

Tesis de Posgrado

Regulación del receptor benzodiazepínico periférico

Calvo, Daniel J.

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Calvo, Daniel J.. (1991). Regulación del receptor benzodiazepínico periférico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2412_Calvo.pdf

Cita tipo Chicago:

Calvo, Daniel J.. "Regulación del receptor benzodiazepínico periférico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2412_Calvo.pdf

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tema de Tesis

**Regulacion del Receptor Benzodiazepinico
Periferico**

Autor: Daniel J. Calvo

Director: Dr. Jorge H. Medina

**Lugar de Trabajo: Instituto de Biologia Celular
Facultad de Medicina UBA.**

*Tesis.
2412.
27. 2.*

Tesis para optar al titulo de Doctor en Ciencias Biologicas

1991

A mis padres y mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge H. Medina por dirigirme y enseñarme durante todos estos años de formación y por apoyarme permanentemente.

A mis compañeros y (ex) de laboratorio Lina Levi, Sonia Raskovsky, Diana Jerusalinsky, Claudia Wolfman, Rudy Bernabeu, Nadia, Jorge Gonzalez, Claudio DaCunha, Haydee Viola, Edgar Kornisiuk, Orlando Aguilar y María Laura Novas.

A Mariana del Vas.

A mis amigos y compañeros: Guillermo Gonzalez Burgos, Diego Golombek, Marcelo Rubinstein, Fabiana Scornik, Juancho Bouzat, Fabiana Kubke, Darío Protti, Fabián Biali, Ariel Escobar, Alba Mezio, Ruth Rosestein, Kalpa, Beatriz Kanterewicz, Pablo Schwarzbaum, Dany Carpi, Beto Civetta, Hugo Ríos, Gustavo Dziewczapolski, Raquel Aloyz, Alejandro Schinder, Odu the judge, Leonardo Nicola Siri, Mónica Fiszman, Alejandro Krimer, Verónica Alvarez, Alvaro Estévez, Eleonora Katz, Rey, J.J., Superbutti y la gente del IBC.

Al Club Atlético San Lorenzo de Almagro.

Filosofía barata y zapatos de goma
ni esta mentira te hace feliz,
quise quedarme cuando morí de pena
quise quedarme pero me fui.

Charly García.

INDICE:

Introducción:

	pag:
Generalidades y reseña histórica	1
Propiedades farmacológicas de las Benzodiazepinas	3
a) Efectos farmacológicos	3
b) Aspectos de su farmacocinética	7
c) Propiedades estructurales de importancia para su acción	8
En busca de un mecanismo de acción para las BZDs	10
Receptores de Benzodiazepinas	13
Receptores a BZDs de tipo central	14
Receptores a BZDs de tipo periférico	18
Localización de los Receptores Periféricos de BZDs	20
Estructura del Receptor Periférico de BZDs	23
Efectos del RO 5-4864 y PK 11195, dos ligandos del RP-BZD .	26
Efectos del RO 5-4864 a nivel central	28
Modulación endógena de los receptores de BZDs	32
Modulación endógena de los RP-BZDs	35
Regulación de los RP-BZDs	38
Heterogeneidad de los RP-BZDs	40
Relación con mensajeros celulares y iones	41
Receptor periférico de BZDs y esteroidogénesis	42
Benzodiazepinas y esteroides: Posibles relaciones y papel en la comunicación celular	44

Objetivos:

Caracterización de los RP-BZDs	45
Regulación de los RP-BZDs	45
Función de los RP-BZDs	46

Materiales y Métodos:

Mantenimiento de los animales y disección de distintos órganos de rata	47
Preparación de membranas: Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial	48
Ensayos de fijación de radioligandos	51
Análisis de los resultados	53
Criterios generales para la identificación de receptores ..	55
Determinación de la concentración de proteínas por espectrofotometría	56
Tratamientos	57
Aislamiento y purificación de moduladores endógenos del RP-BZD	59
Análisis de los datos y estadística	60

Resultados:

a) Caracterización de los RP-BZDs:

Caracterización de los RP-BZDs	61
Influencia de iones inorgánicos y lípidos en la interacción ligando-receptor	64
Sustancias que interaccionan o modifican las propiedades del RP-BZD	81
Aislamiento y purificación de compuestos que interactúan con los RP-BZDs: Posible modulación endógena	90
Caracterización farmacológica y localización subcelular de los RP-BZDs en células intersticiales testiculares	96

b) Regulación de los RP-BZDs:

Estudio de la regulación de los RP-BZDs durante una situación de stress agudo	105
Efecto del tratamiento crónico con BZDs sobre los RP-BZDs ..	110
Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre los RP-BZDs	121

c) Función de los RP-BZDs:

Elección de un modelo experimental para el estudio de una respuesta biológica	125
Correlación entre los cambios en los receptores y la respuesta esteroidogénica	129

Discusión:

Conclusiones generales	136
Resumen	142
Bibliografía	144

Introducción

Generalidades y reseña histórica:

Existen diversos motivos por los cuales el estudio de las propiedades farmacológicas y los mecanismos de acción de las Benzodiazepinas (BZDs) despiertan un gran interés en el área de las Neurociencias.

Las BZDs son el grupo de psicofármacos más usado en la actualidad, constituyendo más del setenta por ciento de las prescripciones de sedantes. En menos de tres décadas han llegado a ser en el mundo occidental drogas de gran consumo, solo superadas en ventas por la aspirina, el ácido acetilsalicílico. En los Estados Unidos, durante 1977 se consumieron 8000 toneladas de BZDs con un costo estimado en 500 millones de dólares (1).

Desde la antigüedad se han utilizado diferentes preparados o pociones para inducir sueño así como también para provocar sedación e hipnosis. Por citar algunas de ellas el láudano, las bebidas alcohólicas y un sinnúmero de hierbas.

El primer compuesto utilizado específicamente como hipnosedante fue el bromuro entre 1853 y 1864. Otros agentes usados antes de 1900 fueron hidrato de cloral, paraldehído, uretano y sulfonal.

En 1903 hacen su aparición como tranquilizantes los barbitúricos logrando un gran éxito de ventas y generándose una enorme variedad de fórmulas (2). La discriminación parcial entre las propiedades sedantes, hipnóticas y anticonvulsivas condujo a buscar agentes que surtiesen efectos más selectivos sobre las funciones del SNC. Así mismo el desarrollo de métodos más elaborados para la evaluación de los efectos de drogas sobre la conducta, hacia los años '50, prepararon el terreno para el descubrimiento del singular espectro de acciones de las BZDs.

Desde el año 1954, el Dr. Leo Sternbach, trabajando en la compañía Hoffman La Roche, utilizó benzoheptoxidiazinas como material de partida para el desarrollo de una nueva serie de tranquilizantes (3). Anteriormente, en la década del '30 en la Universidad de Cracovia, había estado trabajando con estas sustancias con el fin de sintetizar colorantes y pinturas sin obtener resultados que fueran interesantes.

A partir de las benzoheptoxidiazinas logró sintetizar un compuesto con estructura de un N-óxido de quinazolina que satisfacía los requerimientos perseguidos.

Posteriormente el Dr. Lowell Randall seleccionando una batería de tests apropiados evaluó a esta droga en cuanto a sus propiedades farmacológicas y la comparó con los sedantes que estaban siendo utilizadas en aquel momento: meprobamato, clorpromazina y barbitúricos.

Así en 1957 surgió el clordiazepóxido como un compuesto que reunía los efectos buscados. El Dr. Randall por primera vez diferenció el perfil farmacológico del nuevo compuesto, postuló entonces un mecanismo de acción central y predijo para esta sustancia una significativa potencialidad terapéutica (4).

Bastaron unos pocos años para cumplir las etapas experimentales y preclínicas y finalmente, en 1960 el clordiazepóxido salió a la venta con el nombre comercial de Librium. Apenas dos años más tarde se comercializó un derivado llamado diazepam (Valium) que alcanzaría un importante impacto comercial.

Desde el comienzo del uso terapéutico del clordiazepóxido en 1960, más de 3000 BZDs han sido sintetizadas, alrededor de 120 fueron probadas y unas 25 se utilizan en clínica en diversas partes del mundo (5).

El ulterior descubrimiento de receptores para BZDs abriría luego un excitante camino en la comprensión de los modos de acción de estos psicofármacos. Se establecería entonces una suerte de revolución en la neuropsicofarmacología molecular.

Propiedades farmacológicas de las BZDs:

a) Efectos farmacológicos:

La razón de su consumo tan difundido se debe principalmente a sus acciones sobre el SNC.

Las BZDs son las drogas de elección en la farmacoterapia de la ansiedad y trastornos relacionados, desórdenes del sueño, status epilepticus y otros estados convulsivos. También son utilizadas como relajantes musculares de acción central y para premedicación como agentes inductores en anestesiología.

Al ser fármacos muy bien tolerados y ampliamente efectivos y sumado al hecho de que poseen una toxicidad muy baja, adquirieron una amplia gama de aplicaciones terapéuticas.

La mayoría de las BZDs que han llegado al mercado fueron seleccionadas básicamente por su gran potencia ansiolítica y su pobre actividad como depresores generales de las funciones del SNC, debiéndose su extraordinaria popularidad en clínica médica en gran medida a que aliviando los síntomas de ansiedad muestran una interferencia mínima en la función cognoscitiva o la vigilia (3).

Aunque las BZDs afectan la actividad celular en muchos de los niveles del neuroeje, determinadas estructuras del sistema nervioso se ven influidas en un grado mucho mayor que otras. Además algunos efectos de las drogas son indirectos (6 a 8).

Las BZDs no son depresoras generales de las neuronas como los

barbitúricos. Hay grandes diferencias de selectividad entre ellas y la utilidad clínica de las BZDs individuales también varía considerablemente. Incluso existe una serie de compuestos heterogéneos no benzodiazepínicos que actúan a través de receptores a BZDs (9).

Los efectos son cualitativamente similares entre todas ellas, pero existen diferencias cuantitativas importantes en sus espectros farmacodinámicos y en las propiedades farmacocinéticas que condujeron a adoptar distintas modalidades en su aplicación clínica.

Cabe destacar que el estudio de los mecanismos de acción de las BZDs dió lugar, entre otras cosas, al postulado de un nuevo principio farmacológico (10 y 11).

Los receptores a BZDs fueron el primer ejemplo de un receptor que podría ser afectado en direcciones opuestas dependiendo de la naturaleza del ligando con el cual interacciona.

De acuerdo con esta hipótesis los ligandos benzodiazepínicos pueden clasificarse según su efecto en:

i) Agonistas: Para el caso de que incrementen una respuesta dada.

ii) Agonistas Inversos: Cuando el efecto es la reducción de la misma.

iii) Antagonistas: No poseen efecto por sí mismos, es decir son inactivos pero bloquean la acción de agonistas y agonistas inversos.

También existen BZDs que se comportan como agonistas parciales. La tabla 1 muestra algunos ejemplos de ellos.

