

Grado en Farmacia / Medicina
Universidad de Alcalá

Curso Académico 2018–2019

Apellidos:

Nombre:

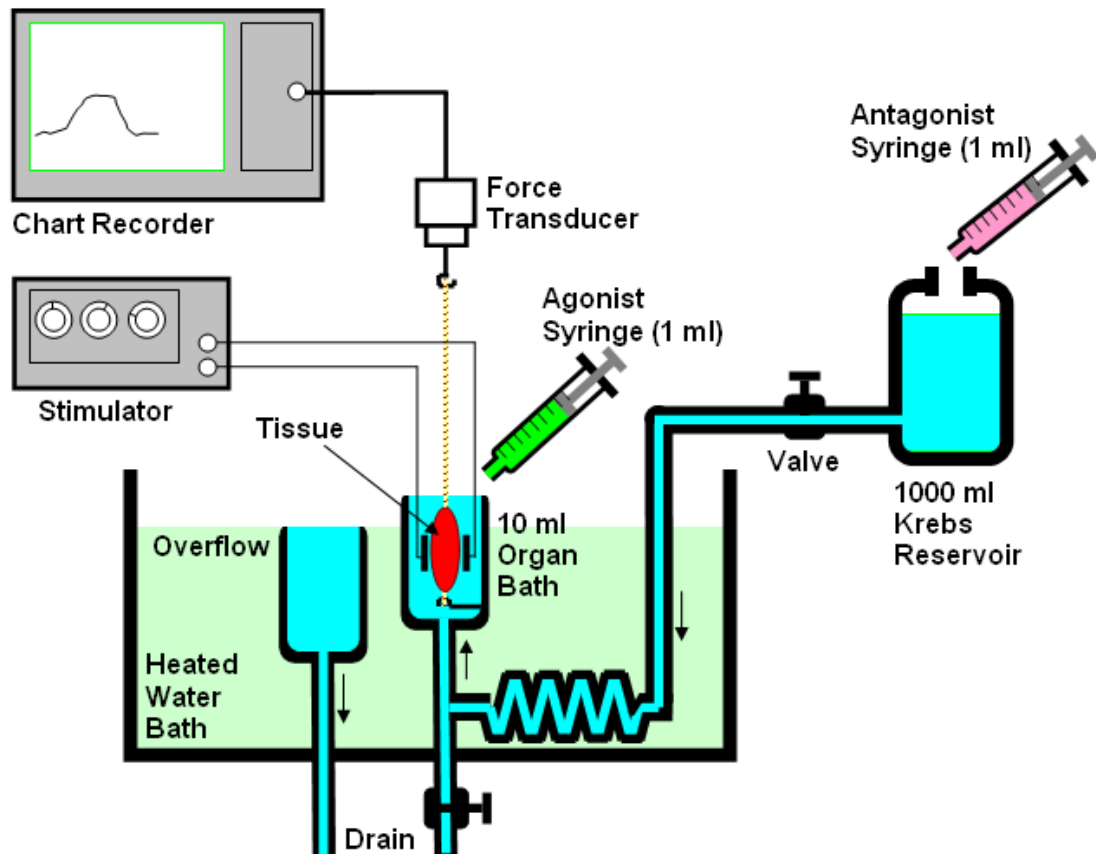
Curso / Facultad:

GUÍA DE PRÁCTICAS DE FARMACOLOGÍA

Dr. Álvaro Cortés Cabrera
Dr. Pedro Alejandro Sánchez Murcia
Prof. Federico Gago Badenas

ORGAN BATH SIMULATIONS

SIMULACIÓN DE EXPERIMENTOS EN BAÑOS DE ÓRGANOS



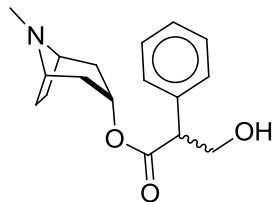
Simulación de íleon de cobaya aislado

El término *simulación* se refiere a la imitación de una cosa o un proceso real. Las técnicas de simulación se emplean en multitud de campos de la tecnología, ingeniería, formación, aprendizaje y educación. En nuestro caso, en esta sesión de prácticas vamos a emplear el programa de simulación de baño de órganos **Virtual Organ Bath** de la Universidad de Strathclyde, que está disponible de forma gratuita en la dirección http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_sims.htm.

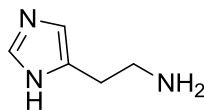
PASOS

1. Vaya al menú de inicio y abra el programa OBSim > OBSim.
2. Una vez abierto el programa de simulación, examine los siguientes apartados:

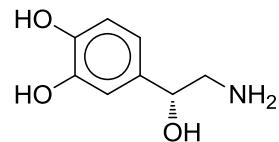
- a. Tipo de tejido (*Tissue type*). Presione **ON** > *New experiment*.
- b. Verá que en los menús que aparecen dos menús de agonistas y antagonistas, en los cuales aparecen diferentes fármacos a distintas concentraciones (nota: no puede añadir más de 1 mL de disolución de fármaco, el volumen para el baño de órganos viene determinado en 10 mL y el volumen de reserva son 1000 mL).



