
Nuevos métodos funcionales para el estudio de la interacción fármaco-receptor

M.D. Ivorra y P. D'Ocón

Departamento de Farmacología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Resumen: *El protocolo experimental más utilizado para establecer la potencia funcional de los antagonistas, el descrito por Arunlakshana y Schild, implica la elaboración de curvas concentración-respuesta del agonista en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del antagonista. Este método requiere utilizar un gran número de animales de experimentación, junto con una gran dedicación de tiempo por parte del investigador para realizar los experimentos y el cálculo de los resultados. Por ello, planteamos un método que, de forma más sencilla y rápida, nos permita determinar la potencia de los antagonistas. Basándonos en la capacidad del antagonista competitivo para revertir la acción del agonista, en el método propuesto el antagonista se añade en concentraciones acumulativas crecientes después de haber dejado actuar al agonista a concentraciones máximas. Se elaboran curvas concentración-“respuesta” del antagonista y a partir de ellas se calcula el valor de pCI_{50} (log negativo de la concentración de antagonista que produce el 50% de inhibición del efecto del agonista), que define la potencia del antagonista, y la pendiente (p) que nos indica el tipo de interacción. Comparando ambos métodos se demuestra que existe una equivalencia entre los valores de pCI_{50} y pA_2/pK_B . Se destaca la utilidad del nuevo método para caracterizar la población de receptores presentes en un territorio, evidenciar variaciones en la funcionalidad de los receptores en diferentes enfermedades y caracterizar nuevos compuestos selectivos de dichos receptores.*

Palabras clave: Interacción fármaco-receptor – Potencia de antagonistas – Método de Schild – Adrenoceptores α_1 – Adrenoceptores β .

Introducción

La caracterización farmacológica de la interacción ligando-receptor incluye la determinación de la “afinidad” del ligando por el receptor, parámetro que se obtiene mediante estudios de unión de radioligandos, y la determinación de la “potencia” del ligando, para lo que se realizan estudios funcionales en los que, además de definir la actuación del ligando como “agonista” o “antagonista”, se calcula un parámetro que nos permita dar una medida matemática de dicha potencia. En el

caso de los agonistas, este parámetro es el pD_2 o pCE_{50} , definido como el logaritmo negativo de la concentración de agonista capaz de producir el 50% de la respuesta máxima. Para determinarlo, se elaboran curvas concentración-respuesta (CCR) con dosis acumulativas del agonista, crecientes en progresión geométrica. El ajuste matemático de la sigmoidea obtenida cuando se hace la transformación logarítmica de la concentración nos permite el cálculo de la pCE_{50} (Fig. 1A). El método más utilizado para establecer la potencia de un antagonista es el descrito por Arunlakshana y

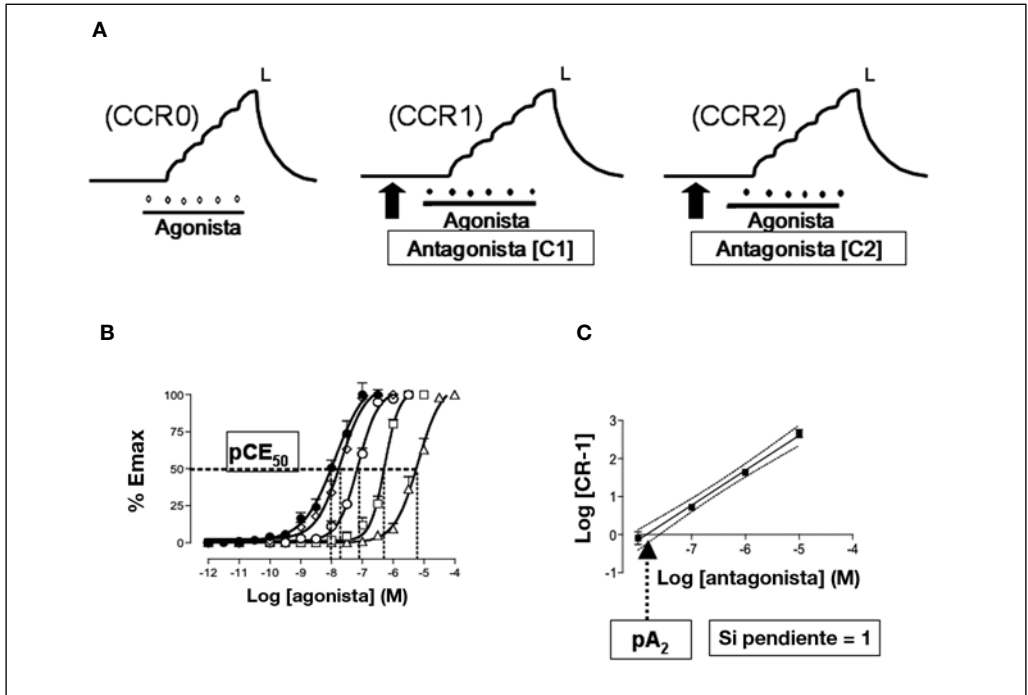


Figura 1. Esquema representativo del método de Schild. (A) Protocolo experimental que consiste en la realización de curvas concentración-respuesta (CCR) del agonista en ausencia (0) y presencia (1, 2...) de distintas concentraciones del antagonista (C1, C2...). (B) Representación gráfica de las CCR obtenidas y cálculo de la pCE_{50} después de realizar su ajuste a una sigmoidea. (C) Representación gráfica de la recta de Schild para el cálculo del pA_2 .