TABLA 1

Receptor Central:

Agonistas:

BZDs: diazepam

flunitrazepam

clonazepam

lorazepam

bromazepam

no BZDs: ciclopirrolones = zopiclone, suriclone

triazolopiridazinas = CL 218, CL 872

pirrazoloquinolines = CGS 9896, CGS 8216

fenilquinolines = PK 8165, PK 9084

β -carboline = ZK 93423

Agonistas Inversos: β -carboline:

β -CCM

β -CCE

β -CCB

β -CCP

DMCM

FG 7142

Antagonistas: BZDs: RO 15-1788

RO 15-3505

ZK 93426

En todos los casos, los compuestos varían en sus grados de potencia farmacológica y presentan especificidades características y también disímiles.

Una segunda hipótesis basada principalmente en observaciones de experimentos farmacológicos, postula que los sitios de reconocimiento de BZDs (complejo GABA/BZD) podrían encontrarse en dos estados transicionales de afinidades diferentes.

No está aún clarificado como es alcanzado y regulado el equilibrio entre estos dos estados conformacionales y si tal regulación, en caso de que exista realmente, está acoplada a señales liberadas del terminal gabaérgico o a algún otro mecanismo que le confiera una particular relevancia fisiológica.

De acuerdo a esta teoría, los sitios de reconocimiento de BZDs (complejo GABA_A/BZD) al encontrarse en dos estados transicionales, uno de ellos tendría afinidad máxima para β -carbolinas y el otro para las BZDs.

Las β -carbolinas sin embargo comparten con las BZDs algunos sitios de fijación y cuando aquellas, siendo ansiogénicas, reconocen un centro modulador alostérico la probabilidad de que el GABA abra canales decrece. Por el contrario, cuando BZDs ansiolíticas se unen a este centro tal probabilidad aumenta.

El centro regulatorio, dentro de esta hipótesis, sería un sitio de modulación alostérica positiva o negativa, según el caso, del receptor de GABA.

La demostración de la existencia de subtipos de receptores, como se verá más adelante, tiende a desacreditar los modelos de estados transicionales (12).

b) Aspectos de su farmacocinética:

Las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas de las BZDs tienen una gran influencia sobre su utilidad clínica.

Todas tienen altos coeficientes de distribución lípido-agua en la forma no ionizada, pero su lipofilia varía más de 50 veces según la polaridad y electronegatividad de los diversos sustituyentes.

En esencia todas las BZDs se absorben por completo salvo el clorazepato que se decarboxila rápidamente en el jugo gástrico a N-desmetildiazepam (nordazepam) para luego absorberse por completo.

Algunas alcanzan la circulación sistémica como metabolitos activos.

La vía de administración mayormente utilizada es la oral en donde la concentración máxima en plasma se alcanza en 0.5 a 8 hs según la BZD. Se reservan las inyecciones intramusculares para el tratamiento agudo de crisis epilépticas.

Las BZDs y sus metabolitos activos se distribuyen a los tejidos transportadas por sangre, unidas en distinto grado a proteínas plasmáticas como la albúmina. El grado de fijación concuerda mucho con la liposolubilidad y abarca generalmente desde un 70% para el alprazolam hasta un 99% para el diazepam, con la única excepción del prazepam (30%).

La concentración en el líquido cefalorraquídeo es más o menos la misma que la de la droga libre en plasma, las concentraciones plasmáticas de la mayoría de las BZDs exhiben patrones compatibles con modelos de dos compartimentos (a pesar de que tres compartimentos sería más apropiado para compuestos solubles en lípidos). En consecuencia se produce una rápida captación de BZDs por el encéfalo y otros tejidos muy perfundidos seguida por una fase de redistribución hacia tejidos no tan bien perfundidos, en particular el muscular y el adiposo. Los volúmenes de distribución

son grandes.

Las BZDs se acumulan en aquellos tejidos ricos en lípidos como el adiposo y el cerebral. Son metabolizadas en el hígado, siendo finalmente excretadas por riñón. La vida media de las BZDs y sus metabolitos varía desde unas pocas horas hasta varios días.

c) Propiedades estructurales de importancia para su acción :

El término benzodiazepina alude al anillo bencénico A fusionado con un anillo diazepínico B de siete miembros que se observa en la figura 1. Todas las BZDs importantes contienen un sustituyente 5-arilo (anillo C) y un anillo 1,4-diazepina. Introduciendo diversas modificaciones en los sistemas de anillos se obtuvieron compuestos que poseen actividades similares. El sustituyente 5-arilo aumenta mucho la potencia. La naturaleza química de los sustituyentes en las posiciones 1 a 3 puede variar mucho. Los grupos que retiran electrones en la posición 7 acrecientan la actividad significativamente, los grupos grandes o que liberan electrones en 7 así como los sustituyentes en otras partes del anillo A reducen la actividad. Los grupos aceptores de electrones en 2' (orto) del anillo C incrementan la potencia. Sustituciones en otras partes de C la disminuyen (3).

La figura 2 muestra la estructura de algunas de las BZDs más representativas (2).

Fig 1

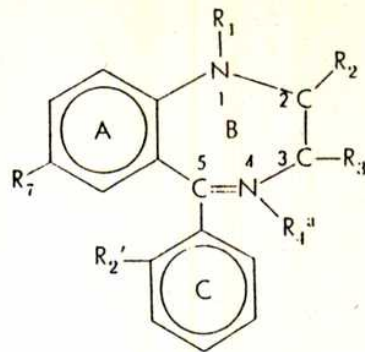
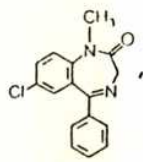
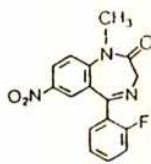


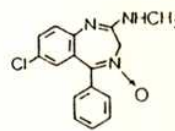
Fig 2



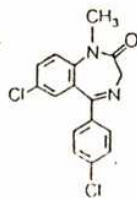
Diazepam



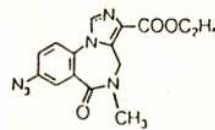
Flunitrazepam



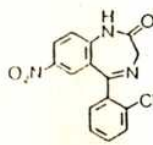
Chlordiazepoxide



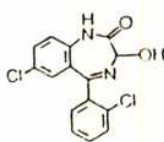
Ro 5-4864



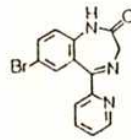
Ro 15-4513



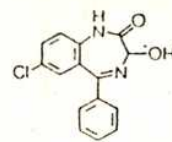
Clonazepam



Lorazepam



Bromazepam



Oxazepam

En busca de un mecanismo de acción para las BZDs:

A pesar de la amplia difusión que habían alcanzado estos fármacos en la práctica médica, no se conoció su mecanismo de acción hasta que en 1967 (13) propusieron que las BZDs facilitaban la neurotransmisión gabaérgica en la médula espinal del gato. Estos autores se basaron en el bloqueo dosis dependiente producido por el diazepam (DZ) de las convulsiones provocadas por un déficit en la liberación de GABA. Estos resultados fueron en general recibidos con escepticismo y debido a ello quedaron por algunos años en el olvido.

Durante los primeros años de la década del '70 se intentó correlacionar los efectos de las BZDs, con una posible interacción a nivel de los distintos sistemas de neurotransmisión. Se encontraron diferencias en la concentración y el recambio de neurotransmisores como la acetilcolina, dopamina y serotonina (14) en diversas estructuras cerebrales. Estos cambios nunca alcanzaban a explicar todos los efectos observados durante la acción de las BZDs. De todos modos se propusieron alternativamente la glicina, acetilcolina, catecolaminas y serotonina como posibles sitios de acción de las BZDs (15). En verdad las BZDs parecen alterar la dinámica de virtualmente todos los sistemas de neurotransmisión conocidos en el SNC, al menos con dosis altas, hablando esto de una posible acción indirecta en este aspecto.

El aumento provocado por DZ en la inhibición presináptica de los reflejos monosinápticos de la médula espinal del gato explicaba en parte la acción miorrelajante de las BZDs. Pero recién después de la aceptación del GABA como responsable de esta inhibición fue posible comenzar a pensar en una interacción de las BZDs sobre la

neurotransmisión gabaérgica (6).

Los trabajos realizados en esta dirección demuestran inequívocamente dicha interacción, ya que la potenciación observada en aquella respuesta con DZ se bloqueaba por el antagonista gabaérgico bicuculina y disminuía al inhibir la síntesis de GABA con tiosemicarbazida (16). Además la depleción del GABA endógeno producía la abolición de los efectos encontrados de modo que se postuló que la potenciación de los efectos del GABA por BZDs se llevaban a cabo sin actuar directamente sobre el sitio de reconocimiento de este aminoácido en la proteína receptora.

Entonces, las BZDs no compiten con el GABA por su sitio de reconocimiento, pero sus efectos no son independientes de aquel ya que para su acción requieren de su presencia (17).

Es así que hacia 1975 se habían acumulado una gran serie de evidencias bioquímicas, electrofisiológicas y conductuales en tal sentido que hicieron retomar la hipótesis inicial de Schmidt. Los experimentos comentados proveyeron una explicación no sólo acerca de la identificación y naturaleza del blanco de acción, sino también para aquellas alteraciones secundarias que se encontraba eran inducidas por estas drogas en otros sistemas de neurotransmisión distintos del GABA (18 y 19).

Como resultado de este amplio estudio, surge la idea actualmente aceptada, de que el principal mecanismo de acción de las BZDs se basa en su capacidad de interactuar en aquellas sinapsis en donde el GABA es utilizado como mensajero intercelular sin que hubiera modificación en la síntesis o utilización del neurotransmisor.

No debe perderse de vista de todas formas, que si bien las BZDs producen un moderado corrimiento hacia la izquierda de la curva

dosis respuesta para GABA, sin incrementar la conductancia máxima al Cl^- , un tratamiento individual con dosis apropiadas de BZDs no necesariamente altera la transmisión en todas las sinapsis, debiéndose tener en cuenta factores que también influyen como la concentración de GABA en el lugar y la ocupación fraccional de los receptores de GABA. También es importante tener en cuenta que independientemente de que las BZDs provoquen o no una inhibición a nivel general siempre actúan potenciando la acción del GABA (2) Es por todas estas razones que hoy se acepta en forma general el hecho de que la sinapsis gabaérgica es el sitio primario de acción de las BZDs.

Mientras tanto la descripción de los efectos GABA-independientes fue incrementándose y lo que se atribuía a errores de interpretación o de artefactos de las técnicas de estudio y por lo tanto se desechaban sistemáticamente como datos o evidencias, hoy se tratan de relacionar y explicar en base a la confirmación de la existencia de una amplia diversidad de receptores (subtipos). La hipótesis generalmente se sustancia con evidencias electrofisiológicas bioquímicas, farmacológicas y conductuales.

En la actualidad hay motivos para creer que existen diversos mecanismos de acción que contribuyen en grados variables a producir efectos determinados, como su interacción con receptores diferentes o incluso enzimas u otro tipo de blancos intracelulares (20 y 21).