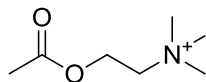
ATROPINA



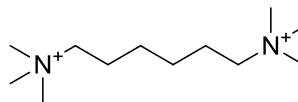
HISTAMINA



NORADRENALINA

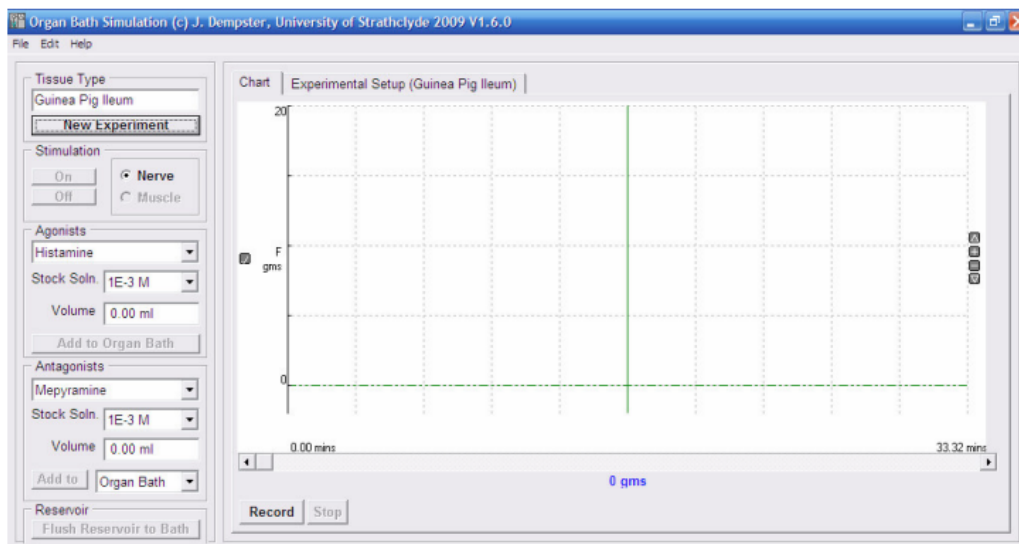


ACETILCOLINA

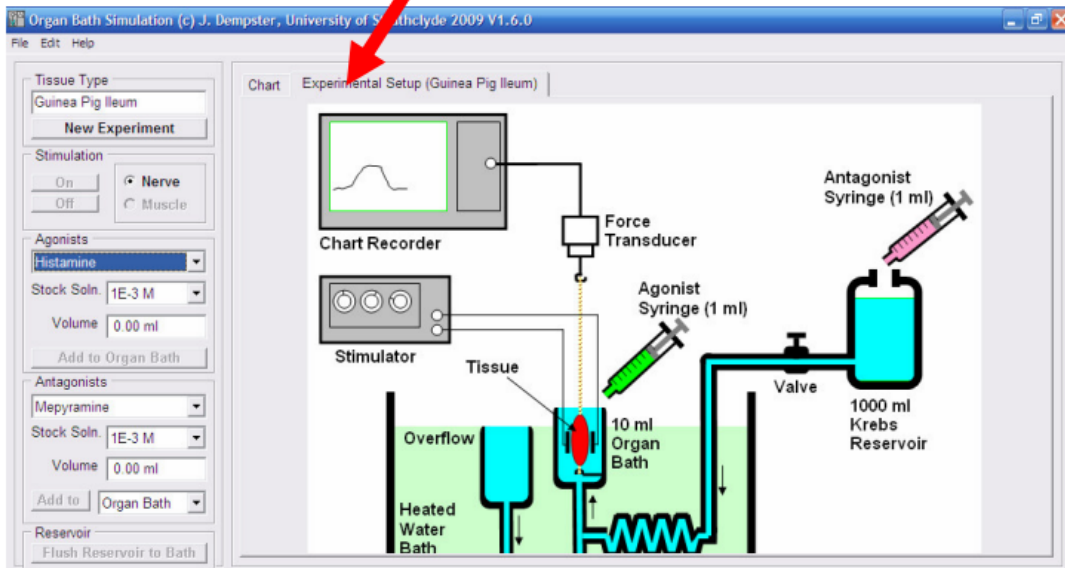


HEXAMETONIO

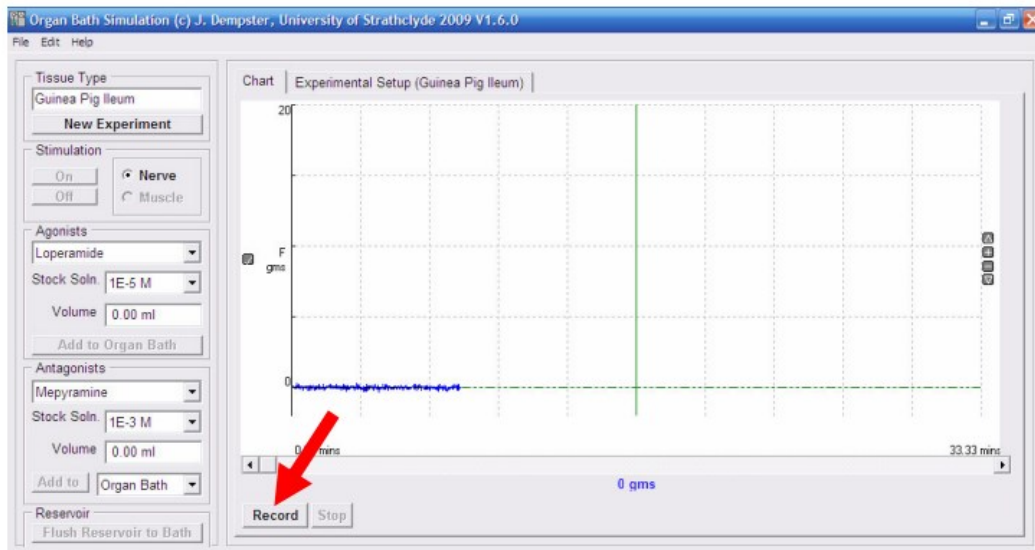
- c. En el eje de las abscisas (X) se representa el tiempo en minutos.
- d. En el eje de las ordenadas (Y) se representa la fuerza de contracción en gramos.



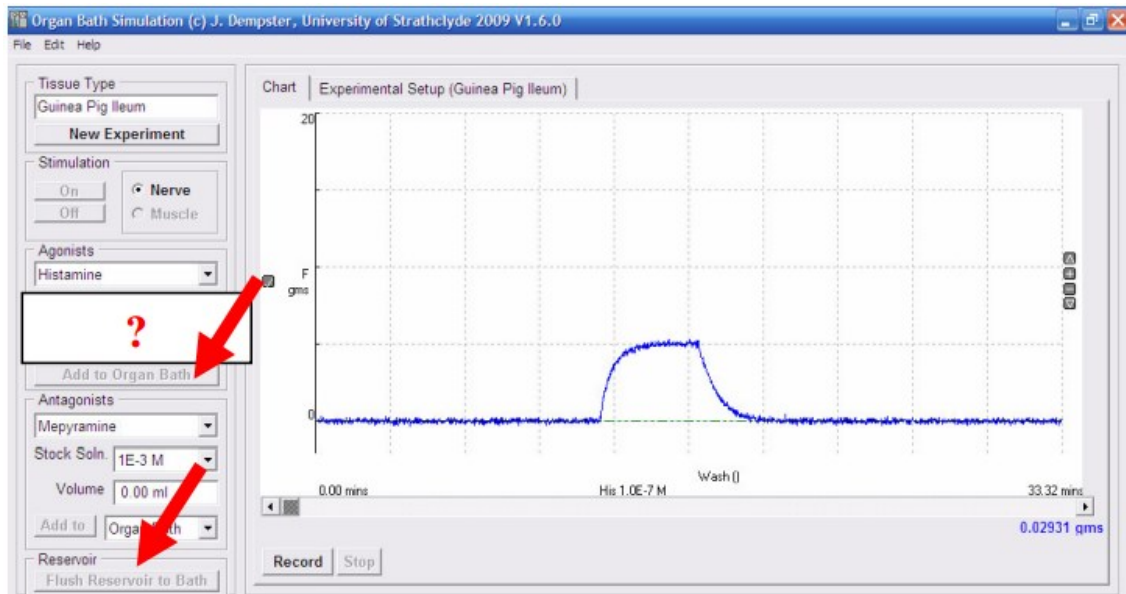
3. Seleccione **íleon de cobaya** como tipo de tejido e **histamina** como agonista. Después presione *Experimental Setup* para ver la representación del montaje experimental.



4. Vuelva a *Chart* y presione ahora *Record* para comenzar el experimento. Compruebe que la línea base está estabilizada.



5. Seleccione el volumen y la concentración *stock* de histamina que desea añadir al baño de órganos con el fin de obtener una concentración final en el baño de órganos de 10^{-9} M (e.g. $1 \text{ mL} \cdot 10^{-8} \text{ M} / 10 \text{ mL}$). Presione entonces *Add to Organ Bath*; **compruebe que la concentración deseada coincide con la que aparece en la parte inferior del registro**. Deje la histamina durante unos 5 s (i.e. ~ 1 división vertical), y presione a continuación *Flush Reservoir to Bath*, con el fin de lavar el órgano y eliminar la histamina. Espere hasta que se recupere la línea base.

