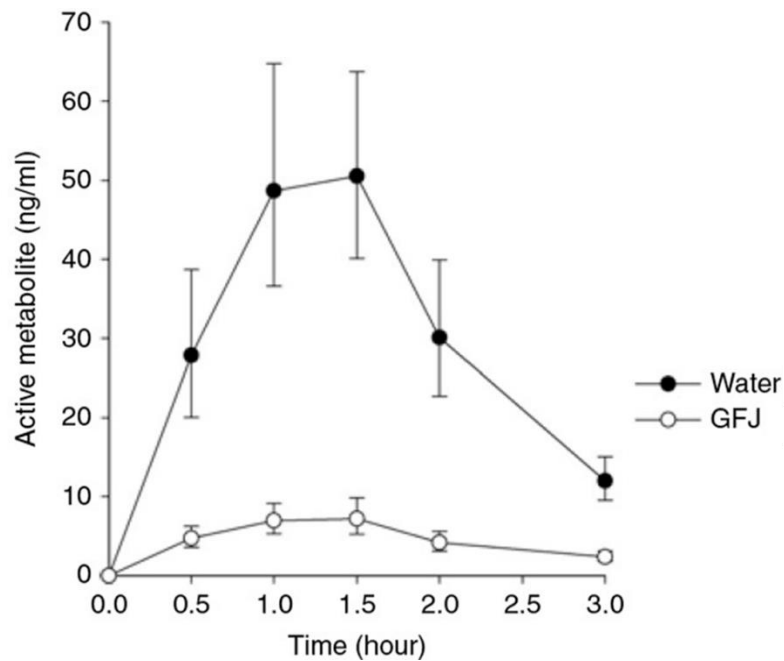


Figura obtenida del artículo: "Grapefruit juice inhibits the metabolic activation of clopidogrel" por Holmberg MT et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Mar;95(3):307-13. DOI: 10.1038/clpt.2013.192.

EJERCICIO 3.6. En la siguiente gráfica se muestra el efecto del **verapamilo** sobre las Cp de **irinotecán** (CPT-11) así como de las de su metabolito activo (SN-38). Discuta los resultados en el contexto de interacciones farmacocinéticas y consecuencias sobre la eficacia y seguridad.

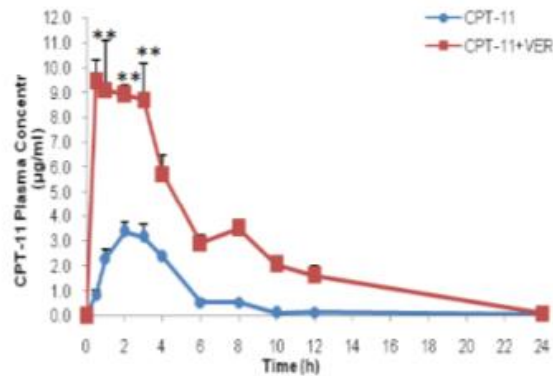


Figure 1. Mean plasma irinotecan (CPT-11) concentration-time plot for A) 20, B) 40 and C) 80 mg/kg after oral administration in control (-●-) and in verapamil (VER) treated (-■-) rats. Verapamil at 25 mg/kg was administered orally 2 h prior to irinotecan dosing. Each data point represents the mean ± SEM of five different rats. **Statistical significant difference between control and verapamil treated rats, $p < 0.01$

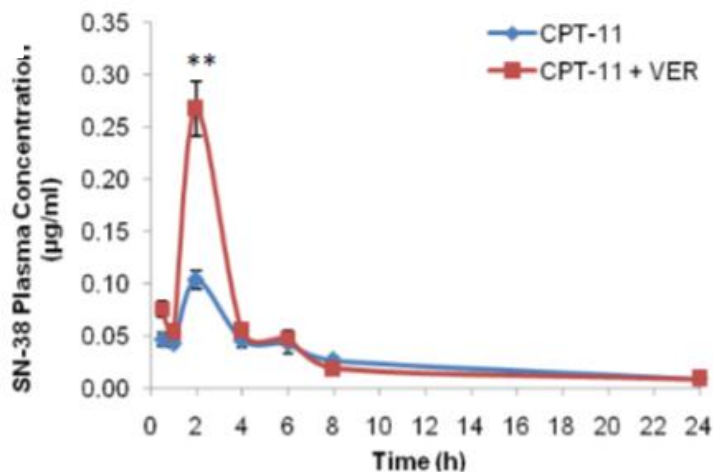


Figure 2. Plasma concentrations of SN-38 following irinotecan (CPT-11) administration in control and verapamil (VER) treated female Wistar rats. The control group was given an oral dose of A) 20, B) 40 and C) 80 mg/kg irinotecan only (-●-). The treated (-■-) were administered verapamil at 25 mg/kg orally 2 h prior to irinotecan dosing. Each data point represents the mean ± SEM of five different rats. **Statistical significant difference between control and verapamil treated rats, $p < 0.01$

Figura obtenida del artículo: "Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats" por Bansal T et al. *Eur J Pharm Sci.* 2009 Mar 2;36(4-5):580-90. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.12.005.

