

# Análisis de datos en estudios de receptores por autorradiografía

A. Pazos y A.M. González

Departamento de Fisiología y Farmacología. Sección de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander.

## Introducción

El desarrollo de las técnicas de marcaje de receptores mediante el uso de radioligandos específicos, habitualmente conocidas como técnicas de *binding*, ha permitido identificar y caracterizar bioquímicamente la amplia variedad de receptores para neurotransmisores hasta ahora descritos<sup>1</sup>. Esta caracterización se ha producido tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Sin embargo, desde un punto de vista anatómico, la resolución de estos métodos es muy limitada. Las técnicas de marcaje autorradiográfico de receptores tienen como objetivo primordial superar esta limitación. Para ello combinan los principios metodológicos de la autorradiografía para sustancias difusibles<sup>2,3</sup>, con las bases del marcaje por fijación de radioligandos<sup>4</sup>. Por esta razón, la autorradiografía de receptores comparte con los análisis de *binding* toda una serie de requisitos, tanto los relativos al ligando —afinidad, especificidad—, como los inherentes a las condiciones de incubación —tiempo, temperatura, pH— o aquellos referentes a la especificidad de la fijación —definición del «no específico»<sup>4,6</sup>. Metodológicamente, el marcaje se realiza mediante la incubación con el radioligando de secciones históicas obtenidas por microtomía de congelación. Tras una fase de secado, los tejidos se cubren con una emulsión fotográfica rígida radio-sensible cuyo revelado, tras un adecuado tiempo de exposición, permite obtener una imagen histórica: el autorradiograma. En esta imagen, compuesta de granos de plata originados en la emulsión por la emisión de electrones por parte de la molécula radiactiva, la intensidad de gris —densidad óptica— es, por tanto proporcional a la cantidad de radiactividad fijada<sup>4,7</sup> (fig. 1). Como se discutirá ampliamente más adelante, mediante la utilización de curvas de calibración y sistemas computadorizados de análisis óptico es posible cuantificar la densidad de recep-

tores en cada área con el nivel de resolución del microscopio óptico<sup>8,11</sup>. El procedimiento descrito constituye lo que habitualmente se conoce como autorradiografía *in vitro*, a diferencia del marcaje *in vivo*, en el cual se administra el ligando radiactivo al ser vivo, sacrificándolo posteriormente y obteniendo el tejido problema que es entonces cortado y expuesto a la emulsión bajo las condiciones ya citadas. El procedimiento de marcaje autorradiográfico *in vivo* presenta grandes limitaciones<sup>4</sup> y es poco usado, por lo que no nos referiremos específicamente a él en esta revisión.

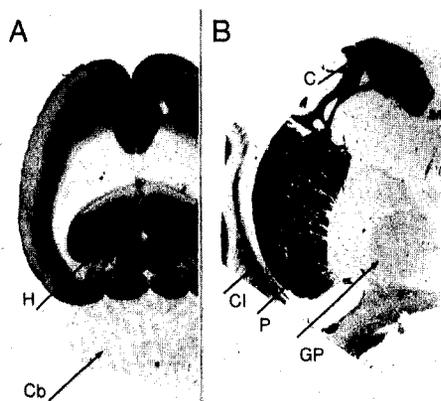


Fig. 1. Distribución autorradiográfica de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> en el cerebro de rata (A) y de receptores muscarínicos colinérgicos en cerebro humano, a la altura de los ganglios basales (B). Las áreas oscuras son aquellas ricas en fijación radiactiva. Nótese la alta densidad de receptores 5-HT<sub>1</sub> en el hipocampo (H) y las láminas IV-VI del neocórtex (Cx) de rata, en contraste con la escasa densidad en las láminas cerebelosas (Cb). En el ser humano, se ilustra la riqueza de receptores muscarínicos en el caudado (C), putamen (P) y claustrum (Cl), frente a su escasez en el globo pálido (GP). Imágenes magnificadas 1 x 7 (A) y 1 x 2 (B).

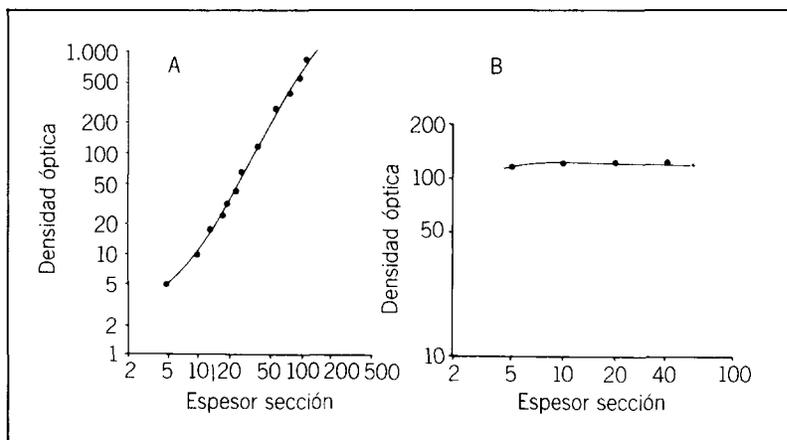


Fig. 2. Densidades ópticas obtenidas al exponer a la emulsión una concentración determinada de  $^{14}\text{C}$  (A) y de  $^3\text{H}$  (B), en función del espesor de la sección histica expuesta. Se observa que pequeñas modificaciones en el espesor generan grandes cambios de densidad óptica para el  $^{14}\text{C}$ , mientras no hay variaciones relevantes para el  $^3\text{H}$ . (Tomada de J.M. Alexander et al <sup>13</sup>, con autorización.)