También hay reportes sobre acciones de las BZDs sobre tejidos periféricos como vasodilatación coronaria y bloqueo neuromuscular (8, 22 y 23).

Es común además, encontrar diferencias interespecíficas, siendo las especies más utilizadas en experimentación u observaciones el mono, perro, gato, rata, ratón y hombre.

Receptores a BZDs:

Hacia 1977 dos grupos de investigación, trabajando independientemente hicieron posible la primera caracterización de receptores a BZDs, Braestrup y Squires en Dinamarca y Möhler y Okada en Suiza (24 a 26).

Aquellos experimentos fueron en gran medida el resultado del perfeccionamiento de las técnicas bioquímicas para el estudio de los receptores a hormonas y neurotransmisores, y por otra parte del creciente interés por comprender acabadamente las acciones de las BZDs a nivel del sistema nervioso.

Por caminos paralelos y mediante la utilización de un análogo radiomarcado del diazepam describieron la fijación específica del ligando y consecuentemente la interacción directa con este sitio de reconocimiento.

Aspectos tales como orden de potencia relativa en estos sitios, propiedades farmacológicas, comparación de las constantes de equilibrio para la fijación y capacidad o número de sitios de fijación presentes se convirtieron en preguntas capaces de ser contestadas.

Los sitios de reconocimiento fueron entonces considerados receptores basándose en criterios farmacológicos tales como:

Saturabilidad de la unión

Reversibilidad

Estereoespecificidad

La afinidad de la interacción

Correlación entre la afinidad in vitro y la potencia farmacológica

Respuesta celular característica

Distribución subcelular y regional característica y especificidad de tejido

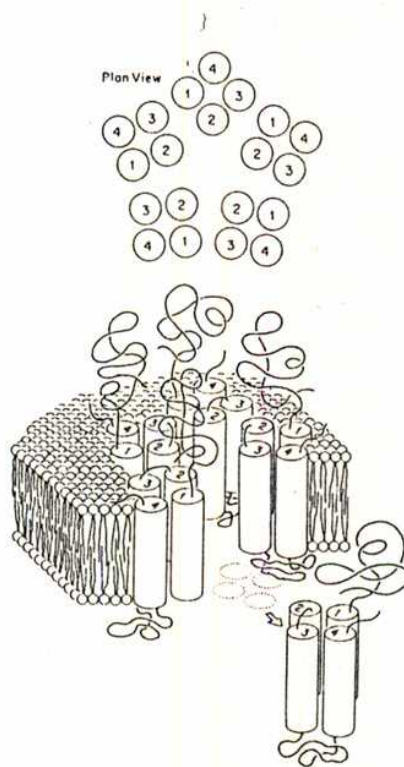
Tales criterios fueron aceptados (27), y una vez establecida la existencia de receptores para BZDs en el SNC se profundizó en el estudio de sus propiedades por diferentes disciplinas, dando cuenta de una profusa diversidad estructural y por consiguiente funcional.

Receptores a BZDs de tipo central:

Se denomina en forma general receptor a BZDs de tipo central (RC-BZD), a aquel que existe en el complejo macromolecular que contiene al sitio receptor de BZDs y también incluye al receptor gabaérgico y un ionóforo de cloruro.

La figura 3 muestra el modelo más aceptado que describe la estructura del complejo macromolecular.

Fig 3



Durante los últimos años, los neurobiólogos llevaron a cabo un intenso estudio sobre diferentes aspectos de los receptores a neurotransmisores. Su presencia en membranas no neuronales y neuronales en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados indica la importancia de estas moléculas para la regulación y el mantenimiento de una amplia variedad de funciones celulares (28).

Desde los comienzos del estudio de los receptores a neurotransmisores uno de los receptores más íntimamente estudiados fue el receptor colinérgico nicotínico, el cual ha sido purificado, sus subunidades fueron parcialmente secuenciadas y posteriormente clonadas y reconstituídas funcionalmente en diferentes sistemas.

Esta aproximación molecular ha sido combinada con estudios farmacológicos clásicos de fijación de ligandos, medición de flujos iónicos y técnicas de registro electrofisiológico dando como resultado un cuadro por demás detallado acerca de la estructura y función de estos receptores.

Por todo ello, no resulta entonces sorprendente que el mismo tipo de técnicas hayan sido y aún estén siendo utilizadas en estudios similares para analizar las características y el comportamiento de otros canales iónicos activados por neurotransmisores como es el caso del receptor para GABA/BZDs.

Corroborando la antigua hipótesis de Schmidt y partiendo de la posterior descripción de Costa y Haefely, en los últimos 10 años se han publicado un sinnúmero de artículos en donde se confirma la íntima asociación del sitio de reconocimiento de BZDs con el receptor de GABA, conformando un complejo macromolecular ubicado en las membranas sinápticas de neuronas del SNC, formando parte de una proteína oligomérica con subunidades α , β , τ y δ (29).

La familia de canales iónicos relacionada estructuralmente de naturaleza multimérica y función ligando-activada incluye a los

receptores para GABA, Glicina, acetilcolina, N-Metil-D-Aspartato, 5HT₃, y se amplia día a día debido al aislamiento, caracterización y expresión subsiguiente de cDNAs que codifican para numerosas subunidades de cada grupo.

La heterogeneidad de los receptores de GABA/BZDs había sido propuesta y tratada en extenso con anterioridad a la utilización de técnicas de DNA recombinante mediante los ensayos de fijación de radioligandos. Pero ahora, una diversidad mayor que la esperada está siendo encontrada debido al amplio número de subunidades y de variantes moleculares de una misma subunidad que han aparecido en los últimos dos años [6 α , 3 β , 2 τ y 2 δ (30 y 31)].

El tema entonces ha ido cobrando importancia debido al hecho de que las propiedades funcionales del receptor obviamente dependen de la composición y la naturaleza de las subunidades constituyentes.

Análogamente al caso de otros receptores para neurotransmisores (colinérgico nicotínico, aminoácidos excitatorios) en los receptores a BZDs de tipo central existe un acoplamiento funcional entre el receptor al neurotransmisor y un canal iónico o ionóforo.

La acción fisiológica del GABA es mediada por una interacción rápida y reversible del aminoácido con sitios de reconocimiento en la macromolécula receptora, y esta interacción permite la regulación de la apertura y cierre de un canal para cloruro en la membrana celular. De esta manera las BZDs facilitan la transmisión gabaérgica al incrementar el tiempo medio de apertura del canal aniónico, cuando se unen a su sitio en el complejo receptor GABA/BZDs (31,32 y 33).

Actualmente los receptores de GABA se clasifican en dos grandes grupos o clases de acuerdo con el mecanismo de transducción utilizado y las propiedades de reconocimiento del transmisor y de

fármacos (34):

Por un lado aquellos que formando parte de una superfamilia de receptores ionotrópicos acoplados a un canal iónico fueron denominados GABA_A. El sitio de reconocimiento para el GABA se haya en la subunidad β de la proteína integral que forma el canal aniónico, y las BZDs se unen a la α , y no se descarta una posible interacción con la subunidad γ (31). A su vez existen subtipos de receptores de GABA_A, de acuerdo a las propiedades farmacológicas de los mismos pueden clasificarse en GABA_{A1}, GABA_{A2} y GABA_{A3}.

La clase de receptores a la cual pertenece el receptor de GABA_B utiliza como mecanismo de transducción proteínas G ligadoras de GTP que a su vez modulan la actividad de canales iónicos, principalmente de K⁺ y de Ca²⁺, y no poseen en su estructura sitios de reconocimiento de BZDs. También en este caso se describieron subtipos GABA_{B1} y GABA_{B2}. Los receptores de GABA_B no reconocen BZDs. Los RC-BZDs o GABA/BZD se localizan en neuronas del SNC principalmente asociados a membranas sinápticas. Estructuras como la corteza cerebral y el cerebelo son ricas en este tipo de receptores. Paralelamente, los estudios realizados para la caracterización farmacológica del RC-BZD revelaron la presencia de receptores benzodiazepínicos localizados en tejidos periféricos, que poseían características que los diferenciaban de los anteriormente descritos (35). Esta descripción ha sido posible gracias a la disponibilidad de diferentes drogas congéneres aunque con un perfil de unión marcadamente distinto.

Debido a que se encontró una alta densidad de este tipo de receptores a BZDs en tejidos periféricos como riñón, testículo y glándula adrenal se los llamó receptores periféricos de BZDs (RP-BZD) a pesar de que luego se describió su existencia en el SNC tanto en neuronas como en células gliales (36 a 39).

Mukhin y col. describieron que los RP-BZDs son también abundantes en tejido neural donde parecen estar preferencialmente asociados con elementos astrogliales (40).

Es común encontrar en la bibliografía los términos receptor central y periférico de BZDs en referencia a los clásicamente descritos en SNC y los encontrados inicialmente en tejidos periféricos. Es por esa razón que muchas veces se refiere receptor central o GABA/BZDs indistintamente y RP-BZD se usa para denominar al sitio de reconocimiento que está localizado en tejidos periféricos y también en el SNC, pero no acoplado al receptor de GABA_A.

Receptores a BZDs de tipo periférico:

Al demostrarse que algunas BZDs reconocían con alta afinidad sitios saturables que se localizan en numerosos tejidos periféricos se observó que estos sitios periféricos de fijación específica de BZDs no solo presentaban características farmacológicas y bioquímicas distintas, sino también una distribución tisular y subcelular diferente de los del tipo central (41).

Algunas BZDs como el clonazepam tienen una gran afinidad por el RC-BZD y prácticamente no interactúan con el RP-BZD, en cambio otras como el diazepam presentan un menor grado de selectividad (42). La tabla 2 muestra el perfil farmacológico de ambos receptores en corteza cerebral de rata (36 y 42).

A diferencia de los RC-BZD los RP-BZD no están acoplados al receptor de GABA (43) y la fijación del agonista periférico de alta afinidad ³H-RO 5-4864 al RP-BZD no se ve estimulada alostéricamente por Cl⁻ como en el caso de la unión de ³H-Flunitrazepam al receptor de tipo central (44 a 47).

La afinidad de estos receptores por sus ligandos complementarios es alta, con constantes de disociación (Kd) del orden nanomolar. Esta afinidad elevada refleja la baja concentración de BZDs necesaria para ejercer un efecto mediado a través del receptor, pero paradójicamente un número alto de sitios por célula ha sido reportada.

T A B L A 2 Inhibición de la fijación específica de ^3H -RO 5-4864 y ^3H -Clonazepam por diferentes BZDs en cerebro de rata.

Compuesto	IC50 (nM).	
	Tipo periférico	Tipo central
Diazepam	20	8
Clonazepam	8400	1,2
RO 5-4864	4,1	40000
Clordiazepóxido	4000	900
Flunitrazepam	60	2

Localización del Receptor Periférico de BZDs:

Estudios de fraccionamiento subcelular revelan que los RP-BZD se encuentran localizados preferencialmente en la membrana externa mitocondrial y en menor cantidad en la membrana plasmática y núcleo de diferentes tipos celulares (48 a 52). La tabla 3 muestra la densidad de receptores a BZDs de tipo periférico encontrados en una preparación de corteza cerebral de rata, y la comparación de aquella densidad con la encontrada en las mismas condiciones para los RC-BZDs.