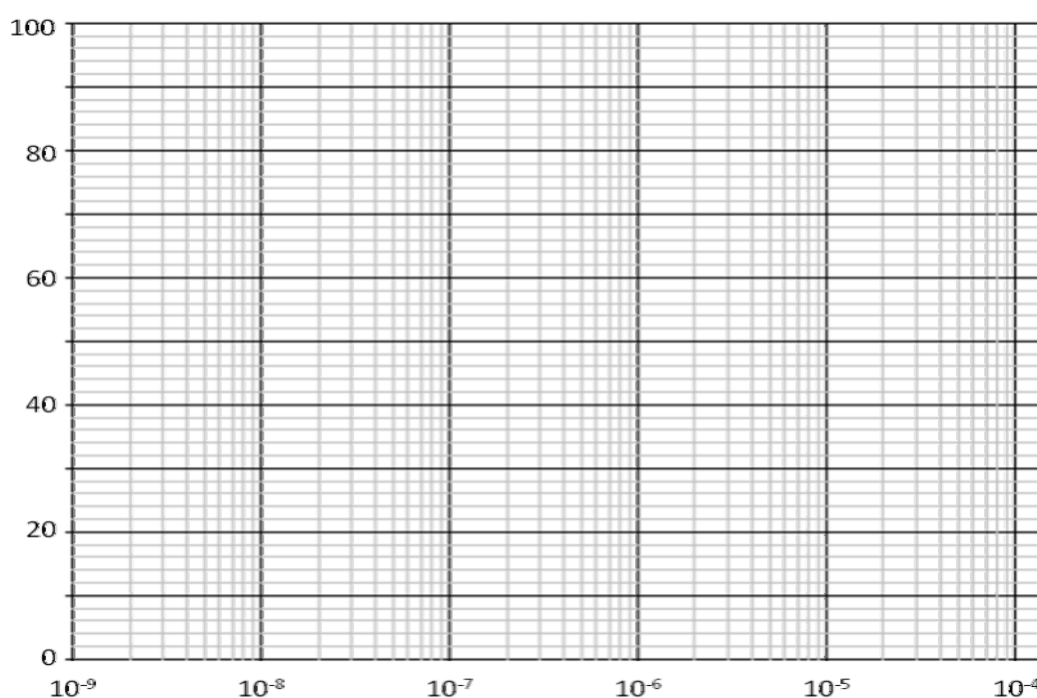


6. Añada dosis crecientes de histamina (2x, 5x, 10x) usando el procedimiento anterior (e.g. $0,2 \text{ mL} \cdot 10^{-7} \text{ M}$; $0,5 \text{ mL} \cdot 10^{-7} \text{ M}$; $0,1 \text{ mL} \cdot 10^{-6} \text{ M}$; etc), dejando 5 s entre cada una de las administraciones ("dosis") y lavando entre ellas. Continúe hasta que se alcance la respuesta máxima ($E_{\text{máx}} = 100\%$ efecto).
7. Para cada concentración de histamina en el baño (que aparece mostrada en la parte inferior del gráfico), mida la fuerza de contracción ("gms") desplazando la línea verde vertical con el botón izquierdo del ratón hasta los puntos deseados. Anote el valor en cada caso.



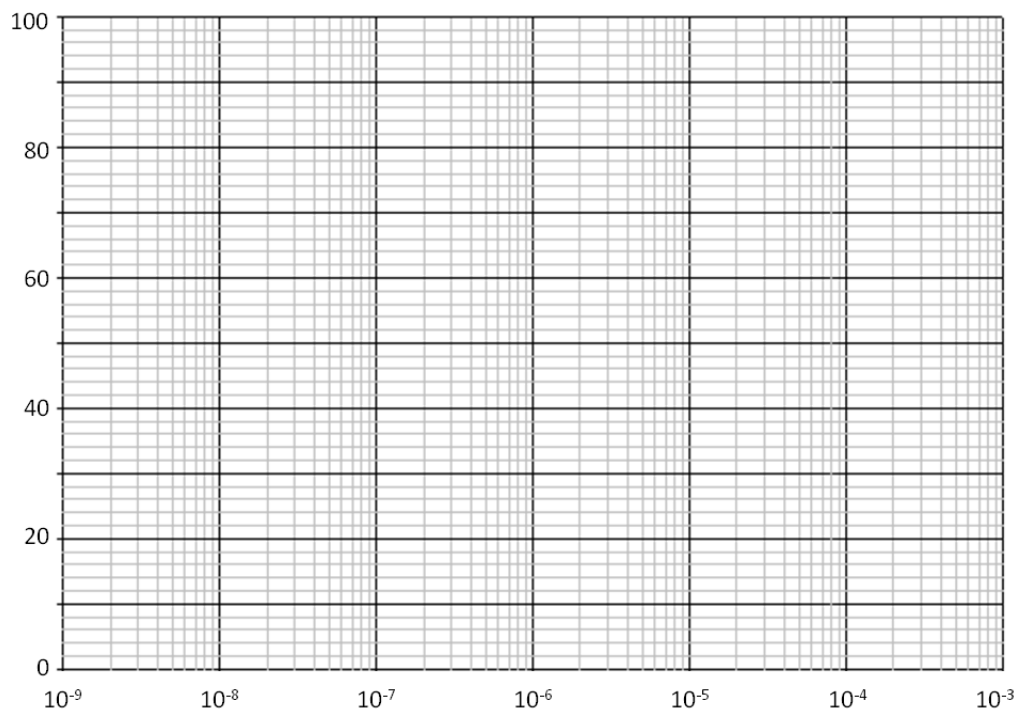
8. Rellene la siguiente tabla y construya finalmente la “curva dosis-respuesta” representando la fuerza de la contracción, expresada como % del efecto máximo, frente al log[histamina] en el baño.

