

El problema de los receptores de reserva en el análisis de datos farmacológicos

F. Barturen y J.A. García-Sevilla

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco.

Introducción

En su formulación inicial¹⁻³ la teoría ocupacional de receptores asume que el efecto farmacológico (E) inducido por una concentración de agonista [A] es directamente proporcional a la concentración del complejo agonista receptor [AR]

$$1. \quad (E) = \alpha [AR]$$

siendo α una constante de proporcionalidad, de tal modo que los receptores no ocupados no desarrollarían respuesta y que la máxima respuesta se alcanzaría sólo cuando todos los receptores estuvieran ocupados.

Sin embargo, ya en 1956, Stephenson⁴ introdujo una importante modificación conceptual en la teoría clásica al proponer que si bien la respuesta biológica es dependiente de la ocupación fraccional del receptor, la relación entre ambas variables no debe, forzosamente, ser lineal. Así:

$$2. \quad \frac{E_A}{E_m} = f(s) = f\{E[AR]\}$$

donde E_m es el efecto que provoca una concentración [A] de agonista, E_m es el efecto máximo, (s) el estímulo y E la actividad intrínseca del complejo fármaco-receptor, de tal modo que una ocupación inferior a la totalidad de los receptores podría ser suficiente para lograr la respuesta máxima del sistema.

La relación no lineal entre la ocupación de receptores y el efecto promovido, descrita en términos teóricos por Stephenson, obtuvo un importante apoyo experimental cuando Nickerson (1956)⁵ demostró en fleo de cobayo que el bloqueo irreversible del receptor histaminérgico con concentraciones crecientes de dibenamina provoca un desplazamiento importante hacia la derecha de la curva concentración-efecto antes de inducir una reducción en el efecto máximo

(fig. 1). El desplazamiento hacia la derecha tras bloqueo irreversible parcial sin variación en el efecto máximo parece indicar que una proporción de la población de receptores puede ser inactivada sin que el sistema pierda la capacidad de desarrollar su efecto máximo. Surge así el concepto de receptor de reserva para definir aquella proporción de receptores cuya ocupación no es requerida para lograr el efecto máximo.

Resultados similares a los descritos por Nickerson⁵ fueron pronto aportados por otros autores, utilizando dibenaminas y análogos, para receptores muscarínicos, histamínicos y adrenérgicos α_1 en diversos tejidos^{6,7} confirman-

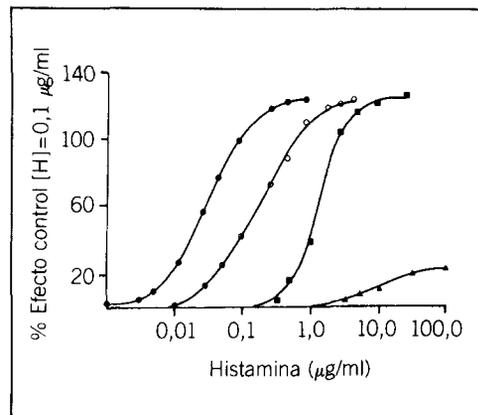


Fig. 1. Curvas dosis-efecto para la histamina en fleo de cobayo. En ordenadas se expresa el porcentaje de respuesta control para una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de histamina y en abscisas el (—) logaritmo de la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de histamina.

Nótese cómo el bloqueo irreversible del receptor con 0,0006 $\mu\text{g/ml}$ (○) y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (●) de dibenamina provocó un importante desplazamiento de la curva control (●) hacia la derecha antes de que se produjera pérdida de efecto máximo (▲) ([dibenamina]=0,1 $\mu\text{g/ml}$). Tomada de Nickerson (1956)⁵.

TABLA I

<i>Ecuación 6</i>	<i>Forma general</i>
Forma hiperbólica directa	
a) $[A] = \frac{[A^*]}{[A^*] + K_A/(1-q)} \cdot K_A \cdot \frac{q}{(1-q)}$	$Y = \frac{MX}{X+K}$
Formas lineales	
b) $\frac{1}{[A]} = \frac{1}{K_A} \cdot \frac{(1-q)}{q} + \frac{1}{q} \cdot \frac{1}{[A^*]}$	$\frac{1}{Y} = \frac{1}{M} + \frac{K}{M} \cdot \frac{1}{X}$
c) $\frac{[A^*]}{[A]} = \frac{1}{q} \cdot \frac{1}{K_A} \cdot \frac{(1-q)}{q} \cdot [A^*]$	$\frac{X}{Y} = \frac{K}{M} + \frac{1}{M} X$
d) $[A] = K_A \frac{q}{(1-q)} - \frac{K_A}{(1-q)} \cdot \frac{[A]}{[A^*]}$	$Y = M - K \frac{Y}{X}$

do la no linealidad de la relación ocupación del receptor-respuesta funcional.

Sin embargo, ha sido preciso el desarrollo de técnicas de fijación específica de radioligandos para la confirmación del carácter irreversible de ciertos antagonistas, así como el desarrollo de métodos efectivos para el cálculo de la constante de disociación en equilibrio del complejo agonista-receptor (K_A) y en consecuencia de la ocupación fraccional para cada concentración de agonista, con el fin de acumular mayores evidencias experimentales en relación con la disparidad entre ocupación del receptor y respuesta funcional.