**Valoración de resultados autorradiográficos: análisis farmacológicos y análisis densitométricos**

De lo expuesto hasta aquí, se deduce que la técnica de marcaje autorradiográfico de receptores proporciona un alto nivel de información morfológica, manteniendo las posibilidades de caracterización bioquímica. Ello ha dado lugar a la aplicación de esta técnica desde dos perspectivas muy diferentes: el uso de los principios de *binding* como nueva herramienta para identificar la distribución anatómica microscópica de un receptor (estudios de mapeo)<sup>4</sup>, y el aprovechamiento de la mayor resolución morfológica como un factor más en el momento de analizar con detalle las propiedades del receptor<sup>11</sup> (estudios farmacológicos). Por otra parte, la obtención de autorradiogramas está íntimamente ligada a los problemas de la densitometría, del

análisis de imágenes y de la microscopía<sup>12</sup>. Por tanto, al abordar los problemas relacionados con el análisis de datos en estudios de autorradiografía, es inevitable hacerlo a dos niveles diferentes: el nivel de la información sobre las características farmacológicas del receptor marcado y el nivel óptico de la interacción radioligando-emulsión y las diversas variables densitométricas que aparecen a partir de dicha interacción y que permiten la cuantificación del autorradiograma.

**Factores diferenciales en la generación del autorradiograma: radioligandos y emulsiones**

El proceso de formación del autorradiograma depende en gran medida del tipo de isótopo utilizado. Como queda reflejado en la tabla I, existen importantes diferencias entre los isótopos en

TABLA I  
PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ISÓTOPOS RADIATIVOS

ISÓTOPO	$T_{1/2}$ (días)	PARTÍCULA EMITIDA	ENERGÍA (KE V)
$^3\text{H}$	$4,5 \times 10^3$	$\beta$	18,6
$^{14}\text{C}$	$19,6 \times 10^5$	$\beta$	156
$^{35}\text{S}$	87,4	$\beta$	167
$^{125}\text{I}$	60,0	e. extranucl. Radiología	2,7 (28 %) 3,6 (49 %) 22,5 (14 %) 31,0 (7 %) 34,3 (2 %)
$^{32}\text{P}$	14,3	$\beta$	1.709

\* Vida media.

lo referente a la vida media, tipo de emisión y, lo que es más importante, energía máxima. Una alta energía implica un gran poder de penetración a través del tejido y, en virtud de ello, un menor nivel de resolución anatómica<sup>13,14</sup>. Esto supone una seria limitación para utilizar isótopos tales como <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>So, <sup>32</sup>P. Además, su elevada capacidad de penetración origina que mínimas variaciones en el espesor de la sección histórica pueden dar lugar a errores importantes en el proceso de cuantificación (véase más adelante). En contraste con esto, los radioligandos tritados, por poseer una energía muy baja, tienen un escaso poder de penetración —alrededor de 5-7  $\mu\text{m}$ — lo que les confiere un alto nivel de resolución anatómica y un amplio margen de seguridad en cuanto a variaciones en el espesor de la sección<sup>1</sup> (fig. 2). De todo lo anteriormente expuesto se deduce que, desde el punto de vista de resolución, el <sup>3</sup>H presenta indudables ventajas para los estudios autorradiográficos. Sin embargo, el empleo de ligandos tritados presenta dos limitaciones importantes: a) la necesidad de exponer los tejidos a la emulsión durante largos periodos de tiempo, debido a su baja energía, y b) la atenuación diferencial de la emisión energética en función de la composición química del tejido que emite la partícula  $\beta$ , por ejemplo, substancia gris frente a substancia blanca en el sistema nervioso. Ambos problemas se comentarán en profundidad más adelante.

Estos problemas han sido parcialmente resueltos con el uso de radioligandos yodados, cuya energía máxima (tabla I) permite todavía un nivel de resolución adecuado. Estos radioligandos requieren periodos de exposición mucho más cortos y no presentan el problema de la diferente absorción en función de la composición química histórica<sup>9</sup>.

En cuanto a la emulsión fotográfica rígida donde se genera la imagen autorradiográfica, puede tratarse de colocar en un portaobjetos muestras individuales impregnadas en emulsiones líquidas, por ejemplo, Kodak NTB3 (*coverslip*) o de filmes radiosensibles especialmente diseñados para favorecer la autorradiografía con tritio. Aunque el método del *coverslip* parece poseer un grado de resolución ligeramente mayor al obtenido con el filme<sup>4,7</sup>, la necesidad de procesar individualmente cada sección entorpece extraordinariamente el proceso de generación de autorradiogramas y dificulta su cuantificación. Por ello, en este momento la gran mayoría de estudios de marcaje de receptores por autorradiografía se realizan utilizando el método del filme.