Schild,¹ que implica la elaboración de curvas CCR del agonista en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del antagonista (Fig. 1B). A partir de estas curvas se calcula la CE_{50} del agonista en ausencia y en presencia de las distintas concentraciones del antagonista, y con ellas se determina la razón de concentraciones:

$$CR = \frac{CE_{50} \text{ en presencia de antagonista}}{CE_{50} \text{ en ausencia de antagonista}}$$

La recta dada por la ecuación $\log (CR-1) = \log [B] - \log K_B$ se denomina recta de Schild (Fig. 1C), y en ella [B] es la concentración de antagonista empleada y el término pK_B coincide con el valor de $-\log [B]$ cuando CR es igual a 2. Esta recta permite determinar la naturaleza competitiva del antagonismo (si

tiene una pendiente cercana a la unidad) y calcular la potencia del antagonista al obtener una estimación funcional de la constante de afinidad del antagonista por el receptor: $-\log K_B = (pK_B)$, que representa la intersección de la recta de Schild con el eje de abscisas. Cuando la pendiente de la recta es la unidad, este valor de pK_B corresponde al valor de pA_2 , parámetro empírico que utilizamos para definir la potencia del antagonista.

Según el método de Arunlakshana y Schild,¹ para poder determinar la potencia, expresada como pA_2 , es necesario realizar diferentes CCR del agonista en ausencia y en presencia de al menos tres o cuatro concentraciones de antagonista, lo cual, si se realiza en un único experimento, supone una gran inversión de tiempo. Si además tenemos en cuenta los fenómenos de sensibilización o taquifilaxia de los recep-

tores, en muchas ocasiones resulta necesario utilizar diferentes muestras biológicas para realizar cada una de las CCR, lo que a su vez implica la utilización de un elevado número de animales de experimentación. A todo ello hay que añadir el tiempo que posteriormente se emplea para la medida de las curvas y su análisis matemático. Este alto coste en tiempo y animales es especialmente relevante cuando se realizan experimentos de cribado de nuevos productos, cuando se quiere caracterizar la población de receptores funcionalmente activa en diferentes territorios y cuando se

quieren analizar cambios en la funcionalidad de los receptores derivados de una situación patológica, especialmente si estos cambios se van a analizar en muestras humanas.

Para simplificar esta cuestión en los estudios funcionales en baño de órganos, planteamos un nuevo método que nos permite determinar la potencia de un antagonista mediante un desarrollo experimental más sencillo y rápido que el descrito, y que supone, además, una considerable reducción en el número de muestras a utilizar. El esquema del protocolo utilizado para este nuevo método se mues-