Cálculo de receptores de reserva

El hecho de que la interacción fármaco-receptor es bimolecular y reversible y cumple la ley de acción de masas constituye un presupuesto clásico en farmacología. Según esto⁸, la ocupación fraccional del receptor ($[AR]/[RT]$) en equilibrio para una concentración de agonista $[A]$ viene dada por la expresión:

$$3. \quad \frac{[AR]}{[RT]} = \frac{[A]}{[A] + K_A}$$

donde $[AR]$ es la concentración del complejo agonista receptor, $[RT]$ es la concentración total de receptores y K_A es la constante de disociación. De tal modo que conociendo el valor de K_A es posible estimar el valor de la fracción de receptores ocupada para cada concentración, y por contraposición con el efecto promovido, evaluar la posible existencia de receptores de reserva. Así, en el supuesto de que

concentraciones de agonista capaces de promover efecto máximo ocupen tan sólo una fracción q de receptores hablaremos de una fracción $(1-q)$ de receptores de reserva.

Estima del valor de K_A

Hasta la fecha, la estima de la constante de disociación del complejo agonista-receptor, a partir de estudios funcionales, se ha abordado desde tres planteamientos:

1. A partir de la comparación de curvas dosis-efecto antes y después del bloqueo irreversible de una fracción de receptores⁷.

2. A partir de las curvas dosis-efecto logradas por un agonista completo y un agonista parcial^{9,10}.

3. A partir del uso de un agonista parcial como antagonista competitivo tras el bloqueo parcial del receptor por un antagonista irreversible¹¹.

En el presente capítulo consideraremos y desarrollaremos la primera posibilidad.

De acuerdo con la teoría propuesta por Stephenson⁴ (ecuación 2) y siendo la eficacia del fármaco (e) igual al producto de la eficacia intrínseca del complejo agonista-receptor (E) por la concentración de receptores totales $[RT]$ y asumiendo la ley de acción de masas (véase ecuación 3) obtenemos:

$$4. \quad \frac{E_A}{E_m} = f \left\{ \frac{e [A]}{[A] + K_A} \right\}$$

En el caso de presencia de un antagonista que bloquee de forma irreversible una proporción de

receptores la ecuación 4 puede expresarse como:

$$5. \frac{E_A^*}{E_m} = f \left\{ \frac{e q [AR^*]}{q [RT]} \right\} = f \left\{ \frac{e q [A^*]}{[A^*] + K_A} \right\}$$

donde (q) es la fracción de receptores totales no inactivada tras tratamiento con el antagonista irreversible y siendo el resto de los términos similares a los de la ecuación 4 pero con un asterisco (*) para indicar que un antagonista ha actuado sobre el sistema.

En el caso de que (q) tenga un valor suficiente que permita alguna respuesta al agonista A y para [A] y [A*] equiefectivas (esto es, siendo $E_A = E_A^*$) podemos igualar las expresiones 4 y 5, de tal modo que:

$$6. \frac{[A]}{[A] + K_A} = \frac{q [A^*]}{[A^*] + K_A}$$

La ecuación 6 puede ser expresada en las cuatro formas que se recogen en la tabla I, en la que la ecuación a) corresponde a la relación hiperbólica directa entre las concentraciones [A] y [A*] mientras que las formas b), c) y d) corresponden a distintos modelos de transformaciones lineales de a).

La ecuación b) corresponde a la transformación lineal de la hipérbola a) por el método de dobles recíprocos y ha constituido hasta la fecha la función más utilizada para el cálculo de los valores de q y K_A . El método, descrito por Furchgott⁷, consiste en la obtención de la recta de ecuación:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{K_A} \cdot \frac{(1-q)}{q} + \frac{1}{q} \cdot \frac{1}{[A^*]}$$

por regresión lineal simple a partir de los puntos (1/[A*], 1/[A]) obtenidos del análisis de las curvas dosis-efecto antes y después* de la inactivación, del tal modo que:

$$q = 1/\text{pendiente}$$

$$K_A = (1-q)/q \cdot Y \text{ (x=0)}$$

Sin embargo, y pese a partir de errores experimentales pequeños, la varianza de las estimaciones de K_A cuando se utilizan métodos de transformación lineal simple adquiere, generalmente, valores importantes. Estudios realizados

con experimentos simulados con ordenador¹² demuestran cómo la precisión estadística de la estima de K_A puede verse mejorada utilizando regresiones lineales ponderadas, si bien los esquemas adecuados de ponderación exigen análisis interactivos de complejidad no inferior a modelos de análisis no lineal¹³. Sobre la base de este hecho, diversos autores^{13,14} han sugerido el análisis directo de la relación hiperbólica entre concentraciones equiefectivas por regresión no lineal como método para reducir la varianza de la estima de K_A , obteniéndose resultados muy satisfactorios cuando se utilizó la regresión lineal propuesta por Furchgott⁷ para la obtención de estimas iniciales.

Relación ocupación fraccional-respuesta fraccional

A partir de la estima del valor de K_A y con la aplicación de la ecuación³ es posible determinar el valor de la ocupación fraccional para cada concentración de agonista, de efecto conocido, para a partir de estos valores construir la relación ocupación-respuesta.

Paton y Rothschild (1965)¹⁵ demostraron cómo la función resultante de la combinación de dos o más funciones de Langmuir es igualmente una función de Langmuir. De tal modo, y dado que tanto la relación dosis-efecto como la relación dosis-ocupación siguen una distribución hiperbólica, la relación ocupación-efecto seguirá igualmente una distribución hiperbólica según la ecuación genérica:

$$7. \frac{E}{E_m} = \frac{[AR]^n}{[AR]^n + K_E^n}$$

siendo K_E el valor de la ocupación fraccional que logra un efecto del 50% y n un factor que define la pendiente de la hipérbola, de tal modo que para n=1 la distribución corresponde a una hipérbola rectangular. La posibilidad de que n adquiera valores distintos de 1 hace extensible el modelo para aquellos sistemas en los que la relación dosis-efecto presente una pendiente distinta de 1.