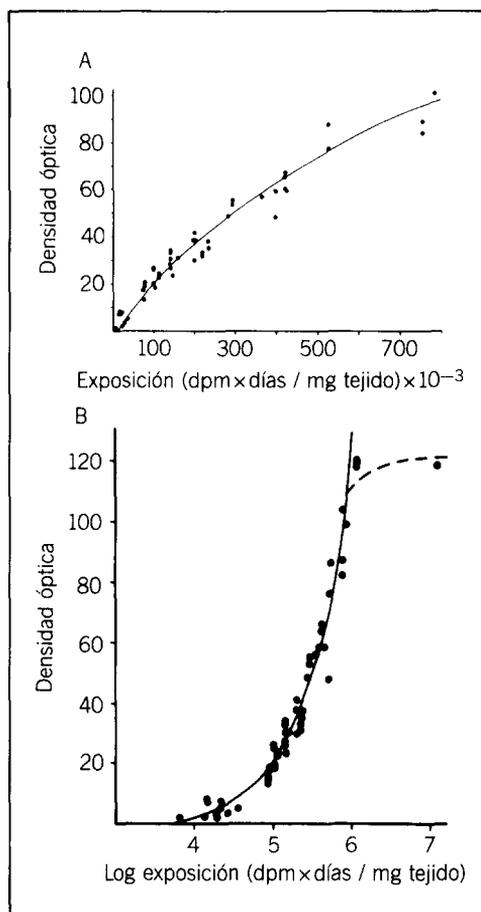


Fig. 3. A) Relación entre el nivel de radiactividad expuesto por unidad de tiempo y la densidad óptica obtenida. B) Transformación logarítmica de la relación anterior. (Tomada de J.R. Unnerstall<sup>12</sup>, con autorización.)

Debido a la escasa energía de los ligandos tritados, no es posible utilizar filmes radiológicos convencionales, porque las partículas beta no atraviesan la película protectora externa de dichos filmes. Por ello se recurre a láminas especiales, sin película protectora, de las cuales existen solamente dos en el mercado: el <sup>3</sup>H-Ultrafilm (LKB)<sup>10,15</sup> y el Hyperfilm<sup>3</sup>H (Amersham). Las propiedades de ambos filmes son muy similares, consiguiendo una resolución muy alta en tejidos incubados con ligandos tritados.

En 1982 Unnerstall et al<sup>12</sup> estudiaron el comportamiento o respuesta del filme a la cantidad de radiactividad, es decir, la relación entre la

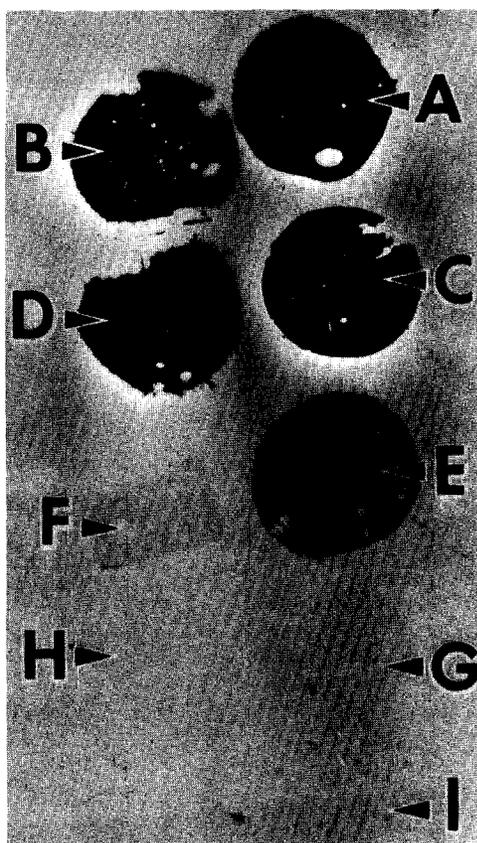


Fig. 4. Imagen autorradiográfica de una serie de estándares de pasta cerebral de materia gris montados sobre portaobjetos gelatinizados y expuestos a  $^3\text{H}$ -Ultrofilm durante 5 días. A-H corresponden a las cantidades de radiactividad descritas del 1 al 8 en la tabla II. I representa el background del filme. (Tomada de J.R. Unnerstall et al<sup>12</sup>, con autorización.)

concentración de la radiactividad presente en el tejido y la densidad óptica (DO) generada en el filme. Para ello, expusieron, a diversos tiempos, secciones históicas que contenían diferentes cantidades de una sustancia tritiada (medidas previamente por centelleo en secciones consecutivas a las anteriores), y valoraron por densitometría el marcaje obtenido. Como se muestra en la figura 3, la relación existente entre la densidad óptica y el factor «exposición» (radiactividad/mg tejido x tiempo) es una hipérbola que se transforma en recta cuando se relaciona con el log exposición ( $\text{DO} = 0,0017 \times \text{exposición}^{0,8090}$ ).

Sin embargo, dicha transformación no es válida en las zonas de densidad óptica muy alta y muy baja. Este hecho ilustra la peculiar respuesta del filme a la radiactividad<sup>12</sup>. Estos estudios permitieron desarrollar ecuaciones para calcular el período de exposición de un tejido determinado, pero, sobre todo, fueron el inicio de los sistemas de estandarización y cuantificación autorradiográfica que revisamos a continuación.

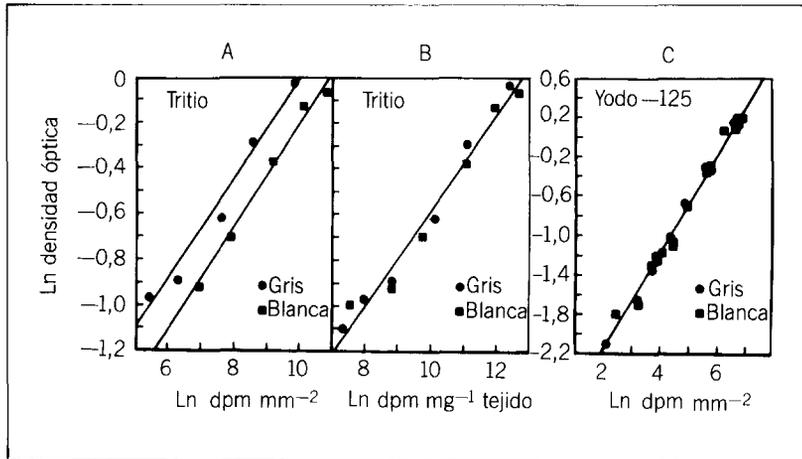
### Problemas ligados a la cuantificación de autorradiogramas

