

**BASES TEORICAS DE LA INTERACCION FARMACO-RECEPTOR.
*TRATAMIENTO Y REPRESENTACION GRAFICA DE LOS DATOS***

(Segunda edición, Noviembre de 1992)

**Federico Gago Badenas
Departamento de Fisiología y Farmacología
Universidad de Alcalá de Henares**

Prólogo a la primera edición.

Esta pequeña guía de trabajo no es un libro de texto, sino un intento de brindar al estudiante de Farmacología un puente de unión entre las obras de referencia utilizadas en esta disciplina y las publicaciones científicas. Los trabajos de investigación se multiplican y tanto los estudiantes de último curso como los licenciados que desean incorporarse a la investigación actual en Farmacología pueden en ocasiones ver retrasado su progreso en este campo al encontrarse con problemas conceptuales o prácticos con los que aún no se han familiarizado.

Con esta pequeña obra se espera suplementar, que no suplantar, a los textos habitualmente consultados durante la carrera. Estos son ya conocidos por aquéllos a los que esta guía va dirigida, pero con ella se intenta llenar el vacío existente en lo que se refiere a la utilización racional de los datos obtenidos experimentalmente en el laboratorio, así como a su interpretación y representación gráfica. En las últimas páginas se incluyen, a modo de ejemplo, algunos de los ejercicios numéricos sobre los que se trabaja en los seminarios de la asignatura de Farmacodinamia en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá de Henares.

Si a pesar de ser una breve e incompleta introducción a algunos de los cálculos más frecuentemente utilizados en esta importante área de conocimiento, sirve para que el estudioso de la materia tenga un más fácil acceso a los artículos de investigación actuales y para permitirle profundizar en esta ciencia relativamente joven, su validez habrá sido demostrada.

Alcalá de Henares, 1 de Abril de 1986

Federico Gago Badenas

INDICE TEMATICO

1. Introducción.
2. Ensayos enzimáticos.
 - 2.1. Inhibición competitiva.
 - 2.2. Inhibición no-competitiva.
3. Medida del efecto. Teoría ocupacional.
4. Respuestas equivalentes y grado de antagonismo.
5. Ensayos de unión de ligandos.
6. Experimentos de desplazamiento de ligandos.
7. Receptores de reserva.
8. Respuestas cuantizadas: efectos de todo-o-nada.
9. Margen de seguridad. Evaluación del índice terapéutico.
10. Referencias seleccionadas.
11. Tablas.
12. Ejercicios numéricos.
13. Índice de materias.

Introducción

El punto de partida para el estudio de la farmacodinamia nos lo proporciona la capacidad de muchas células de responder de forma altamente selectiva a concentraciones extraordinariamente pequeñas de determinadas sustancias químicas.

Hay 3 características de la acción de los fármacos que condujeron a la hipótesis de que las células poseen receptores específicos para las moléculas de los fármacos:

1) *alta potencia*: son corrientes los fármacos que actúan a concentraciones de nanomolar y los hay que presentan efectos a concentraciones de 10^{-11} M o menos.

2) *especificidad química*: puesta claramente de manifiesto por las diferencias en potencia tan marcadas que se observan entre los isómeros ópticos de una misma sustancia.

3) *especificidad biológica o selectividad* de tejido u órgano: la adrenalina, por ejemplo, tiene un efecto marcado sobre el músculo cardíaco, pero muy poco efecto sobre el músculo esquelético.

Langley, en 1905, fue el primero que sugirió la existencia de receptores específicos para explicar la acción contracturante de la nicotina cuando se aplicaba sobre una determinada región de los músculos voluntarios (hoy sabemos que esa región es precisamente la placa motriz), y cómo esa acción era antagonizada por el curare.

Hill, en 1909, elaboró esta idea y formuló una expresión algebraica basada en la ley de acción de masas, pero no fue hasta 1933 que los trabajos cuantitativos de A. J. Clark hicieron ganar aceptación a la teoría de los receptores, demostrando que la combinación fármaco-receptor se puede interpretar como el resultado de la formación de un enlace (no necesariamente covalente) entre el fármaco y un receptor específico para ese fármaco presente en el tejido. Al mismo tiempo que estas ideas sobre los receptores tomaban forma, comenzaban los estudios de la fijación del oxígeno a la hemoglobina y los estudios de cinética enzimática que culminaron en la teoría de Michaelis-Menten. Estas tres líneas de investigación tienen en común que estudian la unión a proteínas de pequeñas moléculas, por lo que no es de extrañar que exista una gran semejanza formal entre las distintas teorías que se han elaborado para su explicación. El principal factor que ha dificultado y retrasado el progreso en el área de la Farmacología con respecto a los otros dos campos ha sido la dificultad casi insalvable por mucho tiempo de aislar algún receptor. El concepto de receptor, si bien resultaba necesario para explicar la acción de los fármacos,

no dejaba de ser meramente operacional. Durante décadas casi toda la información que se podía obtener sobre los receptores provenía de métodos indirectos.

A partir de los clásicos estudios de "dosis-respuesta" comenzaron a establecerse las relaciones cuantitativas estructura química-actividad biológica (QSAR). El sitio receptor presente en la molécula del receptor es análogo al sitio activo de la molécula de una enzima, aunque desde el principio quedó claro que los fármacos agonistas eran análogos no a los sustratos de las enzimas (puesto que no son modificados por sus receptores), sino a los coenzimas que asisten a la enzima para su funcionamiento. La topología del sitio receptor se puede deducir estudiando su respuesta a la unión de distintos compuestos química o estructuralmente relacionados, que permiten delimitar los grupos presentes en la molécula que resultan esenciales para la actividad. Asimismo, los estudios de QSAR permiten diferenciar entre distintos subtipos de receptores.

Con posterioridad, estudios de fijación selectiva de ligandos han permitido localizar, aislar e identificar distintos receptores. El receptor debe realizar dos funciones: 1) reconocer las características químicas del fármaco necesarias para la interacción y formación del complejo fármaco-receptor, y 2) conducir a la iniciación de un cambio fisiológico en la célula. "Receptores silenciosos" serán aquellas macromoléculas que, como la seroalbúmina, ligan el fármaco sin dar lugar a una respuesta. El fármaco, por su parte, presentará tanta mayor *afinidad* cuanto mayor sea su capacidad para unirse a los receptores, y una *actividad intrínseca* o *eficacia* en relación con su capacidad para activar a los mismos. De acuerdo con este último parámetro puede diferenciarse entre agonistas puros, agonistas parciales y antagonistas competitivos (con alta, intermedia y nula actividad intrínseca, respectivamente), aún cuando todos ellos presenten afinidad por receptores comunes.

En las páginas que siguen se consideran algunos de los aspectos de la interacción fármaco-receptor con mayor detalle, especialmente en lo referente a los cálculos utilizados para establecer los parámetros que la caracterizan.

2. Ensayos enzimáticos.

Hay un considerable número de fármacos cuyo mecanismo de acción se explica satisfactoriamente por un efecto de inhibición enzimática. Por ello resulta interesante recordar algunos de los tratamientos más habituales de la cinética enzimática, que por otra parte son aplicables a otros tipos de ensayos en los que los fármacos se ven implicados. La representación esquemática de una reacción de este tipo puede ser la siguiente:



Michaelis y Menten (1913) propusieron un modelo matemático simple para el tratamiento de las reacciones entre una enzima (E) y un único sustrato (S). Asumiendo previamente que

- 1) la concentración de enzima es muy pequeña comparada con la de su sustrato, por lo que [ES] es insignificante frente a [S].
- 2) la [P] es efectivamente 0, *i.e.* se miden velocidades iniciales,
- 3) E y ES se consideran en equilibrio porque la velocidad con que S se libera de ES es mucho mayor que la de liberación del producto de reacción,

estos autores propusieron su conocida ecuación:

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

donde $V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima, V_o = velocidad en ausencia de inhibidor y K_m = constante de Michaelis del sustrato.

Cuando la velocidad (V) es la mitad de la velocidad máxima, la concentración de sustrato corresponde a la K_m . Si $V = V_{m\acute{a}x}/2$:

$$\frac{K_m}{[S]} + 1 = 2; K_m = [S] \quad (2)$$

Briggs y Haldane (1926) reconocieron que la restricción 3) impuesta por estos autores era innecesaria para la obtención de una ecuación formalmente similar a la suya en la que únicamente variaba el significado matemático de K_m , aunque su definición se mantenga como *la concentración de sustrato a la cual la velocidad de una reacción*

enzimática es igual a la mitad de la velocidad máxima. En cambio, asumieron un **estado estacionario**: las concentraciones de E y ES se mantienen efectivamente constantes durante el período en que se mide la velocidad enzimática. De este modo, la velocidad de formación de ES a partir de E y S es igual a su velocidad de disociación a E y S.

Para conocer los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y de K_m se mide la velocidad inicial a diferentes concentraciones de S.

Como no es fácil dibujar la hipérbola resultante, se intentó reescribir la ecuación en forma lineal. Cuando la ecuación (1) se invierte, se obtiene:

$$\frac{1}{V} = \frac{\frac{K_m}{[S]} + 1}{V_{m\acute{a}x}}$$

, de donde

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

expresión en doble recíproco (figura 1) conocida como ecuación de Lineweaver-Burk (1934), que define una recta y permite calcular con mayor precisión los valores de K_m (por extrapolación) y de $V_{m\acute{a}x}$ (a partir del valor de la pendiente). Para ello es necesario que el intervalo de [S] utilizado sea el adecuado, con los valores máximos cerca de la saturación de la enzima y los bajos, suficientes para proporcionar una velocidad $< 0.25 V_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, su principal desventaja radica en que errores experimentales en los valores más bajos de V y [S], incluso pequeños, tienen un efecto marcado sobre los inversos. Se puede recurrir a ponderar los datos o, más sencillamente, a utilizar los valores mayores de V y [S] que son más fiables.

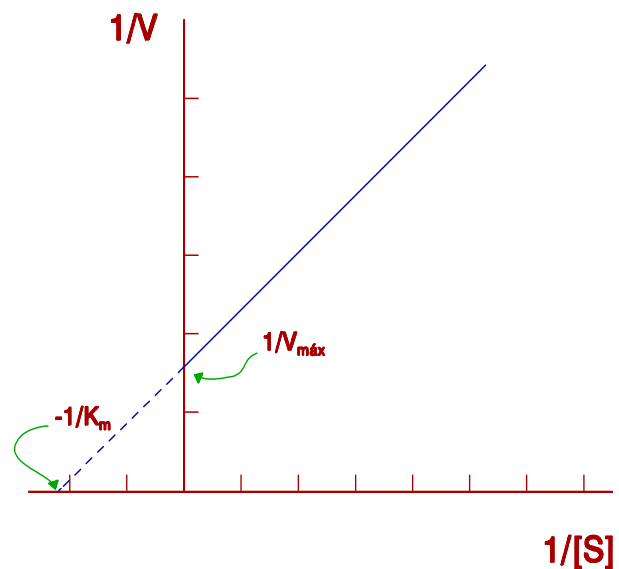
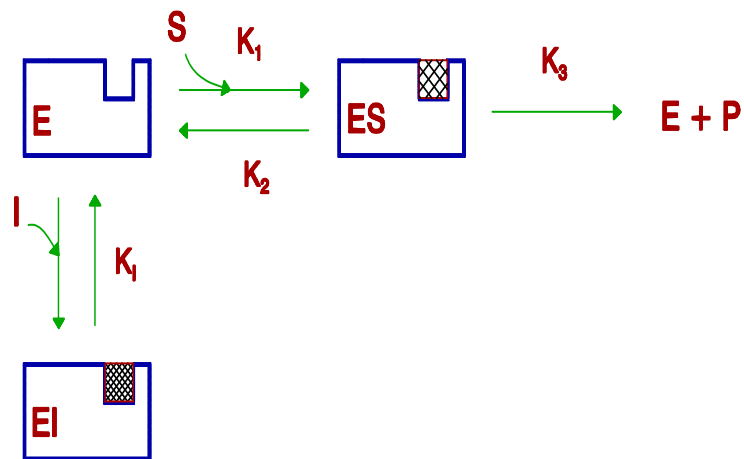


Figura 1

Esta gráfica permite estudiar el efecto de los antagonistas y determinar si la inhibición es o no competitiva.

2.1. Inhibición competitiva. Consideremos primero el caso en que la enzima libre E se puede combinar con S

(para dar el complejo productivo ES) o con I (para dar el complejo EI):



Para el antagonista (I), la constante de inhibición vendrá dada por :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (4)$$

siendo K_I la constante de disociación para el complejo EI, de donde:

$$[EI] = [E] \frac{[I]}{K_I}$$

La concentración total de enzima vendrá dada por la suma de $[E] + [ES] + [EI]$ y, sustituyendo $[EI]$ por su valor y sacando factor común $[E]$:

$$[Enzima\ total] = [ES] + [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (5)$$

por lo que la ecuación (1) se transforma en:

$$V_I = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (6)$$

siendo V_I la velocidad en presencia del inhibidor.

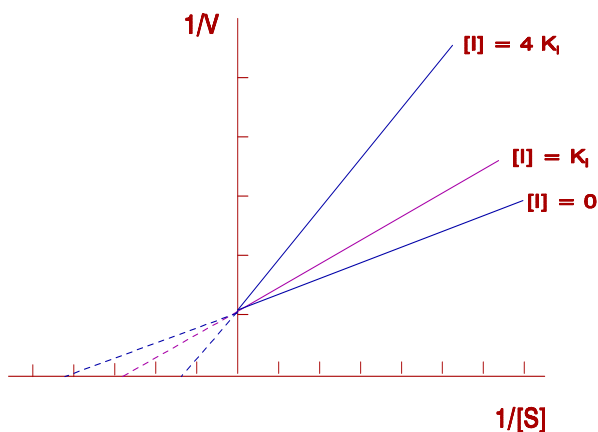


Figura 2

Esta ecuación es la que corresponde precisamente a una **inhibición competitiva**: se trata por tanto, bien de un análogo del sustrato que ocupa el centro activo de la enzima, o de un compuesto distinto al sustrato que se une a otra parte de la enzima de tal forma que el sustrato no puede unirse al sitio activo. En cualquier caso, S e I son mutuamente excluyentes. Las consecuencias de esta inhibición sobre la gráfica

se pueden ver en la figura 2: para diferentes concentraciones del inhibidor se obtiene un abanico de rectas que tienen una ordenada en el origen común, lo que demuestra que $V_{m\acute{a}x}$ sigue inalterada: si [S] aumenta, EI tiene que liberar inhibidor para mantener el equilibrio con E, por lo que a concentraciones de S suficientemente altas, incluso en presencia de I, casi toda la enzima estara presente como ES. Precisamente porque I puede desplazar a S, S puede desplazar a I.

El análisis teórico de la relación entre la K_I y la CI_{50} , o concentración de antagonista que produce un 50% de inhibición en una reacción enzimática, lo llevaron a cabo Cheng y Prusoff (1973), teniendo en cuenta ciertas limitaciones:

- 1) la reacción en ausencia de inhibidor sigue una ecuación sencilla de Michaelis-Menten (1);
- 2) la velocidad de reacción depende de la cantidad de complejo enzima-sustrato;
- 3) se utiliza un método rápido para alcanzar el estado estacionario de equilibrio;
- 4) se trata sólo de inhibidores reversibles.

