Estudios de fijación y discriminación de receptores

J. Garzón

Instituto Cajal, CSIC, Madrid.

Introducción

La teoría de los receptores, inicialmente propuesta y más tarde demostrada por la investigación farmacológica, ha servido de base al diseño y realización de numerosos estudios. Sin embargo, la interpretación correcta de los datos experimentales está condicionada al conocimiento de los sucesos moleculares que tienen lugar entre el estímulo farmacológico (activación del receptor por el agonista) y la respuesta del sistema. En este sentido, la heterogeneidad de ciertos receptores ha sido sugerida en base al orden de potencia de agonistas, estructuralmente relacionados, en diferentes sistemas experimentales. El estudio de las posibles causas de esta actividad diferencial, intra e intersistemas, de los agonistas ha sido objeto de numerosos trabajos, así en base a conceptos como «eficiencia», «eficacia intrínseca» y «receptores de reserva» se han justificado algunas de estas diferencias sin necesidad de asumir más de un único receptor[1]. Por otra parte, aunque los antagonistas competitivos son posiblemente las herramientas farmacológicas más eficaces en el estudio de los tipos de los receptores, si no poseen la selectividad necesaria su utilización puede conducir a interpretaciones erróneas de los resultados[2]. Las interacciones entre sinergistas constituyen una alternativa válida en situaciones semejantes[3]. Dentro de este marco, los estudios de fijación de radioligandos constituyen, junto con los farmacológicos, el procedimiento más adecuado para la demostración de los diferentes tipos de los receptores. Estos estudios pueden proporcionar una gran información; no obstante, a pesar de su aparente sencillez, con mucha frecuencia se cometen errores que repercuten negativamente en el análisis e interpretación de los datos experimentales. En las siguientes líneas describiremos sucintamente los diferente pasos que deben seguirse hasta la eventual demostración de los tipos de un receptor.

Estudios de fijación: requisitos básicos

Los elementos esenciales de estos estudios son tres: el ligando, el receptor y las condiciones de incubación. En el apartado del ligando hay que considerar: criterios de selección, estabilidad metabólica, isótopo y pureza química y física. Su selección debe realizarse a partir de su perfil farmacológico (potencia agonista o antagonista y selectividad), además ha de conservar su integridad en el medio de incubación. El tritio [^{3}H] y el yodo [^{125}I] se presentan como los isótopos más recomendables, el primero se beneficia de su fácil incorporación, de no perturbar la actividad del ligando, de su alta estabilidad y larga vida media, al tiempo que facilita actividades específicas superiores a los 50 Ci/mmol. El ^{125}I proporciona actividades específicas muy elevadas, más de 1.000 Ci/mmol, se incorpora únicamente a grupos hidroxiloaromáticos pudiendo alterar el comportamiento de la molécula; además su vida media es de apenas unas 4 semanas. Otros isótopos, ^{14}C y ^{32}S, no proporcionan niveles aceptables de actividad específica por lo que no son válidos para detectar las pequeñas concentraciones en que los receptores se hallan en los tejidos biológicos. La pureza química del ligando debe conocerse con precisión y no ser inferior a un 90-95 %, el grado de pureza física determina la fracción del radioligando que es susceptible de unirse al receptor (mezclas racémicas). La actividad específica y la potencia (afinidad por el receptor) son propiedades del ligando que trabajan juntas. Cuanto mejores sean estos parámetros menor será la calidad potencialmente detectable del radioligando unido al receptor. Debe prestarse especial atención a aquellos experimentos en que se utilicen ligandos muy potentes a elevadas concentraciones y/o concentraciones de receptores igualmente elevadas (cercanas o superiores a la Kd); en estas circunstancias se aumenta extraordinariamente el menoscabo de la forma libre del radioligando, y si

bien se favorece la detección de lo unido a receptor (relación unido/libre elevada) se hace indispensable la determinación de la concentración libre real, de otro modo el análisis matemático posterior tendría un inicio seriamente viciado.