EJERCICIO 3.7. El **tamoxifeno** es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno (SERM), ampliamente utilizado en la terapia adyuvante del cáncer de mama hormono-dependiente. En realidad el compuesto activo es el endoxifeno, metabolito activo del tamoxifeno. En la figura de la izquierda se muestra la ruta de metabolización y en la de la derecha se muestran las Cp del metabolito endoxifeno, en mujeres en tratamiento antidepresivo con los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS): **fluoxetina** (círculos blancos) o **escitalopram** (círculos negros). Discuta los resultados en el contexto de interacciones farmacocinéticas y consecuencias sobre la eficacia y seguridad.

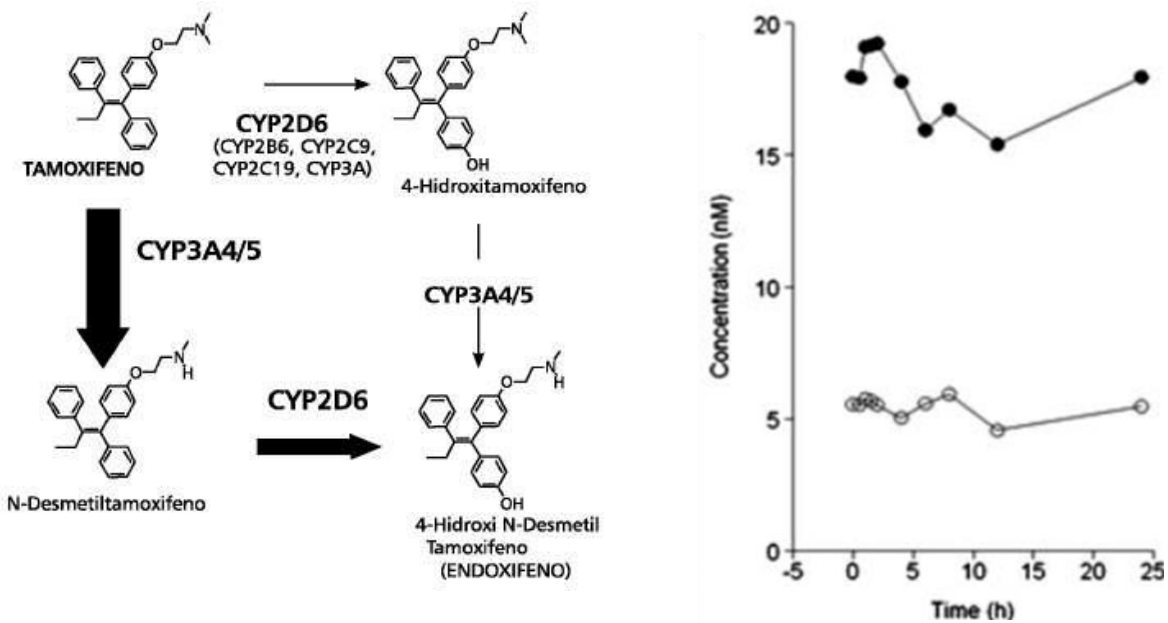


Figura obtenida del artículo: "Augmentation of Endoxifen Exposure in Tamoxifen-Treated Women Following SSRI Switch" por Binkhorst L et al. Clin Pharmacokinet. 2016 Feb;55(2):249-55. DOI: 10.1007/s40262-015-0315-x.

EJERCICIO 3.8. Se muestra el efecto que ejerce el antivirico **ritonavir** (RTV) (círculos blancos) sobre los niveles plasmáticos de los hipnóticos **triazolam** (gráfico de la izquierda) y **zolpidem** (gráfico de la derecha).