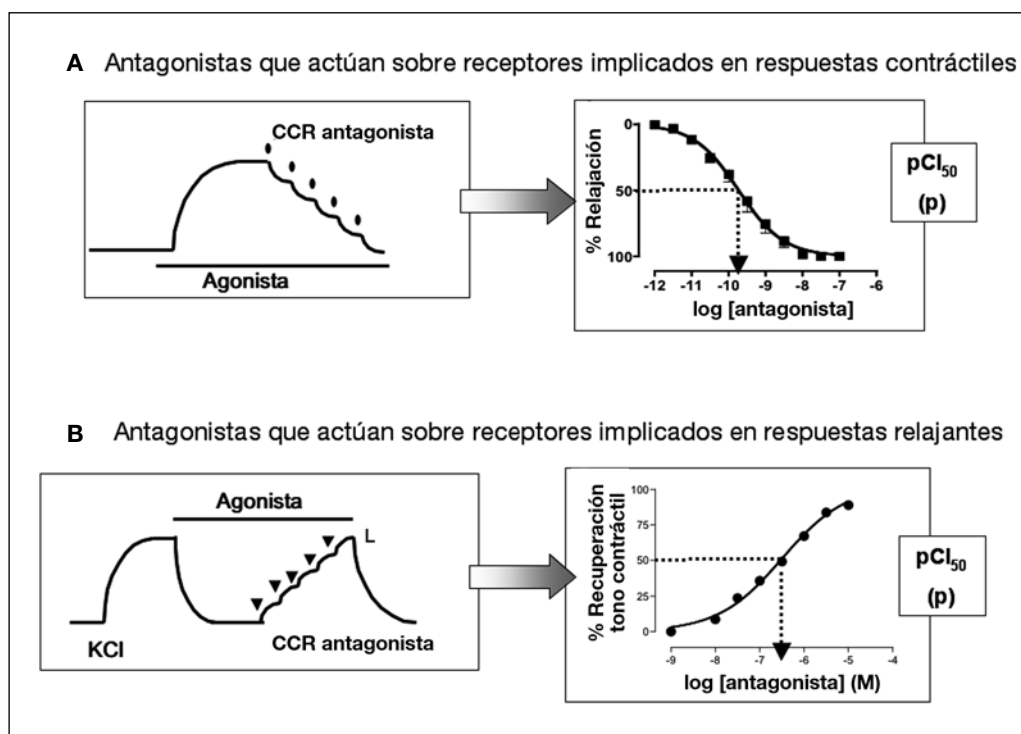


Figura 2. Esquema representativo del nuevo método propuesto en dos situaciones experimentales distintas. (A) Antagonistas que actúan sobre receptores implicados en respuestas contráctiles. Sobre la meseta estable de contracción inducida por el agonista, se añaden concentraciones acumulativas crecientes del antagonista, lo que origina una inhibición del tono contráctil dependiente de la concentración. Se construye la CCR y se realiza el ajuste a una sigmoidea, calculando la pCI₅₀ y la pendiente (p). (B) Antagonistas que actúan sobre los receptores implicados en las respuestas relajantes. Sobre un tono contráctil estable obtenido por despolarización de la membrana se añade el agonista hasta inhibir completamente dicho tono. A continuación, y en presencia del agonista, se realiza la adición de concentraciones acumulativas crecientes del antagonista que, al revertir la acción del agonista, da lugar a recuperaciones del tono contráctil previo dependientes de la concentración. Como en el caso anterior, se realiza la CCR y se calculan la pCI₅₀ y la pendiente (p).

tra en la Fig. 2, y aunque conceptualmente se basa en el mismo principio, la capacidad del antagonista para revertir la acción del agonista, técnicamente exige un protocolo experimental diferente según se trate de sistemas receptores que median respuestas contráctiles (Fig. 2A) o relajantes (Fig. 2B). En ambos casos, la principal diferencia es el nuevo método y el tradicional de Schild estriba en el agente con que se elaboran las CCR y en el orden en que se añaden agonista y antagonista. En el método de Schild, el antagonista se añade antes que el agonista y las CCR siempre se elaboran con el agonista. En el nuevo método, el antagonista se añade después de haber obtenido una respuesta máxima y sostenida del agonista, y la CCR se elabora con el antagonista. Cuando el agonista induce una respuesta contráctil (Fig. 2A), sobre la meseta estable de contracción se añaden concentraciones acumulativas crecientes del antagonista, obteniéndose una CCR de relajación. Cuando el agonista induce una respuesta relajante, el protocolo es algo más complejo (Fig. 2B) porque es necesario establecer un tono contráctil previo, por ejemplo por despolarización con KCl, para inducir, sobre este tono, una relajación máxima con el agonista y a continuación añadir concentraciones acumulativas crecientes del antagonista tratando de revertir esa relajación y recuperar el tono inicial.

El objetivo del presente trabajo es demostrar que con este método podemos obtener unos parámetros equivalentes a los del método clásico de Schild: pCI_{50} (log negativo de la concentración de antagonista que produce el 50% de inhibición del efecto del agonista) equivalente al pA_2 y pendiente (p) de la CCR del antagonista equivalente a la pendiente de la recta de Schild. El cálculo de ambos parámetros se realiza a partir del ajuste matemático de la CCR del antagonista.

Material y métodos

Para la puesta a punto del nuevo método hemos caracterizado la población de adrenoceptores (AR) α_1 y β presente en diferentes te-

rritorios de rata, como preparaciones de vasos (arteria caudal, aorta) y tejido intestinal (colon, íleon) ricos en AR α_1 y β_3 , respectivamente.²⁻⁸

El aislamiento de los tejidos y su montaje se realizaron según el protocolo descrito en la bibliografía,⁹⁻¹¹ y el desarrollo experimental se detalla en la Fig. 2. La activación de los AR α_1 con una concentración de noradrenalina capaz de inducir la respuesta máxima (10^{-6} - 10^{-5} M según los territorios) da lugar a una respuesta contráctil sostenida durante periodos de tiempo prolongados (Fig. 2A), mientras que la activación de los AR β se pone de manifiesto por la relajación observada tras la adición de los agonistas (isoprenalina 10^{-6} M o SR 58611A 10^{-6} M) sobre el tono contráctil previo y estable obtenido con solución despolarizante (Fig. 2B). Para calcular la potencia de los antagonistas según este nuevo método, se añaden concentraciones acumulativas crecientes de cada compuesto tras la máxima contracción (en el caso de los AR α_1 , Fig. 2A) o relajación (en el caso de los AR β , Fig. 2B) obtenidas con el agonista adrenérgico correspondiente. Es importante determinar adecuadamente el intervalo de concentraciones a utilizar, de manera que incluya desde concentraciones que no revierten la actividad del agonista hasta las que dan lugar a la inhibición completa de su acción. La adición de concentraciones crecientes de los antagonistas α_1 da lugar a una relajación dependiente de la concentración (Fig. 2A), mientras que la adición de los antagonistas β da lugar a incrementos en el tono contráctil proporcionales a la concentración añadida, llegando a revertir totalmente la relajación inducida por el agonista β -adrenérgico. Las CCR de relajación o de recuperación del tono contráctil obtenidas con los antagonistas se ajustan a una sigmoidea (GraphPad Software, San Diego, CA) y se calcula el valor de la pCI_{50} . Este parámetro, que se ha utilizado como indicativo de la potencia de los distintos antagonistas, se correlaciona con los valores de pA_2 o pK_B determinados para los diferentes antagonistas según el método clásico de Schild. Otro parámetro que se obtiene a partir de las CCR de los antagonistas es la pendiente de la curva (p), y si ésta es significativamen-