concentración (M)	Respuesta (g)	% E _{máx} (H sola)	Respuesta (g)	% E _{máx} (H + antag.)
1 · 10 ⁻⁹				
5 · 10 ⁻⁹				
1 · 10 ⁻⁸				
2 · 10 ⁻⁸				
5 · 10 ⁻⁸				
1 · 10 ⁻⁷				
2 · 10 ⁻⁷				
5 · 10 ⁻⁷				
1 · 10 ⁻⁶				



9. En un nuevo experimento, utilice ahora la CE₅₀ de histamina obtenida de la gráfica anterior y, sin lavar, añada al baño mepiramina (Mepyramine) para obtener una concentración de 1 nM de este antagonista. Observe el efecto y razone el resultado.
10. Pruebe a añadir concentraciones mayores y menores de agonista y antagonista en este mismo orden. Razone los resultados cualitativos obtenidos.
11. En un nuevo experimento, examine el efecto de invertir el orden de adición de agonista y antagonista. Observe los efectos y razone los resultados cualitativos obtenidos.

12. En una nueva serie de experimentos, añada al reservorio una cantidad de mepiramina tal que dé lugar a una concentración de 10^{-9} M. **Compruebe que la concentración deseada coincide con la que aparece en la parte inferior del registro.** Presione *Flush Reservoir to Bath* y repita los puntos 6–8.
13. Anote los datos en la misma Tabla del punto 8 y represente en la misma gráfica la nueva curva dosis-efecto para la histamina, teniendo en cuenta que necesitará una concentración superior a $1 \cdot 10^{-6}$ M de histamina para obtener el efecto máximo. Compare los resultados y determine la CE_{50} en presencia del antagonista. Calcule la "razón de dosis".



Apellidos / Nombre:

Grado:

Curso:

Grupo Prácticas:

PROBLEMA 1: receptores opioides intestinales

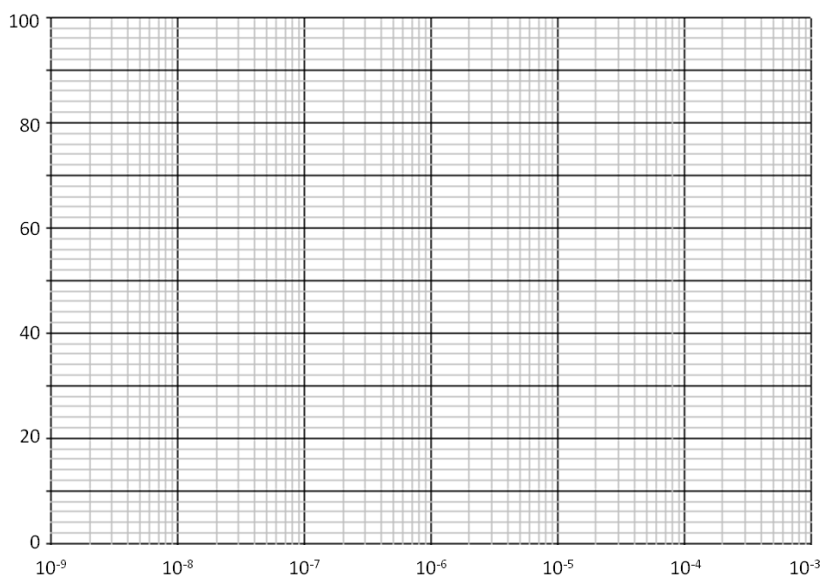
A. (i) Seleccione "**Guinea pig ileum**" como material biológico sometido a estudio. Haga clic en *Record* para comenzar el registro y presione ON en *Stimulation – Nerve*. La estimulación eléctrica manda trenes de ondas cuadradas al plexo mientérico y se produce la contracción de la musculatura lisa intestinal por la acetilcolina liberada por la neurona posganglionar de forma altamente reproducible. Seleccione ahora *Morphine* de la lista de *Agonists*, fije la concentración de la solución madre (*Stock soln.*) en 10^{-6} M y, al cabo de unas 5 contracciones, añada al baño de órganos 0,1 mL de la solución de **Morfina**. Lave el órgano (*Flush Reservoir to Bath*) y, una vez recuperada la contracción máxima, añada 0,2 mL de la misma solución. Lave y repita con 0,5 mL de la misma solución. Anote, en cada caso, **el cambio** en la fuerza de la contracción correspondiente a cada concentración de morfina en el baño (es decir, **la diferencia** entre los valores en ausencia y en presencia de morfina). Vuelva a lavar y repita las administraciones, incrementando progresivamente la concentración en el baño hasta que obtenga el efecto máximo posible ($E_{máx}$). Calcule y represente gráficamente los ($\% E_{máx}$) obtenidos frente a las concentraciones de **Morfina** haciendo uso del papel semilogarítmico (o utilizando Excel). Compare sus resultados con los registros mostrados en la figura de la página 14.

(ii) Lave el órgano (*Flush Reservoir to Bath*) y observe la recuperación de los valores basales.