El ajuste no lineal de los valores conocidos de la relación ocupación-efecto a la ecuación 7 permitirá obtener una estima del valor de K_E y a partir de aquí calcular el valor de la ocupación fraccional para cada nivel de respuesta. Finalmente, el valor de la reserva de receptores para cada nivel de respuesta podrá calcularse como la diferencia entre respuesta fraccional y ocupación fraccional.

Significado funcional de los receptores de reserva: adrenoceptores α_2 de reserva en conducto deferente de rata y su modulación por antidepresivos

La presencia de receptores de reserva ha podido ser demostrada para una amplia variedad de receptores y sistemas. Así, ha podido demostrarse la existencia de una importante reserva funcional para receptores opioides del subtipo k en íleo de cobayo¹⁶, para receptores a la angiotensina II en vena porta de rata¹⁷, para receptores a la sustancia P en el íleo de Cobayo¹⁸, para receptores dopaminérgicos del subtipo D₂ en cuerpo estriado de rata¹⁹, adrenoceptores α_2 en córtex cerebral de rata²⁰ y para receptores β adrenérgicos en ventrículo cardíaco de conejo²¹.

Sin embargo, la presencia o ausencia de receptores de reserva no parece ser una característica propia de los distintos subtipos de receptores sino que parece depender además del sistema en que se encuentren o incluso de la respuesta que mediaticen. Así, la existencia de reserva funcional para el adrenoceptor α_1 ha sido ampliamente demostrada para el conducto deferente de rata^{22,23} la aorta y el bazo de conejo^{24,25} mientras que no parece existir en arteria mesentérica y renal de perro²⁶.

Recientemente y en un intento de aproximación al significado funcional de los receptores de reserva¹⁹ se ha demostrado cómo para el receptor dopaminérgico D₂ presináptico del cuerpo estriado de rata existe una importante reserva funcional que contrasta con la ausencia de receptores de reserva D₂ posinápticos en el mismo sistema.

Sin embargo, existen pocas evidencias relacionadas con el posible papel que pueda desempeñar la modulación del fenómeno de receptores de reserva en los procesos de sensibilización o desensibilización de los diversos sistemas por tratamiento farmacológico.

En este contexto se consideró de interés determinar la posible existencia de adrenoceptores α_2 de reserva en conducto deferente de rata y en su caso la modulación de esta población por tratamiento crónico con antidepresivos.

El conducto deferente aislado de rata estimulado eléctricamente, constituye un modelo óptimo para la valoración funcional de adrenoceptores α_2 ya que además de presentar una muy importante inervación noradrenérgica²⁷, su transmisión motora, con independencia de su naturaleza noradrenérgica o no noradrenérgica²⁸, es modulada por adrenoceptores α_2 presinápticos²⁹.

Para el presente estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dowley (280-330 g) que fueron sacrificadas por dislocación cervical y sección carotídea bilateral. Tras su disección, el conducto deferente fue sumergido en baño de órgano aislado (7 ml) a $31 \pm 0,5$ °C en Krebs bicarbonato conteniendo (en mM): NaCl 112, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, KH₂PO₄ 1,1, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0 y glucosa 11,1, y gaseado con 95% O₂-5% CO₂. Los tejidos fueron sometidos a una tensión basal de 0,5 g y lavados cada 10 minutos durante un período de 30 minutos previos a la estimulación, procediendo durante este tiempo a la preincubación o no con el antagonista irreversible, y siendo posteriormente estimulados eléctricamente mediante ondas cuadradas de 3 msec de duración con una frecuencia de 0,1 Hz y un voltaje supramaximal de 25-30 V.

El análisis de las curvas dosis-efecto se realizó por regresión no lineal de los valores de respuesta para cada concentración según la ecuación¹³:

$$E = \frac{E_{\max} [A]^n}{[A]^n + Ec50^n}$$

utilizando una adaptación para análisis con microordenador³⁰ del algoritmo de Marquardt.

El resto de los cálculos para la evaluación de la posible presencia de reserva funcional se realizaron tal y como se detalla en el apartado de cálculo de receptores de reserva del presente capítulo, realizándose la estima del valor K_e por ajuste no lineal de los puntos de la relación ocupación-respuesta a la ecuación 6-a utilizando igualmente el algoritmo de Marquardt.

Como antagonista irreversible se utilizó N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (10⁻⁸-10⁻⁶ M) cuya potencia como bloqueante no competitivo del adrenoceptor α_2 ha sido ampliamente demostrada tanto a partir de estudios con fijación específica de radioligandos como a partir de estudios funcionales *in vivo*³¹.

Como agonista completo se empleó UK 14304 (5-bromo-6-[2-imidazolín-2-yl-amino]-quinoxalina), para el que se ha podido demostrar en diversos sistemas, tanto periféricos como centrales, su carácter de agonista completo y selectivo para el adrenoceptor α_2 ^{32,33}.

La preincubación (15 minutos) del conducto deferente aislado de rata con distintas concentraciones de antagonista irreversible EEDQ (10⁻⁸-10⁻⁶ M) provocó un importante desplazamiento hacia la derecha de las curvas dosis-

TABLA II
EFFECTO DE LA PREINCUBACIÓN (15 MIN) CON EEDQ SOBRE LA INHIBICIÓN MEDIADA POR UK 14304 DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA*

	% E_{max}/E_{max} control	E_{c50}	(N)
Control	100,0 ± 1,2	0,64 ± 0,06	(12)
EEDQ 10 ⁻⁸ M	96,8 ± 1,80	0,92 ± 0,08**	(4)
EEDQ 10 ⁻⁷ M	103,2 ± 1,64	11,78 ± 0,64***	(6)
EEDQ 2.10 ⁻⁷ M	101,1 ± 1,01	27,21 ± 1,4***	(6)
EEDQ 3.10 ⁻⁷ M	60,7 ± 0,92***	62,43 ± 5,2***	(6)
EEDQ 10 ⁻⁶ M	28,2 ± 1,22***	139,1 ± 29,7***	(4)

*Se representan valores medios ± EEM de (n) experimentos.