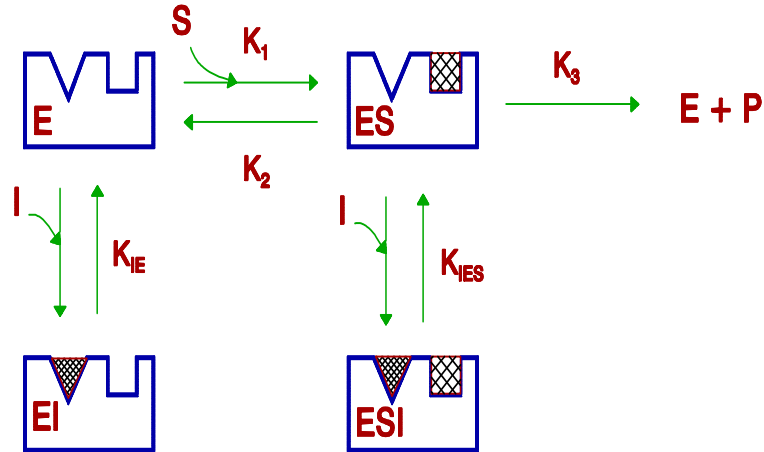
Cuanto $[I] = CI_{50}$, $V_o = 2 V_I$, y sustituyendo en (6) :

$$\frac{2 V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m \left(1 + \frac{CI_{50}}{K_I} \right) + [S]} = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

Reordenando:

$$CI_{50} = K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (7)$$

2.2. Inhibición no-competitiva. El inhibidor en este caso puede unirse tanto a E como a ES para formar EI y ESI:



Se asume que ESI no puede formar el producto de la reacción. Aparecen ahora dos constantes de inhibición distintas (K_{IE} y K_{IES}) que no tienen por qué valer necesariamente lo mismo, ya que es probable que la presencia de S afecte a la facilidad con que el inhibidor se une a la enzima.

La ecuación (1) se transforma en:

$$V_I = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{IE}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{IES}} \right)} \quad (8)$$

Cuando $[I] = CI_{50}$, $V_o = 2 V_I$ y:

$$V_I = \frac{2 V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m \left(1 + \frac{CI_{50}}{K_{IE}} \right) + [S] \left(1 + \frac{CI_{50}}{K_{IES}} \right)} = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

Reordenando:

Cuando $K_{IE} =$

$$CI_{50} = \frac{K_m + [S]}{\frac{K_m}{K_{IE}} + \frac{[S]}{K_{IES}}} \quad (9)$$
 K_{IES} , es decir, cuando la afinidad del inhibidor por la enzima libre (E) y por el

complejo enzima-sustrato (ES) es la misma, nos encontramos con el caso especial de la **inhibición no-competitiva simple**, en la que la K_m no es alterada por el inhibidor, de modo que la representación de Lineweaver-Burk (figura 3) muestra una familia de rectas que tienen en común el punto de intersección con el eje de abscisas ($-1/K_m$). En este caso, la ecuación (9) se transforma en:

$$CI_{50} = K_{IES} \text{ ó } K_{IE}, \text{ o simplemente: } CI_{50} = K_I \quad (10)$$

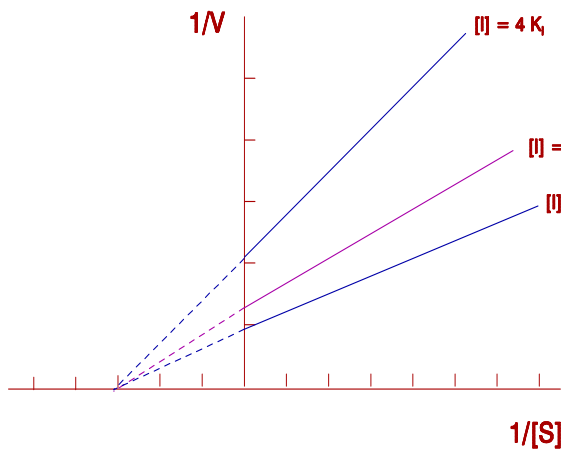


Figura 3

Por el contrario, si las dos K_I no son iguales, se habla de **inhibición mixta**, en cuyo caso las rectas se cortan bien por encima del eje de abscisas (figura 4, $K_{IES} > K_{IE}$, K_m aumenta) o por debajo de él ($K_{IES} < K_{IE}$, K_m disminuye). Como $[S] \gg K_m$ en la mayor parte de los experimentos, la ecuación (9) se puede transformar en:

$$CI_{50} = \frac{I}{\frac{K_m}{[S]} \frac{I}{K_{IE}} + \frac{I}{K_{IES}}} \quad (11)$$

de donde:

$$CI_{50} = \frac{K_{IE}}{\frac{K_m}{[S]} + \frac{K_{IE}}{K_{IES}}} \quad (12)$$

Con tal que $K_m/[S] \ll K_{IE}/K_{IES}$ (ya que $K_m/[S]$ se puede ajustar), la ecuación (11) se convierte en:

$$CI_{50} = K_{IES} \quad (13)$$

por lo que se pone de manifiesto que la CI_{50} es independiente de $[S]$, a diferencia de lo que se observa para un inhibidor competitivo (cf. ecuación (7)).

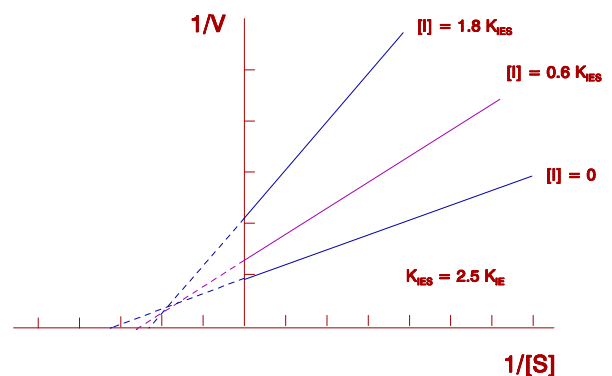
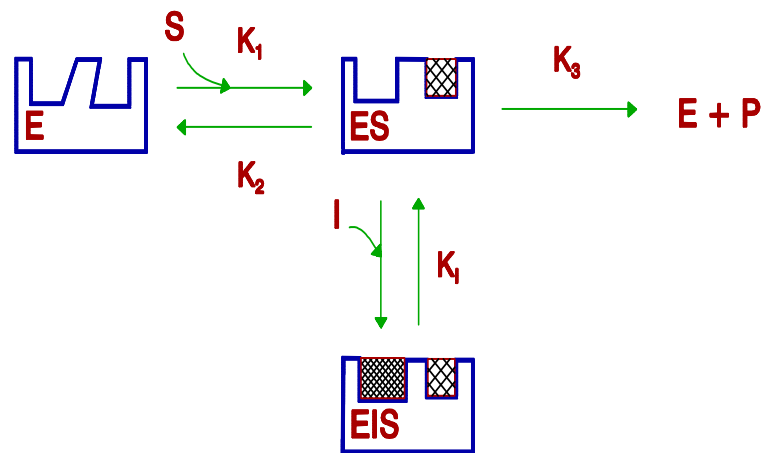


Figura 4

Dentro de la inhibición no-competitiva está el caso particular del inhibidor que es capaz de unirse a ES pero no a E libre, justamente la situación contraria a la inhibición competitiva:



$V_{m\acute{a}x}$ disminuye por el factor $1 + [I]/K_I$ y la K_m (que mide esencialmente cuánto hay que aumentar [S] para que E pase de un estado "libre de sustrato" a un estado "con sustrato unido") paradójicamente disminuye, puesto que la presencia de I, al combinarse sólo con ES, hace que la enzima se desplace hacia el estado ES. Este tipo de inhibición se reconoce fácilmente en una representación de los datos del tipo de Lineweaver-Burk porque los puntos de corte tanto con el eje de ordenadas ($1/V_{m\acute{a}x}$) como de abscisas ($-1/K_m$) aumentan por el mismo factor, dando lugar a una familia de rectas paralelas (figura 5) para los diferentes valores de [I].

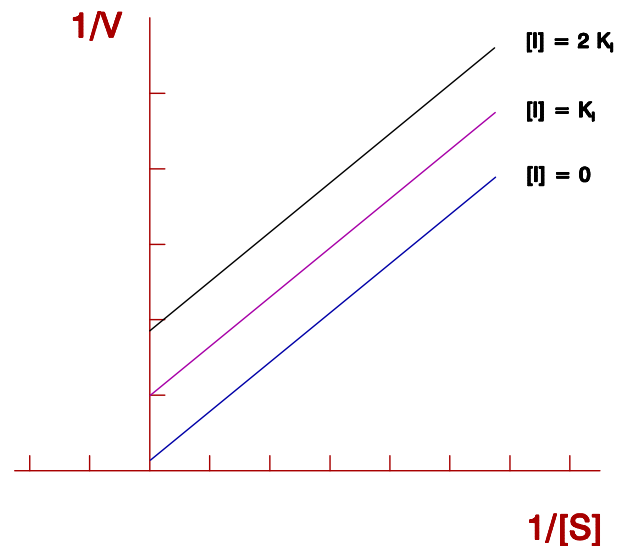


Figura 5

En este caso, $CI_{50} = K_I$, siempre que $[S] \gg K_m$, y también independiente de [S].

Los valores de K_I sirven para comparar la potencia relativa de distintos inhibidores. La forma más sencilla de obtenerlos es medir V_0 para una serie de [S] en ausencia y en presencia de una concentración fija de I y representar los datos según Lineweaver-Burk: la pendiente, la ordenada en el origen, o ambas, pueden estar alteradas por el valor de $1 + [I]/K_I$. Para obtener la K_I se pueden graficar las pendientes (figura 6,

caso del antagonismo competitivo) y/o las ordenadas en el origen (caso del antagonismo no-competitivo) frente a las [I] ensayadas.

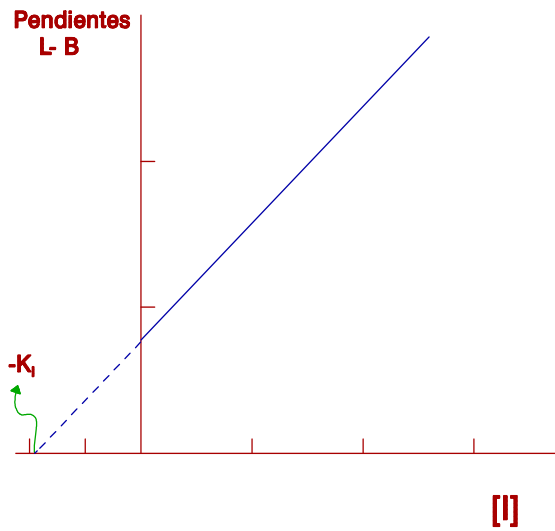


Figura 6

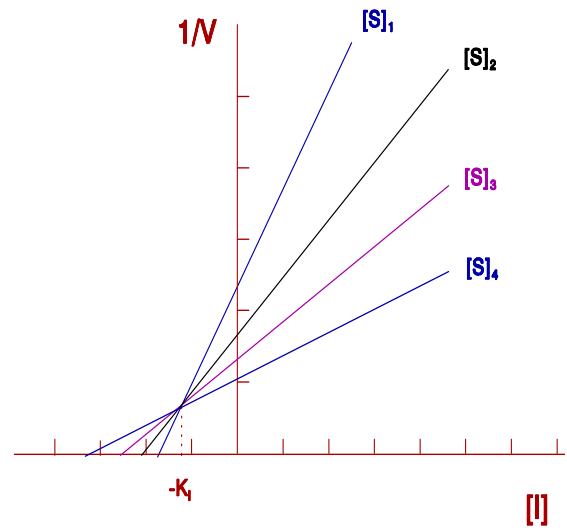


Figura 7

Dixon (1953) propuso un procedimiento alternativo para el cálculo de la K_I : se representa $1/V$ directamente frente a $[I]$. La K_I se obtiene de forma inmediata a partir del punto de intersección de las rectas, en el caso de que la inhibición sea competitiva (figura 7) o no-competitiva simple.

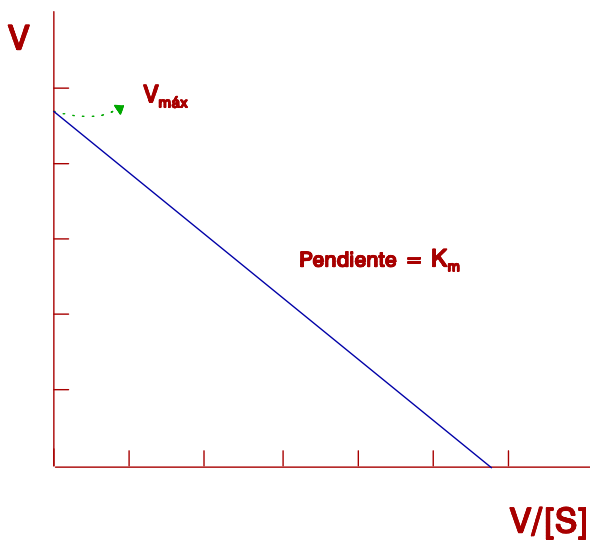


Figura 8

Para rectificar la ecuación (1) se ha propuesto también multiplicar la expresión (3) por $V/V_{máx}$, de tal forma que se obtenga:

$$V = V_{máx} - K_m \frac{V}{[S]} \quad (14)$$

ecuación que también corresponde a una recta si se toman ahora V y $V/[S]$ como las variables (*representación de Eadie-Hofstee*; figura 8).

En otra variante (*representación de Hanes-Woolf*) se multiplica la ecuación (3) por $[S]$ y se grafica $[S]/V$ frente a $[S]$.

3. Respuestas graduales y teoría ocupacional.

Cuando se estudia el efecto de los fármacos, especialmente en preparaciones de órgano aislado, es frecuente representarlo gráficamente como el porcentaje del efecto máximo posible frente al logaritmo de la concentración molar de fármaco. Para muchos agonistas este tipo de representación se traduce en una curva sigmoidea (figura 9), en la cual la porción comprendida entre el 20% y el 80% de la respuesta máxima es aproximadamente lineal. Los datos comprendidos en esta región del 20-80% pueden someterse por lo tanto a regresión lineal y servir para comparar las potencias relativas de varios fármacos de una misma clase (siempre que las rectas obtenidas sean

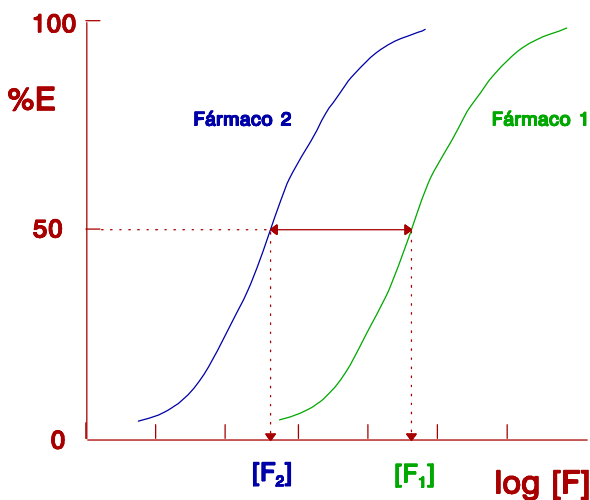


Figura 9

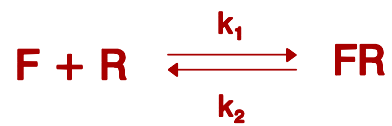
paralelas), expresadas como el cociente entre las concentraciones de uno y otro necesarias para producir el mismo efecto, o en forma semilogarítmica:

$$\text{Potencia relativa} = \log [F_1] - \log [F_2] \quad (15)$$

La aproximación inicial y más sencilla para explicar el origen de estas curvas fue la de Clark, quien postuló que el efecto de algunos fármacos inhibidores es proporcional a la fracción de receptores ocupados (*teoría ocupacional simple*), en aplicación de la isoterma de adsorción de Langmuir.