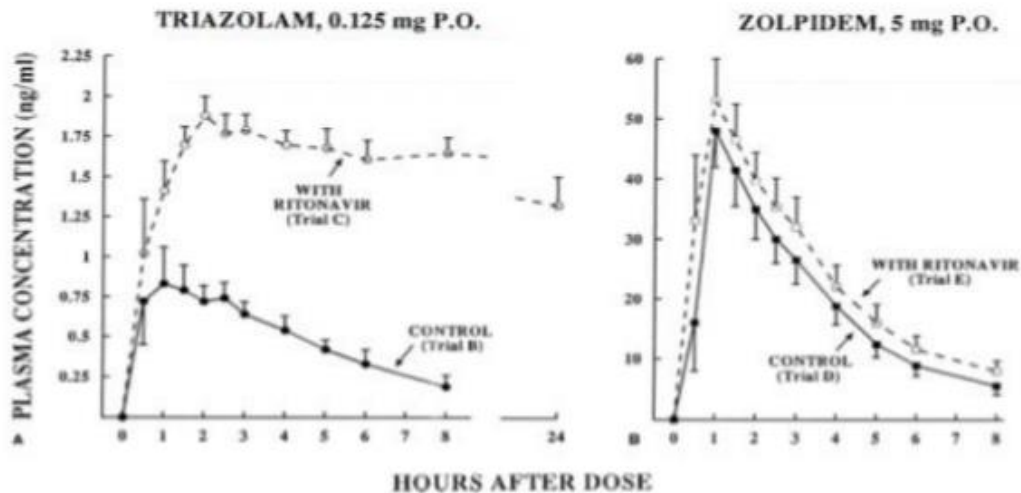


Figura obtenida del artículo: "Differential impairment of triazolam and zolpidem clearance by ritonavir" por Greenblatt DJ et al. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000 Jun 1;24(2):129-36. DOI: 10.1097/00126334-200006010-00007.

Según lo observado en estas gráficas y revisando las fichas técnicas de los fármacos explique de manera razonada:

- 1) ¿Qué efecto tiene RTV sobre las C_p de los dos hipnóticos?
- 2) ¿Qué posibles consecuencias puede tener dicha interacción?
- 3) ¿Cuál es la posible causa de dicho efecto?
- 4) Si a un paciente en tratamiento con RTV fuese necesario instaurarle un tratamiento hipnótico, razone cuál de los dos fármacos hipnóticos sería más apropiado con el fin de evitar la aparición de efectos tóxicos.
- 5) ¿Puede aprovecharse este efecto en el tratamiento de HIV?

EJERCICIO 3.9. En la siguiente gráfica se muestran las Cp del bloqueante de los canales de calcio, nifedipino, cuando éste se administra por vía i.v. (gráfica de la izquierda) o por vía oral (gráfica de la derecha), bien solo (círculos negros) y con rifampicina (círculos blancos).

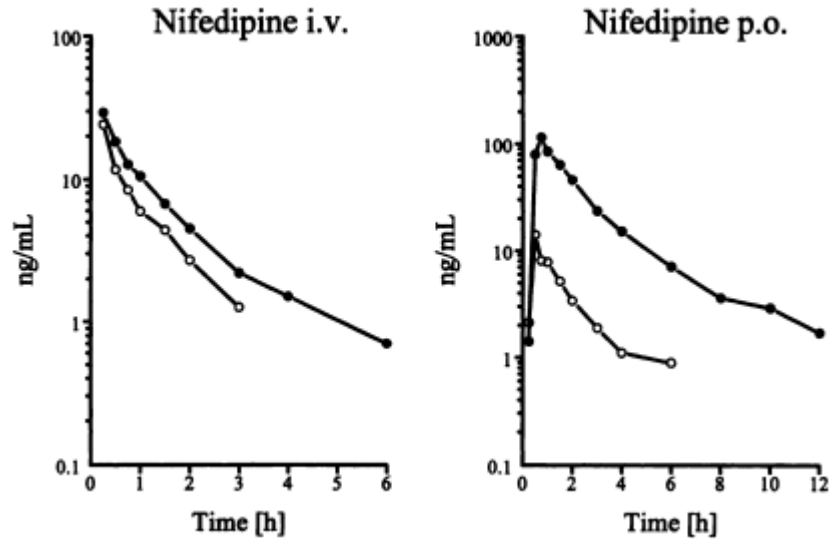


Figura obtenida del artículo: "The nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism" por Holtbecker N et al. *Drug Metab Dispos.* 1996 Oct;24(10):1121-3.

Preguntas:

- En base a las curvas plasmáticas obtenidas deduzca qué tipo de interacción está teniendo lugar. Razona la respuesta.
- ¿Por qué la interacción es más manifiesta cuando se administra por vía oral?
- Suponiendo que la CME para el nifedipino es de 50 ng/ml, razona si dicha interacción presenta relevancia clínica cuando se administra por vía oral y que consecuencia podría tener.