te menor que la unidad se ha determinado la significación estadística del ajuste de la curva a uno o a dos sitios de unión (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados y discusión

Validación del método propuesto

Los antagonistas selectivos α_1 , prazosina, BMY 7378 (α_{1D} -selectivo) y 5-metilurapidilo (α_{1A} -selectivo), relajan de forma dependiente

de la concentración la contracción máxima inducida por noradrenalina en la arteria caudal (Fig. 3A), obteniéndose unos valores de pCI_{50} (Fig. 3B) que coinciden con los valores de pK_B determinados para estos mismos antagonistas según el método de Schild (Fig. 3C) y con los valores de pA_2 determinados por otros autores.¹⁰ Resultados semejantes se obtienen en la aorta.¹⁰ La pendiente de las CCR nos aporta información adicional. Observamos que es próxima a la unidad en las CCR de la prazosina y el BMY 7378, pero significativamente menor

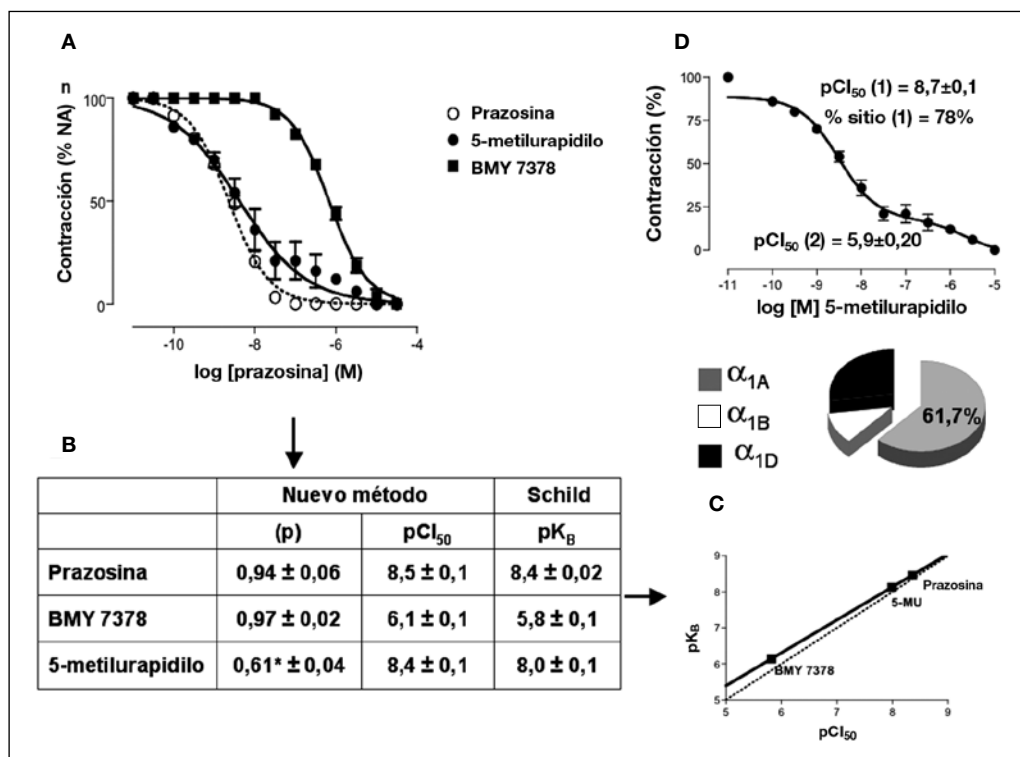


Figura 3. Resultados obtenidos con los antagonistas selectivos de los adrenoceptores α_1 en arteria caudal de rata. (A) CCR de relajación de los distintos antagonistas sobre la meseta de contracción inducida por noradrenalina $10^{-5}M$. (B) Parámetros característicos de los distintos antagonistas calculados según el nuevo método (pendiente y pCI_{50}) y el método de Schild (pK_B). * $p < 0.05$ respecto a la unidad. (C) Representación de la correlación entre los valores de pCI_{50} y pK_B obtenidos por uno y otro método para cada antagonista. La línea discontinua representa la recta de identidad. (D) Representación gráfica del ajuste a dos lugares de unión de la CCR de relajación del 5-metilurapidilo, antagonista selectivo de los adrenoceptores α_{1A} . En este caso se obtienen dos valores de potencia distintos que corresponden a dos sitios por los que el antagonista tiene alta ($pCI_{50} 1$) y baja ($pCI_{50} 2$) afinidad. El porcentaje del sitio 1 se asemeja al grado de expresión de RNAm del receptor α_{1A} en ese tejido (diagrama de sectores). Resultados modificados de Gisbert et al.¹⁰ y Marti et al.¹¹