El proceso de cuantificación de autorradiogramas se basa en la asunción del principio según el cual, el nivel de densidad óptica —fácilmente valorable con un densitómetro— está relacionado con la cantidad de radiactividad presente en el tejido. Como se ha expuesto anteriormente, esta relación empezó a estudiarse al valorar la respuesta del filme a la radiactividad<sup>12</sup>. Sin embargo, un intento serio de cuantificación requería la existencia de tejidos patrón, es decir, tejidos que contuviesen concentraciones conocidas de radiactividad que pudieran exponerse al filme conjuntamente con los tejidos experimentales, permitiendo la realización de un calibrado. Por esta razón, Unnerstall et al<sup>12</sup>, en 1982, diseñaron una serie de estándares o patrones elaborados con una mezcla de pasta de cerebro y concentraciones crecientes de un radioligando tritiado volátil. Tras su desecación y compactación, estos bloques fueron cortados y montados sobre portas, lo que permitió su exposición al filme y el análisis densitométrico de su respuesta (fig. 4). Al mismo tiempo, se contaron por centelleo las concentraciones reales de radiactividad y se determinó el contenido de proteínas. En la figura 5 se observa que existe una relación lineal entre el ln de la densidad óptica y el ln de la concentración de radiactividad presente en los estándares. De esta forma, la aplicación combinada de la densitometría cuantitativa y el manejo de patrones estándar supuso el comienzo de la verdadera autorradiografía cuantitativa de receptores<sup>9,12</sup>.

Sin embargo, existe una serie de limitaciones y problemas en el proceso de cuantificación autorradiográfica. Estas limitaciones se refieren fundamentalmente a los fenómenos de autoabsorción diferencial (*quenching*), estados de sobre o infraexposición y homogeneidad del gris de base.

Como ya se ha comentado, debido a la baja energía de emisión del tritio se produce un fenómeno de absorción por parte del tejido y esta

Fig. 5. Relación lineal entre el  $\ln$  de la densidad óptica y el  $\ln$  de la radiactividad contenida en los patrones (estándares) de pasta cerebral de substancia gris y substancia blanca. Relación correspondiente al tritio en función de la superficie (A) y en función de la masa (B), y relación correspondiente al yodo-125, en función de la superficie (C) (Modificada de M.J. Kuhar y J.R. Unnerstall<sup>9</sup>, con autorización.)



absorción depende de la densidad hística<sup>9</sup>. En el cerebro, dado que la substancia blanca es más densa que la gris, esta última absorberá proporcionalmente menos rayos  $\beta$  que la primera. Como consecuencia de ello, no es posible analizar cuantitativamente las densidades autorradiográficas en substancia gris y substancia blanca con un mismo patrón de calibración (fig. 5), lo que ha obligado a la fabricación de patrones selectivos de ambas substancias<sup>9</sup>. Sin embargo, esta medida no resuelve totalmente el problema de la influencia del *quenching* diferencial sobre la cuantificación de autorradiogramas, ya que a lo largo del cerebro se encuentran núcleos que presentan diferentes proporciones de substancia gris y blanca. Para obviar esto, se han propuesto diversos sistemas:

1. Eliminación de los lípidos hísticos previa a la

incubación, mediante extracción con cloroformo<sup>16</sup>, tratamiento con alcohol<sup>17,18</sup>, etc. Al modificar la densidad hística, estos procesos reducen la absorción diferencial<sup>9,16,18</sup>. Sin embargo, los métodos de deslipidación no pueden aplicarse a veces a los tejidos, dependiendo del ligando con el que se pretenda incubarlos.

2. Obtención, mediante los procedimientos anteriores, de un mapa de factores de corrección para cada núcleo cerebral que refleje las variaciones anatómicas<sup>18</sup>.

3. Pretratamiento radiactivo de los portaobjetos sobre los que van a montarse los tejidos, reduciendo así la atenuación diferencial<sup>9</sup>.

Mediante estos procedimientos se ha paliado en gran medida el fenómeno del *quenching* regional al usar ligandos tritidos. Por supuesto, este problema no existe con el empleo de ra-

TABLA II  
CONCENTRACIÓN DE RADIATIVIDAD EN LOS DIVERSOS PATRONES (DPM/MG  $\times 10^3$ )

Nº	PASTA CEREBRAL (SUBSTANCIA GRIS)	Polímero plástico			
		POLÍMERO	EQUIVALENTE HÍSTICO TEÓRICO	EQUIVALENTE HÍSTICO CALIBRADO*	COEFICIENTE DE EQUIVALENCIAS**
1	113	242	72,6	73,3	0,99
2	31	202	63,4	61,0	1,04
3	20	165	53,9	52,8	1,02
4	12,2	121	41,4	36,3	1,14
5	2,1	74	27,1	25,8	1,05
6	0,9	42	17,2	19,3	0,89
7	0,7	27	10,8	14,4	0,75
8	0,6	7	2,9	4,3	0,67

\* Calibrados con los patrones de pasta gris.

\*\* Relación equivalente hístico teórico/equivalente hístico calibrado.