Para ello es necesario asumir que el tejido posee una población de receptores para un determinado fármaco y que estos receptores (1) son idénticos, y (2) no interactúan, en el sentido de que la unión de una molécula de fármaco a un receptor dado no tiene efecto sobre la probabilidad de que se ocupe un receptor vecino (lo cual no significa necesariamente que el efecto que produce la ocupación de un receptor dado sea independiente de si los vecinos están o no ocupados).

Si se define que el receptor (**R**) es capaz de unir una sola molécula de fármaco (**F**), y aplicamos la ley de acción de masas:



En el equilibrio : $k_1 [F] [R] = k_2 [FR]$, donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de asociación y disociación, respectivamente, $[FR]$ es la concentración del complejo fármaco-receptor y $[R]$ es la concentración de receptor no unido.

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{[F] [R]}{[FR]} = K_D = \text{Constante de disociación en el equilibrio}^* \quad (16)$$

La concentración de receptores totales ($[R_t]$) vendrá dada por:

$$[R_t] = [FR] + [R], \text{ de donde } [R] = [R_t] - [FR]$$

Sustituyendo :

$$K_D = \frac{[F] ([R_t] - [FR])}{[FR]} = [F] \left(\frac{[R_t]}{[FR]} - 1 \right) \quad (17)$$

Es fácil comprender que la K_D se corresponde con la concentración de fármaco agonista que da lugar a una ocupación del 50% de la población total de receptores: cuando $[FR] = [R_t]/2$, $K_D = [F]$. Claramente, cuanto menor sea este valor, mayor será la afinidad del fármaco por el receptor. Por esta razón, la inversa de K_D es la constante de afinidad, $K_a = 1/K_D$. La K_D es una constante del fármaco con un valor único para cada tipo de receptor farmacológico. En este sentido, K_D se puede utilizar para clasificar fármacos y puede ser útil para predecir la respuesta a los mismos de un sistema efector.

Despejando la fracción de receptores ocupados (r),

$$\frac{[FR]}{[R_t]} = r = \frac{[F]}{K_D + [F]} = \frac{K_a [F]}{1 + K_a [F]} \quad (18)$$

*En muchos textos y artículos científicos la constante de disociación se representa por K_a ó K_d . A lo largo de esta obra se utilizará K_D , salvo indicación en contrario.

Si se representa ahora r frente a la concentración de fármaco libre ($[F]$), se obtiene la familiar curva hiperbólica de saturación (figura 10) o, si se representa en semilogarítmica, una curva sigmoidea simétrica (figura 11). Se puede normalizar el eje de abscisas dividiendo el valor de $[F]$ por K_D .

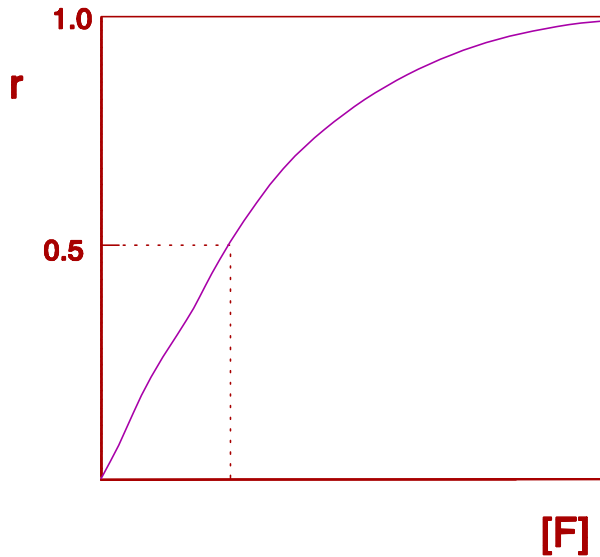


Figura 10

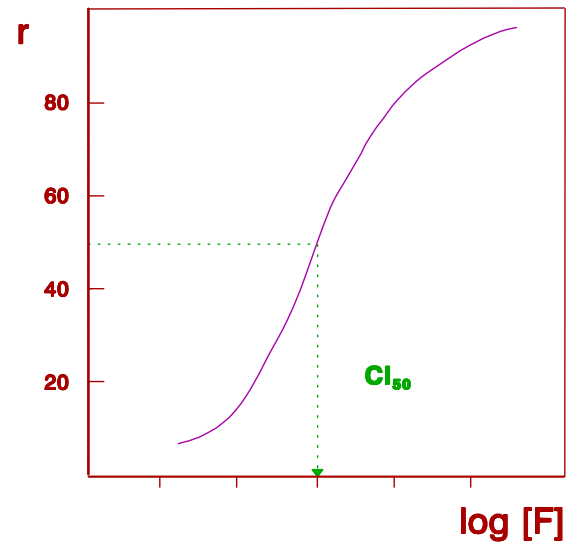


Figura 11

Para probar esta hipótesis, el ensayo más obvio, pero menos satisfactorio, es ver si las curvas concentración-efecto para el fármaco se pueden ajustar a esta ecuación, asumiendo que el efecto (E) producido por el fármaco (F) es directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados.

$$\frac{E}{E_{m\acute{a}x}} = \frac{[F]}{K_D + [F]} = \frac{[FR]}{[R_t]} \quad (19)$$

donde $E_{m\acute{a}x}$ es el efecto máximo.

Agrupando: $E (K_D + [F]) = E_{m\acute{a}x} [F]$

y despejando:
$$\frac{E}{E_{m\acute{a}x} - E} = \frac{[F]}{K_D} \quad (20)$$

o: $[FR] ([K_D] + [F]) = [R_t] [F]$, de donde:

$$\frac{[FR]}{[R_t] - [FR]} = \frac{[F]}{K_D} \quad (21)$$

En este caso, al representar $\log ([FR] / ([R_t] - [FR]))$ frente al $\log [F]$ se obtiene una recta de pendiente unidad. Si no es así, existen *mecanismos alostéricos* o *fenómenos de cooperatividad* y no se puede asumir que la unión fármaco-receptor no es interactiva. Esta es la conocida como **representación de Hill** (figura 12) y se puede utilizar también para relacionar $\log (E/E_{m\acute{a}x}-E)$ frente al $\log [F]$ (ecuación 20).

Si se cumplen los siguientes postulados:

- 1) el efecto es proporcional al grado de ocupación de los receptores, es decir, $E_{m\acute{a}x} = K_3 [R_t]$;
- 2) una molécula de fármaco se combina con un solo sitio receptor;
- 3) se combina una fracción muy pequeña del total de fármaco presente ($[F] = [F]_{total}$),

se puede escribir, a partir de la ecuación (19) :

$$E = \frac{E_{m\acute{a}x} [F]}{K_D + [F]} \quad (22)$$

expresión análoga a la **ecuación (1) de Michaelis-Menten** para la cinética enzimática.

Cuando el efecto (E) es la mitad del efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$), la concentración de fármaco corresponde a la concentración eficaz 50 (CE_{50}). En este caso, si $E = E_{m\acute{a}x}/2$:

$$K_D / [F] + 1 = 2; \quad K_D = [F] \quad (23)$$

Cuando la ecuación (21) se invierte, se obtiene:

$$\frac{1}{E} = \frac{\frac{K_D}{E_{m\acute{a}x}} + 1}{[F]} = \frac{K_D}{E_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[F]} + \frac{1}{E_{m\acute{a}x}} \quad (24)$$

expresión semejante a la **ecuación (3) de Lineweaver-Burk** que da lugar asimismo a una representación en doble recíproco (figura 13).

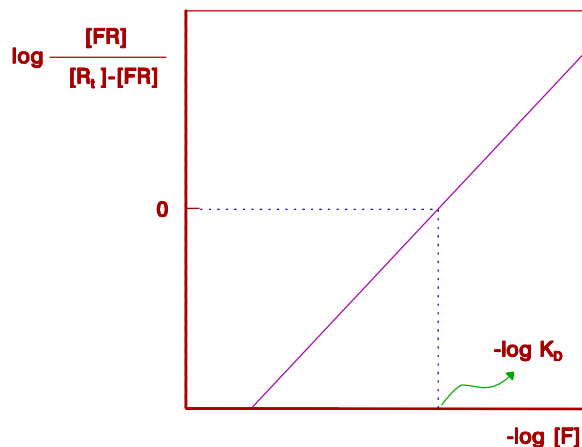


Figura 12

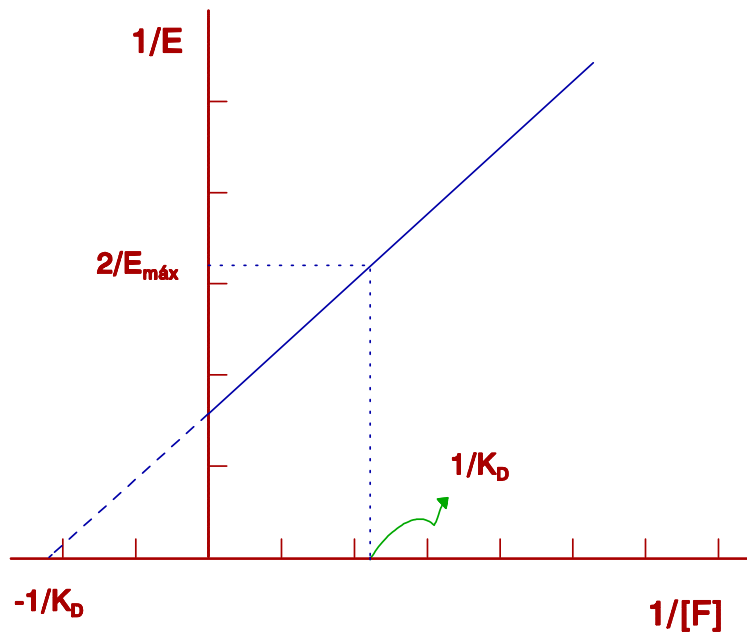


Figura 13

Esta representación de los datos permite calcular y comparar la **potencia** de los fármacos, que se puede expresar como *el valor de [F] (o log [F]) que produce un efecto igual a la mitad del efecto máximo, i.e. la CE₅₀*. Asimismo permite estudiar el efecto de los antagonistas y determinar si la inhibición es o no competitiva, de igual modo a como se trata la cinética enzimática (páginas 9 - 14).

Con el desarrollo de la Farmacología se fue acumulando evidencia a favor de que se puede obtener la misma respuesta biológica con distintos fármacos para grados distintos de ocupación del receptor. Igualmente, a concentraciones que exceden con creces sus respectivos valores de K_D , no todos los fármacos de una clase dada producen una respuesta máxima en el sistema estudiado. En otras palabras, distintas moléculas biológicamente activas pueden variar en la **eficacia** con que perturban al receptor e inducen el cambio que da lugar a la respuesta farmacodinámica. Esto quiere decir que el nexo entre unión y perturbación debe ser flexible y esta observación no está de acuerdo con la ecuación (19). Por ello Ariëns (1954) definió el término *actividad intrínseca*, que se interpreta como una medida de la probabilidad de que un receptor ocupado adopte una conformación activa.

Con la introducción de este concepto es necesario modificar la teoría ocupacional simple, de modo que la ecuación (19) se transforma en :

$$\frac{E}{E_{máx}} = \frac{\alpha[FR]}{[R_t]} \quad (25)$$

Del mismo modo, a partir de la ecuación (22) :

$$\frac{E}{E_{\text{máx}}} = \frac{\alpha[F]}{K_D + [F]} \quad (26)$$

donde α es la actividad intrínseca. Sus límites son $\alpha = 1$ para los agonistas puros y $\alpha = 0$ para los antagonistas, sustancias capaces de inhibir o prevenir la respuesta inducida por los agonistas.

Cuando $0 < \alpha < 1$, el fármaco es un *dualista* (Ariëns), o un *agonista parcial* (Stephenson). El valor de α se obtiene a partir de la respuesta máxima que produce, y se expresa como la fracción de la respuesta máxima que se puede obtener con el agonista puro ($\alpha = 1$).

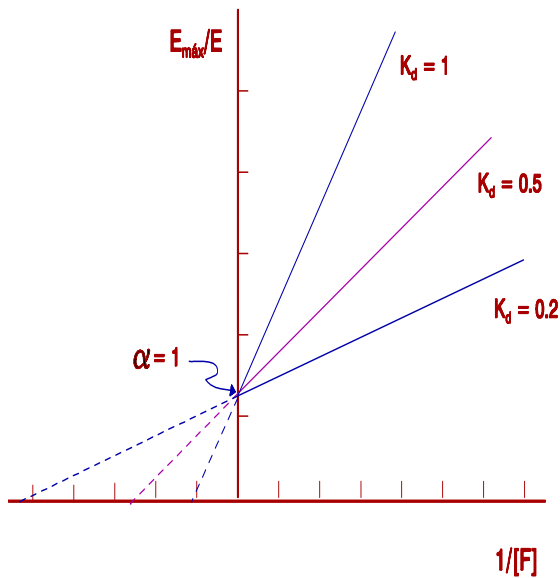


Figura 14

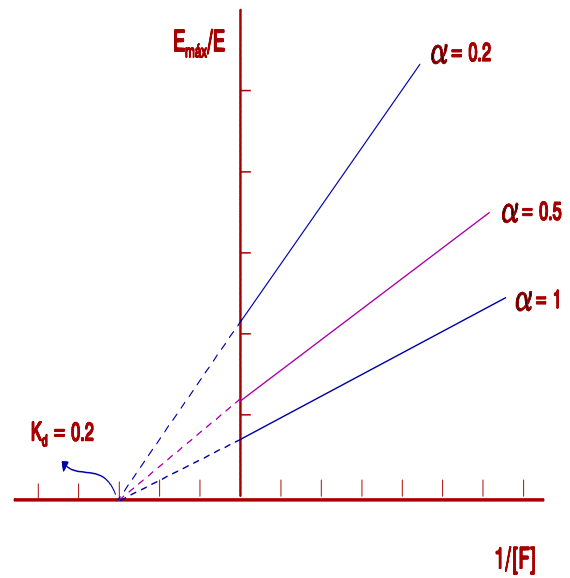


Figura 15

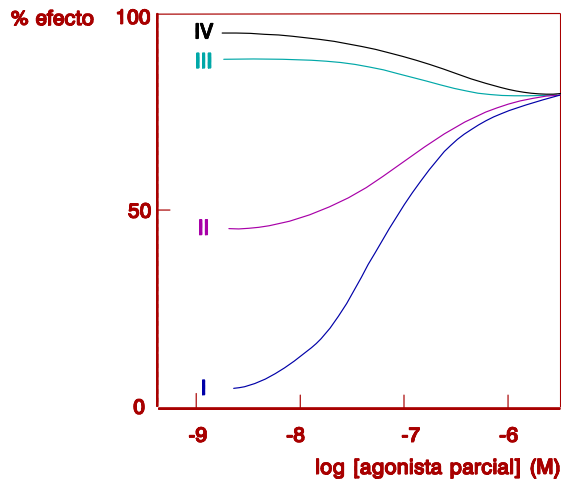
La ecuación de Lineweaver-Burk (24) se convierte en:

$$\frac{E_{\text{máx}}}{E} = \frac{K_D}{\alpha} \frac{1}{[F]} + \frac{1}{\alpha} \quad (27)$$

Cuando $1/[F]$ es igual a 0, $E_{\text{máx}}/E = 1/\alpha$. Por lo tanto, α se obtiene a partir de la ordenada en el origen (figura 14).