EJERCICIO 3.10. Se ha evaluado el efecto del ketoconazol y de la rifampicina sobre la farmacocinética de GLS4, un nuevo compuesto anti-hepatitis B en perros. A continuación, se muestran los niveles plasmáticos del GLS4 a diferentes tiempos tras tratamiento con ketoconazol y rifampicina, tras la administración de una única dosis de 15 mg/kg.

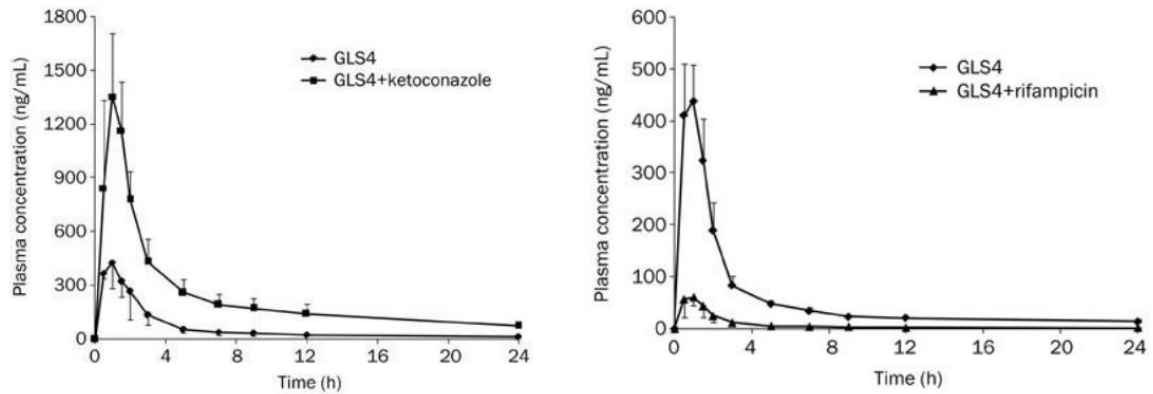


Figura obtenida del artículo: "Effects of ketoconazole and rifampicin on the pharmacokinetics of GLS4, a novel anti-hepatitis B virus compound, in dogs" por Zhou X et al. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013 Nov;34(11):1420-6. DOI: 10.1038/aps.2013.76.

Preguntas:

- Indicar qué tipo de interacción presentan el ketoconazol y la rifampicina frente al GLS4.
- Suponiendo que la CME es de 150 ng/ml y la CMT de 900 ng/ml, razonar si dicha interacción puede tener relevancia clínica.
- En caso de que GLS4 se coadministrara con los siguientes fármacos, señalar qué consecuencia podría tener lugar:
 - Carbamazepina
 - Fenitoína
 - Ritonavir
 - Atorvastatina
 - Hipérico
 - Itraconazol

EJERCICIO 3.11. ENUNCIADO INTRODUCTORIO: El manejo terapéutico de fármacos de estrecho margen terapéutico y cuya eficacia y seguridad puede ser alterada por interacciones farmacológicas y/o por polimorfismos genéticos que introducen una gran variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento, presenta especial dificultad.

Un ejemplo representativo de este tipo de fármacos es el anticoagulante oral **warfarina**. La warfarina actúa inhibiendo a la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKOR), responsable de la síntesis de factores de coagulación dependientes de la vitamina K. La warfarina se presenta como forma racémica de dos enantiómeros, R-warfarina y S-warfarina, siendo esta última la forma activa. La warfarina v.o. se absorbe casi en su totalidad, presentando una biodisponibilidad cercana al 100% y se elimina vía renal previa metabolización de ésta por la isoenzima CYP2C9.