En todos los casos se realizaron curvas dosis-efecto completas para el agonista UK 14304 (0,1-10⁴ nM).

La E_{c50} representa la concentración de agonista para producir en cada caso un 50% del efecto máximo.

p<0,05; *p<0,001 (test t de Student).

Resultados no publicados.

TABLA III
RELACIÓN OCUPACIÓN FRACCIONAL-
RESPUESTA FRACCIONAL PARA DISTINTAS
DOSIS DE UK 14304 EN CONDUCTO
DEFERENTE DE RATA*

[A] nM	% Ocupación	% Respuesta máxima
0,1	0,165 ± 0,017	8,3 ± 1,5
0,3	0,495 ± 0,05	30,4 ± 3,8
1	1,63 ± 0,17	63,2 ± 3,3
3	4,73 ± 0,49	85,0 ± 2,2
10	14,11 ± 1,28	95,0 ± 1,0
30	32,85 ± 2,18	99,8 ± 0,72

*Se representan valores medios ± EEM de (6-12) experimentos.

Los valores de ocupación fraccional se obtuvieron a partir de la ecuación 3 utilizando el valor de K_A obtenido por comparación de las curvas dosis-efecto tras inactivación parcial con EEDQ 3.10⁻⁷ M con la curva promedio control.

Los valores de % de respuesta máxima se obtuvieron a partir de las curvas control dosis-efecto completas para el agonista UK 14304 (0,1-10⁻⁴ nM).

Resultados no publicados.

efecto para el agonista UK 14304 antes de que se produjera reducción en el efecto máximo (fig. 2).

Así, el bloqueo irreversible del adrenoceptor α_2 con 10⁻⁸, 10⁻⁷ y 2,10⁻⁷ M de EEDQ provocó incrementos importantes y significativos (p<0,001) en los valores de E_{c50} (10⁻⁸ M E_{c50} =0,92 ± 0,08 nM; 10⁻⁷ M E_{c50} =11,78 ± 0,64 nM y 2,10⁻⁷ M E_{c50} =27,21 ± 1,4 nM) para la inhibición por UK 14304, cuando se compararon con los valores de la curva control (E_{c50} =0,64 ± 0,06 nM) sin que se redujera el efecto máximo, cuyo valor sólo se vio reducido cuando se incrementó el grado de inactivación

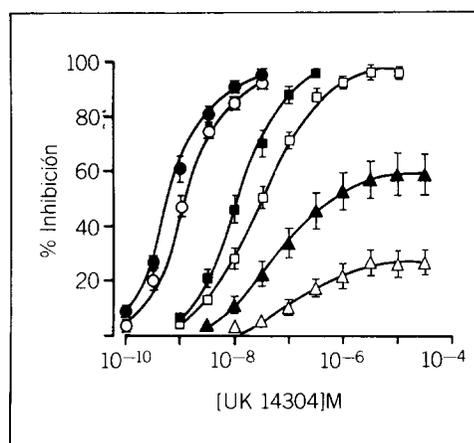


Fig. 2. Curvas dosis-efecto correspondientes a la inhibición por UK 14304 de la respuesta contráctil del conducto deferente de rata estimulado eléctricamente, antes (●) y después de su preincubación (15 min) con 10⁻⁸ M (○), 10⁻⁷ M (■), 2.10⁻⁷ M (□), 3.10⁻⁷ M (▲) y 10⁻⁶ (△) del antagonista irreversible EEDQ. Cada punto representa la media ± error estándar de 4-12 experimentos. Nótese cómo el bloqueo progresivamente creciente del adrenoceptor α_2 provocó reducción en el efecto máximo solamente tras desplazamiento importante de la curva dosis-efecto hacia la derecha. (Resultados no publicados).

del adrenoceptor α_2 . Así, la preincubación del tejido con EEDQ 3,10⁻⁷ M provocó un mayor desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-efecto (E_{c50} =62,43 ± 5,2 nM, p<0,001) y una reducción significativa del efecto máximo (Δ =39,3 ± 5,2%, p<0,01), que fue mayor tras preincubación con 10⁻⁶ M (Δ =71,8 ± 1,2%, p<0,01) (tabla II).

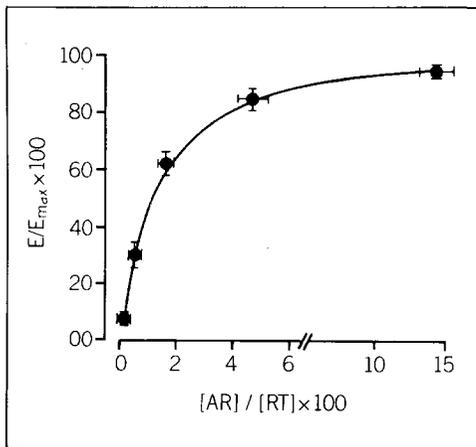


Fig. 3. Relación ocupación fraccional-respuesta del adrenoceptor α_2 en conducto deferente de rata para el agonista completo UK-14304. Cada punto representa la media \pm error estándar de 6 experimentos. Puede apreciarse la naturaleza hiperbólica de la relación ocupación-respuesta y cómo con una ocupación inferior al 15% de la población total de receptores pueden lograrse valores porcentuales de respuesta superiores al 90% del efecto máximo. (Resultados no publicados).