Igualmente, cuando $E_{\text{máx}}/E$ es igual a 0, $1/[F] = -1/K_D$, de donde se deduce que el punto de corte con el eje de abscisas es una medida de la afinidad (figura 15).

Para un agonista parcial, sólo una fracción de los receptores ocupados se activan. El resultado de la combinación de una cierta concentración de agonista puro con concentraciones crecientes de un agonista parcial es



- I Ausencia de agonista puro
- II Agonista puro 10 nM
- III Agonista puro 50 nM
- IV Agonista puro 100 nM

Figura 16

que la respuesta obtenida aumenta o disminuye (dependiendo de la concentración de agonista puro) con respecto a la que se obtiene con el agonista puro actuando solo (figura 16). El agonista parcial, a concentraciones altas, ocupa todos los receptores, por lo que las curvas concentración-respuesta convergen para el nivel de respuesta que corresponde al efecto máximo para el agonista parcial solo (saturación de los receptores). De esta forma se revela el **carácter dualista** (*agonista-antagonista*) de los agonistas parciales, como los β -bloqueantes con "actividad simpaticomimética intrínseca" o los analgésicos

opiáceos tipo pentazocina.

Esta modificación a la teoría ocupacional simple de Clark todavía asume que para conseguir una respuesta máxima con un agonista puro se requiere la ocupación máxima de los receptores. Stephenson (1956) introdujo un parámetro, al que denominó **estímulo (S)**, que permitía eliminar esta limitación.

$$S = \frac{e [FR]}{[R_t]} = \frac{e [F]}{[F] + K_D} \quad (28)$$

donde e es un factor de proporcionalidad adimensional que denota el poder del fármaco para producir un determinado efecto, y que se denomina *eficacia*. La eficacia se puede cuantificar como *el inverso de la fracción de receptores ocupados necesarios para producir una respuesta igual al 50% de la respuesta máxima*. La respuesta a los fármacos se asume entonces que es una función *indefinida* del estímulo:

$$\frac{E}{E_{m\acute{a}x}} = f(S) = f\left(\frac{e[F]}{[F] + K_D}\right) \quad (29)$$

Esta funci3n f disocia el est3mulo del receptor de la respuesta celular o tisular: la respuesta no tiene porqu3 ser necesariamente directamente proporcional al est3mulo, por lo que se elimina la necesidad de asumir que para conseguir el efecto m3ximo la totalidad de los receptores deban estar ocupados, lo cual est3 de acuerdo con los datos experimentales.

4. Respuestas equivalentes.

Con objeto de obviar una definición de la compleja relación existente entre la fracción de receptores ocupados por un agonista y la respuesta fisiológica, Gaddum (1937) introdujo la idea de usar *respuestas equivalentes*: determinó la relación concentración-respuesta para un fármaco agonista, F, en ausencia de antagonista (curva 1 en la figura 17) y de nuevo en presencia de una concentración fija de antagonista [A] (curva 2 en esta misma figura).

La cantidad de agonista necesario para producir una respuesta equivalente en los dos casos la expresó como un cociente, la **razón de dosis d**.

En este caso, la teoría para una situación de equilibrio entre agonista, antagonista y receptores es la siguiente:

$$Respuesta = \frac{[F]_1 K_a}{1 + [F]_1 K_a} = \frac{[F]_2 K_a}{[F]_2 K_a + [A] K_{ant} + 1}$$

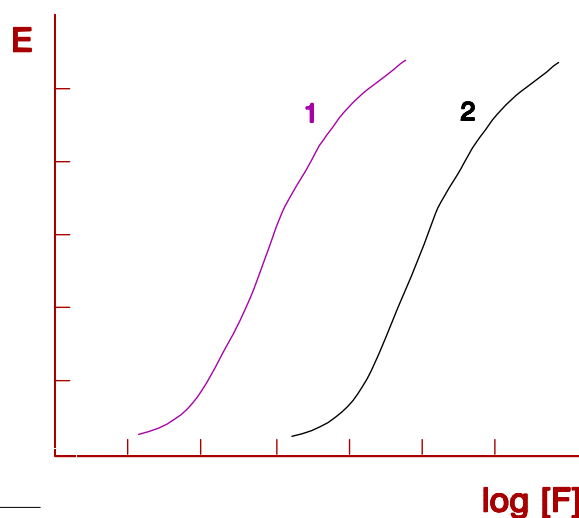


Figura 17

de donde

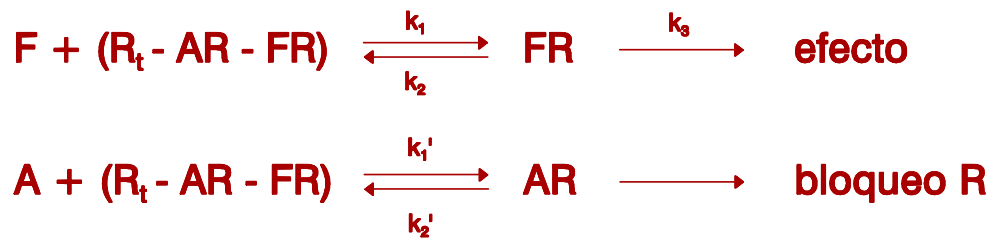
$$d = \frac{[F]_2}{[F]_1} = [A] K_{ant} + 1 \quad (28)$$

siendo K_{ant} la constante de afinidad del antagonista.

Arunlakshana y Schild (1959) comprobaron la veracidad de esta relación y demostraron que se aplicaba con una precisión excelente, proporcionando valores reproducibles de K_{ant} . Como la parte derecha de la ecuación (28) no se refiere a los agonistas, es de esperar que el cálculo de K_{ant} sea independiente del agonista utilizado en su determinación. Es más, K_{ant} define al receptor y se puede utilizar para examinar la identidad de receptores presentes en diferentes lugares.

Los *antagonistas clásicos* interactúan de forma competitiva o casi competitiva con los receptores para

reducir la fracción de receptores disponibles para los agonistas. Según esto:



En el equilibrio, las velocidades de formación y disociación del complejo FR serán iguales:

$$K_1 [F] ([R_t] - [AR] - [FR]) = K_2 [FR]$$

La constante de afinidad del fármaco vendrá dada por:

$$K_a = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[FR]}{[F] ([R_t] - [AR] - [FR])}$$

de donde

$$K_a [F] = \frac{[FR]}{([R_t] - [AR] - [FR])} \quad (29)$$

Operando de igual manera con la constante de afinidad del antagonista (K_{ant}):

$$K_{ant} [A] = \frac{[AR]}{([R_t] - [AR] - [FR])} \quad (30)$$

por lo que

$$[AR] = K_{ant} [A] ([R_t] - [AR] - [FR])$$

y

$$[AR] = K_{ant} [A] ([R_t] - [FR]) - K_{ant} [A] [AR]$$

de donde

$$[AR] (1 + K_{ant} [A]) = K_{ant} [A] ([R_t] - [FR])$$

Despejando

$$[AR] = \frac{([R_t] - [FR]) K_{ant} [A]}{1 + K_{ant} [A]}$$

Dividiendo ahora (29) entre (30) y sustituyendo:

$$\frac{[F] K_a}{[A] K_{ant}} = \frac{[FR]}{[AR]} = \frac{[FR] (1 + [A] K_{ant})}{([R_t] - [FR]) [A] K_{ant}}$$

de donde

$$[F] K_a = \frac{[FR] (1 + [A] K_{ant})}{([R_t] - [FR])} = \frac{[FR]}{[R_t] - [FR]} (1 + [A] K_{ant})$$

La ocupación (o la respuesta) obtenida con una concentración de fármaco agonista $[F]_2$ en presencia de una concentración de antagonista $[A]$ será igual a la producida por una concentración de agonista más pequeña $[F]_1$ cuando esté ausente el antagonista. A partir de la ecuación (17):

$$[F]_1 K_a = \frac{[FR]}{[R_t] - [FR]}$$

Si se asume que las respuestas son de la misma magnitud y producidas por el mismo fármaco, $[FR]$ debe ser igual con el agonista solo ($[F]_1$) que con el agonista en presencia de una concentración $[A]$ de antagonista ($[F]_2$):

$$\frac{[F]_2}{[F]_1} = d = [A] K_{ant} + 1 \quad (28)$$

La *razón de dosis*, d , depende por tanto únicamente de la concentración del antagonista y de su afinidad.

Si el efecto E producido por el fármaco agonista es función solamente de $[FR]$, esta ecuación significa que el antagonista sencillamente desplaza la curva E vs. $\log [F]$ del agonista a la derecha (figura 18), sin cambiar su pendiente o amplitud (ya que depende sólo de $[A]$ y no de $[F]$). La magnitud del desplazamiento, o sea, d , está linealmente relacionada con $[A]$.

Cuando la razón de dosis valga 2: $K_{ant} [A] = 1 \rightarrow \log K_{ant} + \log [A] = 0$

y de forma análoga al pK y al pH :

$$\log K_{ant} = -\log [A] = pA_2 \quad (31)$$

Es decir, el pA_2 resulta ser una medida de la afinidad del antagonista por los receptores: cuanto mayor sea el pA_2 , mayor será el grado de antagonismo.

El pA_2 , por lo tanto, se puede definir como *el logaritmo del inverso de la concentración molar de antagonista necesaria para que los efectos producidos por una dosis (concentración) de agonista se reduzcan a los efectos producidos por la mitad de esa dosis (concentración)*.

El valor pA_{10} ($d = 10$) es menor que el valor pA_2 para una interacción agonista-antagonista determinada y,

de igual manera, se define como *el logaritmo negativo de [A] que hace necesario multiplicar por 10 la dosis (concentración) de agonista para obtener la misma respuesta que en ausencia del antagonista.*

En general, para una concentración x de antagonista:

$$d - 1 = [A]_x K_{ant}$$

$$\log(d - 1) = \log[A]_x + \log K_{ant} \quad (32)$$

$$\log(d - 1) = -pA_x + pA_2 = pA_2 - pA_x$$

Para $d = 10$, $pA_2 - pA_{10} = \log 9 = 0.95$. Si este valor difiere significativamente del calculado a partir de los datos experimentales, la interacción no es competitiva en los límites de [A] utilizados para obtener estos valores.

En la práctica, se utilizan [A] diferentes y se determina el valor de d para cada una de ellas. Es habitual en la literatura la expresión:

$$\log(d - 1) = \log [B] - \log K_B \quad (33)$$

donde K_B es la **constante de disociación** en el equilibrio para el antagonista y [B] su concentración.

La representación gráfica de los datos como $\log(d-1)$ frente a $-\log [A]$ nos proporciona una línea recta de pendiente teórica -1.0 (figura 19). El punto de intersección con el eje de abscisas nos

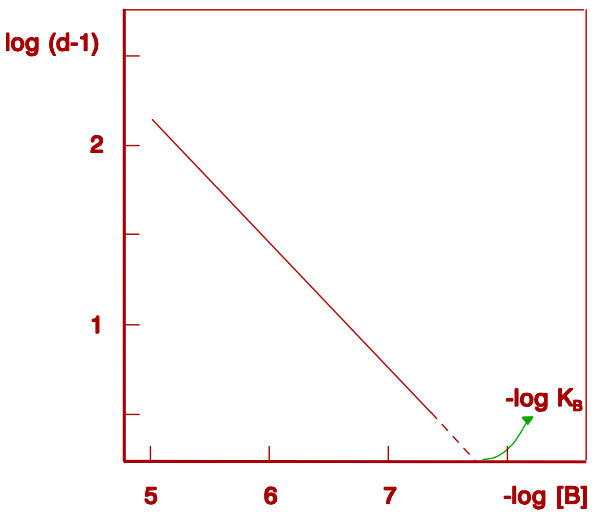


Figura 19

proporciona directamente el valor del pA_2 ($-\log K_B$). Esta es la conocida como **representación de Schild**.

De esta forma, con tal que:

- (1) el antagonismo sea competitivo,
- (2) sólo un tipo de receptor esté implicado en la respuesta, y

(3) las condiciones experimentales sean óptimas (es especialmente importante que el tiempo de equilibrado entre antagonista y receptor sea suficiente),

el valor calculado de pA_2 debe dar una medida de la afinidad del antagonista por ese tipo de receptor y debería ser reproducible. Cuando esto no sea así, se puede deber a:

(1) diferencias en las condiciones experimentales.

(2) método utilizado para analizar los resultados.

(3) pendientes variables de la representación de Schild.

(4) uso de agonistas no selectivos y antagonistas selectivos en un tejido con una población heterogénea de receptores implicados en la respuesta, por ejemplo, isoprenalina y receptores β_1 y β_2 .

En cualquier caso, la representación de Schild puede servir para reconocer estados de no-equilibrio "velados" en ensayos de órgano aislado (lo que puede ocurrir, por ejemplo, cuando los inhibidores de la recaptación de neurotransmisores utilizados en el baño de incubación tienen también propiedades bloqueantes de los receptores) y para detectar situaciones de inequilibrio temporal.

5. Ensayos de unión de ligandos.

A finales de la década de los 40, las proteínas dejaron de verse desde un punto de vista exclusivamente coloidal para empezar a ser consideradas como macromoléculas discretas, de peso molecular claramente establecido. Los datos experimentales de unión de ligandos a proteínas se correlacionaron inicialmente de igual forma que la captación de hidrogeniones por moléculas polibásicas. Este tipo de aproximación supuso el punto de partida para el examen detallado a nivel molecular de la unión fármaco-receptor y para la evaluación de la energía de tales interacciones en términos termodinámicos.

El objetivo principal de estos estudios de unión de ligandos ("*binding*" en la terminología anglosajona) es proporcionar información sobre la saturación progresiva de los receptores por el ligando de interés y expresarla gráficamente.

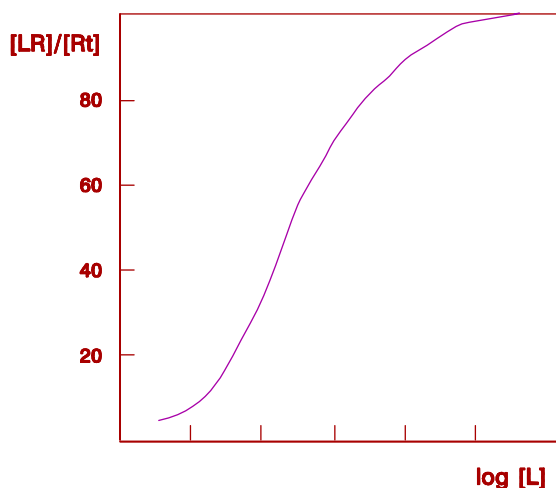


Figura 20

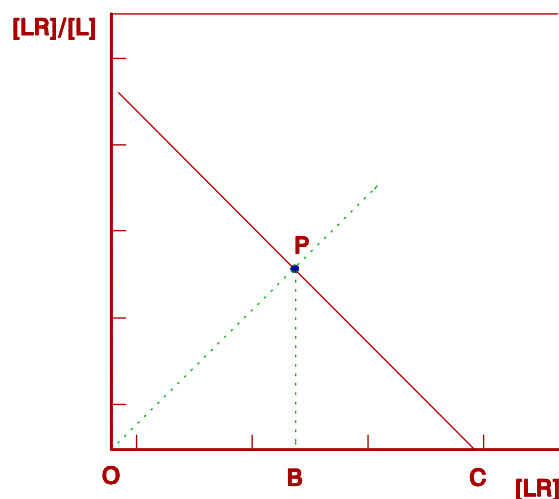
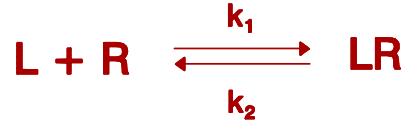


Figura 21

La representación de los moles normalizados de ligando unido ($[LR]$) frente a la concentración de ligando libre ($[L]$) resulta ser la más adecuada y explícita. La experiencia ha demostrado que para un amplio intervalo de concentraciones de L la mejor manera de presentar esta información es en forma de curva $[LR]$ frente a $\log [L]$, que distribuye los datos uniformemente (figura 20). En este caso, las coordenadas son las mismas que se han venido utilizando universalmente en las valoraciones ácido-base.