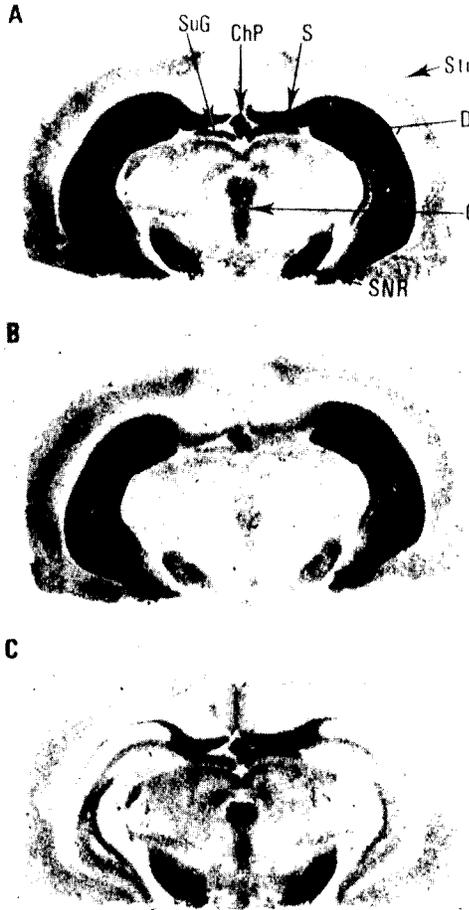


Fig. 6. Ilustración de desplazamientos selectivos por autorradiografía. A muestra la fijación de  $^3\text{H}$ -5-HT en una sección de cerebro de rata. B corresponde a una sección consecutiva, incubada en presencia de  $10^{-8}\text{M}$  8-OH-DPAT. Se observa en B cómo  $10^{-8}\text{M}$  8-OH-DPAT inhibe la fijación de  $^3\text{H}$ -5-HT en el subículo (S), la substancia negra (SNR) y el colículo superior (SuG), sin afectar al giro dentado del hipocampo (DG). En C, 3-OH-DPAT presenta el patrón opuesto. Áreas como el hipocampo son áreas ricas en receptores  $5\text{-HT}_{1A}$ , mientras que el subículo y la substancia negra están enriquecidos en receptores  $5\text{-HT}_{1B}$ . Tomada de A. Pazos y J.M. Palacios<sup>19</sup>, con autorización.)

dioligandos yodados pues, debido a su mayor energía, sufren un nivel de absorción casi despreciable (fig. 5 c).

Recientemente, se ha añadido un nuevo factor a tener en cuenta en relación con la autoabsorción diferencial: la dificultad de fabricar re-

petidamente patrones (estándares) de pasta cerebral ha dado lugar a la aparición de diversas series de patrones comerciales, realizados mediante la mezcla de cantidades crecientes de radiactividad con un polímero de metacrilato pulverizado. Mientras que la aparición de estos patrones comerciales ha hecho posible la elaboración adicional de estándares de  $^{125}\text{I}$ , ha planteado en cambio el problema de su falta de sensibilidad frente a los fenómenos de *quenching* para el  $^3\text{H}$  ya que el polímero no posee substancia gris ni blanca<sup>8,9</sup>. En un intento de obviar esto se ha intentado extrapolar su valor de equivalencia tisular a base de recalibrarlos con patrones de pasta. Sin embargo, los valores obtenidos en estas extrapolaciones no son siempre equiparables, puesto que dependen del grupo de patrones cerebrales usado, tal y como se ilustra en la tabla II.

Otro factor que puede interferir en el proceso de cuantificación autorradiográfica es el hecho de que el período de exposición sea demasiado corto (infraexposición) o demasiado largo (sobrexposición), ya que, como ya se ha reseñado, cuando la densidad óptica se encuentra en niveles extremos, la respuesta del filme es diferente (fig. 3). Estos errores pueden evitarse con el cálculo previo del período de exposición teórico a partir de la fórmula:

$$\text{exposición (días)} = \frac{2,5 \times 10^5}{\text{DPM/mg tejido}}$$

obtenida a partir de la ecuación de respuesta del filme<sup>12</sup>.

El último factor que debe tenerse en cuenta al proceder la cuantificación densitométrica de un autorradiograma es el nivel de gris basal del filme, habitualmente conocido como *background*, que puede variar sensiblemente de un filme a otro. Estas variaciones deben cuantificarse siempre con el fin de corregir adecuadamente las medidas de densidad.

En la actualidad todos los procesos y cálculos citados en este apartado se realizan habitualmente mediante el uso de sistemas computadorizados de análisis de imágenes<sup>4,6</sup>. Estos sistemas constan esencialmente de un densitómetro, un macroscopio acoplado a una cámara de alta resolución y un ordenador. Una vez localizada y amplificada el área a medir, ésta es seleccionada mediante un lápiz o tablero sensible a la luz, procediendo a cuantificar su densidad óptica, a partir de una escala de gris cuya numeración de 0 a 256 valora la transmitancia (inversa a la densidad óptica). La previa cuantificación de los patrones (estándares) y del gris

basal, permite la cuantificación absoluta en moles/unidad de tejido o de proteína en cada área microscópica<sup>4,5</sup>. Existen complejos programas de ordenador que realizan todas las transformaciones secuenciales con un alto grado de velocidad y precisión.

El uso de estos sistemas de análisis de imágenes permite igualmente la conversión de los autorradiogramas en imágenes en escala de colores. De esta forma se substituye el patrón blanco-negro, por una gama opcional de colores, que permite una mejor diferenciación de los distintos niveles de densidad, y una cuantificación más selectiva.