(iii) Repita el experimento con la concentración de **Morfina** que da lugar al 50% del efecto máximo (CE_{50}) y observe el efecto de añadir al baño de órganos 0,15 mL de una concentración de **Naloxona** (en la lista de *Antagonists*), por ej. 10^{-3} M, sin lavar previamente. Pruebe también con otras concentraciones para comprobar la dependencia de los efectos observados con la "dosis". Invierta el orden de adición de estos dos fármacos y razone el resultado obtenido.

B. (i) En un nuevo experimento, añada al reservorio 1 mL de una solución que contenga 10^{-2} M de **Naloxona**. Presione *Flush Reservoir to Bath* para que la preparación esté en todo momento en presencia de este antagonista y repita el experimento anterior, empezando por una concentración de **Morfina** en el baño de $1 \cdot 10^{-8}$ M y aumentando progresivamente las concentraciones hasta que consiga el $E_{máx}$.

(ii) Compare las gráficas obtenidas para **Morfina**, en presencia y ausencia de **Naloxona**, representando en ordenadas el efecto (como $\% E_{máx}$) y en abscisas el logaritmo de la concentración molar de **Morfina** en el baño (comenzando por 10^{-8} M). Utilice el siguiente papel semilogarítmico y/o una hoja de Excel en su ordenador. Calcule la "razón de dosis".

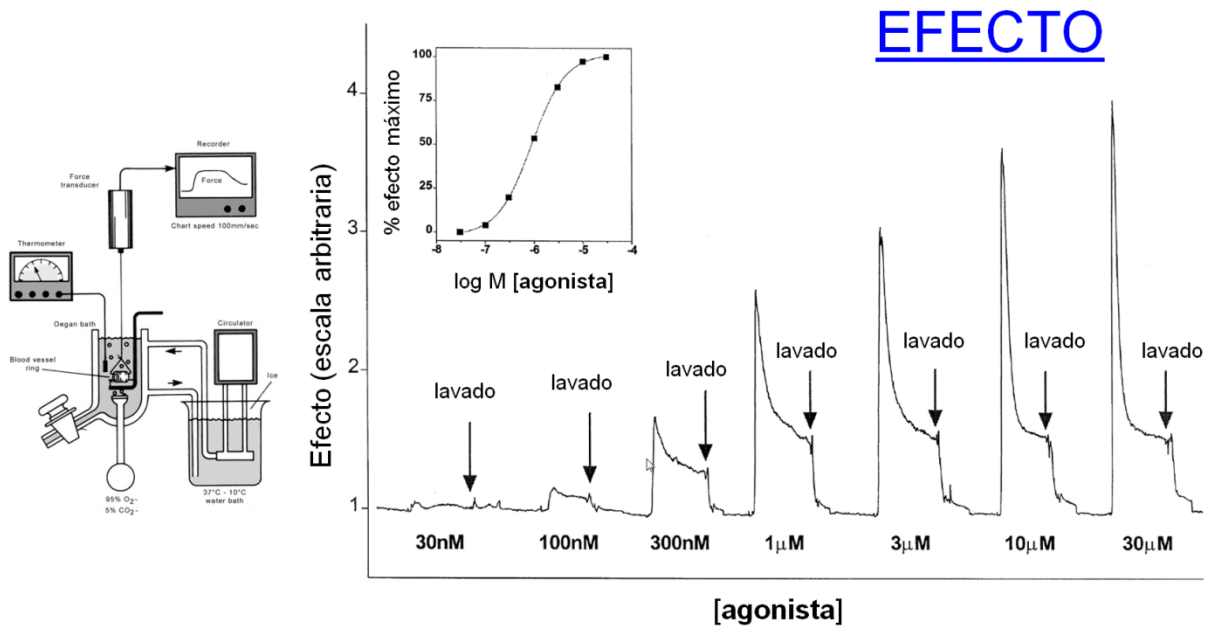


(iii) ¿Qué ocurriría si repite la secuencia de adiciones de **Morfina** realizada en el experimento anterior pero en presencia de una concentración de **Naloxona** en el baño de $5 \cdot 10^{-5}$ M? *Para ello debe calcular primero la dosis que necesita añadir al reservorio mediante un volumen medido con la jeringa.*

(iv) ¿Cómo procedería para calcular el pA_2 (grado de antagonismo) de **Naloxona**?