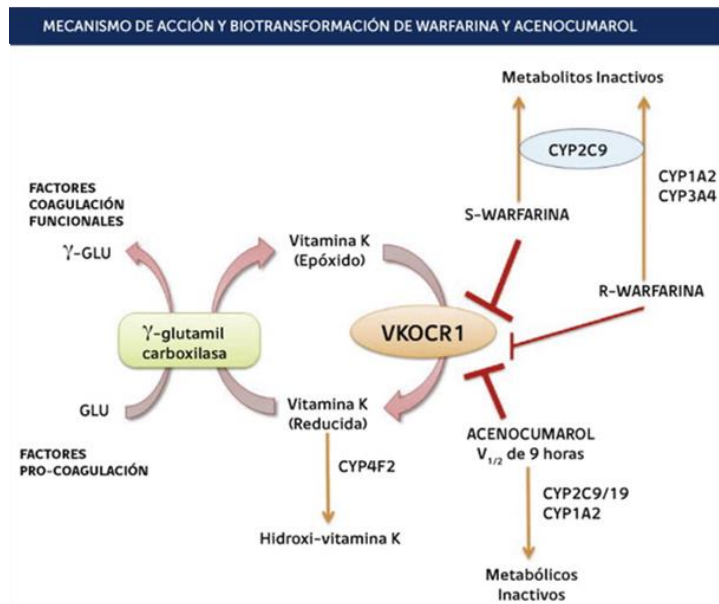


Figura obtenida del artículo: "Farmacogenómica: Aplicaciones cardiovasculares" por Quiñones et al. Revista Médica Clínica Las Condes 2015 26. 198-209. DOI: 10.1016/j.rmclc.2015.04.008.

Ambas enzimas, VKOR y CYP2C9, son susceptibles de ser inducidas e inhibidas por otros fármacos. Más aún, ambas isoenzimas presentan polimorfismos genéticos que resultan en diferentes fenotipos metabolizadores.

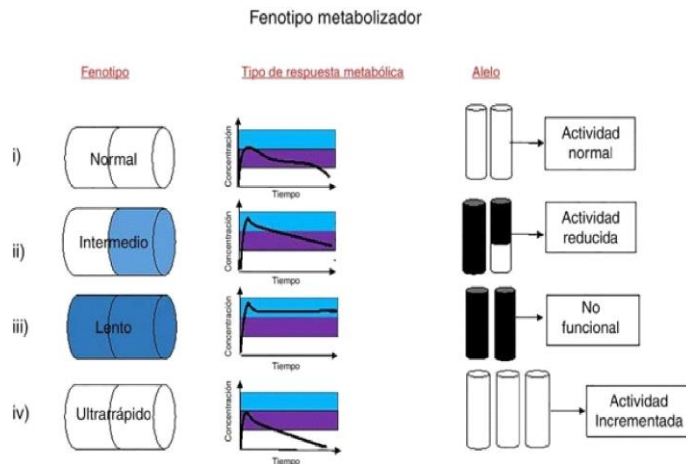


Figura obtenida del artículo: "Aplicación farmacogenómica de los genes CYP2C19, CYP2C9 y VKORC1 implicados en el metabolismo de los fármacos clopidogrel y warfarina" por Vélez Gómez et al. Revista Colombiana de Cardiología 2018 25 (6). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2018.05.005>

Polimorfismos genéticos y fenotipos metabolizadores del CYP2C9

- Los pacientes con los alelos salvajes (CYP2C9*1/*1) tienen una **actividad del CYP2C9 del 100%**.
- Pacientes con una copia del CYP2C9*2 (CYP2C9*1/*2) son **metabolizadores lentos** de la S-warfarina (reducción de la actividad del 30%).
- Pacientes con:
 - CYP2C9*2/*2
 - CYP2C9*2/*3
 - CYP2C9*2/*5
 - CYP2C9*2/*6

son **metabolizadores muy lentos** (reducción de la actividad del 95%; **fenotipo metabolizador pobre (PM)**).

*Estos polimorfismos determinan el **fenotipo metabolizador**. Los portadores de estos alelos lentos o muy lentos requieren dosis más bajas de warfarina para lograr la anticoagulación. A dosis "normales" o "altas", están expuestos a un mayor **riesgo de accidentes hemorrágicos durante el tratamiento**.*

Polimorfismos genéticos y fenotipos metabolizadores del VKOR

VKORC1 son las siglas de Vitamina K epóxido reductasa, gen del complejo 1. La warfarina inhibe el producto de este gen (VKOR), una enzima clave en el ciclo de la vitamina K.

WarfarinDosing.org adapta la dosis estimada a un polimorfismos de nucleótido único (SNP) promotor (a menudo llamado 3673), que se encuentra a -1639 pares de bases

de nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de ATG en el gen VKORC1 (**VKORC1-1639/3673**).

- Los pacientes que tienen el genotipo AA (o haplotipo AA) son los más sensibles a la warfarina y, por lo tanto, a menudo requieren **dosis más bajas de warfarina**.
- Los pacientes que tienen el genotipo AG (o haplotipo AG) son menos sensibles a la warfarina y, por lo tanto, a menudo requieren **dosis intermedias de warfarina**.
- Los pacientes que tienen el genotipo GG (o haplotipo AG) son los menos sensibles a la warfarina y, por lo tanto, a menudo requieren **dosis más altas de warfarina**.