Unos ejes de coordenadas alternativos ampliamente empleados para presentar los datos de *binding* son $[LR] / [L]$ frente a $[LR]$, que dan lugar a la conocida como **representación de Scatchard** (figura 21). El inconveniente inherente a este tipo de gráfica es que, al estar $[L]$ en el denominador de las ordenadas, un amplio intervalo de datos experimentales está comprimido en un pequeño intervalo de esta ordenada y, por tanto, no se puede detectar el rumbo que va a seguir la curva para las concentraciones más altas de L . A estas concentraciones se pueden poner de manifiesto curvaturas en la representación que, si no son detectadas, conducen a una apreciación errónea del punto de corte con el eje de abscisas. Para poder extrapolar con precisión a los puntos de corte sobre este eje, hay que utilizar un intervalo de concentraciones de L lo más amplio posible. En cualquier caso, no hay que olvidar que la transformación gráfica que lineariza la curva de *binding* tiende a distorsionar y oscurecer las propiedades estadísticas de los datos. En los datos experimentales sin transformar prácticamente todo el error de medida se encuentra confinado en la variable $[LR]$. En la representación de Scatchard, los errores de medida aparecen tanto en ordenadas como abscisas, de forma que la regresión lineal ordinaria queda invalidada.

Si consideramos la unión de un ligando L a un conjunto de receptores R :



a partir de una expresión análoga a (21) podemos despejar: $\frac{[LR]}{[L]} = \frac{[R_t] - [LR]}{K_D}$, de donde:

$$\frac{[LR]}{[L]} = \frac{[R_t]}{K_d} - \frac{1}{K_d} [LR] \quad (34)$$

Así, si al representar $[LR] / [L]$ vs. $[LR]$ obtenemos una recta, de su pendiente podremos calcular el valor de la constante de disociación en el equilibrio y del punto donde corta al eje de abscisas, la concentración molar de receptores totales ($[LR] = [R_t]$). Es interesante destacar que los ejes de coordenadas en esta representación son independientes de la concentración de receptores. La concentración de receptores libres ($[R]$) está representada en esta gráfica por la diferencia entre la concentración total de receptores ($[R_t] = \overline{OC}$ en la figura 21) y la concentración de receptores ocupados por el ligando ($[LR] = \overline{OB}$ en la figura 21): $[R] = \overline{OC} - \overline{OB}$.

Se ha reconocido, desde los trabajos de Langmuir para los fenómenos de adsorción en el equilibrio, y de Michaelis y Menten para las velocidades enzimáticas, que la expresión hiperbólica (35) correlaciona adecuadamente la dependencia de la unión de un ligando a un receptor con un solo sitio receptor:

$$\frac{[LR]}{[R_t]} = \frac{k [L]}{1 + k [L]} \quad (35)$$

donde k es la constante de afinidad en el equilibrio.

Scatchard (1949) postuló que para un sistema con más de un sitio de unión, en el que cada sitio tuviera una afinidad diferente pero invariable, la expresión para $[LR]$ se convertiría en una suma de hipérbolas. Así, para un sistema con dos clases de sitios de unión:

$$\frac{[LR]}{[R_t]} = \frac{n_1 k_1 [L]}{1 + k_1 [L]} + \frac{n_2 k_2 [L]}{1 + k_2 [L]} \quad (36)$$

donde n_1 y n_2 son los números de sitios respectivos de cada clase.

La ecuación (36) sirve para analizar cuantitativamente experimentos representados por las gráficas de Scatchard, siempre y cuando las afinidades de los sitios no cambien. En caso contrario (por ejemplo, cuando existe cooperatividad entre los sitios) hay que recurrir a un tratamiento termodinámico de la ecuación.

Si hay dos clases de receptores, que suponemos que no interactúan, a concentraciones distintas $[R_1]$ y $[R_2]$, y un solo ligando, se obtiene una curva (figura 22). Para cada punto P de la curva, [L] están en equilibrio con $[LR_1]$ y $[LR_2]$.

En este caso, y de forma análoga a (36), pero considerando las constantes de disociación k_{d1} y k_{d2} :

$$\frac{[LR]}{[L]} = \frac{[R_1] J_1}{[L] + k_{d1}} + \frac{[R_2] J_2}{[L] + k_{d2}} \quad (37)$$

Este sistema se puede resolver algebraicamente o gráficamente. Para la resolución gráfica por el método de Rosenthal (1967) no hay más que considerar que la curva experimental de la figura 22 corresponde a la resultante de las dos rectas 1 y 2 que representan la unión a R_1 y R_2 , respectivamente: cualquier punto P de la curva es la suma de las coordenadas del punto P_1 del sistema 1 y del punto P_2 del sistema 2. Estos tres puntos son de [L] constante al estar en la misma recta que pasa por el origen. Únicamente hay que dibujar las rectas que satisfagan la relación $\overline{OP} = \overline{OP_1} + \overline{OP_2}$.

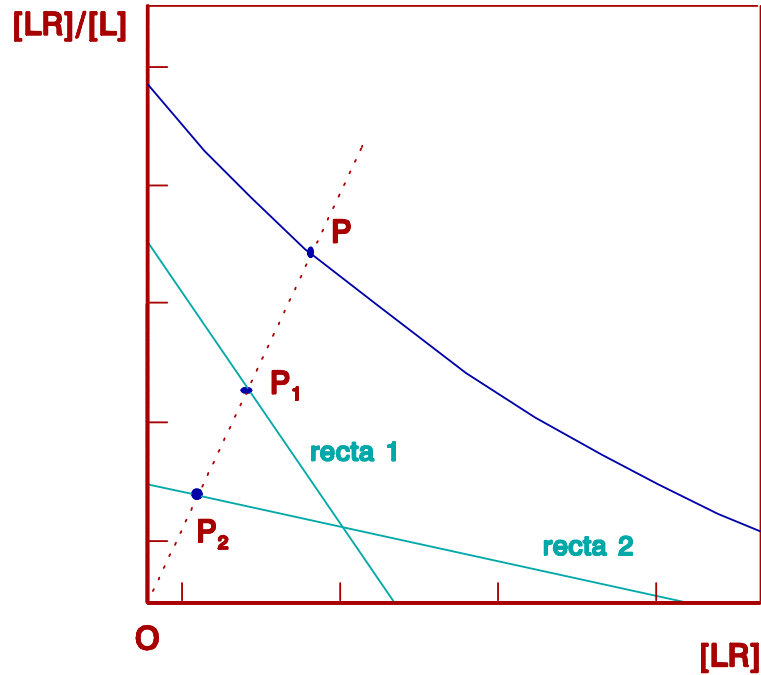


Figura 22

Además de unirse a receptores específicos en las estructuras celulares o subcelulares sometidas a examen, el ligando también se fija a otras proteínas, a organelas, a fragmentos de membrana, etc., generalmente, aunque no necesariamente, con baja afinidad. Para obtener una línea recta en la representación de Scatchard cuando sólo hay un tipo de sitios de unión, se debe sustraer este *binding* no específico, no saturable. Su cuantificación se lleva a cabo añadiendo un exceso de ligando sin etiquetar (una concentración unas 100 veces superior a la de ligando marcado), que desplaza así la práctica totalidad del ligando marcado de sus receptores específicos. En la práctica, la determinación del *binding* no específico en un paso experimental diferente introduce errores estadísticos considerables, por lo que los datos de *binding* específico y no específico se deben intentar ajustar simultáneamente. La base de los cálculos es un modelo " $n \times m$ ", para n ligandos que se unen a m clases de sitios receptores, y un algoritmo de mínimos cuadrados ponderados no-lineal, como el que utiliza el programa *LIGAND*. La ventaja de este método es que permite formular y evaluar varios modelos, y seleccionar el mejor desde el punto de vista estadístico.

6. Experimentos de desplazamiento de ligandos.

En los últimos años ha sido posible, mediante el uso de radioligandos, determinar cuantitativamente la unión de antagonistas marcados radiactivamente a preparaciones subcelulares de tejidos, e incluso a tejidos intactos. Estos experimentos han demostrado que la unión fármaco-receptor sigue la ley de acción de masas y que, en general, los valores hallados para la afinidad concuerdan con los obtenidos por el método de las razones de dosis. Además, han permitido calcular la densidad de receptores en el músculo liso y en otros muchos sistemas efectores.

El principal inconveniente de este tipo de técnicas lo constituye el *binding* no específico. Así, se ha identificado la unión estereoespecífica de opiáceos a filtros de vidrio, que tiene lugar en el mismo sentido que la unión a los receptores opiáceos específicos. Igualmente se ha descrito, entre otros muchos ejemplos, la unión de insulina a polvos de talco con características que imitan a las de los receptores de insulina. Los sitios receptores de neurotransmisores y de fármacos en el cerebro sólo se han podido medir satisfactoriamente a partir de la introducción de técnicas de filtración rápidas y lavados extensivos pero rápidos que permiten eliminar el grupo marcado de los sitios no específicos, dejando intactos los ligandos unidos a los receptores.

Disponiendo de un ligando marcado de alta afinidad para un tipo de receptor es posible llevar a cabo **experimentos de desplazamiento** en que una molécula no marcada compite por los mismos sitios de unión. Como regla general, el mismo ligando sin etiquetar desplaza al ligando marcado de más sitios que otras moléculas no relacionadas químicamente con él.

Una manera conveniente de expresar los resultados de estos ensayos consiste en calcular la concentración a la que el fármaco o antagonista en estudio ocupa el 50% de los sitios receptores (CI_{50} = concentración que produce un 50% de inhibición del *binding* del ligando marcado a sus receptores) y/o su constante de inhibición (K_I), de forma semejante a como se trata la constante de inhibición y la concentración de inhibidor que causa un 50% de inhibición de una reacción enzimática.

En los ensayos de fijación con ligandos competitivos la ecuación (7) se transforma en:

$$CI_{50} = K_I \left(1 + \frac{[L]}{K_D} \right) \quad (37)$$

siendo K_D la constante de disociación del ligando L, y de aquí:

$$K_I = \frac{CI_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right)} \quad (38)$$

Es importante distinguir entre la fijación (*binding*) específica y la no específica, que generalmente tienen lugar juntas. Para ello nada mejor que comparar las distintas situaciones que se pueden encontrar en la práctica (figura 23).

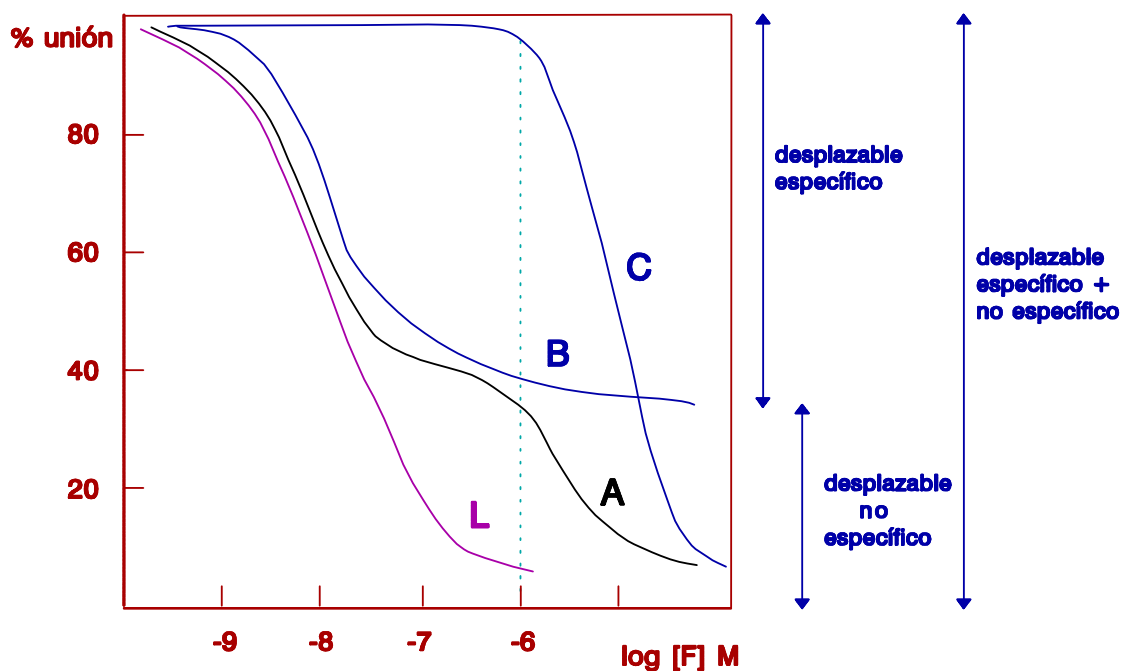


Figura 23

El compuesto **B**, aunque muestre el mismo perfil farmacodinámico que el ligando y se una a los mismos receptores, da lugar a un desplazamiento menor que el propio ligando **L** sin etiquetar. Si hay muchos fármacos con una curva de desplazamiento semejante a la de **B**, se puede pensar que sólo el desplazamiento por **B** representa realmente *binding* desplazable y específico. En la gráfica se puede constatar la alta afinidad de **B** en este ensayo (entre 1 y 10 nM), con una meseta de desplazamiento máximo entre 10^{-7} y 10^{-5} M. Esta sería una situación ideal, pero lo que aparece en muchos casos es una curva bifásica, como la del fármaco **A**, que dificulta la interpretación. Pudiera tratarse de :

(1) desplazamiento de **dos sitios receptores**, excepcionalmente, en cuyo caso al añadir al ensayo de *binding* un fármaco selectivo para uno de los dos tipos de receptores la curva se hace monofásica, revelando sólo un componente.

(2) unión al mismo tiempo a **sitios específicos e inespecíficos**, mucho más frecuente, teniendo lugar este último a concentraciones mucho mayores. La diferencia entre la curva de **A** y de **L** reside esencialmente en que para el primero la afinidad por los sitios no-específicos desplazables es más baja que la del propio ligando, el cual se une a ambos tipos de sitios con alta afinidad. El fármaco **B** en este sentido no tiene ninguna afinidad por los sitios no-específicos desplazables.

(3) para el caso de agonistas, **estados de alta y baja afinidad** de los receptores.