Respecto al tejido portador del receptor, podemos considerar la preparación y el fraccionamiento. La homogenización es el procedimiento más utilizado para obtener una preparación susceptible de distribuirse uniformemente con el radioligando en el medio de incubación. Es preciso realizarla sin alterar las propiedades de los componentes proteicos y entornos lipídicos que determinan la estructura y función de los receptores. Esta preparación se lava y preincuba a temperaturas medias (25° C) o altas (37°C) a fin de eliminar fracciones solubles y ligandos endógenos que pudieran interferir durante la incubación. El almacenamiento del homogenado sólo debe realizarse cuando no conlleva alteraciones en sus propiedades. Así mismo, la cantidad de receptores presentes en el medio de incubación ha de estar comprendida en la «zona lineal», es decir, en aquel rango de concentraciones de los receptores en el que la unión específica del radioligando varía según una relación lineal. La utilización de concentraciones bajas de los receptores aleja el riesgo de secuestro del ligando libre por el receptor, pero disminuye la posibilidad de detectar la fracción unida al receptor. Por el contrario, las cantidades elevadas favorecen la detección al tiempo que disminuyen la adsorción del radioligando, sin embargo aumentan el secuestro específico e inespecífico de la forma libre e incluso pueden inferir con el proceso de separación de las formas libre y unida al receptor (filtración lenta). Por otra parte, el patrón de fijación del radioligando ha de coincidir con la *distribución* del efecto farmacológico mediado por el receptor, siendo éste un criterio de gran importancia a la hora de conceptuar los lugares de unión como receptores. En este sentido, los receptores de los neurotransmisores son más abundantes en el tejido nervioso, en la substancia gris que en la blanca y dentro del fraccionamiento subcelular, su mayor densidad se asocia a la fracción rica en sinaptosomas. Como criterios adicionales hay que señalar el de *saturabilidad* del receptor por concentraciones crecientes del radioligando, y el de *esteroselectividad* en aquellos casos en que los isomeros correspondientes sean disponibles.

Además de los factores considerados hasta ahora, las condiciones de la incubación vienen determinadas por el volumen total, pH, medio iónico, temperatura y tiempo de incubación. El volumen se suele ajustar en función de las posibilidades de detección de la forma unida, igualmente se puede recurrir a elevados volúmenes con la finalidad de reducir en lo posible el secuestro de la forma libre en favor de la unida. La mayoría de los ensayos tienen su pH óptimo en el rango 7-8. La temperatura más usual es 22-25° C, la de 0° C es adecuada cuando se utilizan ligandos susceptibles de sufrir degradación enzimática, 37° C es poco utilizada ya que las afinidades suelen ser peores que a 25° C. La elección del medio iónico se justifica en función del fin perseguido, por ejemplo optimizar la formación del complejo ligando-receptor, diferenciar diferentes clases de ligandos aunque esto conlleve pérdida de afinidad (caso de agonistas y antagonistas con el Na^+ y el GTP). De los tres tipos básicos de experimentos de fijación (saturación, competición y cinéticos), en los dos primeros se precisa alcanzar el equilibrio, es decir que la formación por unidad de tiempo, del complejo ligando-receptor iguale a la disociación, mientras que los estudios cinéticos consisten en un seguimiento de la formación o desaparición del complejo dependiente del tiempo. El tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio es tanto menor cuanto mayor sea la temperatura (mayor movilidad molecular) y mayor la concentración de radioligando y/o receptor (mayor probabilidad de encontrar una molécula de ligando disponible o un receptor vacío). Para unas determinadas condiciones de incubación, el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio debe determinarse estudiando la menor de las concentraciones a utilizar. La separación de las formas libre y fijada al receptor, antes de alcanzar el equilibrio, implica la determinación errónea de las Kds y Kis. A fin de establecer la validez de las Kds es conveniente comparar las halladas en los estudios de saturación con el cociente k_{-1}/k_1 que se obtiene en estudios de asociación y disociación.

Las técnicas principales de separación de la forma libre de la fijada se pueden resumir en tres: diálisis en equilibrio, centrifugación y filtración. Las dos primeras son recomendables en situaciones en que el radioligando presenta baja afinidad por el receptor. La diálisis requiere elevadas cantidades de tejido a fin de poner de manifiesto la unión específica sobre el fondo de la forma libre de ambas células en el equilibrio. La centrifugación, presenta la desventaja de unos blancos elevados debido a la imposibilidad de eliminar la forma libre atrapada en el entramado del «pellet», por tanto, la relación específi-

co/inespecífico no es muy favorable. La filtración es el método más utilizado, por su mayor simplicidad y sencillez, la relación específico/inespecífico es más favorable que en los casos anteriores. Como desventaja se puede argumentar la pérdida de una fracción de receptores a través de los filtros, además se requiere que el ligando tenga buena afinidad por el receptor (intervalo medio-bajo nanomolar) puesto que la utilización de elevadas cantidades de homogenado enlentece la filtración favoreciendo la disociación del complejo ligando-receptor durante los lavados del filtro para eliminar la forma libre residual.