### Análisis de datos autorradiográficos en relación con problemas farmacológicos

Como se ha comentado al principio, las técnicas autorradiográficas de receptores comparten los mismos principios fundamentales que las de fijación a membranas (*binding*). Esto quiere decir que, aparte de la aplicación meramente anatómica de realización de mapeos microscópicos de receptores, bien sea en el animal<sup>4,19</sup> o en el ser humano<sup>4,20</sup>, estas técnicas permiten la realización de estudios de saturación, cinética y competición con el mismo desarrollo que en *binding*, ganando además el factor de resolución morfológica. La aplicación de los sistemas computadorizados de análisis de imágenes permite además el tratamiento simultáneo de los datos con los programas existentes para valorar representaciones de Scatchard, curvas de desplazamiento, etc. Por tanto, para cada área microscópica se obtendrán valores de  $K_D$ ,  $B_{max}$ ,  $K_i$ , etc. La realización de estos estudios y el análisis de los datos resultantes plantea toda una serie de problemas que, por ser totalmente similares a los de estudios de *binding* y haber sido ya tratados por otros autores en esta contribución, no pasaremos a comentar. Sin embargo, hay un aspecto donde la aplicación de técnicas autorradiográficas ha permitido no sólo reproducir los estudios de fijación sino mejorarlos de forma relevante: la discriminación de subtipos de receptores.

Como ejemplo, se puede describir el tipo de estudios que permitió la caracterización detallada de los diversos subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> en el cerebro de rata. Mediante estudios de fijación se había propuesto la existencia de tres subtipos diferentes de este receptor (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>). Sin embargo, la información facilitada por dichos estudios en cuanto a propiedades farmacológicas y dis-

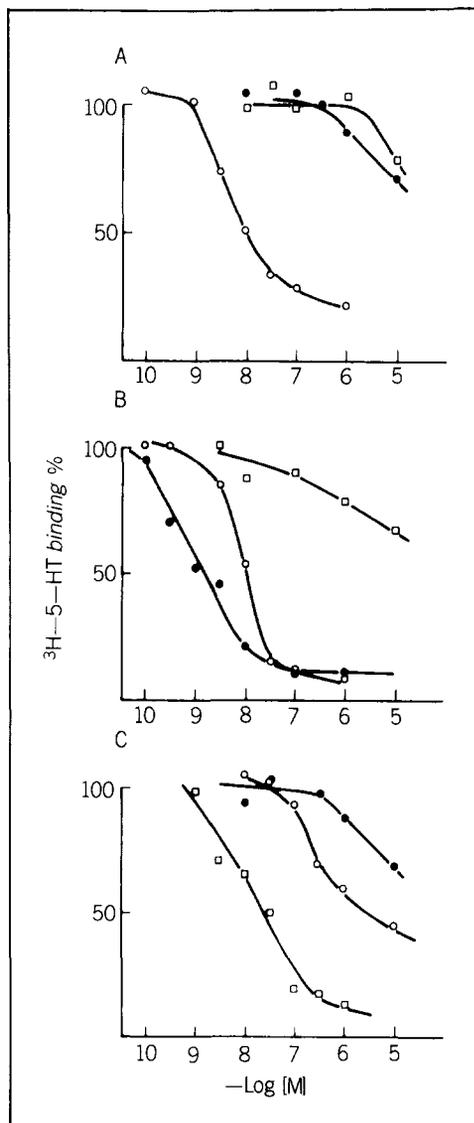


Fig. 7. Curvas de competición frente a la <sup>3</sup>H-5-HT en secciones de cerebro de rata, medidas por autorradiografía en el giro dentado del hipocampo (○), el subículo dorsal (●) y el plexo coroideo (□). A: Desplazamientos por 8-OH-DPAT; B: (-)-21009; C: mesulergina. (Tomada de A. Pazos y J.M. Palacios<sup>6</sup>, con autorización.)

tribución de cada subtipo era muy limitada<sup>11,19,21</sup>. Por esta razón, se diseñaron experimentos de competición autorradiográfica incubando secciones consecutivas de una misma re-

TABLA III  
AFINIDADES ( $K_d^*$ ) DE DIVERSOS FÁRMACOS FRENTE A  $^3\text{H}$ -5HT EN DIFERENTES ÁREAS DEL CEREBRO DE RATA, MEDIDAS POR AUTORADIOGRAFÍA\*\*

FÁRMACO	ÁREA CEREBRAL				
	SUBICULO	SUSTANCIA NEGRA	SEPTO LATERAL	HIPOCAMPO, CA <sub>1</sub>	PLEXOS COROIDEOS
8-OH-DPAT	> 3.000	> 5.000	19,2	4,8	> 4.000
(-) 21 009	0,6	0,9	6,0	7,2	> 4.000
LSD	29,9	44,9	ND***	3,6	4,1
Mianserina	143,7	ND	> 1.000	269,8	13,6
Mesulergina	> 5.000	> 3.000	> 1.000	> 1.000	11,8

\* nM.

\*\* Tomada de A. Pazos y J.M. Palacios<sup>19</sup>, con modificaciones.