Por lo antedicho, ha de quedar claro que el *binding* no-específico no ha de ser necesariamente de baja afinidad, como generalmente se cree. La espiperona, por ejemplo, se une con alta afinidad no sólo a receptores de dopamina y de serotonina, sino también a sitios no-específicos (*sitios de espirodecanona*), que no son relevantes farmacológicamente, y de los cuales puede ser desplazada por otros fármacos.

Hay otros ligandos, como [³H]-QNB (benzilato de quinuclidinilo) o [³H]-dextetimid, cuyo *binding* desplazable parece ser únicamente de naturaleza específica, pero son escasos. En general se podría afirmar que cuanto mayor sea el *binding* no desplazable de un ligando dado, mayor es la probabilidad de que se una a sitios desplazables no-específicos.

La curva del compuesto **C**, en la mayor parte de los casos en que se trate de fármacos o antagonistas lipofílicos, va a representar desplazamiento no-específico. Concentraciones superiores a 10⁻⁶ M ya hacen pensar en que la unión no presenta relevancia farmacodinámica.

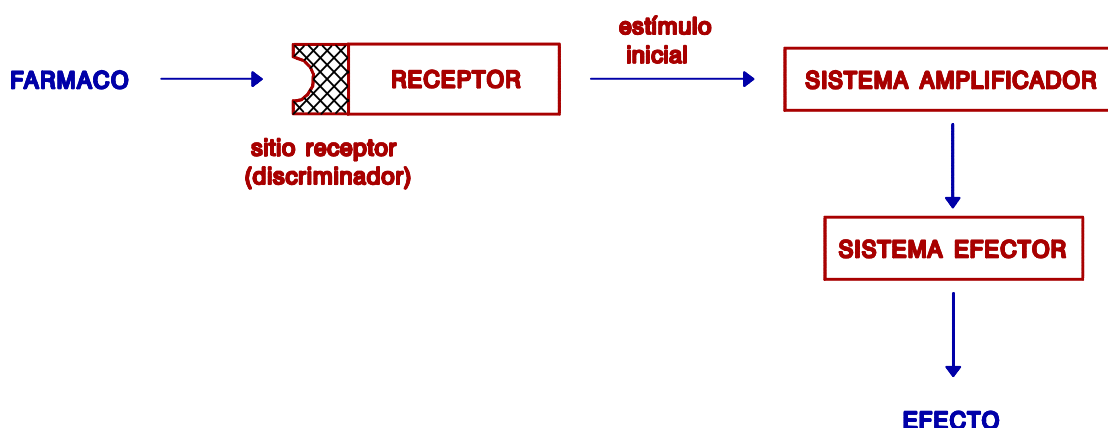
A este respecto no hay que olvidar que los ensayos de unión de ligandos proporcionan información sobre la **afinidad**, pero ésta debe ser correlacionada con parámetros farmacodinámicos, bioquímicos o de comportamiento del fármaco (**eficacia**). En caso contrario, se trataría únicamente de sitios de reconocimiento para determinadas estructuras, pero no de auténticos receptores farmacológicos.

7. Receptores de reserva.

Clark (1933) y Stephenson (1956) postularon la existencia de receptores de reserva (= **capacidad de reserva de los receptores**) y los definieron como *aquellos en exceso de los necesarios para producir una respuesta máxima*.

Esto implica que la proporción de receptores de reserva se puede determinar únicamente midiendo el porcentaje que debe ser ocupado por un agonista para producir una respuesta máxima (*ocupación fraccional*). La fracción de receptores que "sobran" (de reserva) se puede determinar por los métodos clásicos de inactivación de receptores (según la técnica de Furchgott) o por técnicas de radioligandos. Estos procedimientos, junto con las curvas dosis-respuesta, se pueden utilizar para definir todo el intervalo de la relación ocupación-respuesta, desde cero hasta la ocupación total y la respuesta máxima.

El hecho de que la ocupación de una pequeña proporción de la población de receptores pueda dar lugar a una respuesta relativamente grande implica la existencia del **fenómeno de amplificación** (figura 24), que por otra



parte puede tener lugar en ausencia de receptores de reserva.

Un problema frecuente a la hora de determinar la acción de los fármacos es precisamente qué *respuesta* medir. Se pueden obtener resultados aparentemente contradictorios cuando se miden en el mismo sistema dos puntos finales diferentes o cuando se comparan dos sistemas de receptores farmacológicamente similares en distintos tejidos o en el mismo tejido de más de una especie.

Un ejemplo instructivo es la acción de acetilcolina (ACh) sobre los receptores nicotínicos de la placa neuromuscular. La unión de ACh a los receptores desencadena la siguiente secuencia de acontecimientos en la

célula: apertura de canales iónicos, generación de una corriente (flujo de iones) y producción de un cambio de voltaje (potencial de placa). Si la despolarización es lo suficientemente grande para alcanzar el umbral, se genera un potencial de acción propagado que conduce a la contracción muscular.

Dependiendo de qué respuesta se mida experimentalmente, se puede observar o no una "capacidad de reserva" de los receptores: los potenciales de placa generalmente son supraumbrales, lo que significa que se activan más receptores de los que son absolutamente necesarios para alcanzar el umbral de despolarización de la fibra muscular. Este hecho, unido a la naturaleza *todo-o-nada* del potencial de acción propagado muscular, nos permite concluir que este sistema tiene una "capacidad de reserva" si se mide la contracción muscular o los potenciales de acción propagados musculares. Si por el contrario, el investigador mide la corriente de placa (en condiciones de *voltage-clamp*) o cambios en la conductancia, no se encuentran receptores de reserva: cuantos más receptores se activen, mayores son los cambios en conductancia y en flujo de corriente. La relación ocupación-respuesta sería lineal en este caso, hasta un techo en que todos los receptores hayan sido ocupados por el agonista.

Un sistema muy citado de **amplificación en cascada** mediada por receptores lo constituye la activación del receptor β -adrenérgico, que da lugar a relajación de la musculatura lisa vascular, efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos sobre el corazón, degradación de glucógeno hepático, etc. Casi todas estas acciones implican activación de la enzima adenilil ciclasa (AC), que conduce a una elevación de los niveles de AMP_c intracelulares, que a su vez conduce a una activación de proteína-quinasa dependientes de AMP_c, las cuales a su vez fosforilan un número de proteínas diana, incluyendo enzimas, que son los efectores moleculares de la respuesta observada en el tejido. De todas las medidas que se pueden realizar en cada cascada de reacciones, una de las más accesibles es la activación de la AC mediada por el receptor, midiendo la acumulación de AMP_c en células intactas o la $V_{\text{máx}}$ de la AC en homogeneizados.

A partir de la K_D para agonistas (v.g. isoprenalina) en ensayos de *binding* se pueden construir las curvas de ocupación, y a partir de la constante de activación de AC (K_{act}), la curva completa ocupación-respuesta. Ya en los primeros trabajos se hicieron aparentes ciertas discrepancias: la K_D para el agonista era generalmente 1-2 unidades logarítmicas más baja que la K_{act} , de aquí que pareciera que sólo se tenían que ocupar una fracción de los receptores y se concluyera que el tejido tenía un gran exceso de receptores β -adrenérgicos. Pero cuando se tuvo en cuenta que los protocolos corrientemente utilizados para medir la actividad AC eran incubaciones de 5 minutos

mientras que los experimentos de radioligandos se analizaban en el equilibrio (20 minutos a 2 horas, dependiendo de los ligandos), se comprobó que las K_D que se habían venido midiendo reflejaban una reducción tiempo-dependiente en la afinidad por desensibilización de los receptores. Cuando se hicieron las determinaciones en condiciones de no-equilibrio (la teoría cinética se complica y no se pueden utilizar las fórmulas sencillas de Scatchard o de Cheng-Prussoff) la discrepancia entre la K_D y la K_{act} resultó mínima (pasó de factores de 100 a factores de 2-3). La relación ocupación-respuesta es esencialmente lineal y, al menos en los sistemas estudiados, hay pocos receptores de reserva, si es que hay alguno.

8. Respuestas cuantizadas: efectos de todo-o-nada.

A diferencia de lo considerado hasta ahora con respecto a las *respuestas graduales*, para obtener la relación dosis-respuesta se puede fijar un punto final específico como criterio de la acción del fármaco y determinar el número de sujetos experimentales que lo alcanzan en función de la dosis.

Imaginemos, por ejemplo, la inducción de sueño por un hipnótico (como punto final se puede fijar la pérdida del reflejo de enderezamiento): para cada dosis se anota el número (o porcentaje) de animales que

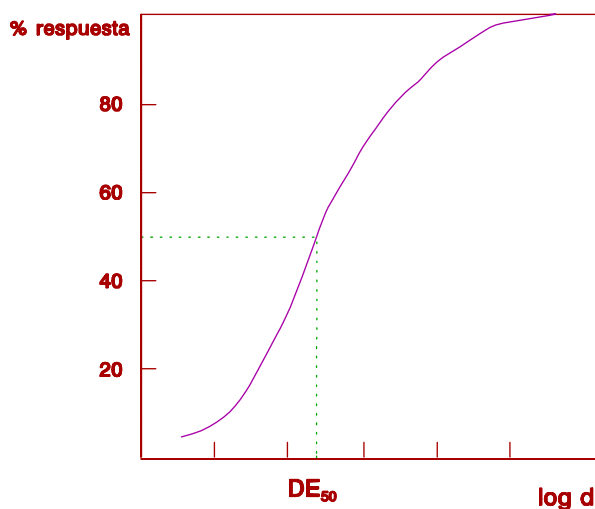


Figura 25

experimentan sueño. Cada dosis progresivamente mayor incluirá todos los animales que experimentaron sueño con la dosis anterior, más un número adicional. De esta forma, el número (o porcentaje) es acumulativo, lo que resulta en una *curva sigmoidea* cuando se representa este porcentaje frente al logaritmo de la dosis (figura 25).

La dosis eficaz 50 (DE_{50}) nos da una idea de la potencia de un fármaco y corresponde a la dosis a que el 50% de los sujetos experimentales manifiestan un efecto específico. De igual forma se puede estudiar

la letalidad (DL_{50} = dosis letal 50 = dosis que produce la muerte al 50% de los animales tratados) o la toxicidad (DT_{50} = dosis tóxica 50 = dosis que produce efectos tóxicos en el 50% de la población sometida a tratamiento).

Estos parámetros sirven para caracterizar la acción de los fármacos. Así, cuanto más baja sea la DE_{50} de un fármaco, mayor será su potencia, pero también puede serlo su toxicidad. Por ello, una forma conveniente de expresar el balance riesgo/eficacia o el *margen de seguridad* de un fármaco lo constituye el **índice terapéutico** ($IT = DT_{50}/DE_{50}$). Cuanto mayor sea este índice, más amplio será el intervalo entre la dosis eficaz y la dosis tóxica.

Para considerar las respuestas de todo-o-nada puede ser ilustrativo considerar el cálculo de la DE_{50} del citado hipnótico en ratones, según el método de Miller y Tainter: cada ratón se clasifica como dormido o despierto, a un tiempo determinado después de la administración del fármaco. Habrá dosis más bajas con las que no se duerma ningún ratón, dosis altas uniformemente hipnóticas y dosis intermedias con las que se dormirán distintos

porcentajes de la población.

La medida en que varía la sensibilidad frente a una dosis de fármaco de unos animales a otros se puede establecer dando el mismo fármaco a un número de animales y determinando la cantidad necesaria para producir el efecto. Las dosis eficaces individuales se distribuirán simétricamente con respecto al logaritmo de la dosis eficaz media. La media es la DE_{50} : todos los animales sensibles a una dosis menor se duermen; todos los animales que soportan una dosis mayor, se mantienen despiertos.

En la figura 26 aparecen tres casos hipotéticos para los fármacos A, B y C: A y C muestran la misma eficacia ($DE_{50} = 10 \text{ mg Kg}^{-1}$), pero la población responde de forma más homogénea a C que a A.

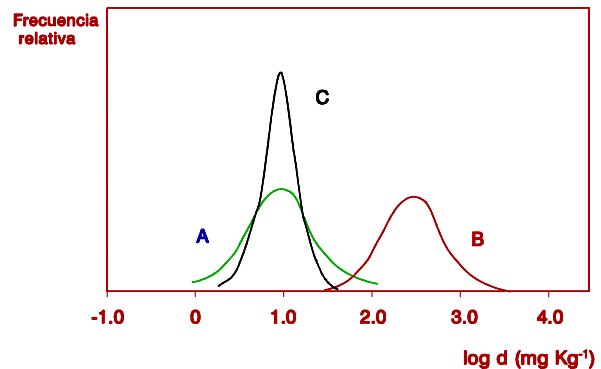


Figura 26

Con el fármaco A, a 1 mg Kg^{-1} , se duerme una proporción menor de la población, al igual que otra pequeña proporción sólo se duerme si la dosis es mayor de 100 mg Kg^{-1} . El fármaco B resulta menos eficaz (mayor DE_{50}), pero la curva de frecuencias es análoga a la obtenida con el fármaco A.

La magnitud de la dispersión de los resultados individuales alrededor de la media (DE_{50}) viene dada por la desviación típica:

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} \quad (39)$$

donde:

n = número de resultados

d = desviación de cada resultado de la media \bar{x} ($\sum(x - \bar{x}) = 0$; $\sum(x - \bar{x})^2$ es positivo)

$(n-1)$ = número de grados de libertad = número de "piezas" de información sobre la dispersión. Con x y $(n-1)$ valores de x se puede calcular el valor enésimo; por tanto, sólo hay $(n-1)$ piezas de información.

Consideremos ahora la distribución de las dosis eficaces individuales, no en términos de la dosis*, sino en términos de la *media* (\bar{x}) y la *desviación típica* (s): la dosis x se sustituye por $\bar{x} \pm N s$ y se representa N como la variable. La curva de distribución adopta una forma similar a una curva de frecuencias normal, que expresa de modo puramente matemático la probabilidad (P) de obtener un resultado particular que se encuentre en el intervalo comprendido entre $\bar{x} \pm N_1 s$ y $\bar{x} \pm N_2 s$:

$$P = \int_{N_1}^{N_2} \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-1/2 N^2} \right) dN$$

De esta forma las curvas A, B y C se pueden hacer idénticas (estirando o contrayendo la escala de log dosis).