Demostración de los tipos de un receptor: diseño experimental

Son varias las aproximaciones experimentales potencialmente útiles a este fin: *1.* Utilización de un radioligando que posea prácticamente afinidades idénticas por los receptores en estudio. Para soslayar las dificultades inherentes a la posible formación por los agonistas del complejo ternario en la membrana celular (ligando-receptor-trasductor) es deseable que éste sea un antagonista. La validez de esta aproximación depende del cumplimiento de los requisitos hasta ahora enunciados y en particular que: *a)* el radioligando y los competidores se unan al receptor de forma reversible y sin alterar las propiedades de ambas partes; *b)* que la cinética de unión obedezca los principios básicos de la ley de acción de masas; *c)* que las condiciones experimentales favorezcan la conservación de la forma libre del radioligando por encima del 95 % de la cantidad inicial total en el sistema; *e)* que, siempre que pueda disponerse de ellas, es recomendable utilizar preparaciones que contengan un único tipo de receptor para poder verificar que en éstas se cumplen los requisitos anteriores. *2.* El uso de radioligandos altamente selectivos de uno u otro tipo del receptor es adecuado cuando se conoce la existencia de los diferentes tipos y lo que se desea es determinar su distribución en diferentes órganos y estructuras. *3.* Si el interés se centra en la distribución o demostración de un único tipo en una especie animal o estructura, se utiliza un radioligando no selectivo al que se le impide el acceso a los otros tipos mediante el *bloqueo secuencial*[4]. Los ligandos bloqueantes no precisan ser muy potentes pero sí deben poseer una gran selectividad (al menos dos órdenes de magnitud) para reducir el riesgo de competición con el radioligando por el receptor en estudio. *4.* Los ligandos irreversibles son difíciles de manejar en el bloqueo secuencial, es difícil llegar a bloquear completamente un tipo del receptor sin que se produzca la reducción de otro distinto. No obstante, son de gran utilidad en estudios de autoprotección y protección cruzada dirigidos a demostrar la multiplicidad de receptores[5,6].

Análisis matemático de los datos experimentales

Este análisis, asistido por ordenador, presenta la ventaja de su rapidez y precisión, al tiempo que se evita la subjetividad de las aproximaciones gráficas tradicionales. Se precisa: *a)* un modelo matemático que describa la situación experimental; *b)* un procedimiento que facilite el proceso del ajuste de los datos experimentales al modelo, y *c)* unos métodos objetivos que permitan verificar la validez del ajuste. Los parámetros que generalmente se ajustan son las afinidades (Kd) y densidades de receptores (Bmax); sus valores se modifican dentro de la expresión matemática hasta que la curva teórica alcanza la mayor proximidad a los datos experimentales. El procedimiento más general es el análisis no lineal de los mínimos cuadrados de las diferencias entre datos experimentales y teóricos[7]. Esta técnica, en su versión no ponderada, admite cualquier modelo matemático. Los parámetros se determinan con mayor precisión cuando los datos originales se utilizan sin sufrir transformación alguna. En el caso particular de los estudios de fijación, se conoce que los datos (cpms de radioligando unido) presentan una varianza variable que aumenta con su magnitud, por consiguiente es necesario recurrir a la ponderación estadística. En este sentido, son varios los métodos propuestos para determinar el modelo más adecuado[8,9]. La comprobación de la validez del modelo se inicia con la inspección gráfica de los residuales (diferencias entre datos experimentales y teóricos) y se continúa con la aplicación de diferentes tests estadísticos, paramétricos y no paramétricos, a fin de detectar una posible carencia de azar en la distribución de residuales alrededor de la curva de regresión (bondad del ajuste). Los paramétricos proporcionan unos valores objetivos, (suma de los cuadrados de las desviaciones, la media del cuadrado de las desviaciones y la desviación estándar de los puntos alrededor de la curva de ajuste); los no paramétricos examinan la distribución de los puntos experimentales alrededor de la curva de ajuste, el número de veces que se alternan grupos de puntos a ambos lados de su trazado. El «runs text» y el «Robust test» son

muy sensibles cuando se maneja un número elevado de puntos (>20), cuando el número de observaciones es más reducido, se aplica la correlación seriada de residuales o la media de los cuadrados de las diferencias sucesivas[10]. El programa ha de proporcionar la representación gráfica de los datos experimentales y teóricos en diferentes sistemas de coordenadas: curvas de saturación, curvas de competición, gráficas de Scatchard. Como ventaja adicional ciertos programas ofrecen la posibilidad de sobreimponer los límites de confianza del 95 % de cualquier observación (ayuda a la detección de datos anómalos) y el error estándar y/o límites de confianza del 95 % de la curva de ajuste. De esta forma, y mediante un criterio estadístico (t de Student o de la F)[11], es posible determinar el grado de confianza en la existencia de la fijación específica, es decir, si la densidad de receptores es o no diferente de cero. Por otra parte, la fijación inespecífica puede ser integrada en el modelo como un parámetro más en el ajuste, evitando posibles errores al sustraerla de la cantidad total de radioligando fijado.