Estos receptores se localizan en un gran número de tejidos, pero a pesar de esta amplia distribución existen notables diferencias en cuanto a la densidad encontrada en los diferentes tejidos e incluso variaciones con respecto al tipo celular estudiado.

Estudios de su localización por técnicas autorradiográficas utilizando el ligando agonista ^3H -RO 5-4864 como sonda, demostraron que aquellos tejidos involucrados en la esteroidogénesis como la zona glomerulosa de la corteza adrenal y las células de Leydig testiculares por un lado, y los epitelios relacionados con el flujo de electrolitos (plexos coroideos, glándula salival, porción distal del nefrón, etc.) por otro son especialmente ricos en este tipo de receptor (53 a 55).

La distribución tisular de los RP-BZD se muestra en la tabla 4, la misma expresa la densidad de receptores encontrada en los diferentes tejidos tomando como 100% al valor descripto para glándula adrenal.

T A B L A 3 Densidad de la fijación de ^3H -RO 5-4864 (RP-BZD) y ^3H -RO 15-1788 (RC-BZD) a fracciones subcelulares de corteza cerebral de rata (50).

Fracción	Tipo periférico fmol/mg proteína	%	Tipo central fmol/mg proteína	%
Homogenato	320	100	711	100
P ₁	496	39	555	31
Nuclear	96	4	100	7
Fragmentos	414	83	790	89
P ₂	349	44	820	47
Mitocondrial	1132	60	583	14
Sinaptosomal	302	30	1136	79
Mielina	80	4	64	5
P ₃	164	3	666	3

T A B L A 4 Distribución tisular y regional de la fijación de ^3H -RO 5-4864, medida en homogenatos totales (41).

Tejido o región	Fijación específica de ^3H -RO 5-4864 %
Glándula adrenal	100
Epitelio nasal	83,1
Glándula salival	73,4
Pulmón	71,6
Eritrocitos	62,6
Riñón	40,1
Corazón	40,1
Testículo*	33,2
Bazo	29,0
Lengua	17,0
Hígado	11,8
Hipófisis	7,1
Páncreas	3,9
Intestino delgado	1,0
Músculo esquelético	0,8
Cerebro:	
Bulbo olfatorio	21,4
Tálamo/hipotálamo	5,7
Hipocampo	4,2
Cerebelo	4,0
Corteza	3,4
Cuerpo estriado	2,4

* Esta tabla está confeccionada con datos tomados de la bibliografía y correspondientes a la comparación de experimentos realizados en fracciones mitocondriales crudas de los distintos tejidos citados. Es importante tener en cuenta esto debido a que puede generar una falsa imagen de la densidad relativa real, pero al mismo tiempo es ilustrativo de la ubicuidad de los RP-BZDs.

Otras estructuras que presentan RP-BZD son la médula espinal, el nervio óptico, células del canal del epéndimo y la glándula pineal. Los RP-BZD presentes en el bulbo olfatorio se encuentran en fibras nerviosas y en las capas glomerulares correspondientes a neuronas olfatorias aferentes. También se han visto en células sanguíneas como plaquetas, macrófagos, linfocitos y mastocitos (56 a 68).

Estructura del receptor periférico de BZDs:

La naturaleza proteica del RP-BZD ha sido demostrada ya que hay una pérdida de la actividad de unión al ser tratados con enzimas proteolíticas. Por otra parte los tratamientos con fosfolipasas y reactivos reductores influyen sobre las características del receptor, lo cual sugiere que puede contener un componente fosfolipídico importante, así como también grupos disulfuro necesarios para el mantenimiento de la conformación biológicamente activa (69 a 71). No se sabe si presentan en su estructura restos de hidratos de carbono.

La caracterización fisicoquímica de los RP-BZD no ha sido completa, en gran medida por su naturaleza insoluble, característica que comparte con la mayoría de las proteínas asociadas a membrana. Esta dificultad llevó a utilizar detergentes con el propósito de extraer

los receptores periféricos de BZDs de la fracción de membranas, para el posterior análisis de los preparados solubilizados (72 a 75).

La solubilización y reensamblado de los RP-BZD fue llevada a cabo por R. Anholt y col. (72) utilizando mitocondrias de glándula adrenal de rata. Usando digitonina para separar las membranas mitocondriales interna y externa, y luego detergentes no iónicos como el Tritón X-100, se observaba una pérdida de la afinidad por un derivado isoquinolínico marcado que posee alta afinidad por los RP-BZDs y es postulado como un posible antagonista, el ^3H -PK 11195, pero la función era reconstituida por el agregado de colato con una mezcla suplementaria de lípidos de soja. Las microfotografías electrónicas de la preparación solubilizada muestra una población heterogénea de pequeñas partículas (<100 Å) y algunos agregados de membrana (>500 Å). El comportamiento de este receptor durante la solubilización y el reensamblado sugiere que es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial.

Por otra parte existen una serie de estudios que mediante el uso de técnicas de marcado por fotoafinidad estiman el peso molecular del receptor, habiendo en algunos casos ciertas discrepancias. El fotomarcado del receptor se realiza utilizando un ligando radioactivo que al iluminarlo se modifica covalentemente fijándose irreversiblemente al receptor. En un paso posterior se puede visualizar la migración del complejo ligando-receptor por electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS. En estos experimentos reportan un peso molecular aparente de 17 KD. Además la subsiguiente secuenciación de fragmentos del péptido purificado indica que la proteína no guarda homología significativa con la secuencia de otras proteínas conocidas (76 a 82). De esta manera los autores proponen haber purificado a homogeneidad aparente una proteína de 17 KD asociada con los sitios de reconocimiento RP-BZDs.

Hay otros estudios que tratan de relacionar a este receptor con un canal aniónico mitocondrial activable por voltaje ubicado en la MEM, capaz de funcionar como poro o tamiz para sustancias de peso molecular mayor a 6 KD. Este canal, es la proteína más abundante de la MEM, tiene un tamaño de poro de 15 Å y permite transferir grandes aniones como ADP y ATP a través de la MEM. Se la denomina Porina por su gran similitud con una proteína de la membrana celular de bacterias gram negativas. Según estos autores, el RP-BZD tendría un peso molecular idéntico al de la Porina (alrededor de 30-35 KD), y ambas proteínas poseen idéntica movilidad en diferentes sistemas electroforéticos (41, 83 y 84).

Por otra parte, otros autores llevando a cabo experimentos de irradiación-inactivación del RP-BZD se ha estimado el peso molecular en 34 KD (85).

En este último año dos grupos han comenzado a trabajar sobre los aspectos moleculares del RP-BZD, principalmente en relación a la estructura del gen y su regulación.

Uno de ellos, el grupo de Krueger y col. en Washington, fabricó una biblioteca genómica de rata que fue estudiada con una sonda correspondiente a la proteína que fija PK 11195. Fueron aislados seis clones que muestran mapas de restricción idénticos salvo en sus extremos 5' y 3'. El aislamiento de un gen para el RP-BZD concuerda con el hallazgo de una sola banda de hibridización en ensayos de Southern Blot de DNA de rata. El gen del RP-BZD se estima que tiene un tamaño de 2500 pares de bases, con dos intrones de 800 y 500 respectivamente. El sitio de iniciación de la transcripción del RNA se encuentra aproximadamente 200 pares de bases río arriba del codón de iniciación de la traducción. Por otra parte la región promotora muestra secuencias repetitivas largas.

El otro grupo, Le Fur y col. en Francia, localizó el gen de RP-BZD de humanos en la región distal del brazo largo del cromosoma 22.

La mayor parte de los estudios estructurales del RP-BZD indican que es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 18 KD (86 y 87).

Efectos del RO 5-4864 y PK 11195, dos ligandos "periféricos":

La función de los RP-BZD no está aún totalmente aclarada, aunque su rol modulador en la esteroidogénesis ha sido recientemente reconocido (ver más adelante).

El RO 5-4864 es la droga de mayor afinidad descrita para este tipo de receptores, la misma produce un efecto pleiotrópico de acciones farmacológicas. En algunos casos los efectos observados por aplicación de RO 5-4864, son revertidos por PK 11195, un derivado isoquinolínico que posee alta afinidad por el RP-BZD (88 y 89), debido a esto se postuló que el RO 5-4864 se comporta como agonista de estos sitios en tanto que el PK 11195 lo hace como antagonista (90).

Así como se encuentra muy buena correlación entre la habilidad de varias BZDs para inhibir la fijación de ^3H -Diazepam a membranas de cerebro de rata y su efectividad clínica en humanos, no ocurre lo mismo con los sitios periféricos de reconocimiento de BZDs. Hasta ahora no ha sido correlacionada una respuesta biológica, o farmacológica, con la ocupación de los RP-BZD (91).

Algunos de los efectos provocados por RO 5-4864 son:

Disminución de la duración del potencial de acción en células cardíacas antagonizado por PK 11195 (92); alteración de la expresión de protooncogenes (93); modificación de la actividad proliferativa de distintas líneas de cultivo de células por ejemplo, estimulación

de la melanogénesis en células B16/C3 de melanoma de ratón (94), inhibición de la proliferación de células de timoma de ratón (95 y 96); estimulación de la metilación de fosfolípidos en células de astrocitoma C6 (97); incremento en el flujo en las arterias coronarias (8); aumento de la producción de testosterona en células de Leydig testiculares, antagonizado por PK 11195 (98 y 99); reducción de las arritmias ventriculares durante la isquemia miocárdica en el perro (100); etc (101 a 111).

Los posibles mecanismos de acción se desconocen y tampoco se sabe si los efectos observados son mediados directamente por este receptor.

Efectos del RO 5-4864 a nivel central:

Se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de la interacción de BZDs de uso clínico con receptores en el sistema nervioso central modulando las sinapsis gabaérgica como hemos citado, principalmente a través de un cambio en la cinética de apertura y cierre de canales de cloruro.

Hay básicamente tres tipos de ligandos para los sitios de modulación alostérica del RC-BZD a saber:

i) Las BZDs ansiolíticas que comportándose como reguladoras alostéricas positivas incrementan la probabilidad de los eventos resultantes de la acción del GABA (18).

ii) Los distintos derivados ansiogénicos de núcleo heterocíclico β -carbolina-3-carboxilato o también llamados moduladores alostéricos negativos que disminuyen aquella probabilidad (30).

iii) Los antagonistas que como el flumazenil o RO 15-1788 están prácticamente desprovistos de actividad intrínseca pero antagonizan la acción de moduladores alostéricos positivos y negativos. Siendo el RO 15-1788 además un antagonista puro del sitio modulador (10).