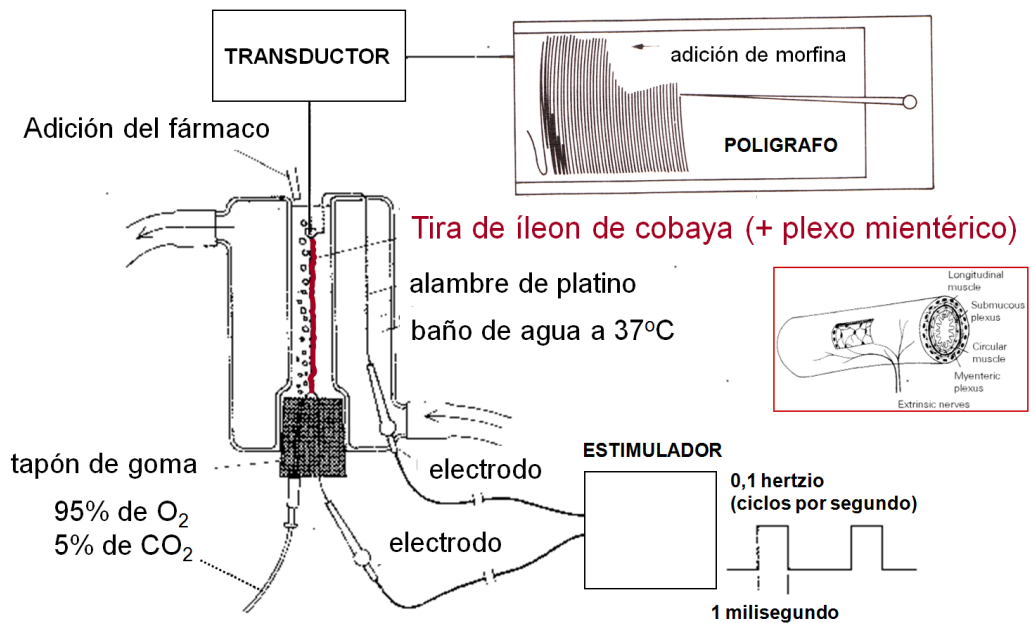
(v) Caracterice en esta misma preparación la acción farmacológica de **Loperamida**.

Recordatorio de las clases teóricas:

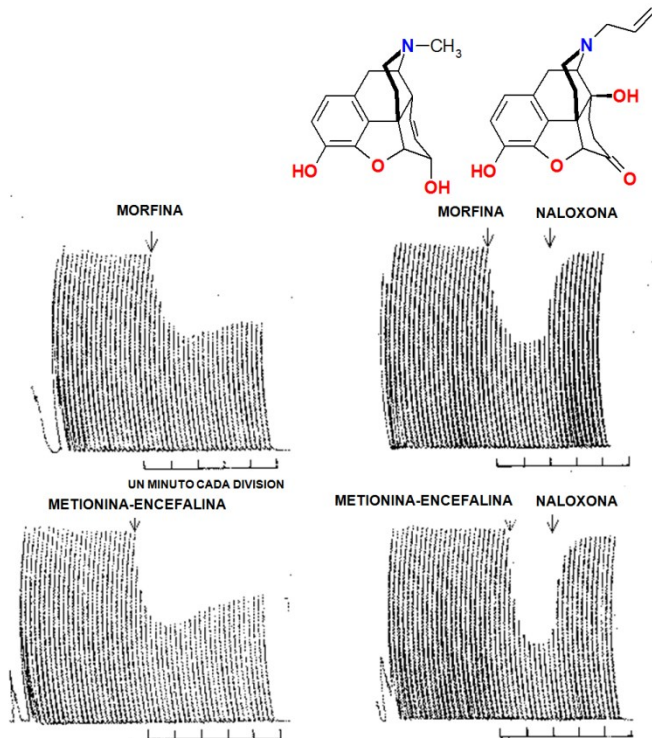


Resultados de un típico experimento farmacológico en el que se mide la dependencia de un efecto biológico (por ejemplo, contracción, secreción, cambios de conductancia a iones, o producción de un segundo mensajero) con la concentración de agonista añadida. Entre adiciones sucesivas de agonista existe 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.

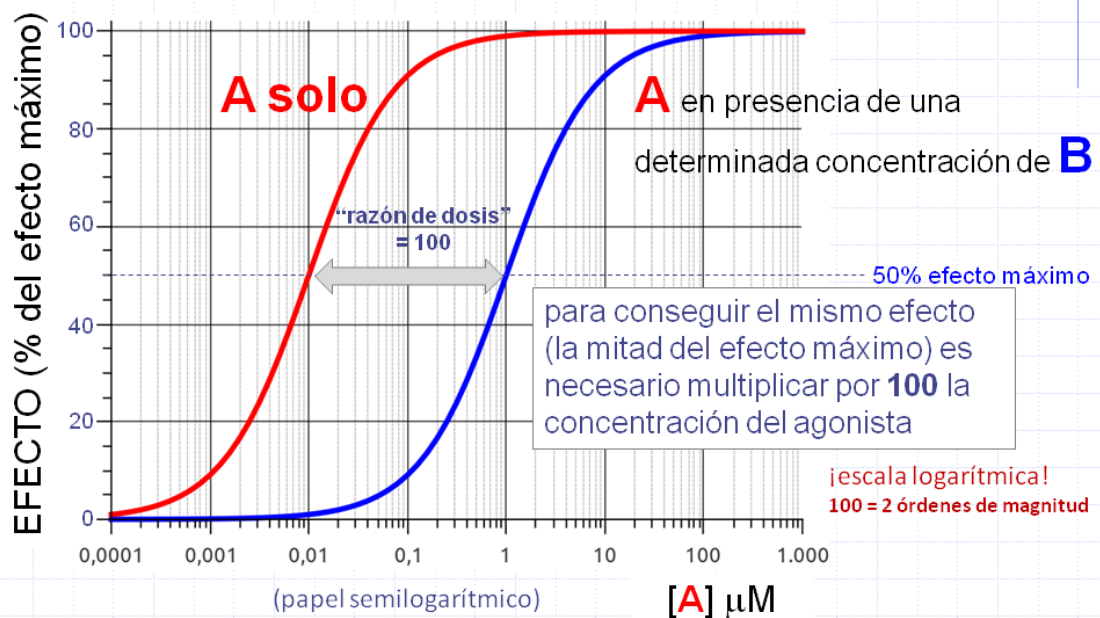
BIOENSAYO



"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)