La situación en la que están implicados varios ligandos y diferentes receptores está convenientemente descrita en el modelo N por M formulado por Feldman[12], posteriormente expandido por Munson y Rodbard[9], De Lean[13] y otros.

Este modelo permite el diseño de experimentos en los que se varían simultáneamente las concentraciones de varios ligandos. Así, en lugar de curvas dosis respuesta se analizan superficies o hipersuperficies en tres dimensiones. En este sentido, los estudios más frecuentes pasan a ser considerados como casos particulares del modelo N por M, por ejemplo, una gráfica de Scatchard o curva de saturación (1 ligando 1 receptor; 1 ligando 2 receptores), competición (2 ligandos 1 receptor; 2 ligandos 2 receptores). Las representaciones gráficas tipo Scatchard o Hofstee evidencian la existencia de más de un tipo de receptor mediante la aparición de una curvatura cóncava. Este fenómeno requiere que la relación de afinidades del ligando por los receptores (caso de dos) sea de al menos 10. Por otra parte, la relación entre las densidades de receptores no ha de ser mayor de este valor, de lo contrario su visualización resulta muy difícil y únicamente un diseño experimental adecuado seguido de un análisis matemático riguroso puede llegar a demostrar su presencia. Las curvas de competición también delatan la presencia de diferentes receptores, si el radioligando no es selectivo, entonces la relación de afinidades del competidor es el determinante de la aparición de pendientes más suaves (respecto a la autocompetición)[14] o incluso en situaciones de elevada selectividad pueden aparecer «hombros» o zonas en las que la competencia cesa para comenzar de nuevo a mayores concentraciones del competidor[15]. La mayoría de los análisis matemáticos, sean sobre datos transformados o no, precisan de unos valores iniciales de los parámetros que se quieren estimar, algunos programas admiten incluso unos intervalos dentro de los cuales se espera encontrar el valor final del parámetro. Los métodos más utilizados se basan en la representación de los datos experimentales, generalmente en Scatchard para visualizar la curvatura, y mediante diferentes procedimientos, como el «pelado» de la gráfica o la determinación de la intersección de las asíntotas con los ejes, se determinan estos datos iniciales[16].

Ventajas e inconvenientes del análisis matemático

En sus versiones más completas, se analiza la distribución del error experimental, proporcionando una ponderación adecuada a cada valor dentro del conjunto. Así evita los artefactos en la transformación de los datos; proporciona una medida de los errores estándar y límites de confianza para cada uno de los parámetros, por separado y en parejas (covarianza); facilita unos índices objetivos que permiten valorar la bondad del ajuste, así como representaciones gráficas que posibilitan la detección de aquellos valores anómalos que pudieran interferir con la eficiencia del ajuste global; permite la comparación estadística entre los ajustes correspondientes a diferentes modelos matemáticos alternativos, pudiéndose seleccionar el más adecuado en base a criterios objetivos. Así mismo, permite el análisis simultáneo de datos generados en diferentes experimentos para así verificar la consistencia de los resultados o para disponer del número suficiente de observaciones a la hora de abordar el análisis de un modelo complejo y obtener valores más fiables.

El análisis matemático, por muy sofisticado que sea, es sin embargo incapaz de transformar malos resultados en resultados útiles. Algunos de los problemas se originan ante la misma dificultad de satisfacer ciertos supuestos de los modelos basados en la ley de acción de masas: obtención del equilibrio; determinación precisa del radioligando libre y del unido al receptor; separación perfecta de ambas formas sin perturbar el equilibrio inicial, ausencia de de-

gradación del ligando y/o del receptor; ausencia de interacciones cooperativas entre receptores; ausencia de reacciones enzimáticas; ausencia de internalización de los receptores; determinación precisa de la unión inespecífica; conocimiento de la identidad química del radioligando, su pureza y homogeneidad (ausencia de mezclas racémicas); ausencia de cambios de conformación del receptor inducidos por el ligando, agregación desgregación; interacciones del receptor con otros componentes de membrana (proteínas reguladoras G, fosfolípidos o enzimas); el ligando y el receptor deben estar en solución no presentando gradientes o distribuciones en capas. Los errores sistemáticos cometidos antes del análisis matemático, tales como imprecisiones en la actividad específica, impurezas del radioligando, desconocimiento de la eficacia del contador, o de la eficacia del procedimiento de separación del radioligando libre del unido, afectan en gran medida a los valores estimados de los parámetros. Es por tanto probable que su imprecisión sea mayor que los errores estándar calculados por los programas, puesto que estos últimos se calculan únicamente en base a la dispersión de los puntos experimentales alrededor de la curva de ajuste. Varios autores han realizado simulaciones asistidas por ordenador a fin de valorar los aspectos cualitativos y cuantitativos asociados con el incumplimiento de alguno de los requisitos antes enumerados; su lectura es muy recomendable[17-23].