APARTADOS PARA RESOLVER

A través de los enlaces proporcionados se puede acceder a algoritmos diseñados para calcular la dosis de warfarina recomendada en base a las características fisiológicas y genéticas del paciente, así como en base a los tratamientos farmacológicos de éste.

<http://www.warfarindosing.org/Source/Home.aspx>

https://cpicpgx.org/content/guideline/publication/warfarin/2011/IWPC_dose_calculator.xls

Partiendo de un paciente base con las siguientes características (*edad: 75 años, altura: 175 cm y peso: 75 Kg*), modifique las características genéticas del paciente siguiendo las instrucciones de la tabla y anote la dosis recomendada que obtiene en cada caso.

Genotipo VKORC1	Genotipo CYP2C9	Grupo racial
A/A	*1/*1	Asiático
A/G	*1/*2	Africano / Raza Negra
GG	*1/*3	Caucásico / Blanco
Desconocido	*1/*1	Desconocido / Mixto
	*2/*2	
	*2/*3	
	*3/*3	
	Desconocido	

- Explique breve y razonadamente por qué la dosis recomendada aumenta o disminuye en cada caso.
- Explique razonadamente qué ocurriría si el paciente está además en tratamiento con fármacos inductores del CYP2C9. Haga el cálculo de la dosis de warfarina introduciendo esta variable en la calculadora.

- c) ¿Qué ocurriría si el paciente está además en tratamiento con **amiodarona**? Haga el cálculo de la dosis de warfarina introduciendo esta variable en la calculadora. Revise la ficha técnica de la amiodarona y razone su respuesta.

EJERCICIO 3.12. Un fármaco se elimina en su totalidad por metabolización hepática mediante la acción del citocromo CYP2D6. Indica lo que ocurriría en los siguientes casos, suponiendo que presenta un estrecho margen terapéutico:

1. El paciente presenta insuficiencia hepática.
2. El paciente presenta insuficiencia renal.
3. El paciente tiene múltiples copias del gen codificante del CYP2D6.
4. El paciente tiene fenotipo metabolizador lento.
5. El paciente toma la medicación con zumo de pomelo.
6. El paciente está bajo tratamiento con antidepresivos ISRS.
7. Se trata de una mujer diagnosticada de cáncer de mama y que está tomando tamoxifeno.



PRÁCTICA 6

DISEÑO, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE UN ENSAYO CLÍNICO

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE Y DE ADQUISIÓN DE COMPETENCIAS QUE SERÁN EVALUADAS

- Conocer las diferentes fases de los ensayos clínicos y sus principales objetivos.
- Identificar los tipos de diseños experimentales, ventajas e inconvenientes.
- Conocer la importancia y necesidad de realizar análisis estadísticos.
- Representar gráficamente, interpretar y discutir de forma crítica el ensayo clínico y los resultados obtenidos, en base a los resultados de los análisis estadísticos, en el contexto de eficacia y seguridad.
- Conocer la utilidad y relevancia clínica de los fármacos estudiados.
- *De manera transversal aprender a utilizar el programa estadístico Sigmaplot y el programa Excel como hoja de cálculo y herramienta de representaciones gráficas.*

EJERCICIOS

EJERCICIO 6.1. ENSAYO CLÍNICO: FÁRMACOS BRONCODILATADORES

ENUNCIADO: En esta práctica se compara el efecto sobre la función pulmonar de la administración, una vez al día, de **bromuro de glicopirronio** frente a la asociación medicamentosa de **bromuro de glicopirronio/maleato de indacaterol**. Para ello se realiza un estudio prospectivo, multicéntrico, de 12 semanas de duración (más 30 días de seguimiento de la seguridad), aleatorio abierto para evaluar la eficacia y la seguridad del bromuro de glicopirronio (50 microgramos) frente a la combinación de maleato de indacaterol y bromuro de glicopirronio a dosis fija (110/50 microgramos respectivamente) en el que se evalúa la eficacia y seguridad, en relación con los síntomas y el estado de salud en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica moderada (EPOC). Cada grupo experimental consta de 200 pacientes.

El principal objetivo de este estudio es evaluar la eficacia y seguridad de ambos tratamientos en pacientes con EPOC moderada. La eficacia de ambos tratamientos se evalúa frente a **placebo**. La mejora en la función pulmonar se evalúa mediante una prueba denominada "volumen espiratorio forzado en 1 segundo" (FEV1, volumen total de aire que un paciente puede expirar en el primer segundo).