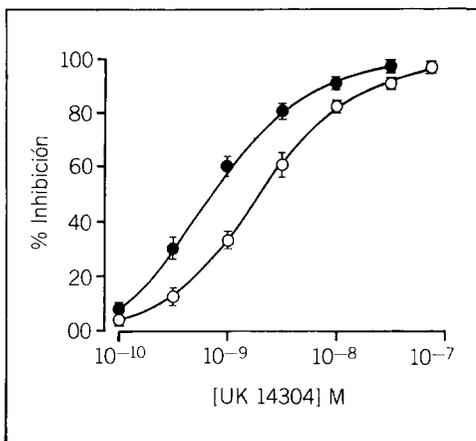


Fig. 4. Curvas dosis-efecto correspondientes a la inhibición por UK 14304 de la respuesta contráctil del conducto deferente de rata estimulado eléctricamente en animales control (●) y tras tratamiento crónico con desipramina (10 mg/kg/24 h i.p., 14 días) (○). Cada punto representa la media \pm error estándar de 8-12 experimentos. El tratamiento crónico con desipramina provocó un desplazamiento significativo de la curva dosis-efecto hacia la derecha sin modificación en el efecto máximo. (Resultados no publicados).

A fin de estimar el valor de K_A para el complejo agonista UK 14304-adrenoceptor α_2 se compararon las distintas curvas obtenidas tras preincubación del tejido con $3,10^{-7}$ M de EEDQ con la curva promedio control, obteniéndose las concentraciones equiefectivas (30, 40, 50, 60 y 70% del efecto máximo tras inactivación) antes y después de la inactivación.

El valor promedio de K_A obtenido por ajuste no lineal de estos valores equiefectivos a la ecuación (6-a) fue de $63,2 \pm 5,2$ nM, lo cual sugiere por discordancia con el valor E_{c50} de la curva control la presencia de una importante proporción de receptores de reserva α_2 en conducto deferente de rata.

A partir del valor de K_A y aplicando la ecuación 3 se obtuvieron valores de ocupación fraccional del adrenoceptor α_2 para las distintas concentraciones de éste (tabla III) de tal modo que, y siendo conocido el efecto promovido por cada concentración, se pudo «construir» la relación ocupación-efecto (fig. 3) y por ajuste a la ecuación 7, el valor de K_e . El valor del porcentaje de receptores cuya ocupación es requerida para lograr el 50% del efecto máximo (K_e), así obtenido, fue de $1,05 \pm 0,11$ %.

Como aproximación al valor del porcentaje de receptores de reserva se estimó, a partir del valor K_e , la ocupación fraccional que promueve el 98% del efecto máximo, obteniéndose un valor de $28,4 \pm 3,1$ %, de donde podríamos asignar con un mínimo error un valor del $71,6 \pm 3,1$ % para la población de receptores de reserva α_2 en conducto deferente de rata.

A fin de evaluar el posible papel funcional de esta importante población de receptores de reserva y su posible modulación por tratamiento farmacológico, se estudió el efecto sobre ella del tratamiento crónico con desipramina (10 mg/kg/24 h i.p. 14 d), realizándose, en animales tratados, curvas dosis-efecto para UK 14304 antes y después de la inactivación parcial del adrenoceptor α_2 con EEDQ ($3,10^{-7}$ M).

El tratamiento crónico con desipramina provocó una importante desensibilización del adrenoceptor α_2 inhibitorio en conducto deferente de rata (fig. 4), observándose un incremento importante del valor de la E_{c50} para UK 14304 (E_{c50} control = $0,64 \pm 0,06$ nM; E_{c50} DMI = $1,90 \pm 0,18$ nM, $p < 0,001$, $n=6$), en concordancia con resultados publicados por otros autores³⁴.

La preincubación del conducto deferente tras tratamiento con desipramina con una concentración de $3,10^{-7}$ M de EEDQ provocó un importante desplazamiento de la curva de inhibición hacia la derecha ($E_{c50} = 195,6 \pm 22,7$,

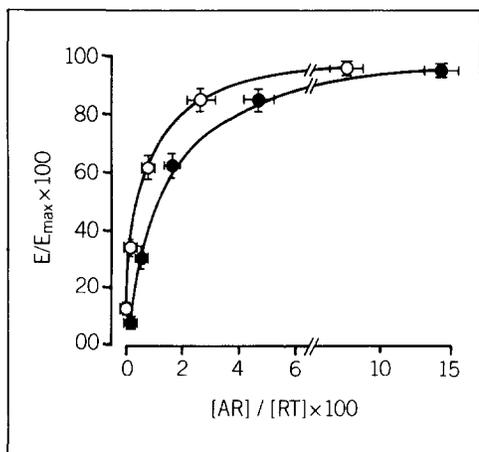


Fig. 5. Relación ocupación fraccional-respuesta fraccional del adrenoceptor α_2 en conducto deferente de rata para el agonista completo UK-14304 en animales control (●) y tras tratamiento crónico con desipramina (10 mg/Kg/24 h i.p., 14 días) (○). Cada punto representa la media \pm error estándar de 6-8 experimentos. El tratamiento con desipramina provocó un desplazamiento hacia la izquierda de la curva ocupación fraccional-respuesta fraccional lo cual sugiere un incremento en la reserva funcional del adrenoceptor α_2 . (Resultados no publicados).