En estos trabajos se demuestra cómo determinadas situaciones pueden originar falsas imágenes de heterogeneidad de receptores, por ejemplo curvaturas en las representaciones de Scatchard o curvas de competición que se extienden más allá de dos órdenes de magnitud. Las causas más comunes son: definición incorrecta de la fijación específica y/o forma libre del radioligando, formación del complejo ternario, heterogeneidad del ligando e interacciones receptor-receptor (cooperación negativa)[15]. Algunas de estas circunstancias pueden ser detectadas o descartadas mediante aproximaciones experimentales sencillas. Como regla general, la forma no marcada del radioligando desplaza más fijación que otro ligando relacionado, si sistemáticamente una parte de la fijación no fuese desplazada por los competidores o éstos lo hiciesen muy débilmente y/o con un orden de potencia ilógico, podría tratarse de una fijación inespecífica desplazada por el ligando que define la unión específica[25]. En este caso, se observaría un patrón similar en aquellas estructuras donde se conoce la ausencia de receptor farmacológico. Si el artefacto se debiese a la determinación deficiente de la forma libre del ligando (secuestro), entonces la curvatura del Scatchard debería amortiguarse al realizar el experimento en volúmenes del orden de 10 veces superiores al inicial, pero manteniendo la cantidad de receptores en el medio de incubación[22]. La descripción del modelo ternario, así como su formulación matemática, ha sido revisada y ampliada recientemente[23]. Son numerosas las observaciones en que los agonistas compiten por la unión de radioligandos antagonistas siguiendo un patrón bifásico[9]. Esta imagen desaparece en presencia de GTP. Por consiguiente, sólo en aquellas situaciones en las que el radioligando sea un antagonista y los competidores agonistas es esperable esta situación, además si el GTP no altera el patrón bifásico se podría considerar como indicativo de diferentes receptores. Una última precaución consiste en la realización del experimento en diferentes estructuras. La consistencia del patrón bifásico apoyaría la existencia del complejo ternario puesto que es muy poco probable que la distribución de los diferentes tipos del receptor sea uniforme.

Otro tipo de problemas se originan por la utilización inadecuada de las posibilidades del análisis matemático: *1.* Antes de aceptar como válidos unos parámetros, es preciso verificar su consistencia en diferentes experimentos. *2.* La correción del diseño experimental es igualmente verificable, en este sentido, la dispersión de los puntos ha de ser mínima puesto que aumentando su número o expandiendo el rango de concentraciones apenas se contrarresta su influencia negativa. La distribución de los puntos es decisiva en la calidad del ajuste, como caso general los puntos deben colocarse espaciados abarcando el mayor rango de saturación posible. Saturaciones del 70-80 % son satisfactorias para el análisis matemático, evidentemente si no se alcanza el 50 % de saturación las curvas son inservibles. Generalmente se precisan experimentos preliminares antes de abordar los definitivos. *3.* Influencia de los valores iniciales de los parámetros, unos valores inadecuados pueden llevar a la rutina de ajuste lejos de la zona de convergencia, o incluso a unos parámetros finales que determinen unos residuales mínimos relativos, pero no a aquéllos que corresponden al menor residual posible. Por consiguiente, el conocimiento del sistema en estudio y la provisión de unos valores adecuados de los parámetros condicionan extraordinariamente la bondad del ajuste. *4.* En general se considera que se precisan 6 puntos por cada parámetro que se ajusta, así pues, cuanto más com-

plejo es el modelo matemático mayor es el número de puntos que se precisan. La relación entre el error experimental (estimado a partir de la variabilidad de los replicados de los puntos experimentales) y el residual (diferencias entre datos experimentales y teóricos) proporciona una medida de la bondad del ajuste; si el primero es considerablemente menor que el segundo, se puede cuestionar la validez del modelo matemático utilizado. Por el contrario, si el residual es claramente inferior al experimental, el modelo adolece de sobreparametrización de forma que la curva de ajuste resulta tan flexible que prácticamente busca a los puntos experimentales allí donde se encuentren. Es conveniente considerar como adecuado aquel modelo cuya bondad de ajuste no es estadísticamente peor que el inmediatamente siguiente en complejidad (un parámetro adicional). Ambas medidas de error no deben ser idénticas pero sí comparables[8,25]. *5.* Independencia de las observaciones, es imprescindible realizar al menos duplicados para disponer de un número elevado de grados de libertad (concentraciones diferentes), al tiempo que se estima el error experimental necesario para seleccionar el modelo más apropiado de ponderación estadística.