Actualmente cobró fuerza la idea de que los receptores de GABA_A también podrían ser modulados por RO 5-4864, de esta manera los RC-BZDs tendrían, además del sitio clásico de reconocimiento del tipo central, un dominio en su estructura molecular con la propiedad de reconocer ligandos benzodiazepínicos del tipo periférico.

Cabe recordar para evitar algún tipo de confusión que los sitios de

reconocimiento de RO 5-4864 a nivel del complejo receptor GABA_A/BZDs no se refieren a los receptores periféricos de BZDs (RP-BZDs) propiamente dichos.

El derivado 4'-clorodiazepam (RO 5-4864), como ya se ha visto, tiene un perfil farmacológico claramente distinto del de sus compuestos parentales análogos (sustituídos de manera diferente).

El anticonvulsivante diazepam incrementa la probabilidad de que el GABA evoque corrientes de cloruro mientras que el proconvulsivante RO 5-4864 decrece esta probabilidad.

Aunque hay una gran similitud química entre el diazepam y su derivado clorado RO 5-4864 (ver figura 2), el primero se une con una afinidad mucho más alta que el segundo al RC-BZD, sitio de reconocimiento clásico.

El RO 5-4864 desplaza a la picrotoxina mejor de lo que el diazepam lo hace, aún cuando su afinidad por este sitio es más baja que por los sitios de reconocimiento encontrados en tejidos periféricos (112).

Evidencias anatómicas electrofisiológicas y bioquímicas apoyan la hipótesis de la acción moduladora negativa del RO 5-4864 sobre los canales de Cl⁻ GABA-activados en neuronas del SNC de mamífero y ganglio ciliar (113 y 114).

La disponibilidad de clones de cDNA para varias subunidades del receptor de GABA_A y la posibilidad de expresarlo transientemente en una línea celular de riñón (línea 293) permitió el estudio de los receptores de GABA_A ensamblados de distintas maneras, es decir pudiendo reconstituir de diferentes formas los receptores BZDs modificando el tipo y la estequiometría de las subunidades constituyentes (31).

Mientras el GABA, la bicuculina y picrotoxina actúan sobre receptores formados con subunidades α_1 y β_1 , la coexpresión de estas subunidades con otra del tipo α_2 es requerida para que se exprese la modulación alostérica positiva o negativa de las BZDs o derivados β -carbolínicos sobre las corrientes de cloruro evocadas por GABA. El RO 5-4864 produce una disminución rápida y dosis dependiente de las corrientes de cloruro registradas en estos experimentos (30). El PK 11195 no es capaz de antagonizar al RO 5-4864 en estas condiciones.

El convulsivante peptídico TBPS (t-butylbicyclophosphorothionate) se une específicamente a un sitio alostérico acoplado al ionoforo de cloruro asociado al complejo del receptor GABA_A/BZDs (115).

Se demostró también que diferentes BZDs son capaces de modular la fijación de ^3H -TBPS en corteza cerebral de rata. Además se acepta en forma general que la modulación del binding de ^3H -TBPS al sitio de picrotoxina (cercano al ionoforo de cloruro) por ligandos del receptor central de BZDs, es una respuesta farmacológicamente relevante para la activación de los receptores a BZDs. Como ejemplo puede citarse que las BZDs utilizadas clínicamente como hipnosedantes o anticonvulsivantes inhiben la fijación de ^3H -TBPS, mientras que los ligandos proconvulsivantes o convulsivantes del receptor benzodiazepínico producen un efecto opuesto en la fijación. Consistentemente con sus acciones opuestas al GABA, se ve que el RO 5-4864 incrementa el binding de ^3H -TBPS en concentraciones compatibles a las observadas para el antagonismo de la función del GABA y aumenta también la potencia inhibitoria del TBPS sobre la fijación de ^3H -flunitrazepam. Contrariamente el PK 11195 inhibe la fijación de ^3H -TBPS, posiblemente actuando en el mismo sitio y consecuentemente reduce la potencia del TBPS como modulador de la

acción de BZDs centrales. El RO 15-1788 no bloquea tal función.

Investigaciones previas llevadas a cabo por Weismann y col. en 1983 habían demostrado una acción proconvulsivante para el RO 5-4864 y el PK 11195, también se habían encontrado otros efectos excitatorios sobre el SNC (103 y 116 a 120).

Es posible que exista una proporción de ionóforos de cloruro que poseyendo dominios de regulación alostérica efectuado por el RO 5-4864, constituyan entidades moleculares independientes del complejo receptor GABA_A/BZDs. Tal hipótesis es sustentada por estudios de distribución de los sitios de reconocimiento por autoradiografía (113).

Estas observaciones demostrarían la existencia de sitios regulatorios adicionales a través de los cuales la función gabaérgica podría ser modulada.

Modulación endógena de los receptores de BZDs:

Con la dilucidación del papel de las BZDs sobre la neurotransmisión gabaérgica se suscitó, con lógica, un acentuado interés por la bioquímica, fisiología y farmacología de este sistema, en virtud de que el GABA es reconocido actualmente como el neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC de mamíferos, participando aproximadamente en un tercio del total de las sinapsis existentes en el SNC.

El hecho de que las BZDs modulen la neurotransmisión actuando a nivel de un paso regulatorio y funcional de tal importancia indujo a los investigadores a trabajar intensamente en la demostración de la existencia de sustancias a las cuales se les pudiera adjudicar un papel de modulador endógeno directo, estimulados en parte por el problema a resolver de que un receptor sea reconocido por sustancias obtenidas por síntesis química en laboratorios y por lo tanto aparentemente ajenas al sistema nervioso.

Tales estudios fueron en gran medida influenciados por el descubrimiento de los neuropéptidos que reconocen endógenamente al receptor de morfina (encefalinas, endorfinas y dinorfinas). Sin embargo para el caso del receptor de BZDs, el problema por ahora parece ser de más difícil solución (121).

Muchas sustancias fueron propuestas como moduladoras naturales del receptor de BZDs, pero básicamente tres han quedado a lo largo de los años como actuales hipótesis de trabajo (122).

1) En primer lugar voy a referirme a una serie de péptidos inicialmente descrita por Costa y col. (122 y 123), que se generan a partir de un precursor denominado, con un criterio operacional, DBI (inhibidor del binding de diazepam). Esta familia de péptidos que rondan aproximadamente los 10 Kdalton de peso molecular, son también llamados genéricamente endozepinas y poseen no sólo actividades de lo más dispares sino también una localización bastante amplia.

El DBI actúa como un modulador alostérico negativo del receptor de GABA_A. Posee una masa molecular de 10 Kdalton (105 aminoácidos) y se encuentra en altas concentraciones en cerebro y en tejidos periféricos específicos de diferentes especies de mamíferos.

El DBI puede ser clivado postraduccionalmente en fragmentos biológicamente activos por acción de neuropeptidasas endógenas, y esto está perfectamente demostrado para el caso particular de cerebro.

Recientemente se han caracterizado tres neuropéptidos endógenos con estructura primaria derivada del fragmento 17-50 del DBI.

Todos contienen la secuencia 33-50 en su estructura ubicada en la región c-terminal. Estos neuropéptidos son el TTN (DBI 17-50) el cual es el más abundante, EPN (DBI 26-50) y ODN (DBI 33-50).

Estos fragmentos originados por el procesamiento de un mismo precursor parecían poseer actividades farmacológicas muy similares, por ejemplo todos inducían comportamiento conflictual cuando eran inyectados en ratas. Pero sin embargo tienen sitios intrínsecos de acción diferentes, en diferentes subtipos de receptores benzodiazepínicos (124 a 128).

2) Por otro lado se ha descrito que una β -carbolina extraíble de corteza cerebral (butil éster de β -carbolina) posee gran afinidad por los receptores centrales de BZDs y sus niveles se modifican por situaciones de stress (129 a 131).

Siendo un inhibidor muy activo de la fijación de BZDs centrales al receptor de $GABA_A$ /BZDs posee potencia nanomolar y se encuentra especialmente concentrada en membranas sinaptosomales.

No se conocen sus vías biosintéticas ni tampoco la localización neuronal exacta.

3) Por último, se ha demostrado en los últimos años la existencia de BZDs de origen natural. El origen exógeno o endógeno está en discusión, pudiendo o bien ser biosintetizadas, o ser adquiridas por medio de la dieta de la misma forma que muchas vitaminas son absorbidas (132 a 134).

Esta hipótesis por lo tanto sostiene la posibilidad de que BZDs naturales, idénticas estructuralmente a las sintéticas utilizadas como psicofármacos, tengan a cargo la función de modular endógenamente la actividad de los receptores benzodiazepínicos.

También se ha especulado en algunas oportunidades con la posibilidad de que los RC-BZDs puedan ser regulados por dos sistemas endógenos interactuantes con acciones opuestas (135).

Modulación endógena del RP-BZD:

Como hemos visto, uno de los aspectos más controvertidos con respecto a los receptores a BZDs, es la demostración de la posible existencia de ligandos endógenos para estos sitios (136 y 137). Es decir sustancias de origen natural sintetizadas para esa función específica y que sean capaces de interactuar con estos receptores modulando de este modo la función celular.

Como se vió anteriormente esto constituye un gran desafío en la completa comprensión de las propiedades funcionales de los receptores a BZDs de tipo central.

Para el caso de los RP-BZDs también se ha intentado encontrar moléculas endógenas que interactuaran con estos sitios de reconocimiento, por ejemplo desplazando la fijación de agonista.

Y el problema resulta aún mayor dado que el rol fisiológico de los RP-BZDs aún permanece sin aclarar totalmente.

En un principio se observó que al menos dos fracciones purificadas de diferentes extractos de tejidos o fluidos biológicos, poseían esta actividad. Se encontró una fracción activa de alto peso molecular (>10000) y otra de bajo (<1000). La posterior caracterización de una proteína (correspondiente a la fracción de alto PM) que se llamó antralina por hallarse en alta cantidad en el antro estomacal y además se sintetiza en muchos otros tejidos, demostró que se trataba de una fosfolipasa A2 que presentaba un efecto modulador sobre la fijación de agonista por un mecanismo aún no descrito (71 y 136).

El estudio de la fracción de bajo PM había sido realizado en ultrafiltrados de plasma y orina de humanos (138), los trabajos posteriores que caracterizaron estructuralmente a esta fracción, demostraron que algunas porfirinas extraídas y purificadas a partir

de tejidos periféricos presentaban afinidad en el rango nanomolar por estos receptores (139). Según estos autores las porfirinas relevantes fisiológicamente poseerían mayor afinidad que las no fisiológicas, los precursores o productos de degradación de aquellas (140 y 141).

Cabe destacar que tanto los pasos iniciales, como finales en la biosíntesis de porfirinas tienen lugar en la mitocondria y que los citocromos contienen también porfirinas y algunos de ellos están ubicados en la MEM e involucrados en el metabolismo de los esteroides, en concordancia con la predominante localización de los RP-BZD en esta organela.