La representación de esta función frente a N indica cómo cambia P con respecto a N , y su forma es similar al histograma que relaciona la proporción de animales cuyas dosis eficaces individuales se encuentran en un

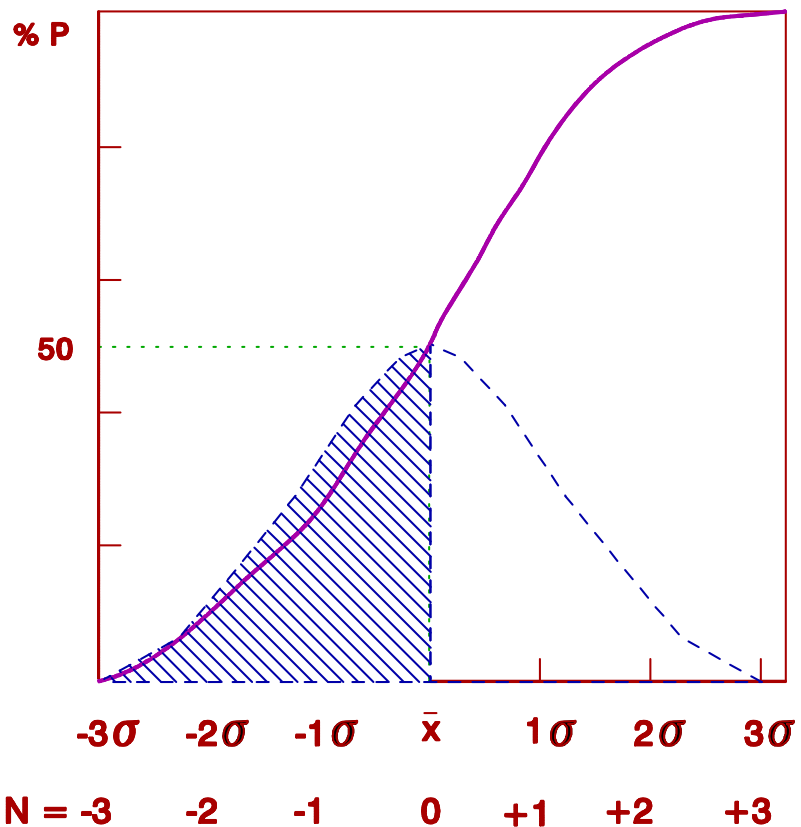


Figura 27

intervalo determinado. Cuando la función se integra entre $N = -1$ y $N = +1$, se encuentra que $P = 0.68$, de modo que hay aproximadamente DOS probabilidades en TRES de obtener un resultado que se encuentre en este intervalo y, experimentalmente, dos tercios aproximadamente de los animales tendrán sus dosis eficaces individuales en este intervalo. La integración entre $N = -2$ y $N = +2$ da un valor de 0.955 y cabe esperar que más de un 95% de los animales tengan su dosis eficaz individual a \pm dos desviaciones típicas de la media.

*En la discusión del método que sigue a continuación, donde dice dosis se refiere al logaritmo de la dosis.

En la práctica resultaría tedioso medir dosis eficaces individuales (DEI). Es más fácil dar la misma dosis a un grupo de animales y observar la proporción que manifiesta el efecto. Esta incluirá no sólo los animales para los cuales la dosis elegida fue la DEI, sino también todos aquéllos cuya DEI fue inferior a ésta. Siguiendo con el ejemplo anterior, si un animal se duerme con una dosis de 5 mg Kg⁻¹, es de suponer que igualmente se dormirá con una dosis mayor. Esta proporción se corresponderá con la probabilidad P de obtener un resultado que se encuentre en el intervalo de $N = -\infty$ hasta el valor de dosis elegido. Si la dosis fuera de hecho la dosis media, x , el límite superior sería $N = 0$ y el valor de $P = 0.5$ (esta dosis experimentalmente induce el sueño en el 50% de los animales = DE_{50}). La dosis que es inferior a ésta en 1 s ($N = -1$) dormirá justamente a menos del 16% de los animales. La dosis 1 s por encima de la DE_{50} ($N = +1$) dormirá a más del 84% (y $84-16 = 68\%$ de los animales cuyas DEI se encuentran entre $N = -1$ y $N = +1$).

La relación entre la dosis real, x , que produce efectos en una proporción, p , de los animales, y N , la *desviación equivalente normal* correspondiente a p , viene dada por la ecuación:

$$x = \bar{x} \pm N s \quad (40)$$

La representación de N frente a $\log x$ es una recta (figura 28), a partir de la cual se puede calcular x . En la práctica se añade 5 al valor de N , de modo que todos los números sean positivos y reciben el nombre de **PROBITS** (Tabla I).

En los experimentos que producen respuesta del todo-o-nada, por tanto, se administra el fármaco a grupos de animales a distintas dosis y el porcentaje de animales que responden de cada grupo se grafica como probit vs. log dosis, obteniéndose una recta. La región más fiable de esta recta es alrededor del 50%. En los extremos, diferencias de 1/20 a 2/20, por ejemplo, suponen cambios de un 5 a un 10% (probits de 3,36 a 3,72, respectivamente).

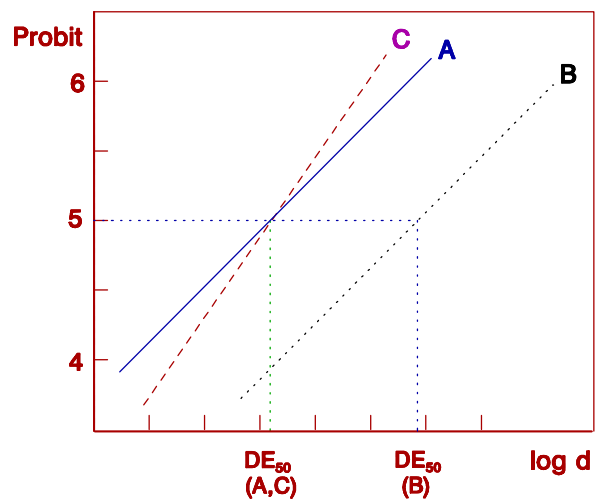


Figura 28

Si reevaluamos ahora los valores obtenidos

para los fármacos A, B y C (figura 28), A y C aparecen como los más activos, pero se observa que cuanto mayor es la pendiente en este caso, la población es más homogénea (la variación biológica en sensibilidad al fármaco es menor). C no se puede comparar con los otros dos fármacos, pues esta diferencia de pendientes lleva a pensar en mecanismos de acción diferentes: al probit 5 (DE_{50}) ambos tienen la misma potencia. Al probit 6 (84% de efectos) C es más potente; al probit 4 (16% de efectos), B es más potente. Por esta razón es importante que cuando se consideran potencias o toxicidades se especifique qué porción de la curva dosis-efecto se está considerando.

La desviación típica, s , se puede encontrar fácilmente, en general, como la diferencia en log dosis correspondiente al cambio de un probit. Por ejemplo, para A, de probit 3 a probit 4, el logaritmo de la dosis cambia de 1 (10 mg Kg^{-1}) a 1,3 (20 mg Kg^{-1}), es decir, se duplica la dosis. La desviación típica es igual a 0,3.

La curva B tiene la misma pendiente ($1/s$) que A, pero corresponde a un fármaco menos potente.

Para calcular el **error estándar de la DE_{50}** (o de la DL_{50}), Miller y Tainter propusieron la siguiente fórmula:

$$ES_{DE_{50}} = \frac{2s}{\sqrt{2n}} \quad (41)$$

$2s$ vendrá dada por la diferencia entre los valores de log dosis correspondientes a los probits 4 y 6, y n es el número total de animales de los grupos incluidos en el intervalo de probits de 3,5 a 6,5.

Los **límites de confianza de la DE_{50}** (o de la DL_{50}), aunque en realidad no son simétricos, se pueden determinar de forma muy aproximada como:

$$LC_{DE_{50}} = DE_{50} \pm t s \quad (42)$$

donde t es el valor de la *t de Student* para el nivel de confianza deseado y $n-1$ grados de libertad (Tabla II).

Para calcular la verdadera DE_{50} ó DL_{50} y sus límites de confianza se puede recurrir al método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Estos autores propusieron un método para "corregir" los efectos correspondientes al 0% y al 100%, para los que no existe valor de probit. Consiste en:

- (1) convertir los efectos intermedios a probits (Tabla I);
- (2) hallar la recta de regresión de probit vs. log dosis con sólo estos puntos intermedios;
- (3) calcular a partir de esta recta de regresión los valores de probit que corresponderían a los log dosis que producen el 0% y el 100% de efecto;
- (4) convertir estos valores de probit hallados en (3) a porcentajes (Tabla I): estos son los porcentajes de efecto "esperados". Se eliminan los valores mayores del 99,99% y menores del 0,01%;
- (5) estos porcentajes "esperados" se convierten en porcentajes "corregidos" (Tabla III) y se representan junto con los puntos intermedios (no más de dos puntos de 0% ni de 100%), constituyendo este conjunto el total de efectos observados para el resto del análisis.

9. Margen de seguridad. Evaluación del índice terapéutico.

Los efectos terapéuticos y los tóxicos se deben estudiar en la especie más apropiada, que puede no ser la misma en ambos tipos de ensayo. Por ejemplo, la toxicidad aguda se suele cuantificar como la DL_{50} en ratones mientras la eficacia puede venir dada como la DE_{50} en perros. En el caso del hombre, el *índice terapéutico* que se desea en realidad debería ser mayor que DT_1/DE_{99} , es decir, el fármaco debería producir efectos beneficiosos en más de un 99% de los enfermos tratados y producir efectos tóxicos en menos de un 1%. Si la pendiente fuera la misma en todas las curvas de respuesta, este índice sería una fracción del cociente DT_{50}/DE_{50} .

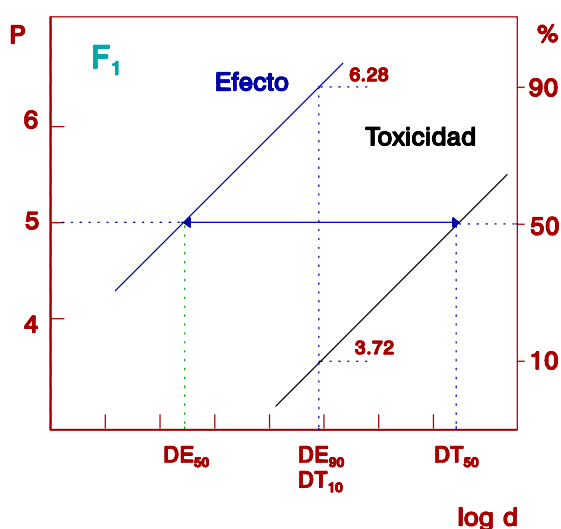


Figura 29

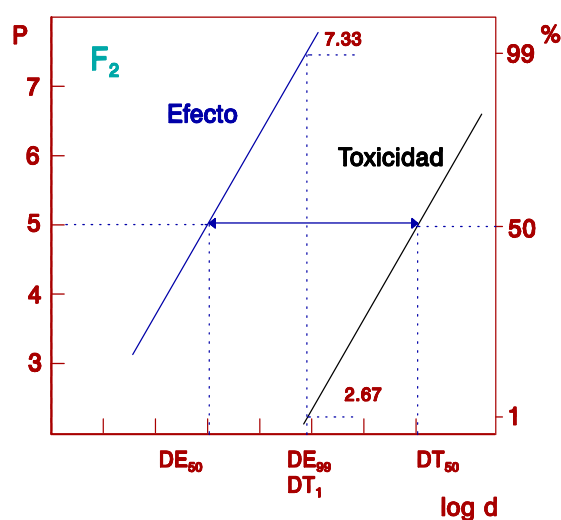


Figura 30

Así, si comparamos las gráficas de las figuras 29 y 30, F_1 parece más seguro, a juzgar por el criterio DT_{50}/DE_{50} , pero hay una mayor superposición de eficacia y toxicidad, al ser las pendientes menores que para F_2 . La DE_{90} se corresponde con la DT_{10} , *i.e.*, con una dosis eficaz para el 90% de los individuos tratados, un 10% presentarán efectos tóxicos. Con F_2 , a pesar de que su margen de seguridad a probit 5 es menor, se puede seleccionar una dosis que sea eficaz para el 99% de los pacientes tratados y presente toxicidad sólo para un 1% (la superposición es menor que en el caso de F_1). La desventaja, sin embargo, de las pendientes pronunciadas es que es más fácil sobrepasar los niveles plasmáticos eficaces hacia zonas de toxicidad (por fluctuaciones en los procesos de absorción o eliminación del fármaco, intervalos interdosis demasiado cortos, etc.): la sobredosis inadvertida es más peligrosa con F_2 que con F_1 , ya que los límites entre DT_1 y DE_{99} son más estrechos. Si además las curvas de eficacia y toxicidad no son paralelas, la situación se hace mucho más compleja.

REFERENCIAS SELECCIONADAS.

1. Arunlakshana, O.; Schild, H. O.
"Some quantitative uses of drug antagonists"
Br. J. Pharmac. Chemother. **14**, 48-58 (1959).
2. Ariëns, E. J.
"Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition"
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **99**, 32-49 (1954).
3. Clark, A.J.
"*The mode of action of drugs on cells*", London: Edward Arnold (1933)
4. Cheng, Y-C; Prusoff, W. H.
"Relationship between the inhibition constant and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition of an enzymatic reaction".
Biochem. Pharmacol. **22**, 3099-3108 (1973).
5. Furchgott, R. F.; Bursztyn, P.
"Comparison of dissociation constants and of relative efficacies of related agonists acting on parasympathetic receptors".
Ann. N.Y. Acad. Sci. **144**, 882-898 (1967)
6. Gaddum, J. H.
"Bioassays and mathematics".
Pharmacol. Rev. **5**, 87-134 (1953)
7. Hill, A. V.
"A new mathematical treatment of ionic concentration in muscle and nerve under the action of electric currents, with a theory as to their mode of excitation".
J. Physiol. (London) **40**, 190-224 (1910)
8. Litchfield, J. T. Jr.; Wilcoxon, F.
"A simplified method of evaluating dose-effect experiments".
J. Pharmacol. Exp. Ther. **96**, 99-113 (1949)
9. Munson, P. J.
"LIGAND: A computerized analysis of ligand binding data".
Methods in Enzymology **92**, 543-576 (1983)
10. Rosenthal, H. E.
"A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system".
Anal. Biochem. **20**, 525-532 (1967)
11. Scatchard, G.
"The attractions of proteins for small molecules and ions"
Ann. N.Y. Acad. Sci. **51**, 660-672 (1956)
12. Stephenson, R. F.
"A modification of receptor theory".
Br. J. Pharmacol. **11**, 379-393 (1956)

Tabla 1. Transformación de porcentajes a probits.

%		%		%		%		%	
0		20	4.1584	40	4.7467	60	5.2533	80	5.8416
1	2.6737	21	4.1936	41	4.7725	61	5.2793	81	5.8779
2	2.9463	22	4.2278	42	4.7981	62	5.3055	82	5.9154
3	3.1192	23	4.2612	43	4.8236	63	5.3319	83	5.9542
4	3.2493	24	4.2937	44	4.8490	64	5.3585	84	5.9945
5	3.3551	25	4.3255	45	4.8743	65	5.3853	85	6.0364
6	3.4452	26	4.3567	46	4.8996	66	5.4125	86	6.0803
7	3.5242	27	4.3872	47	4.9247	67	5.4399	87	6.1264
8	3.5949	28	4.4172	48	4.9498	68	5.4677	88	6.1750
9	3.6592	29	4.4466	49	4.9749	69	5.4959	89	6.2265
10	3.7184	30	4.4756	50	5.0000	70	5.5244	90	6.2816
11	3.7735	31	4.5041	51	5.0251	71	5.5534	91	6.3408
12	3.8250	32	4.5323	52	5.0502	72	5.5828	92	6.4051
13	3.8736	33	4.5601	53	5.0753	73	5.6128	93	6.4758
14	3.9197	34	4.5875	54	5.1004	74	5.6433	94	6.5548
15	3.9636	35	4.6147	55	5.1257	75	5.6745	95	6.6449
16	4.0055	36	4.6415	56	5.1510	76	5.7063	96	6.7507
17	4.0458	37	4.6681	57	5.1764	77	5.7388	97	6.8808
18	4.0846	38	4.6945	58	5.2019	78	5.7722	98	7.0537
19	4.1221	39	4.7207	59	5.2275	79	5.8064	99	7.3263

Tabla 2. Distribución *t* de Student.

grados de libertad	90% (P=0.1)	95% (P=0.5)	99% (P=0.01)
1	6.314	12.706	63.657
2	2.920	4.303	9.925
3	2.353	3.182	5.841
4	2.132	2.776	4.604
5	2.015	2.571	4.032
6	1.943	2.447	3.707
7	1.895	2.365	3.499
8	1.860	2.306	3.355
9	1.833	2.262	3.250
10	1.812	2.228	3.169
11	1.796	2.201	3.106
12	1.782	2.179	3.055
13	1.771	2.160	3.012
14	1.761	2.145	2.977
15	1.753	2.131	2.947
16	1.746	2.120	2.921
17	1.740	2.110	2.898
18	1.734	2.101	2.878
19	1.729	2.093	2.861
20	1.725	2.086	2.845
21	1.721	2.080	2.831
22	1.717	2.074	2.819
23	1.714	2.069	2.807
24	1.711	2.064	2.797
25	1.708	2.060	2.787
26	1.706	2.056	2.779
27	1.703	2.052	2.771
28	1.701	2.048	2.763
29	1.699	2.045	2.756
≥30	1.645	1.960	2.576

PROBLEMA 1.