$p < 0,001$) con una reducción en el efecto máximo ($\Delta = 31,7 \pm 4,9\%$) ligeramente inferior a la que se indujo en animales control y permitió obtener estimas del valor de la constante de disociación en equilibrio ($K_A = 468,1 \pm 93,5$ nM).

Así, la desensibilización inducida por desipramina se acompañó de un incremento importante del valor de la constante de disociación del complejo agonista-receptor ($K_A = 468,1 \pm 93,5$ nM) y de una reducción significativa en la ocupación fraccional requerida para lograr el 50% del efecto máximo ($K_e = 0,53 \pm 0,09\%$, $p < 0,001$). De tal modo que para este nivel de respuesta puede afirmarse que el tratamiento crónico con desipramina provoca un incremento en la reserva funcional de adrenoceptores α_2 en conducto deferente de rata (fig. 5), si bien, y en contraposición, la población de receptores de reserva a un nivel de respuesta del 98% no presentó diferencias significativas frente a control. Así, la ocupación fraccional requerida para lograr el 98% del efecto máximo tras tratamiento con el antidepressivo fue de $23,10 \pm 5\%$.

Los resultados presentes demuestran la existencia de una importante población de receptores de reserva para el adrenoceptor α_2 en

conducto deferente de rata y apuntan la posibilidad de modulación farmacológica de la relación ocupación-efecto en los procesos de desensibilización.

El hecho de que la población de receptores de reserva pueda ser modulada por tratamiento farmacológico refuerza la dificultad que su existencia plantea para la extrapolación de resultados funcionales a partir de estudios bioquímicos, o, en sentido inverso, la estima de parámetros bioquímicos a partir de estudios funcionales. En un plano teórico, el significado funcional de modificaciones inducidas por tratamiento farmacológico en los parámetros bioquímicos de densidad y afinidad del receptor podría verse amortiguado o potenciado por variaciones en la relación ocupación-efecto del sistema.

La valoración del acoplamiento receptor-efector a partir de la relación ocupación-efecto y de su modulación farmacológica puede sin duda ser de gran valor en el conocimiento de los procesos de neurotransmisión y aportar datos importantes para la mejor comprensión de los mecanismos de acción farmacológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clark AJ. The reaction between acetylcholine and muscle cells. *J Physiol (Lond)* 1926; 61: 530-546.
2. Gaddum JH. The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit. *J Physiol (Lond)* 1926; 61: 141-150.
3. Gaddum JH. The quantitative effects of antagonistic drugs. *J Physiol (Lond)* 1937; 89: 7-9.
4. Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol* 1956; 11: 379-393.
5. Nickerson M. Receptor occupancy and tissue response. *Nature* 1956; 178: 679-698.
6. Ariens EJ, Beld AJ, Demiranda JFR, Simonis AM. The pharmacoreceptor-effector concept. A basis for understanding the transmission of information in biological systems. En: O'BRIEN RD, ed. *The receptors, a comprehensive treatise*. Nueva York, Plenum Press, 1979; 33-91.
7. Furchgott RF. The use of β -h alloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. *Advan Drug Res* 1966; 3: 21-55.
8. Ruffolo RR Jr. Review: important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol* 1982; 2: 277-295.
9. Barlow RB, Scott NC, Stephenson RP. The affinity and efficacy of onium salts on the frog rectus abdominis. *Brit J Pharmacol* 1967; 31: 188-196.
10. Waud DR. On the measurement of the affinity of partial agonists for receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 170: 117-122.

11. Furchgott RF, Bursztyn P. Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. *Ann NY Acad Sci* 1967; 144: 882-899.
12. Thron CD. Graphical and weighted regression analysis for the determination of agonist dissociation constants. *J Pharmacol Exp Ther* 1970; 175: 541-553.
13. Parker RB, Waud DR. Pharmacological estimation of drug-receptor dissociation constants. Statistical evaluation. I. Agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 177: 1-12.
14. McPherson GA, Molenaar P, Raper C, Malta E. Analysis of dose-response curves and calculation of agonist dissociation constants using a weighted nonlinear curve fitting program. *J Pharmacol Meth* 1983; 10: 231-241.
15. Black JW, Leff FRS. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond* 1983; B220: 141-162.
16. Cox BM, Chavkin C. Comparison of dynorphin-selective kappa receptors in mouse vas deferens and guinea pig ileum: spare receptor fraction as a determinant of potency. *Mol Pharmacol* 1983; 23: 36-43.
17. Know YC, Moore GJ. Photoaffinity labeling of rat isolated portal vein: determinants of affinity constants and spare receptors for angiotensins II and III. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 231: 137-140.
18. Lin CW, Musacchio JM. The determination of dissociation constants for substance P and substance P analogues in the guinea pig ileum by pharmacological procedures. *Mol Pharmacol* 1983; 23: 558-562.
19. Meller E, Bohmacker K, Namba Y, Friedhoff AJ, Goldstein M. Relationship between receptor occupancy and response at striatal dopamine autoreceptors. *Mol Pharmacol* 1987; 31: 592-598.
20. Alder CHH, Meller E, Goldstein M. Receptor reserve at the α_2 -adrenergic receptor in the rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240: 508-515.
21. Siegl PK, McNeill JH. Antagonism with dibenamine D-600 and Ro 3-7894 to estimate dissociation constants and receptor reserves for cardiac adrenoceptors in isolated rabbit papillary muscles. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60: 1.131-1.137.
22. Minneman KP, Fox AW, Abel PW. Occupancy of α_1 -adrenergic receptors and contraction of rat vas deferens. *Mol Pharmacol* 1983; 23: 359-368.
23. Minneman KP, Abel PW. Spare α_1 -adrenergic receptors and the potency of agonists in rat vas deferens. *Mol Pharmacol* 1984; 25: 56-63.
24. Besse JC, Furchgott RF. Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on α -adrenergic receptors in rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197: 66-78.
25. Sheys EM, Green RD. A quantitative study of α -adrenergic receptors in the spleen and aorta of the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1972; 180: 317-325.
26. Guimaraes S, Paiva MQ. Postsynaptic α -adrenoceptor reserve and the shift of the concentration-response curves to the right, as caused by the irreversible α -adrenoceptor antagonist phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 505-512.
27. Zieherlm, Jaim-Etcheverry G. Regional variations in the distribution of noradrenaline along the rat vas deferens. *J Pharm Pharmacol* 1971; 23: 61-62.
28. Farmer SG. Noradrenaline and ATP-Cotransmitters? *Trends Pharmacol Sci* 1985; 6: 10-11.
29. Illes P, Dorge L. Mechanism of α_2 -adrenergic inhibition of neuroeffector transmission in the mouse vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1985; 328: 241-247.
30. Yamoaka K, Tanigawara Y, Nakawa T, Uno T. A Pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J Pharm-Dyn* 1981; 4: 879-885.
31. Adler CH, Meller E, Goldstein M. Recovery of α_2 -adrenoceptor binding and function after irreversible inactivation by N-ethoxycarboxy-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ). *Eur J Pharmacol* 1985; 116: 175-178.
32. Cambridge D. UK-14304 a potent and selective α_2 -agonist for the characterization of α -adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1981; 72: 413-415.
33. Berridge TL, Gadie B, Roach AG, Tulloch IF. α_2 -adrenoceptor agonists induce midriasis in the rat by an action within the central nervous system. *Br J Pharmacol* 1983; 78: 507-515.
34. García-Sevilla JE, Zubieta JK. Activation and desensitization of presynaptic α_2 -adrenoceptors after inhibition of neuronal uptake by antidepressant drugs in the rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 673-683.