Como ya se dijo anteriormente los derivados del DBI poseen sitios intrínsecos de acción diferentes, esto es a nivel de diferentes subtipos de receptores benzodiazepínicos.

Un derivado que fue denominado TTN (Triakontatetrapeptido) virtualmente no posee acción sobre el binding de las BZDs ansiolíticas, pero desplaza a la BZD ansiogénica y convulsivante RO 5-4864 de sus sitios específicos de unión, tanto de membranas mitocondriales como de aquellos sitios asociados a un subtipo específico de receptor de GABA_A (125).

En contraste el ODN (octadecaneuropeptido) y el EPN (eicosapentaneuropeptido) desplazan al ³H-flunitrazepam o ³H-flumazenil más potente y eficientemente que el ³H-RO 5-4864 de sus propios sitios de membranas neuronales (127).

La acción proconflictiva del TTN en ratas es bloqueada por el derivado isoquinolín-carboxamida PK 11195 posible antagonista del RO 5-4864. La acción proconflictiva de ODN y EPN sin embargo no es capaz de ser bloqueada con PK 11195 pero sí por flumazenil un antagonista benzodiazepínico central que también antagoniza los

efectos de los ésteres de β -carbolinas a nivel del receptor de GABA_A.

Al encontrarse diferentes mecanismos por medio de los cuales TTN, EPN y ODN expresan un perfil farmacológico aparentemente similar, comenzaron a estudiarse y a analizar en detalle los requerimientos estructurales primarios de las regiones N y C-terminales de estos péptidos, para poder de esta manera encontrar una relación entre la estructura y la expresión de su actividad biológica (126).

Esto permite interpretar en términos de estructura la habilidad de TTN, EPN y ODN para discriminar diferentes subtipos de sitios de reconocimiento. También se estudió su estructura secundaria.

Como queda evidenciado, se buscan activamente compuestos que modulen endógenamente al RP-BZD, pero las controversias son mayores aún que para el caso de los RC-BZD probablemente debido a que todavía los trabajos resultan preliminares y por lo tanto es un tema que aún transita por el camino de la especulación.

Regulación de los RP-BZD:

Los RP-BZD se encuentran sujetos a cambios regulatorios como resultado de tratamientos de diferente naturaleza.

La tabla 5 resume los cambios observados en diferentes tejidos, para distintas situaciones experimentales (142 a 149).

T A B L A 5 Efecto de distintos tratamientos sobre los RP-BZD:

Tratamiento	Tejido	Nº RP-BZDs (Bmax)
Adrenalectomía	riñón	↓
Hipofisectomía	testículo	↓
	glándula adrenal	↓
17-β-Estradiol (crónico)	riñón	↑
	testículo	↓
Tiroxina (crónico)	riñón	↓
	testículo	↓
	corazón	↓
Stress Shock inescapable (80 shocks)	riñón	↓
	corazón	↓
	corteza cerebral	↓
(5 shocks)	riñón	↑
Stress natación forzada	bulbo olfatorio	↑
	riñón	↑
Stress quirúrgico	riñón	↑
	corteza cerebral	↑

Tratamiento	Tejido	Nº RP-BZDs (Bmax)
Simpatectomía química (6OHDA)	hipotálamo	↑
	cuerpo estriado	↑
	ventrículo cardíaco	N.S.
	glándula pineal	↑
Reserpina (crónico)	glándula pineal	↓
	ventrículo cardíaco	↓

Puede agregarse que la administración prolongada de neurolepticos a pacientes esquizofrénicos provocó una caída en el número de RP-BZD en plaquetas (150), que en ratas espontáneamente hipertensas se encuentra modificado el Bmax con respecto al control (151 a 154), y que también varía el Bmax del ^3H -RO 5-4864 en distintos órganos de la rata durante el ciclo estral (155).

Los datos enumerados sugieren la existencia de mecanismos de regulación controlando a los RP-BZDs. Abundan ejemplos de influencias tróficas, hormonales y de situaciones fisiopatológicas como el stress quirúrgico o ablaciones de órganos que modifican los parámetros de este receptor, pero en ninguno de los casos ha sido propuesto un mecanismo que explique tales cambios.

Heterogeneidad de los RP-BZD:

La afinidad de la BZD RO 5-4864 varía marcadamente en diferentes especies y órganos (43, 156 a 158). Por citar un ejemplo, el RO 5-4864 muestra alrededor de 80 veces más potencia en su fijación al riñón de rata que al de conejo y la diferencia es de casi 100 veces si se compara cerebro y corazón de rata o de bovino.

La protoporfirina IX, un compuesto que muestra actividad inhibitoria de la fijación de ^3H -RO 5-4864 en riñón, no es capaz de desplazar a este agonista en mitocondrias de astroglía (43). Si también se tiene en cuenta que el antagonista de alta afinidad para estos sitios PK 11195, es de cinco a diez veces más efectivo en desplazar al ^3H -RO 5-4864 de corteza cerebral y cuerpo estriado que de órganos periféricos (43), no debería descartarse la posible heterogeneidad de los RP-BZD.

Esto hace necesaria una caracterización bioquímica y farmacológica más o menos exhaustiva antes de emprender cualquier estudio en un determinado tejido. El análisis de la posible heterogeneidad de los RP-BZDs es por el momento un tema parcialmente desarrollado. A tal situación contribuyeron con una relativa importancia por lo menos dos hechos; por un lado la ausencia, hasta hace muy poco tiempo, de datos estructurales concretos (ver Estructura de los RP-BZDs), y por el otro la ausencia de una descripción clara sobre la función biológica que podrían tener estos receptores.

Hoy por hoy se cuenta con información obtenida básicamente desde la bioquímica descriptiva y no necesariamente dirigida a sistemas que pueden revestir alguna importancia desde el punto de vista de la posible heterogeneidad funcional de los RP-BZD.

Relación con mensajeros celulares y iones:

No existen evidencias de que la interacción del RP-BZD con un ligando active alguna vía celular iónica o metabólica conocida.

El hecho de que algunas BZDs inhiben la fosforilación de proteínas inducida por el sistema calcio-calmodulina (21), y la ulterior descripción de que el ^3H -RO 5-4864 se une a la calmodulina, de un modo específico, saturable y reversible (aunque con baja afinidad) (159), abre algunos interrogantes acerca de los posibles mecanismos de acción de BZDs "periféricas" sobre el disparo de respuestas intracelulares. En particular sobre aquellas relacionadas con los procesos celulares que involucran la participación del calcio como mensajero celular. Debido a la importancia de la calmodulina a este nivel (ej: sobre la actividad fosfodiesterasa, adenilato ciclasa, transporte iónico a través de membranas, fosforilación de la cadena liviana de la miosina, activación de diversas quinasas y fosforilasas, rol en la liberación sináptica y otros mecanismos de secreción, además de ser blanco de muchos fármacos) (160 a 165), y el conocido papel del calcio en relación a aquella en la regulación de eventos intracelulares por diferentes mecanismos que involucran flujo de iones, segundos mensajeros etc, (74), es interesante definir si hay relación entre el sistema Ca^{2+} -calmodulina y el RP-BZD. Por otro lado, se conoce bastante bien el efecto que poseen distintos iones inorgánicos sobre la interacción de BZDs con el RC-BZD (166 a 169), sin embargo este es un punto que aún no ha sido estudiado sistemáticamente para el RP-BZD.

Los aspectos relacionados con la transducción de un mensaje celular o la influencia de determinadas interacciones iónicas en el proceso de reconocimiento entre el ligando y el receptor son temas que están en continuo desarrollo en el estudio de los RP-BZDs.

Receptor periférico de BZDs y esteroidogénesis:

Los experimentos de localización de RP-BZDs por técnicas autoradiográficas utilizando como sonda al agonista ^3H -RO 5-4864, demostraron que los tejidos esteroidogénicos contienen un abundante número de RP-BZD (48 y 53).

Si los RP-BZD cumplen un rol importante en el camino esteroidogénico, aún no está totalmente dilucidado.

La localización de los RP-BZDs en la membrana externa mitocondrial es sugerente en este sentido. En el caso de participar fisiológicamente en procesos esteroidogénicos se trataría de una ubicación estratégica en cuanto a que un paso clave en la regulación de la producción de esteroides como es el clivaje de la cadena lateral del colesterol por el citocromo P_{450} tiene lugar a este nivel y el aporte de colesterol desde la membrana externa mitocondrial hacia la membrana interna (170 y 171).

El DBI es un polipéptido de abundante ocurrencia en tejidos esteroidogénicos, es expresado en el testículo y está primariamente localizado en células de Leydig. Existe una alta inmunorreactividad para DBI en células de Leydig tumorales (línea establecida MA-10) y además fue aislada de células de la zona fasciculata de la glándula adrenal una proteína, luego identificada por secuenciación, como DBI encontrando que es capaz de estimular la esteroidogénesis en este tejido (172).

Estos datos sugieren la posibilidad de que el DBI, comportándose como un ligando endógeno, o tal vez productos de su posterior procesamiento intracelular puedan interactuar fisiológicamente con los RP-BZD mediando de esta manera la entrega de colesterol a la

mitocondria y consecuentemente estimulando la esteroidogénesis en células adrenales (173).

Estos experimentos pueden proveer datos importantes en la dilucidación de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de esteroides.

De acuerdo con esta hipótesis, los ligandos sintéticos con afinidad alta por el RP-BZD de este modo mimetizarían la acción fisiológica del/os ligandos endógenos dando cuenta de su capacidad para estimular la esteroidogénesis. De hecho estudios recientes realizados en células de la glándula adrenal (172 y 173) demuestran que ligandos del RP-BZD promueven la entrega de colesterol a la mitocondria por un mecanismo posterior al transporte de colesterol exógeno a la mitocondria.

En resumen los RP-BZD estarían implicados en la estimulación aguda de la esteroidogénesis en células adrenales de la zona glomerulosa (173 y 174), posiblemente también en la placenta (175) mediando posiblemente la entrada, distribución y/o disponibilidad de colesterol en la mitocondria.

Estos estudios sugieren que el uso de células intersticiales testiculares, como así también otros tejidos esteroidogénicos resultan sistemas muy adecuados para utilizar como modelos para el estudio de en primer lugar el posible rol biológico de los RP-BZDs y en segundo lugar el estudio de la acción de ligandos benzodiazepínicos en la esteroidogénesis testicular en particular y la modulación endócrina en general.

Benzodiazepinas y Esteroides: Posibles relaciones y papel en la comunicación celular.

Diversas razones contribuyen al interés que comienza a despertarse en el estudio de la relaciones entre las BZDs y sus receptores y los esteroides.

El mecanismo clásico por el cual las hormonas esteroidales llevan a cabo sus efectos involucra la activación de receptores intracelulares de alta afinidad que luego modulan la transcripción de determinados genes. Los esteroides también modulan la expresión génica y la síntesis de nuevas proteínas en el cerebro. Sin embargo la extremada rapidez con la cual los esteroides gonadales y adrenales ejercen sus efectos electrofisiológicos y conductuales a nivel del SNC indican que estas hormonas también actúan a través de mecanismos no genómicos (176 y 177).