En una preparación de membranas cerebrales de cobaya (0.181 mg de proteína/ml) en tampón TRIS-HCl, pH = 7,4 a 37°C, se pretende estudiar un nuevo antagonista del calcio, A, en presencia de cationes endógenos. Para ello se dispuso de una serie de concentraciones del fármaco marcado isotópicamente (L) que variaron desde 35 pM hasta 3,1 nM en un volumen de ensayo de 250 μ L. El tiempo de incubación fue de 45 minutos. Ligando libre y ligando unido se separaron por filtración.

Sin tener en cuenta el *binding* inespecífico, represente la ecuación de Scatchard y la transformación de Hill, conocidas las concentraciones de ligando total (L_T) y ligando libre (L_L).

Calcule el valor de K_D en nM y la densidad de sitios de unión expresada en femtomoles por mg de proteína (1 fmol = 10^{-15} moles).

$[L_T]$ (pM)	$[L_L]$ (pM)
35	30
115	100
220	195
415	375
690	635
1300	1225
3100	3010

PROBLEMA 2.

En un ensayo de fijación al receptor β -adrenérgico se determinaron las concentraciones totales de fármaco **F** marcado, *binding* total y *binding* en presencia de cuatro concentraciones distintas del desplazante dihidroalprenolol (DHA). Para ello se partió de los siguientes valores de c.p.m. obtenidos en el contador de centelleo:

<i>Binding</i> total	<i>Binding</i> en presencia de DHA	F total	DHA (nM)
138,0	32,6	1881,6	0,25
237,4	53,7	3912,8	0,50
378,0	86,3	8653,5	1,00
563,4	154,1	21585,3	2,00

sabiendo que 1 femtomol ($= 10^{-15}$ moles) equivale a 41,3 c.p.m. y que el volumen final en cada tubo fue de 250 μ L.

Calcule la K_D y la concentración total de receptores para este antagonista β -adrenérgico **F**.

Conociendo que para cada determinación se emplearon 2 mg de tejido y que 1 g de tejido contiene 10^9 células, dé una estimación del número aproximado de receptores por célula.

PROBLEMA 3.

El músculo anococcígeo de la rata está densamente inervado y tiene un poderoso sistema de recaptación de catecolaminas que puede afectar a la sensibilidad de este tejido a la noradrenalina (NA). Para bloquear este proceso y producir una pequeña sensibilización de este tejido a la NA se añadió al baño de órganos en que se realizó este ensayo desmetilimipramina 10 nM. En estas condiciones se pretende ahora estudiar el antagonismo del bloqueante α -fentolamina, a distintas concentraciones, frente a las contracciones producidas por la NA.

En la tabla siguiente se dan los valores de la razón de dosis (RD) para las diferentes concentraciones molares de fentolamina utilizadas:

RD	[fentolamina] (M)
6,6	$3,2 \cdot 10^{-8}$
20,9	$1,0 \cdot 10^{-7}$
51,1	$3,2 \cdot 10^{-7}$
200,5	$1,0 \cdot 10^{-6}$
563,3	$3,2 \cdot 10^{-6}$
2239,7	$1,0 \cdot 10^{-5}$

Represente gráficamente la regresión de Schild y calcule la constante de disociación en el equilibrio (K_D) y el grado de antagonismo (pA_2) para la fentolamina. ¿Qué significado farmacológico tienen estos dos valores?

PROBLEMA 4.

En una preparación de tira de íleon de cobayo en un baño de órganos se pretende estudiar el antagonismo de la difenhidramina (**D**) frente a las contracciones producidas por la histamina (**H**) y determinar el grado de antagonismo (pA_2). Con este fin, se determinaron las DE_{25} y DE_{75} para la histamina sola (en ausencia de antagonista), que resultaron ser $5 \cdot 10^{-7}$ M y $2 \cdot 10^{-6}$ M, respectivamente. A continuación se repitió esta determinación pero en presencia de diferentes concentraciones de **D**, anotando en cada caso la concentración de **H** que producía el 50% de la respuesta máxima (DE_{50}) en presencia del antagonista:

Conc. molar D	DE_{50} para H (M)
10^{-8}	$4,6 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
10^{-7}	$2,9 \cdot 10^{-5}$
10^{-6}	$1,3 \cdot 10^{-4}$
10^{-5}	$1,3 \cdot 10^{-3}$

Paralelamente se evaluó en el mismo tipo de órgano el antagonismo de este compuesto a las contracciones producidas por la acetilcolina, obteniéndose un pA_2 de 6,5. Los valores de pA_2 (histamina) y pA_2 (acetilcolina) correspondientes a la mepiramina son, respectivamente, 9,5 y 4,7.

¿Cuál de los dos antihistamínicos estudiados presenta mayor selectividad por el receptor de histamina?

¿Qué significado bioquímico tiene el pA_2 ?

PROBLEMA 5.

Se ha incubado a 23 °C durante 5 min una preparación de vesículas sinápticas aisladas de *cuerpo estriado* bovino en presencia de ^3H -dopamina (1 Ci/mmol) 1 μM , con objeto de estudiar su capacidad para acumular este neurotransmisor en un proceso dependiente de ATP. Cuando al cabo de este tiempo se recogieron las vesículas sobre membranas filtrantes, y tras posterior lavado con el tampón de incubación, se determinó la radioactividad asociada a los filtros. La cantidad de ^3H -dopamina (DA) fijada fue de 250 pmol/mg. El experimento se repitió de forma idéntica pero en presencia de distintos fármacos a diferentes concentraciones. Los resultados, correspondientes a la media de 3 determinaciones y no corregidos para el *binding* no-específico (< 5%), fueron los siguientes:

<u>Fármaco</u>	<u>Concentración (M)</u>	<u>DA (pmol/mg)</u>
Reserpina	$1 \cdot 10^{-10}$	206
	$5 \cdot 10^{-10}$	163
	$1 \cdot 10^{-9}$	125
	$1 \cdot 10^{-8}$	50
	$1 \cdot 10^{-7}$	25
	$5 \cdot 10^{-7}$	23
Tiramina	$1 \cdot 10^{-7}$	200
	$5 \cdot 10^{-7}$	150
	$1 \cdot 10^{-6}$	105
	$5 \cdot 10^{-6}$	25
	$1 \cdot 10^{-5}$	15
Anfetamina	$1 \cdot 10^{-6}$	225
	$5 \cdot 10^{-6}$	160
	$1 \cdot 10^{-5}$	100
	$5 \cdot 10^{-5}$	25

A) Represente estos datos gráficamente con la ayuda del papel semilogarítmico y calcule *gráficamente* los valores de CI_{50} para estos tres fármacos, estableciendo un orden de potencia. Postule una interpretación farmacodinámica de los resultados.

B) En otro experimento se equilibraron previamente las vesículas sinápticas con ^3H -DA 1 μM durante 15 min, lo que resultó en una captación de 500 pmol/mg. Una vez preequilibradas, se incubaron con diferentes concentraciones de anfetamina durante 10 min y, tras filtrado y lavado, se determinó igual que anteriormente la radioactividad asociada a los filtros, encontrándose los siguientes valores:

<u>DA (pmol/mg)</u>	<u>[Anfetamina] (M)</u>
480	$2 \cdot 10^{-8}$
455	$8 \cdot 10^{-8}$
340	$8 \cdot 10^{-7}$
275	$2 \cdot 10^{-6}$
175	$8 \cdot 10^{-6}$
60	$8 \cdot 10^{-5}$
25	$8 \cdot 10^{-4}$

Vesículas cargadas de DA utilizadas como control se incubaron el mismo tiempo en idénticas condiciones en ausencia de anfetamina sin que se apreciara una disminución significativa en su contenido en DA. Represente estos datos y determine la CI_{50} para anfetamina en este ensayo. Compárela con la del ensayo anterior (A) y, a la vista de los resultados, establezca una hipótesis para el mecanismo de acción de la anfetamina.

PROBLEMA 6.

Se ha llevado a cabo un estudio dirigido al descubrimiento de derivados de xantinas que presenten mayor afinidad por el receptor de adenosina que las bases xánticas naturales. Con este fin se ha preparado una muestra biológica portadora de dicho receptor a partir de membranas cerebrales bovinas. Alícuotas de dicha preparación se han incubado a 20°C durante 2 horas con el ligando tritiado N-ciclohexiladenosina ($^3\text{H-CHA}$) 1 nM en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de las sustancias sometidas a estudio.

Los datos obtenidos en el contador de centelleo correspondientes a las cantidades de ligando marcado unido a las membranas, una vez filtradas y lavadas las muestras, fueron los siguientes (y corregidos para el *binding* no-específico determinado con N-fenilisopropiladenosina 10 μM):

- 1) Fijación de $^3\text{H-CHA}$ en ausencia de cualquier otro ligando: 100.000 c.p.m.
- 2) Fijación (c.p.m.) de $^3\text{H-CHA}$ en presencia de una concentración molar dada (M) de cada ligando sometido a estudio:

Ligando	(M)	c.p.m.
	$1 \cdot 10^{-11}$	80.000
1,3-dietil-8- fenilxantina (DFX)	$1,78 \cdot 10^{-11}$	72.500
	$3,16 \cdot 10^{-11}$	60.000
	$1,78 \cdot 10^{-10}$	30.000
	$5,62 \cdot 10^{-10}$	17.500
	$1 \cdot 10^{-9}$	70.000
8-fenil- teofilina (FT)	$1,78 \cdot 10^{-9}$	57.500
	$5,62 \cdot 10^{-9}$	35.000
	$1,78 \cdot 10^{-8}$	22.000
	$4,22 \cdot 10^{-8}$	80.000
1,3-dipropil- xantina (DPX)	$1 \cdot 10^{-7}$	62.500
	$3,16 \cdot 10^{-7}$	37.500
	$1 \cdot 10^{-6}$	20.000
	$1,78 \cdot 10^{-6}$	82.500
Teofilina (T)	$3,16 \cdot 10^{-6}$	65.000
	$5,62 \cdot 10^{-5}$	45.000
	$3,16 \cdot 10^{-5}$	20.000

Represente gráficamente estos datos y determine la CI_{50} para cada uno de estos compuestos.

Razone si los compuestos de síntesis presentan alguna ventaja con respecto a la xantina natural.

PROBLEMA 7.

La acetilcolina (ACh) interacciona con receptores celulares específicos en determinados tejidos y da lugar a una degradación de fosfatidilinositol y polifosfoinosítidos de la membrana. Este proceso puede monitorizarse midiendo, por ejemplo, la acumulación de inositol-1-fosfato (IP) en una suspensión de rebanadas cerebrales de rata.

1.- Los datos en la tabla A corresponden al incremento (% con respecto al control sin ACh) en c.p.m. de ^3H -IP obtenidas al incubar alícuotas de esta suspensión con diferentes concentraciones de ACh. Al repetir el experimento, pero en presencia de 240 nM del antagonista pirenzepina (PZ), se encontraron los valores recogidos en la tabla B.

A	ACh (M)	% Δ c.p.m.	B	ACh (M)	% Δ c.p.m.
	$6 \cdot 10^{-9}$	6		$8 \cdot 10^{-8}$	4
	$1,2 \cdot 10^{-8}$	22		$2 \cdot 10^{-7}$	24
	$4 \cdot 10^{-8}$	62		$4 \cdot 10^{-7}$	54
	$6 \cdot 10^{-8}$	80		$6 \cdot 10^{-7}$	70
	$1 \cdot 10^{-7}$	92		$1,2 \cdot 10^{-6}$	90

Con la ayuda del papel semilogarítmico, represente e interprete la relación concentración-efecto en los dos casos.

2.- Para conocer la potencia de la PZ en relación con el antagonista más conocido atropina (ATR), se efectuó un doble experimento con diferentes concentraciones de PZ y ATR, calculándose en cada caso las razones de dosis (rd) para los dos antagonistas:

rd	atropina (M)	rd	pirenzepina (M)
6,6	$6,4 \cdot 10^{-9}$	2,5	$5,0 \cdot 10^{-8}$
29,2	$3,2 \cdot 10^{-8}$	14,2	$2,5 \cdot 10^{-7}$
142	$1,6 \cdot 10^{-7}$	50	$7,5 \cdot 10^{-7}$
892	$8,0 \cdot 10^{-7}$	400	$5,0 \cdot 10^{-6}$

Determine *gráficamente* para cada uno de estos antagonistas la K_D , en nM, a partir de la representación de Schild.

3.- En un ensayo distinto, que sirvió para detectar el antagonismo a la inhibición por ACh de la actividad adenilil ciclasa en un homogeneizado cerebral, se calcularon unas K_D para PZ y ATR de 310 nM y 1,9 nM, respectivamente. Determine la *selectividad* para estos dos fármacos, expresada como el cociente entre la K_D en el ensayo del cAMP y la K_D obtenida para el ensayo del IP, y razone los resultados.

INDICE DE MATERIAS.**Pág.**

1. Ecuación de Michaelis-Menten	6
2. Ecuación y representación de Lineweaver-Burk....	7,18
3. Inhibición competitiva.....	8
4. Inhibición no-competitiva	10
5. Ecuaciones de Cheng-Prusoff:	
5.1. Inhibidores competitivos.....	9
5.2. Inhibidores no-competitivos.....	10-11
6. Representación de Dixon.....	13
7. Representaciones de Eadie-Hoffstee y Hanes-Woolf	13
8. Potencia relativa de los fármacos.....	13
9. Aplicación de la ley de acción de masas.....	13-14
10. Ecuación de Clark.....	15
11. Ecuación y representación de Hill.....	17
12. Eficacia y actividad intrínseca.....	18
13. Agonistas parciales o "dualistas".....	19
14. Respuestas equivalentes (Gaddum).....	22
15. Representación de Schild. Concepto de pA_2	24-25
16. Ecuación y representación de Scatchard.....	26-27
17. Técnica de Rosenthal para un sistema con más de un receptor.....	29-30
18. Determinación de la CI_{50} y la K_i en un ensayo de fijación	31
19. Capacidad de reserva de los receptores.....	34
20. Sistemas de amplificación.....	34
21. Respuestas cuantizadas todo-o-nada.....	37
22. Probits.....	40
23. Cálculo de la DE_{50} : método de Miller y Tainter...	41
24. Margen de seguridad. Evaluación del índice terapéutico.....	43
29. Referencias seleccionadas.....	44
26. Tabla de probits.....	45
27. Distribución t de Student.....	46
28. Ejercicios numéricos	47-51