para el 5-metilurapidilo. Ajustando esta CCR al modelo de dos sitios de unión (Fig. 3D), encontramos que las pCl_{50} obtenidas para cada sitio coinciden con los datos bibliográficos de afinidad del 5-metilurapidilo por el subtipo α_{1A} (sitio 1 de alta afinidad) y los subtipos α_{1B} y α_{1D} (sitio 2 de baja afinidad), correlacionándose el porcentaje del sitio 1 con los valores de RNAm descritos en este territorio (Fig. 3D).¹¹

En el caso de los AR β , los antagonistas selectivos propranolol, alprenolol, bupranolol y SR 59230A (β_3 selectivo) revierten el efecto relajante máximo tanto de la isoprenalina (Fig. 4A) como de SR 58611A (agonista selectivo β_3 , resultados no mostrados), obteniéndose unas CCR de recuperación del tono contráctil y unos valores de pendiente y pCl_{50} similares a los de pA_2/pK_B hallados con

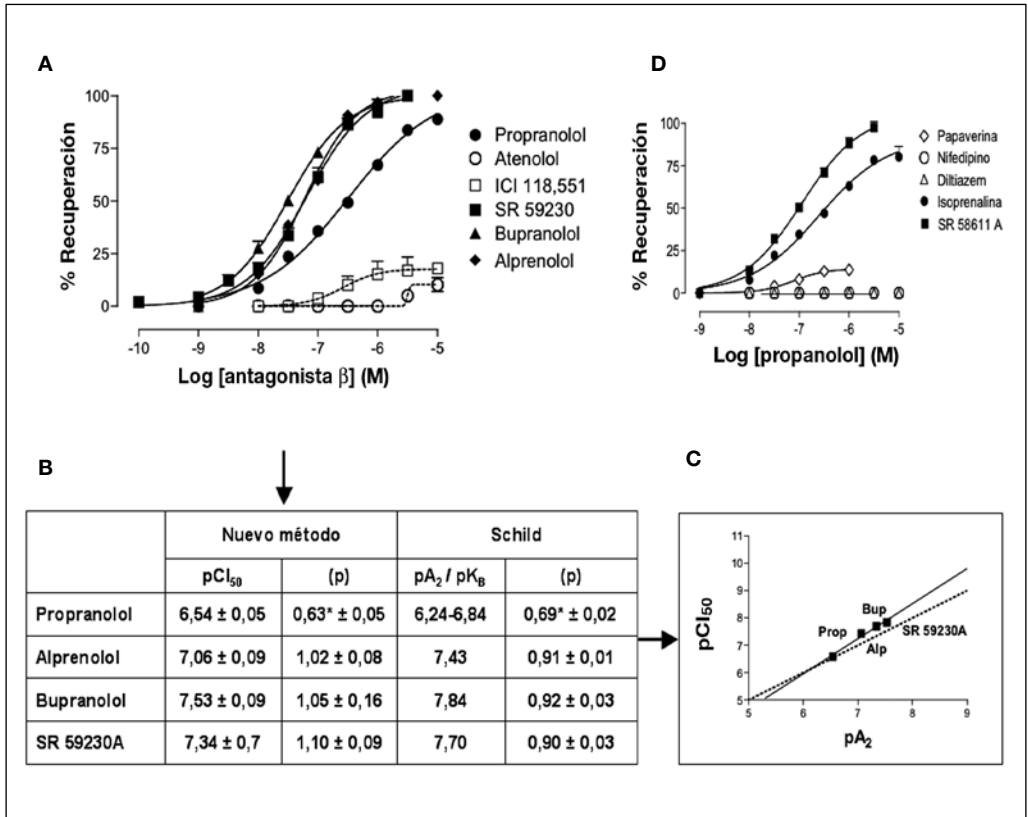


Figura 4. Resultados obtenidos con los antagonistas selectivos de los adrenoceptores β en colon de rata. (A) CCR de recuperación del tono contráctil de los distintos antagonistas sobre la relajación máxima inducida por isoprenalina $10^{-6}M$. Tal como se observa en la gráfica, el atenolol (antagonista selectivo β_1) y el ICI 118,551 (antagonista selectivo β_2), no son capaces de revertir la relajación inducida por el agonista. (B) Parámetros característicos de los distintos antagonistas calculados según el nuevo método (pendiente y pCl_{50}) y el método de Schild (pendiente y pA_2/pK_B). * $p < 0.05$ respecto a la unidad. (C) Representación de la correlación entre los valores de pCl_{50} y pA_2/pK_B obtenidos por uno y otro método para cada antagonista. La línea discontinua representa la recta de identidad. (D) Representación gráfica de la CCR de recuperación del tono contráctil de propranolol frente a diferentes relajantes de la musculatura lisa. Nótese que el propranolol recupera el tono contráctil tras la relajación inducida por los agonistas β (isoprenalina y SR 58611A), pero no es capaz de recuperar el tono contráctil tras la relajación inducida por papaverina, nifedipino y diltiazem.