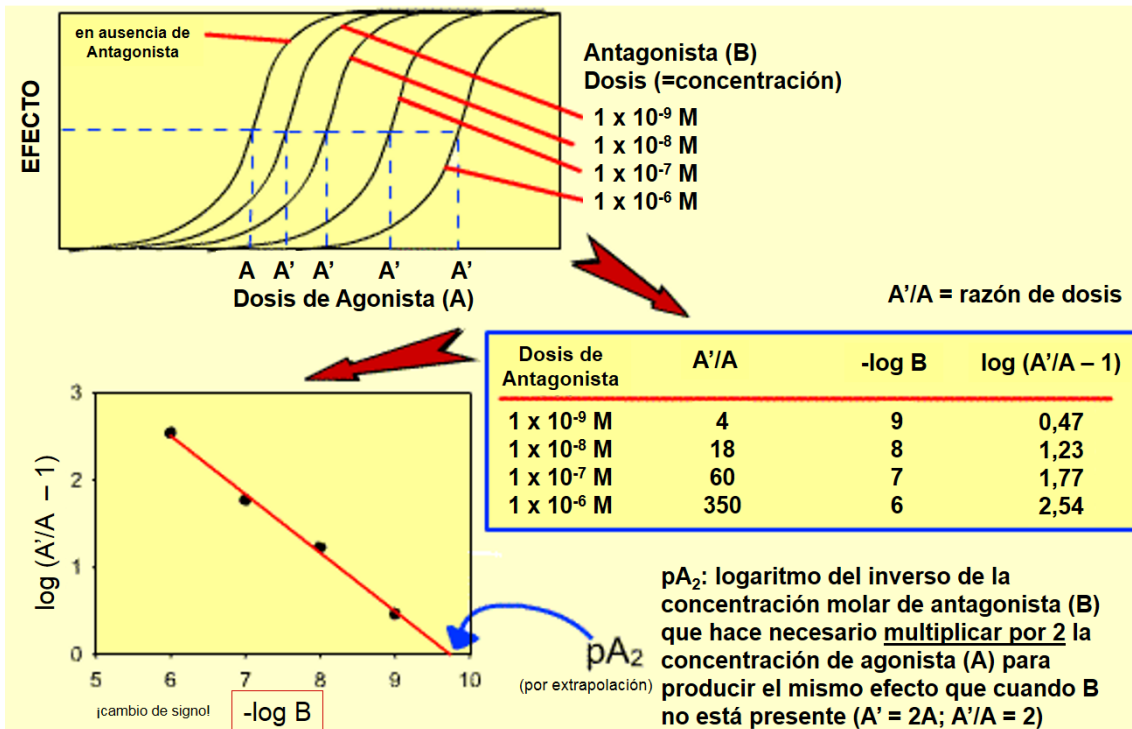


Desplazamiento a la derecha de la curva concentración-efecto de un agonista **A** por parte de un antagonista competitivo reversible **B** ("antagonismo superable")



Trabajo personal: estudie los efectos de *Acetylcholine*, *Carbachol* o *Pilocarpine* como agonistas y *Atropine* como antagonista. Razone los resultados.

OBTENCIÓN DE LA REPRESENTACIÓN DE SCHILD PARA CÁLCULO DEL pA_2

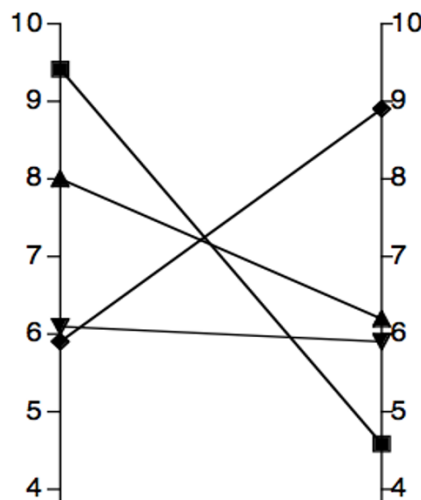


<http://facpub.stjohns.edu/~yoburnb/pages/dictimages/Schild1.html>

Valores de pA_2 de algunos fármacos clínicamente útiles

pA_2 frente a histamina

pA_2 frente a acetilcolina



◆ atropina

▲ difenhidramina

▼ mepiridina (petidina)
(analgésico opioide)

■ mepiramina