La realización correcta de los experimentos de fijación, el diseño experimental adecuado al estudio de diferentes receptores, la elección correcta del modelo matemático y el análisis riguroso de los datos experimentales, pueden llegar a proporcionarnos un cierto grado de confianza en la existencia de los tipos de un receptor, sin embargo únicamente el contraste de estos datos con los de origen farmacológico y/o fisiológico, nos puede reafirmar en este supuesto. Por consiguiente, se debe correlacionar el orden de potencia de los agonistas en los diferentes tipos farmacológicos del receptor con su capacidad de competir por la fijación de los radioligandos a los tipos definidos bioquímicamente. Así mismo, la distribución de los tipos obtenida en base de estudios de fijación, ha de coincidir con aquellas áreas y estructuras en las que los agonistas manifiestan sus efectos y no presentarse allí donde son inactivos.

La complejidad de los procedimientos matemáticos utilizados en los programas de ordenador pudiera llevar al experimentador a una cierta pérdida de contacto con el problema en estudio. En este sentido, es preciso conocer el modelo matemático que describe la situación experimental o en su defecto elegir aquel programa que permita la comparación de las calidades de ajuste a los diferentes modelos que el experimentador considere posibles a su situación particular. La validez y eficacia del procedimiento de ajuste debe estar fuera de toda duda (base bibliográfica). Así mismo, se debe hacer uso no sólo de sus potencialidades estadísticas sino también de las gráficas para así poder valorar la apariencia del ajuste. Los programas que cumplen estos requisitos son varios y únicamente se debe exigir que, independientemente de su potencialidades, sus procedimientos conduzcan a conclusiones similares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kenakin TP. The relative contribution of affinity and efficacy to agonist activity: organ selectivity of noradrenaline and oxymetazoline with reference to the classification of drug receptors. Br J Pharmacol 1984; 81:131-141.
2. Garzón J, Schulz R, Herz A. Evidence for the ϵ type of opioid receptor in the rat vas deferens. Mol Pharmacol 1985; 28:1-9.
3. Sánchez-Blázquez P, Garzón J, Lee NM. Functional opiate receptor in mouse vas deferens: evidence for a complex interaction. J Pharmacol Expt Ther 1983; 226:706-711.
4. Garzón J, Sánchez-Blázquez P, Lee NM. [^{3}H] Ethylketocyclazonice binding to mouse brain membranes: evidence for a kappa opioid receptor type. J Pharmacol Expt Ther 1984; 321:33-37.
5. Smith JR, Simon EJ. Selective protection of stereospecific enkephalin and opiate binding against inactivation by N-ethylmaleimide: evidence for two classes of opiate receptors. Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 1980; 77:281-284.
6. Robson LE, Kosterlitz HW. Specific protection of the binding sites of D-Ala^2-D-Leu^5-enkephalin (δ receptor) and dihydromorphine (μ receptor). Proc R Soc Lond B Biol Sci 1979; 205:425-432.
7. Bard Y. Nonlinear parameter estimation. Nueva York, Academic Press, 1973.
8. Rodbard D, Lenox RH, Wray HL, Ramseth D. Statistical characterization of the random errors in the radioimmunoassay dose-responde variable. Clin Chem 1976; 22:350-358.
9. Rodbard D, Munson PJ, Thakur AK. Quantitative characterization of hormone receptors. Cancer 1980; 46: 2.907-2.918.
10. Bennet CA, Franklin NL. Statistical analysis in chemintry and the chemical industry. Nueva York, Wiley, 1954.
11. Draper N, Smith H. Applied regression analysis. Nueva York, Wiley, 1966.
12. Feldman HA. Mathematical theory of complex lingand-binding systems at equilibrium: some methods for parameter fitting. Anal Biochem 1972; 48:317-338.
13. DeLean A, Hancock AA, Lefkowitz RJ. Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. Mol Pharmacol 1982; 21:5-16.