el método de Schild (Fig. 4B y C). Por el contrario, el atenolol (antagonista selectivo β_1) y el ICI 118.551 (antagonista selectivo β_2) no pudieron revertir los efectos relajantes de los agonistas en el colon (Fig. 4A), lo que indica que los receptores implicados en la respuesta relajante mediada por los AR β en este tejido son mayoritariamente del tipo β_3 . Idénticos resultados se obtuvieron en íleon de rata (no mostrados).

Para descartar la posibilidad de que la recuperación del tono contráctil inducida por los antagonistas β se debiera a una acción inespecífica de éstos, se analizó también su capacidad para revertir la relajación máxima obtenida con otros compuestos que actúan por un mecanismo independiente de la estimulación de los AR β : papaverina (relajante inespecífico), nifedipino y diltiazem (bloqueantes de los canales de calcio), pero en ningún caso se observó recuperación del tono contráctil (Fig. 4D).

Se puede observar en la Fig. 4A y B que la CCR del propranolol presenta una pendiente menor que la unidad, pero su ajuste no es significativo para el modelo de dos sitios de unión. Resultados similares se encontraron en íleon de rata (no mostrados). Esto concuerda con la falta de recuperación del tono contráctil observada con los antagonistas selectivos β_1 y β_2 , por lo que, en colon e íleon de rata, suponemos que existe una población mayoritaria de adrenoceptores β_3 . Sobre ellos, el propranolol ejerce un antagonismo que no sigue el modelo del antagonismo competitivo según el método de Schild, y lo mismo observamos con nuestro método. La explicación a estos resultados puede encontrarse en la existencia de dos conformaciones distintas del receptor β_3 , con distinto grado de acoplamiento a los sistemas de señalización implicados en la transducción de la señal, lo que explicaría la pendiente de las curvas menor que la unidad, y confirmaría, en receptores nativos, la existencia de las dos conformaciones observadas en AR β_3 clonados y expresados en distintas líneas celulares.¹²

Por tanto, podemos concluir que los resultados obtenidos validan la utilización del

nuevo método para analizar la interacción fármaco-receptor mediante estudios funcionales en territorios nativos, siendo un protocolo especialmente útil respecto a los tradicionales porque supone un considerable ahorro en tiempo y en número de experimentos y de animales. Esta última cuestión adquiere una especial relevancia si consideramos los aspectos éticos implicados en cualquier trabajo de experimentación animal o cuando se trabaja con muestras difíciles de obtener, como es el caso de los tejidos humanos.

Utilidad del nuevo método

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA POBLACIÓN DE ADRENOCEPTORES α_1 Y β EN UN DETERMINADO TERRITORIO

Utilizando antagonistas selectivos hemos caracterizado los subtipos de AR α_1 funcionalmente predominantes en la arteria caudal (α_{1A}), la aorta (α_{1D}), la arteria iliaca (α_{1D}/α_{1A}), la mesentérica (α_{1A}/α_{1D}) y las arterias mesentéricas de pequeño calibre (α_{1A}), y hemos observado un diferente predominio funcional de los subtipos de AR α_1 a lo largo del árbol vascular.¹³ Es interesante señalar que este método nos ha permitido demostrar la presencia de una población mixta de AR α_{1D} y α_{1A} en algunas arterias, como la iliaca y la mesentérica, al obtener CCR de relajación de los antagonistas selectivos BMY 7378 y 5-metilurapidilo con pendientes menores que la unidad y que se ajustan significativamente mejor al modelo de dos lugares de unión. Además, la presencia funcional mayoritaria de estos subtipos se correlacionó con la expresión de RNAm determinada en los diferentes vasos estudiados.¹¹

CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES ASOCIADOS A UNA DETERMINADA ENFERMEDAD

Aplicando el método propuesto hemos hallado cambios en la funcionalidad de los subtipos de AR α_1 en la hipertensión. El objetivo que nos planteamos fue la determinación de cambios funcionales del subtipo α_{1D} en dife-

rentes vasos (aorta, arteria mesentérica, caudal, iliaca, arterias mesentéricas de primera y segunda rama) procedentes de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos (WKY), y determinar si estos cambios se producían en los animales adultos ya hipertensos o tenían lugar en el estado prehipertensivo. Además, se analizó si el tratamiento con un agente antihipertensivo como el captopril podía revertir los cambios en la expresión funcional del subtipo α_{1D} . La utilización del método de Schild para determinar las potencias de dos antagonistas (prazosina y BMY 7378) en seis vasos distintos procedentes de seis grupos diferentes de animales supondría la realización de un gran número de experimentos y la utilización de muchos animales. El nuevo método nos permitió optimizar el número de experimentos y de animales, y observamos un aumento en la funcionalidad del subtipo α_{1D} en animales SHR adultos, pero no en jóvenes, aumento que no se produce si los animales son pretratados con captopril, lo que sugiere una posible implicación del subtipo α_{1D} en la génesis y el mantenimiento de la hipertensión arterial.⁹

CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS COMO AGONISTAS/ANTAGONISTAS DE LOS ADRENOCEPTORES α_1 Y β_3

El método propuesto permite determinar de forma rápida y sencilla la actividad y la potencia como agonistas/antagonistas de una serie de compuestos, así como su selectividad para cada subtipo de AR. Gracias a él hemos determinado la potencia antagonista y la selectividad sobre los distintos subtipos de AR α_1 de una serie de 79 alcaloides bencilisoquinoleínicos y aporfínicos, y de los resultados obtenidos destacamos la acción de la glaucina, la boldina y sus derivados halogenados como antagonistas α_{1A} selectivos, así como la ausencia de afinidad de la aminoboldina por el subtipo α_{1D} .¹⁴ En el caso de los AR β_3 hemos ensayado la actividad de siete alcaloides bencilisoquinoleínicos, destacando la actividad de la tetrahidropapaverolina y la higenamina como agonistas β_3 .¹⁵

BIBLIOGRAFÍA

1. Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol.* 1959;14:48-58.
2. Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC, Naylor AM. Characterization of an α_{1D} -adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J Pharmacol.* 1995;115:981-6.
3. Hussain MB, Marshall I. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1997;122:849-58.
4. Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP. Pharmacological characterization of an α_{1A} -adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br J Pharmacol.* 1997;120: 819-26.
5. McLaughlin DP, MacDonald A. Evidence for the existence of 'atypical' β -adrenoceptors (β_3 -adrenoceptors) mediating relaxation in the rat distal colon in vitro. *Br J Pharmacol.* 1990;101:569-74.
6. Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol.* 1996;118:2085-98.
7. Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, et al. Functional identification of rat atypical β -adrenoceptors by the first β_3 -selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br J Pharmacol.* 1996;117:435-42.
8. Roberts SJ, Papaioannou M, Evans BA, Summers RJ. Characterization of β -adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation and detection of mRNA for β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors in rat ileum. *Br J Pharmacol.* 1999;127:949-61.
9. Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E, et al. Pathological role of a constitutively active population of α_{1D} adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135:206-16.
10. Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocón P. Functional characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in vascular tissues using different experimental approaches: a comparative study. *Br J Pharmacol.* 2003;138:359-68.

11. Martí D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, et al. Correlation between mRNA levels and functional role of α_1 -adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of α_{11} as a functional isoform of the α_{1A} -adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1923-32.
12. Baker JG. Evidence for a secondary state of the human β_3 -adrenoceptor. *Mol Pharmacol.* 2005;68:1645-55.
13. Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocón P. Modulatory role of a constitutively active population of α_{1D} -adrenoceptors in conductance vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H 475-81.
14. Ivorra MD, Valiente M, Martínez S, Madrero Y, Noguera MA, Cassels BK, et al. 8-NH₂-boldine, an antagonist of α_{1A} and α_{1B} adrenoceptors without affinity for α_{1D} subtype: structural requirements for aporphines at α_1 -adrenoceptor subtypes. *Planta Med.* 2005;71:897-903.
15. Tur R, Ivorra MD, Anselmi E, Miquel R, D'Ocón P. Selective affinity of some benzyloquinolines for β_3 -adrenoceptors. *Met Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24(Suppl. A):162.

DISCUSIÓN

J. SALLÉS: En vez de utilizar concentraciones máximas, ¿habéis probado concentraciones menores? En ese caso, ¿se alejan los valores de pA_2 y de pCI_{50} ?

M.D. IVORRA: Cuando utilizas concentraciones menores del agonista de los adrenoceptores α , la contracción no se mantiene estable a lo largo del tiempo y por lo tanto nos invalida la aplicación del método. Hemos ensayado con concentraciones aún mayores que las maximales y hemos comprobado que, efectivamente, la pCI_{50} se desplaza y se aleja del valor de pA_2 . Este desplazamiento mantiene cierta proporcionalidad con la concentración que utilizas.

J. SALLÉS: ¿Y si se aplica la ecuación de Cheng-Prusoff?

M.D. IVORRA: Con esta ecuación, los valores se distorsionan totalmente.

J. SALLÉS: Entiendo que el método es bueno para antagonistas de alta afinidad, pero que podría haber problemas para los de baja afinidad. Probablemente se necesitarían tiempos de incubación más largos para llegar a condiciones de equilibrio y obtener valores correctos de pA_2 . El Dr. Badia publicó un método muy parecido al vuestro, referente a la inhibición de la respuesta contráctil inducida por un estímulo eléctrico en el conducto

deferente por agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos, y obtenía resultados similares.

P. D'Ocón: El método ha demostrado ser válido para los antagonistas de alta y baja afinidad probados en aorta y en caudal a los mismos tiempos, ya que en todos los casos el valor de potencia obtenido se corresponde exactamente con la afinidad.