Se dispone de datos de FEV1 (variable cuantitativa, continua) así como de la frecuencia de aparición de las posibles siguientes RAMs (variables categóricas): hiperglucemia, insomnio, glaucoma, taquicardia, sequedad bucal, diarreas y vómitos, temblor muscular, retención urinaria y edema periférico.

El archivo Excel con los datos de este ejercicio está disponible en el Campus Virtual (PRÁCTICA 6_DATOS ENSAYO CLÍNICO EPOC)

APARTADOS PARA RESOLVER:

- 1) ¿A qué fase pertenece este ensayo clínico?
- 2) ¿Cuál es el principal objetivo de este tipo de ensayos?
- 3) Defina placebo y efecto placebo y explique por qué se incluye un grupo placebo.
 - a) Comente las dificultades éticas que la inclusión de un grupo placebo puede suponer teniendo en cuenta que todos los sujetos que han participado en el ensayo padecen EPOC.
- 4) Realice los análisis estadísticos de los datos mediante el uso del programa Sigmaplot.
- 5) Represente gráficamente los resultados mediante gráficas de barras que representen el valor de la media \pm error estándar de la media ($X \pm SEM$) e indicando con símbolos o letras las diferencias estadísticamente significativas (Utilice Excel).

- 6) Discuta los resultados en términos de eficacia y de seguridad comentando las posibles ventajas e inconvenientes asociadas a cada tratamiento farmacológico.
- 7) Consulte las fichas técnicas de los fármacos estudiados e indique el mecanismo de acción explicando razonadamente a qué se pueden deber las RAMs que han aparecido en cada tratamiento, indicando el mecanismo de acción que subyace a la RAM.

EJERCICIO 6.2.

ENSAYO CLÍNICO: FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

ENUNCIADO: Se realiza un ensayo clínico con dos fármacos, el **enalapril** y el **atenolol**, en sujetos voluntarios hipertensos. En el ensayo se incluye también un grupo control al que se le administra un placebo. En el ensayo participan 1125 pacientes hipertensos que se distribuyen aleatoriamente en 3 grupos:

- 1) Grupo control placebo (n= 375)
- 2) Grupos de intervención atenolol (n= 375)
- 3) Grupo intervención enalapril (n = 375).

Los sujetos que participan en el ensayo desconocen a qué grupo han sido asignados y todos ellos han dado su consentimiento informado antes de iniciar el ensayo. El personal médico implicado en el ensayo también desconoce a qué grupo ha sido asignado cada sujeto. Las variables se midieron tras 2 semanas de tratamiento y de nuevo a las 4 semanas:

- 1) Las variables cuantitativas continuas estudiadas fueron:
 - a) Presión arterial sistólica (PAs)
 - b) Presión arterial diastólica (PAd)
 - c) Frecuencia cardíaca (FC)
- 2) Las variables categóricas fueron la frecuencia de aparición de las siguientes RAMs:
 - a) Tos
 - b) Mareo o debilidad
 - c) Fatigabilidad o falta de energía
 - d) Alteraciones del sueño
 - e) Extremidades frías
 - f) Falta de aliento

Los análisis estadísticos de los resultados

- 1) relacionados con variables continuas (PAs, PAd y FC) se llevaron con un análisis de la varianza (AVOVA) de un factor: "tratamiento". Las diferencias entre tratamientos se consideraron estadísticamente significativas (*) cuando el valor de la $p < 0.05$. Cuando la ANOVA indicó diferencias significativas, se realizó un análisis a posteriori con el Student-Newman Keuls para determinar qué grupo era diferente respecto a otro grupo. La significación estadística se consideró cuando $p < 0.05$.
- 2) relacionados con variables categóricas (RAMs) se llevaron a cabo mediante un análisis de la Chi-cuadrado y de nuevo las diferencias entre tratamientos se consideraron estadísticamente significativas (*) cuando el valor de la $p < 0.05$.

Los resultados de los análisis estadísticos de las **VARIABLES CUANTITATIVAS, CONTINUAS**, se muestran a continuación:

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA 2ª SEMANA

One Way Analysis of Variance

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	375	0	153,000	20,000	1,033
Atenolol	375	0	143,000	21,001	1,084
Enalapril	375	0	141,000	16,000	0,826

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	31000,813	15500,407	42,387	<0,001*
Residual	1122	410297,318	365,684		
Total	1124	441298,131			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Placebo vs. Enalapril	12,000	3	12,152	<0,001	Yes*
Placebo vs. Atenolol	10,000	2	10,127	<0,001	Yes*
Atenolol vs. Enalapril	2,000	2	2,025	0,152	No

PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA 2ª SEMANA

One Way Analysis of Variance

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	376	0	101,912	8,171	0,421
Atenolol	376	0	93,907	9,168	0,473
Enalapril	375	0	95,000	9,000	0,465

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	14164,202	7082,101	91,652	<0,001*
Residual	1124	86852,861	77,271		
Total	1126	101017,062			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Placebo vs. Atenolol	8,005	3	17,658	<0,001	Yes*
Placebo vs. Enalapril	6,912	2	15,236	<0,001	Yes*
Enalapril vs. Atenolol	1,093	2	2,41	0,088	No

FRECUENCIA CARDIACA 2ª SEMANA

One Way Analysis of Variance

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	375	0	80,000	12,000	0,620
Atenolol	375	0	67,000	11,500	0,594
Enalapril	375	0	81,000	15,500	0,800

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	45749,880	22874,940	132,867	<0,001*
Residual	1122	193167,886	172,164		
Total	1124	238917,766			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Enalapril vs. Atenolol	14,000	3	20,662	<0,001	Yes*
Enalapril vs. Placebo	1,000	2	1,476	0,297	No
Placebo vs. Atenolol	13,000	2	19,186	<0,001	Yes*

PRESIÓN SISTÓLICA 4ª SEMANA**One Way Analysis of Variance**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	375	0	155,000	20,000	1,033
Atenolol	375	0	142,000	17,000	0,878
Enalapril	375	0	139,000	19,001	0,981

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	54251,920	27125,960	77,499	<0,001*
Residual	1122	392718,345	350,016		
Total	1124	446970,265			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Placebo vs. Enalapril	16,000	3	16,562	<0,001	Yes*
Placebo vs. Atenolol	13,000	2	13,456	<0,001	Yes*
Atenolol vs. Enalapril	3,000	2	3,105	0,028	Yes*

PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA 4ª SEMANA**One Way Analysis of Variance**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	375	0	102,000	7,000	0,361
Atenolol	375	0	95,000	9,999	0,516
Enalapril	375	0	95,000	8,000	0,413

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	12249,627	6124,813	86,270	<0,001*
Residual	1122	79656,961	70,996		
Total	1124	91906,588			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Placebo vs. Enalapril	7,000	3	16,088	<0,001	Yes*
Placebo vs. Atenolol	7,000	2	16,088	<0,001	Yes*
Atenolol vs. Enalapril	0,000	2	0,000	1,000	No

FRECUENCIA CARDIACA 4ª SEMANA**One Way Analysis of Variance**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Placebo	375	0	79,000	11,000	0,568
Atenolol	375	0	66,000	10,500	0,542
Enalapril	375	0	80,000	12,997	0,671

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	45751,580	22875,790	171,496	<0,001*
Residual	1122	149662,829	133,389		
Total	1124	195414,409			

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method):

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
Enalapril vs. Atenolol	14,000	3	23,474	<0,001	Yes*
Enalapril vs. Placebo	0,999	2	1,676	0,236	No
Placebo vs. Atenolol	13,001	2	21,798	<0,001	Yes*

Los resultados de los análisis estadísticos de las **VARIABLES CATEGÓRICAS** se muestran a continuación:

	ATENOLOL	ENALAPRIL
Tos	--	*
Mareo o debilidad	--	*
Fatigabilidad o falta de energía	--	*
Alteraciones del sueño	*	--
Extremidades frías	--	--
Falta de aliento	--	--

APARTADOS PARA RESOLVER:

- 1) ¿Cuáles son las características metodológicas de este ensayo en base a controlabilidad, aleatoriedad, enmascaramiento, diseño paralelo/cruzado, etc.?
- 2) Represente gráficamente los resultados mediante gráficas de barras que representen el valor de la media \pm error estándar de la media ($X \pm SEM$) e indicando con símbolos o letras las diferencias estadísticamente significativas (Utilice Excel).
 - a) Gráfica 1: PAs en placebo, enalapril y atenolol en la 2ª y 4ª semana.
 - b) Gráfica 2: PAd en placebo, enalapril y atenolol en la 2ª y 4ª semana.
 - c) Gráfica 3: FC en placebo, enalapril y atenolol en la 2ª y 4ª semana.
- 3) Discuta los resultados en términos de eficacia antihipertensiva y de seguridad comentando las posibles ventajas e inconvenientes asociadas a cada tratamiento farmacológico.
- 4) Consulte las fichas técnicas de los fármacos estudiados:
 - a) Indique el mecanismo de acción.
 - b) Explique razonadamente a qué se pueden deber las RAMs que han aparecido en cada tratamiento, indicando el mecanismo de acción que subyace a la RAM.