14. Garzón J, Sánchez-Blázquez P. Biochemical approach to the study of the opioid receptor in the mouse brain. Rev Farmacol Clin Exp 1987; 4:25-34.
15. Molinoff PB, Wolfe BB, Weiland GA. Quantitative analysis of drug-receptor interactions: II determination of the properties of receptor subtypes. Life Sci 1981; 29:427-443.
16. Rosenthal HE. A graphical method for the dermination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal Biochem 1967; 20:525-532.
17. Rodbard D, Catt KJ. Mathematical theory of radioligand assays: the kinetics of separation of bound and free. J. Steroid Biochem 1972; 3: 255-273.
18. Ketelslegers JM, Knott GD, Catt KJ. Kinetics of gonadotropin by receptors of the rat testis: analysis by a non-linear curve fitting method. Biochemistry 1975; 14: 3.075-3.083.
19. Buergisser E, Hancock AA, Lefkowitz RJ, DeLean A. Anomalous equilibrium binding properties of high-affinity racemic radioligands. Mol Pharmacol 1981; 19: 205-216.
20. Buergisser E, Lefkowitz RJ, DeLean A. Alternative explanation for the apparent «two step» binding kinetics of high affinity antagonist radioligands. Mol Pharmacol 1981; 19:509-512.
21. Munson PJ. Experimental artifacts and the analysis of ligand bindig data: results of a computer simulation. J. Recept Res 1983; 3:249-259.
22. Goldstein A, Barret RW. Ligand dissociation constants from competition binding assays: errors associated with ligand depletion. Mol Pharmacol 1987; 31:603-609.
23. Abramson S, McGonigle P, Molinoff PB. Evaluation of models analysis of radioligand binding data. Mol Pharmacol 1987; 31:103-111.
24. Laduron P. More binding, more fancy. TIPS 1983; 4:333-335.
25. Rodbard D. Agonist *versus* antagonists. TIPS 1980; 1:222-225.

DISCUSIÓN

A. GÓMEZ-LUQUE: Quisiera plantear al Dr. Garzón un par de cuestiones. La primera de ellas se refiere a la importancia del error experimental en relación con el error residual. La segunda se centra en la importancia de los experimentos cinéticos en el estudio de la posible existencia de subtipos o estados de afinidad distintos de receptores.

J. GARZÓN: Respecto a la primera cuestión se tiende a considerar que cuando el error experimental es muy superior al residual deben adoptarse ciertas precauciones ya que podemos estar trabajando con un modelo que posea un número excesivo de parámetros, es decir, podemos estar generando una curva teórica que prácticamente sea tan flexible que vaya hacia los puntos experimentales allí donde estén. Esto es llevar las condiciones experimentales a un límite que debe evitarse. De hecho hay un criterio que se suele aplicar que consiste en desestimar aquel modelo que no mejora a aquel diseñado con un parámetro menos. En el caso inverso, cuando el error residual es mucho mayor que el experimental, lo primero que hay que pensar es que el modelo matemático elegido no es el correcto.

En relación con los procesos cinéticos, especialmente disociativos, personalmente, opino que donde tienen mayor relevancia es en aquellos casos en que se discuten fenómenos de multiplicidad de receptores o cooperatividad negativa de fijación. En teoría, un proceso de disociación adecuadamente realizado podría darnos información sobre en qué situación nos encontramos, puesto que si la disociación se realiza por aumento de volumen o por introducción de la forma no marcada del ligando, el patrón obtenido debería ser distinto si estamos en un caso de cooperatividad o de multiplicidad de receptores. Considero que los estudios cinéticos como tales son bastante difíciles de controlar por lo que la imprecisión de sus resultados (error experimental) puede dificultar su ajuste a cualquier modelo matemático.

S. ERILL: Estoy totalmente de acuerdo en que hay que comparar siempre los datos de fijación con los datos de respuesta fisiológica. Pero lo que quisiera plantear no es una pregunta ni un comentario sino una provocación. ¿Cómo se interpretan los resultados de las benzodiacepinas periféricas en los que los datos de fijación son extraordinariamente robustos y en cambio prácticamente no hay datos sobre actividad?

J. GARZÓN: Creo que todavía es pronto para responder a este planteamiento que sin duda representa una interesante línea de investigación.

J. MARTÍNEZ-LANAO: El Dr. Garzón ha aborda-

do un tema tan interesante como el de la transformación de variables, procedimiento bastante habitual en estudios cuantitativos, tanto en farmacología como en farmacocinética. Como muy bien ha señalado el ponente, cuando existe una gran variabilidad en estudios cuantitativos es preferible recurrir a una línea directa, es decir, obtenida directamente por ajuste de todos los datos a la función mediante un programa de los que se han comentado. Pero personalmente quisiera defender un poco la transformación de variables porque creo que ésta tiene algunas aplicaciones siempre y cuando se adopten ciertas precauciones. Por poner un ejemplo, en la década de los sesenta se propuso un método de transformación de variables para la conocida ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten haciendo una transformación también de los pesos estadísticos. Se trataba pues de un método matemático que mediante la transformación del peso estadístico validaba los métodos de doble recíproca en la utilización de la transformación de variables. Además, opino que este método también tiene aplicaciones claras en los análisis por ordenador a la hora de seleccionar las primeras estimaciones para aportar datos iniciales que nos permitan realizar el ajuste.