\*\*\* No determinado.

gión anatómica en presencia de  $^3\text{H}$ -5-HT y de concentraciones crecientes de sustancias no marcadas que habían sido propuestas como «selectivas de subtipo»<sup>19</sup>. Mediante este diseño se pudieron construir curvas cuantitativas de competición en las diferentes áreas microscópicas, identificando así núcleos o estructuras enriquecidas en un solo subtipo de receptor 5-HT<sub>1</sub><sup>11,19</sup>. La construcción de estas curvas mediante densitometría computarizada permitió además la identificación selectiva de cada subtipo. En la figura 6 se muestra una imagen puntual densitométrica de dos de estos desplazamientos, mientras que en la figura 7 se recogen las curvas completas en diferentes áreas cerebrales. En ambas puede observarse cómo la fijación de la  $^3\text{H}$ -5-HT en el giro dentado hipocampal fue desplazada con buena afinidad por la 8-OH-2-di-n-propilamino-tetralina (8-OH-DPAT), un compuesto propuesto como 5-HT<sub>1A</sub>-selectivo, pero no por el (-)-21009 (4-3-ter-butilamino-2-hidroxi-propoxi-indol-isopropilester) ni por la mesulergina, propuestos como 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1C</sub>-selectivos, respectivamente. En el subículo dorsal, el *binding* fue inhibido con alta afinidad por (-) 21009 pero no por los otros 2 compuestos. Finalmente, en los plexos coroides, mientras la mesulergina desplazó con afinidad nanomolar la fijación de  $^3\text{H}$ -5-HT, tanto la 8-OH-DPAT como el (-)-21009 fueron inactivos. De esta forma, se pudieron identificar regiones anatómicas exclusivamente enriquecidas en un subtipo de receptor, permutando así el estudio detallado de sus propiedades farmacológicas (tabla III), con una precisión difícil de conseguir al realizar estudios de *binding* en tejidos disecados manualmente<sup>11,19</sup>. Este ejemplo ilustra, pues, la contribución de las técnicas

autorradiográficas a la resolución de problemas típicamente farmacológicos, como es la discriminación de subtipos de receptores.

### Los límites de resolución en el marcaje autorradiográfico de receptores

Un último aspecto íntimamente ligado a la valoración de los datos cuantitativos en estudios autorradiográficos es el que hace referencia al nivel máximo de resolución alcanzable. A pesar de los intentos realizados, hasta ahora este nivel máximo se corresponde con la resolución del microscopio óptico<sup>4</sup>. La localización autorradiográfica de receptores a nivel de microscopía electrónica, además de estar limitada por la reversibilidad de la unión ligando-receptor, se enfrenta con la dificultad en adscribir las zonas de fijación detectadas a una determinada región sináptica, debido a la amplitud de las áreas de probabilidad de localización de la radiactividad. Aunque se están desarrollando métodos que permiten la resolución de estos problemas, es razonable pensar que una mayor resolución anatómica en la localización de receptores vendrá fundamentalmente de la mano de estudios inmunohistoquímicos<sup>4</sup>.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ. Neurotransmitter receptor binding, Nueva York, Raven Press, 1985.
2. Roth LJ, Stumpf WE. Autoradiography of Diffusible substances. Nueva York, Academic Press, 1969.

3. Stumpf WE, Roth LJ. High resolution autoradiography with dry-mounted, freeze-dried frozen sections: comparative study of six methods using two diffusible compounds,  $^3\text{H}$ -estradiol and  $^3\text{H}$ -mesobilirubinogen. *J Histochem Cytochem* 1982; 14: 274-287.
4. Kuhar MJ. Receptor localization with the microscope. En: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, eds. *Neurotransmitter receptor binding*. Nueva York, Raven Press, 1985; 153-176.
5. Palacios JM. Receptor autoradiography: the last ten years. *J Receptor Res* 1984; 4: 633-644.
6. Pazos A, Palacios JM. New imaging techniques in receptor studies. En: Assandri A, Fumero S, eds. *Receptors in Pharmacology*. Ivrea, RBM Press, 1986; 51-65.
7. Palacios JM, Pazos A. Receptor autoradiography. En: Van Leeuwen FW. ed. *Immunocytochemistry and Neurotransmitter Binding*. Amsterdam, ENA, 1984; 40-81.
8. Hall MD, Davenport AP, Clark CR. Quantitative receptor autoradiography. *Nature* 1986; 324: 493-494.
9. Kuhar MJ, Unnerstall JR. Quantitative receptor mapping by autoradiography: some current technical problems. *Trends Neurosci* 1985; 8: 49-53.
10. Palacios JM, Niehoff DH, Kuhar MJ. Receptor autoradiography with tritium-sensitive film: potential for computerized densitometry. *Neurosci Lett* 1981; 25: 101-105.
11. Pazos A, Cortés R, Palacios JM. Quantitative receptor autoradiography: application to the characterization of multiple receptor subtypes. *J Receptor Res* 1984; 4: 645-656.
12. Unnerstall JR, Niehoff DL, Kuhar MJ, Palacios JM. Quantitative receptor autoradiography using  $^3\text{H}$ -Ultrafilm: application to multiple benzodiazepine receptors. *J Neurosci Meth* 1982; 6: 59-73.
13. Alexander GM, Schwartzman RJ, Bell RD, Yu J, Renthal A. Quantitative measurement of local cerebral metabolic rate for glucose utilizing triated 2-deoxy-glucose. *Brain Res* 1981; 223: 59-67.
14. Rogers AW. *Techniques of Autoradiography*. Nueva York, Elsevier, 1979.
15. Unnerstall JR, Kuhar MJ, Niehoff DL, Palacios JM. Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of GABA receptors: evidence from a quantitative autoradiographic study. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218: 797-804.
16. Herkenham M, Sokoloff L. Quantitative receptor autoradiography: tissue defatting eliminates differential self-absorption of tritium radiation in gray and white matter of brain. *Brain Res* 1984; 321: 363-368.
17. Kuhar MJ, Unnerstall JR. *In vitro* labeling receptor autoradiography: loss of label during ethanol dehydration and preparative procedures. *Brain Res* 1982; 244: 178-181.
18. Geary WA, Wooten GR. Regional tritium quenching in quantitative autoradiography of the central nervous system. *Brain Res* 1985; 336: 334-336.
19. Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 1985; 346: 205-230.
20. Palacios JM, Cortés R, Probst A. Mapping receptors in the human brain. *Trends Neurosci* 1986; 9: 284-289.
21. Pazos A, Dietl MM, Hoyer D, Palacios JM. Autoradiography of serotonin receptors. En: Hamon M, Osborne NN, eds. *Neural Serotonin*, Londres, J Willey & Sons, 1988. (En prensa.)