J.M. BAEYENS: Los datos presentados son de antagonistas competitivos. ¿Qué resultados crees que se podrían obtener utilizando antagonistas no competitivos?

M.D. IVORRA: En ese caso, la reversión de la respuesta puede que no sea directamente proporcional a la concentración de antagonista utilizada, obteniéndose interacciones más complejas. Hemos visto que estas interacciones complejas se pueden demostrar con este nuevo método, por la pendiente de las curvas concentración-respuesta del antagonista. En el caso del propranolol, por ejemplo, se obtiene una pendiente menor que la unidad, al igual que la que se obtiene por el método de Schild. Y esto no obedece a la presencia de varios subtipos porque en el colon existe una población mayoritaria de adrenoceptores β_3 . Puede deberse a la presencia de distintos estados conformacionales del receptor β_3 , descritos en receptores clonados. Por tanto, este método también

puede explicar y demostrar este tipo de interacciones complejas.

J. GIRALDO: Creo que valdría la pena desarrollar modelos matemáticos mecanísticos que intenten dar cuenta de las posibles interacciones moleculares complejas que tienen lugar, más que aplicar un modelo empírico y describir simplemente la forma de la curva.

F. PÉREZ-VIZCAÍNO: Parece que definir la concentración máxima a utilizar es clave en este método, y muy complicado porque la curva es una asíntota.

M.D. IVORRA: Sí, se elige la concentración de agonista que da lugar al primer punto de la asíntota, y de hecho hemos utilizado concentraciones diferentes según el territorio, 10^{-6} M de noradrenalina en aorta y 10^{-5} M en caudal, y en estas condiciones los valores de pCl_{50} obtenidos para los distintos antagonistas coinciden con los valores de pA_2 .

J. BURGUEÑO: En relación a las concentraciones, parece ser que se elige la menor de las concentraciones máximas.

M.D. IVORRA: Sí, eliges la primera concentración que te ha dado la asíntota, que posiblemente corresponde al 90% a 95% de la respuesta máxima. No se utilizan concentraciones más altas.

E. VILA: Tengo la impresión de que en la arteria mesentérica sin endotelio es difícil mantener el tono contráctil a pesar de trabajar con concentraciones máximas. Sin saber muy bien por qué, hay días que funciona y otros que no. Por eso creo que en los vasos sanguíneos probablemente sea más cómodo y más rápido hacer curvas concentración-respuesta con el agonista en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de antagonista.

J. LLENAS: En su presentación nos ha mostrado que con los receptores α adrenérgicos existe una buena correlación entre los datos de fijación y los funcionales, pero quiero apro-

vechar para comentar que no siempre es así, y un buen ejemplo de ello son los agonistas β_2 adrenérgicos como el salbutamol. En este caso, el estudio funcional es todavía insustituible cuando se trata de identificar nuevos productos.

M.D. IVORRA: Estoy totalmente de acuerdo. Es verdad que con los receptores β_2 precisamente no se observa correlación.

F. BOSCH: ¿Utilizáis los agonistas β_3 como herramienta farmacológica o con finalidad terapéutica?

M.D. IVORRA: El objetivo era buscar compuestos con actividad selectiva sobre los adrenoreceptores β_3 con la finalidad de utilizarlos como herramienta farmacológica, pero también por su posible aplicación terapéutica. Analizamos diferentes alcaloides bencilisoquinoleínicos que, por su semejanza con el trimetoquinol, podían tener esa actividad.

F. BOSCH: ¿Cuál sería su posible aplicación terapéutica?

M.D. IVORRA: Intestinal.

A.G. FERNÁNDEZ: Querría ampliar un poco la información acerca de la aplicabilidad de los agonistas β_3 , tanto en el campo intestinal como en otros. Hace años, aunque sin éxito, se intentaron desarrollar productos para tratar la úlcera gástrica y duodenal; en el ámbito de la obesidad, algunos fármacos están avanzando en clínica; y para la incontinencia urinaria por vejiga hiperactiva hay un agonista selectivo β_3 que ya ha superado la fase 2a clínica.

A. BADIA: ¿Habéis hecho algún experimento poniendo el agonista durante todo el tiempo que está también el antagonista para ver si hay un proceso de desensibilización del receptor?

M.D. IVORRA: Sí, en el caso de los adrenoreceptores α la contracción se mantenía con el tiempo.

A. BADIA: En el caso de los adrenoceptores β parece ser que hay un proceso de desensibilización más importante, que luego podría falsificar resultados. Creo que es una cuestión importante a tener en cuenta.

M.D. IVORRA: Sí, pero estás añadiendo concentraciones del antagonista que ya están revirtiendo la unión del agonista con ese receptor.

P. D'OCÓN: Además, en este caso concreto, no se observaba un fenómeno de desensibilización muy marcado cuando se hacían las curvas dosis-respuesta en repetidas ocasiones. Quizá sea una característica de los β_3 que los diferencia de los otros subtipos.