J. GARZÓN: Evidentemente. La transformación de variables que se ha aplicado desde hace mucho tiempo estaba justificada, entre otras razones, por la representación gráfica de los resultados. Posteriormente, dicha transformación, como ha puntualizado el Dr. Martínez Lanao, ha pasado a ser útil únicamente en la obtención de valores iniciales para el ajuste, puesto que todos los que trabajamos con estos programas informáticos hemos tenido que aceptar que no siempre los resultados obtenidos aplicando la transformación son coincidentes con los que se obtienen en la actualidad sin transformación. Estos últimos son bastante más precisos y reproducibles, al menos en mi experiencia.

J. MARTÍNEZ-LANAO: Lo que es evidente es que aquí surge otro problema, el de la complejidad de la función. Cuando manejamos funciones complejas necesariamente tenemos que recurrir muchas veces a métodos matemáticos como la transformación de variables para obtener estimaciones porque no tenemos otro método matemático. Al final recurrimos a una optimización fina de métodos informáticos. Es decir, la transformación de variables puede tener bastante utilidad en el método experimental. No creo que sea obligado renunciar a ella *a priori*.

J. GARZÓN: Estoy completamente de acuerdo.

A. GARCÍA: En relación con la correlación entre los datos de fijación de radioligandos en membranas aisladas y los parámetros farmacológicos obtenidos en órganos o células intactas —pienso que casi todos estamos de acuerdo en que es necesario establecer esta correlación para validar los datos de fijación de ligandos— me gustaría plantear al Dr. Garzón la posibilidad de realizar estos estudios en células intactas donde en muchos modelos se puede observar simultáneamente la correlación. Mi pregunta concreta se refiere a qué factores pueden influir en la valoración de los datos de fijación de ligandos a células intactas y si la aproximación experimental y matemática que ha representado puede aplicarse a células intactas al igual que a membranas aisladas.

J. GARZÓN: Por supuesto. Las células intactas constituyen el campo menos malo donde puede estudiarse la fijación descendiendo desde el organismo en su conjunto. Y digo menos malo porque la mayor dificultad que se nos puede plantear es la no obtención de una situación de equilibrio. Si pueden eliminarse las pérdidas continuas de la forma libre por incorporación o procesos de absorción inespecífica en las células, ya habremos ganado bastante. En lo que concierne a la comparación entre datos bioquímicos y farmacológicos, evidentemente lo que es más importante es que los órdenes de potencias sean comparables, no potencias absolutas puesto que como hemos visto y en el caso de agonistas están ocurriendo tantísimas cosas entre el receptor y el efecto medido que es muy difícil llegar a precisar tanto. En cuanto a la utilización de células en este contexto hay alguna referencia en la literatura. Lo que ocurre es que la célula, como ser vivo, puede admitir a lo mejor un antagonista sin excesivas variaciones, pero cuando utilizamos un agonista me temo que la situación puede ser más complicada, puede haber desensibilización, etc., fenómenos que pueden complicar mucho la interpretación de los datos.

A. PAZOS: Quisiera señalar que particularmente sólo conozco un estudio que utilice técnicas de autorradiografía de receptor en célula intacta y realmente desde el punto de vista metodológico el estudio era muy correcto pero los investigadores fueron incapaces de reproducir las propiedades farmacológicas del re-

ceptor. Tengo la impresión de que no se dispone todavía de métodos que respeten las condiciones de equilibrio al menos en lo que concierne a técnicas autorradiográficas en células.

J.A. GARCÍA-SEVILLA: Quisiera hacer un par de comentarios sobre la bondad de utilizar un análisis no lineal frente al clásico Scatchard. Es verdad que hoy en día todos utilizamos ya programas no lineales de ajuste de la hipérbola pero creo que el Scatchard todavía tiene un valor indudable en el sentido de plasmar el resultado en forma de un típico gráfico que permite apreciar globalmente los cambios de densidad y sobre todo de afinidad que pueda tener el radioligando. Además, cuando el experimento está bien hecho, es decir, cuando se ha controlado rigurosamente todo el proceso, creo que puede afirmarse, por ejemplo en el caso del receptor que nosotros estudiámos, que los datos del Scatchard se ajustan perfectamente a los datos que proporciona cualquier programa iterativo de ajuste no lineal.

J. GARZÓN: Quería solamente apuntar que una de las ventajas del análisis que nosotros utilizamos es que los modelos siguen la ley de acción de masas y los diferentes lugares de unión son esencialmente independientes, por consiguiente, no barajamos un abanico de posibilidades y vemos cuál se ajusta mejor o peor. En realidad se parte del modelo más sencillo hacia el más complejo en una única dirección y nos detenemos cuando no se observa mejoría en la calidad del ajuste matemático al asumir un lugar de unión adicional.