## DISCUSIÓN

J.M. PEINADO: Quisiera preguntar al Dr. Pazos si esta técnica distingue bien los distintos tipos de receptores y si permite diferenciar entre receptores y sistemas de recaptación.

A. PAZOS: Depende del radioligando que se utilice. Si el tejido se incubaba con un radioligando que reconoce un sistema de captación, como podría ser, aunque esto también es motivo de controversia, la imipramina, que marca el sistema de captación serotoninérgico, se marcaría el lugar de recaptación. Lo mismo ocurre con el *binding*. Todo depende de la selectividad del radioligando por el que se pretende marcar.

F. BARTUREN: Quería plantear tres preguntas. Desde el punto de vista anatómico está claro que la autorradiografía aporta, en comparación con el *binding*, datos más fiables en cuanto

a la resolución. ¿Hasta qué punto se han desarrollado técnicas de microscopía electrónica? Cabe pensar que teóricamente podrían aportar muchos datos orientados a la localización de la hendidura sináptica, por ejemplo, aunque esto a su vez entrañaría muchos problemas técnicos en cuanto a la preparación de las muestras. La segunda pregunta tiene un enfoque farmacológico. La autorradiografía obliga a congelar el tejido en secciones. ¿Hasta qué punto, dependiendo de los sistemas, esto puede reducir la fijación específica y llegar a enmascarar alteraciones que podrían observarse en fresco?

La tercera cuestión que quería plantear es que la autorradiografía se está empleando de cara a discriminar posibles implicaciones etiopatológicas de receptores.

De hecho, usted la está utilizando en el estudio de enfermedades degenerativas. Estos trastornos degenerativos muchas veces implican alteraciones de la densidad celular o incluso de la distribución de la grasa, lo cual podría alterar los resultados con respecto a la situación basal.

A. PAZOS: Empezando por la última, efectivamente, cuando uno realiza un estudio autorradiográfico de receptores en un tejido afecto de una enfermedad degenerativa debe disponer al mismo tiempo de un estudio anatomopatológico que le permita conocer cuál era la integridad de dicho tejido, por ejemplo si el contenido en grasa estaba o no conservado y en general hay que estar muy seguro de que el trastorno degenerativo no ha modificado características del tejido que a su vez puedan alterar la respuesta de receptor. Eso a veces es complicado pero desde luego es factible, ya que cuando se hacen este tipo de estudios siempre hay una parte del tejido que se utiliza para el estudio autorradiográfico y otra parte que se utiliza para estudios de tipo anatomopatológico, incluso neuroquímico.

En cuanto a la pregunta relativa a la microscopia electrónica, éste es un aspecto sobre el cual diversos grupos llevan varios años trabajando para lograr localizar el receptor no sólo a nivel óptico sino también a nivel subcelular, y por ahora la respuesta no es satisfactoria debido a dos tipos de problemas. En primer lugar existen problemas técnicos ligados al radioligando; por ejemplo, sólo se podría hacer con radioligandos irreversibles debido al tipo de manipulación a que posteriormente se someten las muestras para su observación con microscopia electrónica; hay también otros

problemas ligados a la obtención de las muestras de tejidos. Además, la propia técnica de la microscopia electrónica localiza las estructuras con un límite de probabilidad y, según mi información, no se ha llegado todavía a tener una imagen precisa del receptor justo a nivel de la sinapsis.

En cuanto a la congelación, efectivamente éste es un problema a tener en cuenta. Lo único que puedo decirle es que para bastantes receptores se han comparado en un mismo territorio las técnicas de *binding* y de autorradiografía y los valores de  $K_d$  son absolutamente comparables mientras que los valores de  $B_{max}$  muestran una discreta variación a favor del estudio autorradiográfico, lo cual tampoco resulta sorprendente teniendo en cuenta que el proceso de preparación de la membrana en el *binding* puede no tener una efectividad del 100%. En cualquier caso no puede descartarse que para algún receptor el proceso de congelación sea crítico.

A. SÁNCHEZ-GARCÍA: Los experimentos autorradiográficos tienden a utilizarse aparentemente para localizar la zona concreta donde se encuentra uno y otro tipo de receptor. ¿Qué opinión le merece esta práctica?

A. PAZOS: Todos los sistemas de análisis óptico que aquí se han comentado se basan en la digitalización de la imagen, es decir, lo primero que hace el sistema después de medir los estándares es digitalizar la imagen autorradiográfica que uno le proyecta en el monitor con el nivel de amplificación elegido, y a partir de ahí los sistemas cambian: algunos permiten seleccionar microáreas concretas dentro de esta imagen digitalizada, en otros ocurre al revés, es decir, se digitalizan primero microáreas.