DISCUSIÓN

E. MORCILLO: En primer lugar quisiera pedir al Dr. Barturen que comentara su punto de vista sobre la posible relación entre receptores de reserva y receptores silentes, es decir, aquellos receptores en los cuales se supone que habría una fijación del fármaco y que ésta, sin embargo, no resultaría eficiente.

Otro aspecto que me gustaría que comentase, si es posible, es cuál sería el significado de la N que aparece en la ecuación de Wand, que supongo guarda alguna relación con el coeficiente de Hill, una de las transformaciones lineales que por alguna razón ha caído en un relativo desuso.

En tercer lugar querría preguntar en relación con los experimentos que ha presentado si además de los datos con desipramina en un tratamiento crónico dispone también de datos utilizando otros inhibidores pero *in vitro*, es decir, directamente en un órgano aislado, no tras un tratamiento *in vivo* prolongado; y cuál podría ser el mecanismo de desensibilización.

F. BARTUREN: Empezando por la última pregunta, éstos son los resultados piloto y todavía no están publicados. El único tratamiento ensayado ha sido la desipramina. En un futuro intentaremos inducir desensibilización por otros métodos para ver si este aumento de la eficacia del sistema es algo que acompaña de forma general a distintos procesos de desensibilización.

Con respecto a la primera pregunta quisiera indicar que receptores de reserva y receptores silentes son conceptos diferentes que merece la pena diferenciar puesto que la terminología puede inducir a error. Así, por receptores de reserva se entiende la proporción de receptores cuya ocupación por el agonista no es necesaria para lograr el efecto máximo ya que éste se alcanza con una ocupación fraccional inferior a la unidad, mientras que, como ha indicado el Dr. Morcillo, por receptores silentes se entiende aquella población cuya ocupación no desencadena respuesta funcional alguna. Estos conceptos, aunque prácticamente contrapuestos, guardan una estrecha relación por cuanto ambos suponen aceptar la no linealidad de la función ocupación-efecto. En lo referente a la relación del parámetro N de la ecuación de Wand con el coeficiente de Hill quisiera señalar que si bien existe una proximidad numérica entre ellos, existen diferencias matemáticas y conceptuales que los distinguen. La ecuación de Hill pretende estimar el grado de alejamiento de la interacción fármaco-receptor de la clásica hipérbola rectangular que predice la ley de acción de masas. En ella, el parámetro N , que se define como la potencia a la que se eleva la variable independiente (concentración de fármaco) en una distribución de tipo hipérbola rectangular, representa el número de lugares de fijación por molécula de receptor. Frente a ella, la constante N de la ecuación de Wand surge de asumir la no necesaria relación lineal entre ocupación y efecto y por lo tanto la no obligatoriedad de que la función ocupación-efecto siga una distribución hipérbola rectangular, en un intento de dar flexibilidad al ajuste no lineal. La N de la ecuación de Wand se define

como la potencia a la que se eleva tanto la variable independiente como el parámetro E_{c50} en la ecuación hipérbola clásica. En nuestro caso y en una primera fase, estimamos las hipérbolas sin la potencia N y comprobamos que la introducción de este factor reducía en gran medida el error estándar.

E. MORCILLO: Sólo por curiosidad, ¿qué valores de N se obtenían?

F. BARTUREN: Muy próximos a uno. El valor más lejano a 1 fue 1,19, pero sin embargo, aun con valores comprendidos entre 0,87 y 1,16, la bondad de ajuste era muy superior.