Se han descrito sistemas efectores que transducen la señal generada por la interacción esteroide-membrana en cerebro, estos incluyen receptores a neurotransmisores, mecanismos de liberación de neurotransmisores y canales iónicos (178).

La interacción mejor documentada para este proceso es la modulación del complejo del receptor GABA_{A1} por metabolitos de progesterona y deoxicorticosterona A-reducidos. Concentraciones relativamente bajas de estos compuestos (10^{-9} - 10^{-6}) potencian a este nivel las acciones del GABA, es decir que poseen un efecto BZD-símil (179 a 181).

El cerebro tiene la capacidad de sintetizar esteroides (182), principalmente sus elementos gliales. Los RP-BZDs se encuentran especialmente concentrados en este tipo celular dentro del SNC. La habilidad de ciertos esteroides para facilitar o a veces inhibir la transmisión gabaérgica implica la importancia fisiológica de los esteroides cerebrales en el SNC.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo de tesis fue caracterizar bioquímica y farmacológicamente y estudiar la regulación y función de los receptores a BZDs de tipo periférico en diferentes órganos de rata.

a) Caracterización de los RP-BZDs:

1) Estudio de los parámetros de fijación específica de ^3H -RO 5-4864.

2) Influencia de diferentes iones inorgánicos y lípidos en la interacción ligando-receptor.

3) Sustancias que interaccionan o modifican las propiedades del receptor.

4) Aislamiento, purificación y caracterización de compuestos que interactúan con el receptor. Posible modulación endógena del RP-BZD.

5) El estudio de la localización subcelular de los RP-BZDs en células intersticiales testiculares y su caracterización farmacológica.

b) Regulación de los RP-BZDs:

1) Estudio de la regulación de los RP-BZDs durante una situación de stress agudo.

2) Efecto del tratamiento crónico con benzodiazepinas sobre los RP-BZDs.

3) Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre los RP-BZDs.

c) Función de los RP-BZDs:

1) Elección de un modelo experimental que permita asociar la ocupación de estos receptores con una respuesta biológica determinada y el estudio de posibles mecanismos de acción mediados por RP-BZDs en el disparo de respuestas celulares. En particular sobre la esteroidogénesis testicular.

2) Correlación entre los cambios en los RP-BZDs y la respuesta biológica esteroidogénica.

Materiales y Métodos

Mantenimiento de los animales y disección de distintos órganos de rata:

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar (240-260 g) que fueron mantenidas, en un esquema de 12 hs luz y 12 hs oscuridad, recibiendo agua y comida ad libitum. Los animales fueron en todos los casos sacrificados por decapitación con una guillotina a las 10 hs AM con el objeto de evitar variaciones circadianas en los parámetros estudiados.

Una vez sacrificados los animales, los tejidos o estructuras se removieron rápidamente. Los riñones y testículos* fueron decapsulados. Los cerebros se liberaron de sus meninges y se disecó la corteza cerebral descartándose la sustancia blanca.

*Para los experimentos realizados con testículos se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (240-260 g) con el mismo protocolo de mantenimiento de los animales.

Preparación de membranas: Método de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial,

Homogeneización del tejido:

Los tejidos periféricos (riñón, corazón, bazo o glándula harderiana) fueron cortados con una tijera en pequeños trozos sobre una caja de Petri sobre hielo granizado (4°C). Luego se homogeneizaron en 10 vol de 0,32 M sacarosa usando un homogeneizador Polytrón a velocidad 8 (4000 rpm) en dos intervalos de 30 segundos manteniendo siempre sumergido el tubo que contiene el tejido en un baño de hielo. Los otros tejidos en cambio (corteza cerebral, bulbo olfatorio, cerebelo) se homogeneizaron en un potter de vidrio con vástago de teflón a 1500 rpm en 8 pasajes completos.

Preparación de membranas mitocondriales crudas:

Para la obtención de mitocondrias crudas de riñón, corazón, corteza cerebral y bulbo olfatorio, los homogenatos fueron centrifugados inicialmente a 1000 x g por 10 min. El pellet se descarta, el sobrenadante se centrifugó a 11.500 x g por 30 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 20 vol de 25 mM Tris-HCl pH 7,3 y centrifugado nuevamente a 11.500 x g 30 min. Este lavado se efectuó dos veces más con el objeto de eliminar los restos de sacarosa que pudieran haber quedado en la preparación. El pellet final fue resuspendido en buffer y guardado a -70°C en alícuotas a conveniencia. Este procedimiento rinde una fracción mitocondrial cruda.

Testículo: Método de obtención de membranas y fraccionamiento subcelular.

Dispersión celular:

Una fracción de células intersticiales se obtuvo por dispersión con colagenasa. En estas condiciones la viabilidad celular fue mayor que 95% y el 20-25% de la células se tifen para 3- β -hidroxiesteroideshidrogenasa (criterio para la identificación de células de Leydig).

Homogeneización:

La suspensión celular obtenida como se describió anteriormente, fue homogeneizada en 10 vol de 0,32 M Sacarosa/2 mM HEPES pH 7,4 usando un homogeneizador de vidrio-teflón a 1400 rpm con 20 pasajes, manteniendo la preparación sumergida en un baño de hielo.

Preparación de membranas mitocondriales crudas:

Para la obtención de mitocondrias crudas el homogenato fue centrifugado inicialmente a 1000 x g por 10 min, el sobrenadante se centrifugó a 11.500 x g por 30 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 20 vol de 25 mM Tris-HCl pH 7,3 y centrifugado nuevamente a 11.500 x g 30 min. Este lavado se efectuó dos veces más.

Fraccionamiento subcelular:

Para la obtención de las distintas fracciones subcelulares se procedió según el procedimiento de Antkiewicz-Michaluk y col.(81). Esta técnica de fraccionamiento rinde sucesivos pellets que corresponden a fracciones altamente enriquecidas en núcleos, mitocondrias y microsomas respectivamente y un último sobrenadante citosólico.

Luego de una homogeneización del tejido en potter con vástago holgado, se centrifugó a 770 x g por 15 minutos, este primer pellet (P1) corresponde a la fracción nuclear que posteriormente fue lavada dos veces. El primer sobrenadante (S1) se centrifugó a 5200 x g por 20' rindiendo un segundo pellet y sobrenadante (P2 y S2).

El P2 se centrifugó a 11000 x g 20' y el P3 correspondió a la fracción mitocondrial enriquecida descartándose el S3.

Por otro lado el S2 se centrifugó a 25000 x g por 30' rindiendo una fracción microsomal (P4).

Ensayos hormonales:

Se midió el efecto de drogas que actúan sobre los RP-BZDs sobre la producción de esteroides in vitro, en suspensiones de células intersticiales testiculares purificadas por colagenización de testículo decapsulado (183). Para ello se resuspendieron las células en un medio 199 y se incubaron a diferentes tiempos y condiciones deseadas. La concentración de testosterona en el medio de incubación fue medida por radioinmunoensayo (98). No había reacción cruzada en el RIA en presencia de BZDs.

Por otro lado también se dosaron por RIA LH y Testosterona plasmática.

Ensayo de fijación específica de ^3H -RO 5-4864:

Las membranas preparadas como se indicó anteriormente, fueron posteriormente utilizadas en ensayos de fijación de radioligandos. Las fracciones subcelulares que correspondieran se descongelaron y luego fueron resuspendidas en buffer Tris-ClH pH 7,3, 25 mM a una concentración final de 100 μg de proteína por cada ml de volumen incubación.

Los sitios de fijación de BZDs de tipo periférico fueron medidos usando ^3H -RO 5-4864 (89,3 Ci/mmol, New England Nuclear).

Se realizaron experimentos de 2 hs a 5°C, condiciones de equilibrio para este sistema, en un volumen final de 1 ml.

La fijación no específica se midió en presencia de 10^{-6}M RO 5-4864 o PK 11195 y representó alrededor del 25% del total. Los ensayos fueron finalizados por dilución con buffer frío e inmediata filtración, utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B en una trampa de vacío adecuada y los filtros fueron posteriormente lavados 3 veces con 5 ml de buffer Tris. Por último los filtros fueron secados a 100 °C en una estufa Kotterman durante 1 h y la radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido Tracor luego de sumergir los filtros en 5 ml de solución de centelleo (PPO-Tolueno 5 g/l) y agitarlos durante 1' en viales de vidrio libres de potasio.

La eficiencia de conteo, en promedio, fue del 40%.

a) Curvas de saturación:

Se incubaron las membranas en las condiciones ya descritas, con concentraciones crecientes de droga radioactiva en un rango que va entre 0,2 y 13 nM. La concentración de proteínas en el ensayo se mantuvo constante.

Luego se construyó la curva, graficándose en abscisas la concentración de ligando libre y en la ordenada la cantidad de ligando unido al receptor.

b) Curvas de desplazamiento:

En estos experimentos también se mantuvo invariable la cantidad de proteínas en cada punto ensayado, pero la concentración de droga radioactiva en este caso es una constante, que por lo general se encuentra en el orden de la K_d ($0,5 \times K_d$), ya que debe asegurarse que el sistema no se encuentre en condiciones de saturación. La concentración de droga fría varía entre aproximadamente 10^{-10} y 10^{-3} M.

Se realizó una gráfica semilogarítmica standard dosis-respuesta, esto es: graficando el logaritmo de la concentración de la droga fría en abscisa versus el porcentaje del ligando unido en la ordenada, tomando en este último caso como referencia (100%) a la cantidad de ligando unido específicamente al receptor a la concentración de radioactivo dada.

Análisis de los resultados:

Cálculos:

Los resultados obtenidos en cpm fueron transformados a dpm teniendo en cuenta la eficiencia del conteo.

$$Ef = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \times 100$$

Luego se calcula a que número de moles (fmoles) corresponden las dpm obtenidas. Para ello se construye una curva de eficiencia de conteo con standards de actividad específica conocida contados en el mismo aparato.

$$fmol = \frac{\text{dpm}}{AE \times 2,23}$$

Por último se expresan los resultados en fmoles de droga radioactiva unida por mg de proteína y se construyen las curvas que correspondan.

Transformación de Scatchard:

La ecuación de Scatchard (273), transforma la hipérbola obtenida en las curvas de saturación en una recta.

$$\frac{B}{F} = - \frac{1}{Kd} B + \frac{Bmax}{Kd}$$

En esta ecuación B/F representa la relación entre la cantidad de ligando radioactivo unido específicamente al receptor y la concentración de ligando libre luego de la incubación. En tanto que Kd es la constante de disociación, y es inversamente proporcional a la afinidad aparente.

Experimentos de inhibición (desplazamiento):

De la ecuación de Scatchard y las condiciones de equilibrio fácilmente puede deducirse la relación entre IC₅₀ y Ki. Por definición IC₅₀ es la concentración de droga fría que desplaza el 50% de la fijación total específica.

$$Ki = \frac{IC_{50}}{1 + F/Kd}$$

Un caso especial de experimento de inhibición se da cuando el ligando no marcado es el mismo que el radioligando usado. En este caso la afinidad de las dos formas del ligando es la misma, entonces Ki es idéntica a Kd.