J. GARCÍA RAFANELL: Quisiera plantear una cuestión de tipo general. En mi opinión existe un cierto paralelismo entre la interacción agonista-receptor y lo que ocurre en bioquímica cuando se estudia la interacción entre el sustrato y la enzima mediante estudios de inhibición enzimática. Hay un aspecto básico para plantear cualquier estudio de inhibición o de interacción entre enzima y sustrato, y es que para poder aplicar cualquier modelo matemático, uno debe asegurarse de que existe saturación de la enzima por el sustrato, es decir, que el número de receptores o de centros activos que hay reales, es siempre inferior al número real de moléculas físicas de sustrato. Si previamente esto no puede demostrarse, no tiene sentido aplicar ninguna cinética enzimática o por lo menos la cinética clásica de Michaelis-Menten. Hay un experimento muy sencillo a nivel bioquímico que consiste en doblar la concentración de enzima y ver si la actividad enzimática se dobla exactamente. Ello demuestra que existen condiciones de saturación de la enzima por el sustrato y si estas condiciones no se cumplen el experimento es incorrecto.

¿Existe en los estudios de interacción entre agonista y receptor, algún tipo de experimento previo que permita afirmar que se están cumpliendo estas condiciones?

F.J. MORALES-OLIVAS: No es que la interacción fármaco-receptor y la cinética enzima-sustrato sean parecidas, es que son idénticas y el problema es idéntico. Con alguna frecuencia también nos encontramos estudios que desde el punto de vista farmacológico son incorrectos porque se intenta hacer inferencias a partir de curvas dosis-respuesta que no están saturadas. Y esto es especialmente frecuente cuando después se utiliza un antagonista de tipo competitivo, situación en la que lógicamente es necesario utilizar dosis mucho más altas del agonista para conseguir la saturación.

- Quisiera además hacer una reflexión sobre el problema de la desensibilización de los receptores en los tratamientos crónicos y la relación entre proceso de desensibilización y número de receptores de reserva en el sentido de que ello tiene un interés muy superior al del puro academicismo farmacológico, ya que desde el punto de vista terapéutico puede tener una gran influencia. Pensemos, por ejemplo, en el problema muchas veces descrito de la pérdida de respuesta a los betamiméticos en pacientes asmáticos. Es posible que este fenómeno guarde relación con ese tipo de procesos. Es decir, en tratamientos crónicos en los que está descrita la desensibilización el número de receptores de reserva en el tejido diana del agonista podría condicionar una mayor o menor duración de la eficacia terapéutica.
- F. BARTUREN: Esta es una observación muy interesante. Hasta tiempos muy recientes se ha intentado explicar todo en función de dos parámetros principales: la densidad de receptores y la afinidad del receptor por el agonista. Y quizá exista un tercer parámetro o incluso otros que también puedan estar alterados y se nos escapan cuando utilizamos exclusivamente estudios de fijación con radioligandos.
- E. RUBIO: Quería volver al aspecto comentado por el Dr. Morcillo en el sentido de que en los datos presentados por el Dr. Barturen la interpretación de la N en este caso es un poco distinta de la interpretación de la N en la ecuación de Hill en cuanto a coeficiente representativo del grado de cooperatividad de la unión fármaco-receptor o incluso de la posibilidad de unirse varias moléculas a un mismo receptor.
- F. BARTUREN: Efectivamente, introducimos la N en la curva dosis-efecto. Es decir, estamos presuponiendo que hay una serie de cascadas enzimáticas o reacciones químicas posteriores que desconocemos, que podrían apartarse mucho de una distribución matemática simple.
- S. ERILL: ¿Existe algún dato sobre posible variación de la dotación de receptores de reserva con la edad? ¿Sería relativamente fácil estudiarlo en animales?
- F. BARTUREN: Yo no he encontrado nada. En realidad lo único que he encontrado en la bibliografía son algunos datos sobre modulación de los receptores de reserva en tratamiento crónico con morfina. No se ha valorado realmente como un parámetro que pueda ser modificado por la edad, situaciones patológicas, o tratamientos farmacológicos.
- S. ERILL: De hecho, la pregunta surgía a partir de un comentario anterior sobre el receptor adrenérgico. Hay datos en la literatura sobre modificaciones en la sensibilidad del receptor beta-adrenérgico con la edad, pero los datos no son concluyentes. Inicialmente se pensó que la sensibilidad y la afinidad del receptor beta-adrenérgico tanto a agonistas como a antagonistas disminuía con la edad, en el hombre, pero posteriormente aparecieron algunos datos contradictorios. Quizá el carácter contradictorio de los hallazgos se deba en buena medida a que no se ha considerado el papel de los receptores de reserva y sería muy interesante disponer de datos para poder interpretar estas observaciones.
- F. BARTUREN: Estoy totalmente de acuerdo.
- J. GARZÓN: Quisiera hacer una reflexión sobre la población de receptores de reserva y el uso de sustancias agonistas en tratamientos crónicos. Creo que en muchos casos se plantea la siguiente pregunta: ¿Qué es más conveniente, utilizar una sustancia muy potente que ocupe pocos receptores o una sustancia menos potente? Lo digo porque muchas veces lo que importa es el efecto que se intenta conseguir, el cual va a condicionar posiblemente la desensibilización más que la ocupación propiamente dicha. Esto implica que cuando se utiliza una sustancia muy potente que en principio tiene muchos receptores de reserva, la reducción de ésta es más rápida. En ciertos sistemas, especialmente cultivos celulares, se ha podido demostrar que sustancias que tienen muy poco nivel de ocupación, que son muy potentes, producen, sin embargo, una pérdida de receptores rapidísima en comparación con otras que precisan ocupar mucho más. Sin embargo, no sé hasta qué punto esto puede significar una ventaja de principio o no. Es un comentario simplemente.