Criterios generales para la identificación de receptores:

A pesar de que el perfeccionamiento de las técnicas de fijación de radioligandos, en los años '70, los convirtió en ensayos relativamente fáciles de llevar a cabo, el análisis de los resultados siempre fue objeto de controversias. Por esta razón fue necesario establecer criterios que al cumplirse ayuden a la identificación de sitios receptores.

El mayor problema de interpretación en cualquier estudio de fijación es identificar al sitio que está siendo caracterizado, como un receptor propiamente dicho. La propiedad que define a un sitio de fijación como receptor es su asociación a una función determinada. Solo puede ser llamado receptor un sitio que está acoplado a una respuesta (activación o bloqueo). Por lo tanto es imposible identificarlo solo por ensayos de fijación, estas mediciones deben estar siempre correlacionadas con estudios bioquímicos, electrofisiológicos, y conductuales, preferiblemente ensayados en el mismo tejido donde ha sido hecha la caracterización por ensayo de fijación.

Algunas de las condiciones más relevantes a cumplir por estos sitios son: saturabilidad, reversibilidad de interacción, número finito y limitado de sitios calculados, distribución tisular y subcelular acorde a su función, esteroespecificidad, dependencia de la temperatura y el pH, alta afinidad en la fijación, y lo más importante de todo, su compromiso en el disparo de una respuesta determinada. En el caso de que esto se cumpla, debe existir cierta correlación entre la afinidad de la droga en la interacción in vitro con su potencia farmacológica observada in vivo.

Determinación de la concentración de proteínas por espectrofotometría:

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de Lowry (290). Esta medición da una idea de la cantidad de receptor puesta en cada ensayo, que será proporcional a la concentración de proteínas y también permite controlar la reproducibilidad de los experimentos.

Protocolo: Se colocan en todos los tubos sucesivamente los siguientes reactivos (la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente): NaOH 1N, 100 μ l, 15'. Solución de CO_3Na_2 2% + Tartrato de cobre en relación 50:1, 1 ml 10'.

Reactivo de Folin Ciocalteu (Merck) diluido al medio 100 μ l, 30'.

El volumen final de incubación es de 1 ml.

Finalizada la reacción se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro Metrolab 325, a 750 nm en cubas de vidrio o cuarzo. Se realizan blancos (solo los reactivos) y se lee contra éstos la densidad óptica de las diluciones correspondientes. Una curva standard de proteína, preparada con seroalbúmina bovina (Sigma) disuelta en agua bidestilada a una concentración de 1 mg/ml, es usada como referencia tomando como puntos de la curva 10-20-40-60-80 y 100 μ g de proteína, en duplicado, que representan 10-20-40-60-80 y 100 μ l de la solución de BSA. Paralelamente se hacen diluciones apropiadas de la preparación de membranas cuya concentración de proteínas es desconocida y se las ensaya por triplicado. La curva patrón de proteínas (BSA) se linealiza en una calculadora Hewlett-Packard HP 41 CV y con la recta resultante de la regresión lineal se obtienen los valores de las concentraciones incógnita por interpolación.

Tratamientos:

Stress agudo:

Ratas de la cepa Wistar de ambos sexos que pesaban entre 200 y 250 g fueron forzadas a nadar en grupos de 6 a 8 en una pileta de 60 x 40 x 30 cm con agua a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ como ha sido previamente descrito por Medina y col. 1983. Luego de 15 minutos, en el pico de stress, las ratas fueron decapitadas y sus cerebros, bulbos olfatorios, corazones y riñones fueron rápidamente removidos, puestos en hielo y las cortezas cerebrales fueron disecadas.

Estos tejidos posteriormente se procesaron de acuerdo a lo anteriormente citado para la obtención de las correspondientes fracciones crudas mitocondriales.

Tratamiento crónico con BZDs:

Se hicieron inyecciones de distintas BZDs, Diazepam (3 mg/Kg), RO 5-4864 (3 mg/Kg), Clonazepam (3 mg/Kg) y Flunitrazepam (3 mg/Kg), u otros compuestos de interés para nuestro modelo de estudio, durante un cierto tiempo dependiendo del protocolo experimental. Al día siguiente a la última inyección se sacrificaron los animales con guillotina y se removieron los órganos para efectuar el ensayo bioquímico.

Tratamiento con BC-PS y in vivo:

Ratas adultas de la cepa Wistar que pesaban entre 180-200 g fueron usadas para los experimentos in vivo.

Con Fosfatidilserina (BC-PS) de cerebro bovino (Fidia Research Laboratories) se produjeron liposomas suspendiendo 10 mg de los fosfolípidos en 2 ml de buffer 50 mM Tris HCl, pH 7.5, bajo atmósfera de N₂ para evitar su oxidación. La suspensión fue mezclada en un vortex y luego sonicada en un sonicador de inmersión Kerry por 8 minutos. Con este tratamiento la suspensión lechosa se vuelve transparente siendo indicativo de la correspondiente formación de los liposomas.

Las ratas se dividieron al azar en tres grupos: las ratas del grupo 1 fueron usadas como controles y recibían diariamente inyecciones intraperitoneales (i.p) de 0.5 ml de salina por 5 días.

Las ratas del grupo 2 se inyectaron i.p. con liposomas de BC-PS (15 mg/kg/día). Al sexto día las ratas fueron sacrificadas.

Después de la decapitación los cerebros fueron rápidamente removidos, puestos sobre hielo y las cortezas cerebrales y cerebelos disecados. Estas estructuras se procesaron según se explicó anteriormente para los ensayos de fijación.

Aislamiento y purificación de moduladores endógenos del RP-BZD:

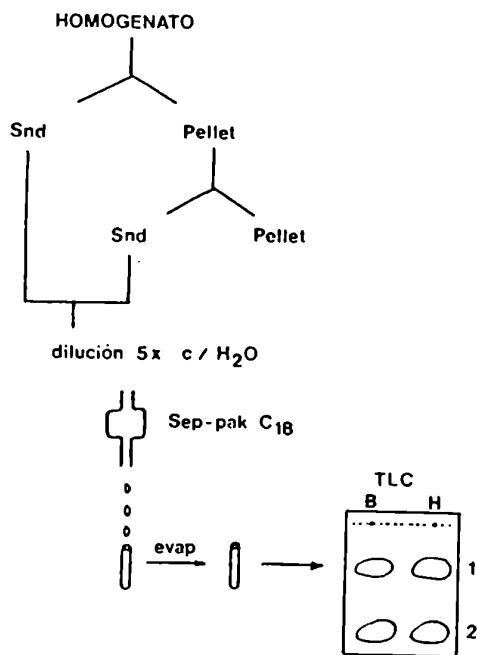
Se realizaron extracciones de tejidos de ratas previamente perfundidos, los extractos obtenidos se sometieron a distintos pasos de purificación y luego fueron testeados en su habilidad para interactuar con RP-BZDs.

La figura 4 muestra el protocolo de extracción y purificación parcial de las fracciones activas en el desplazamiento de la fijación específica del agonista marcado ^3H -RO 5-4864. Bazo y Glándula Harderiana de ratas fueron elegidos como fuente de compuestos activos debido principalmente a reportes anteriores y a su alto contenido en porfirinas. Los mismos fueron homogeneizados con un homogeneizador del tipo Polytrón durante 30" en 10 vol de MeOH/1M HCl 95:5 como solvente de extracción. Luego se realizó una purificación parcial de los sobrenadantes que resultan de dos centrifugaciones (ver figura) y una dilución por cinco en H_2O , en minicolumnas Sep-pak C_{18} Waters Millipore, utilizando como solvente de elución acetonitrilo (ACN)/ H_2O en porcentaje creciente de ACN (10-100%). La fracción retenida en el cartridge C_{18} fue eluida con MeOH / H^+ , luego evaporada en un Speed Vac concentrator Savant a 10°C , y finalmente sembrada y cromatografiada en una placa delgada (TLC) en silicagel utilizando como solvente de corrida una mezcla de composición lutidina/ H_2O 10:3. De aquí fueron recogidas dos fracciones de diferente movilidad (1 y 2) y con ellas se realizaron los ensayos de desplazamiento e inhibición.

Las fracciones que poseían actividad de desplazamiento fueron posteriormente sometidas a un segundo paso de purificación por cromatografía de capa delgada, en silicagel usando como solvente de corrida cloroformo/metanol 1:1, y se compararon los Rfs con standards de porfirinas comerciales.

Finalmente se testearon las fracciones en su habilidad para competir con el agonista marcado de alta afinidad, en un ensayo de desplazamiento del radioligando.

Fig 4



Análisis de los datos y Estadística:

Se calculó la media, error standard y varianza de los parámetros analizados, y cuando fue necesario verificar si existían diferencias entre grupos controles y tratados se utilizó un test "t" de Student para la diferencia de medias observándose si las diferencias encontradas eran significativas.

Los resultados de los experimentos de fijación de radioligandos fueron analizados utilizando un programa de ajuste por cuadrados mínimos no lineal llamado EBDA, para un único tipo de sitio de fijación, cuya teoría ha sido revisada en detalle por Munson y Rodbard 1980 y adaptado a una computadora IBM-PC (184 y 185). La significación estadística se determinó por un test de t.

Resultados

Caracterización de los receptores periféricos

de Benzodiazepinas

a) Caracterización de los RP-BZDs:

1) Estudio de los parámetros de fijación específica de ^3H -RO 5-4864:

Como paso previo al estudio de diversos aspectos de la regulación de los receptores a BZDs de tipo periférico se procedió a caracterizar a estos sitios por técnicas de fijación de radioligandos a membranas de diferentes tejidos, utilizando el agonista marcado ^3H -RO 5-4864. Como resultado de estos experimentos en todos los tejidos estudiados se obtuvo una población homogénea y finita de sitios de fijación saturables y que mostraban una interacción de carácter reversible, pues se podía desplazar en presencia de RO 5-4864 y PK 11195. En forma general se encontró que los parámetros de afinidad y densidad de sitios de fijación estaban de acuerdo con la bibliografía existente.

A modo de ejemplo se muestra en la figura 5 un experimento típico realizado en membranas de riñón de rata, en donde el número de sitios receptores calculado como el B_{max} y la afinidad aparente de tales sitios, K_d , fueron de 9.3 pmol/mg prot y 4 nM respectivamente. La figura 6 muestra el perfil de desplazamiento encontrado en estas condiciones, utilizando diferentes BZDs, pudiendo verse que presentan un rango variado de potencia farmacológica.

IC_{50} : RO= 4.00 nM, PK= 4.34 nM, DZ= 42 nM, FNZ= 270 nM y CLO= > 1 mM.

La caracterización de estos parámetros en otros tejidos será presentado oportunamente en distintos ítems de la presente tesis.

Fig 5

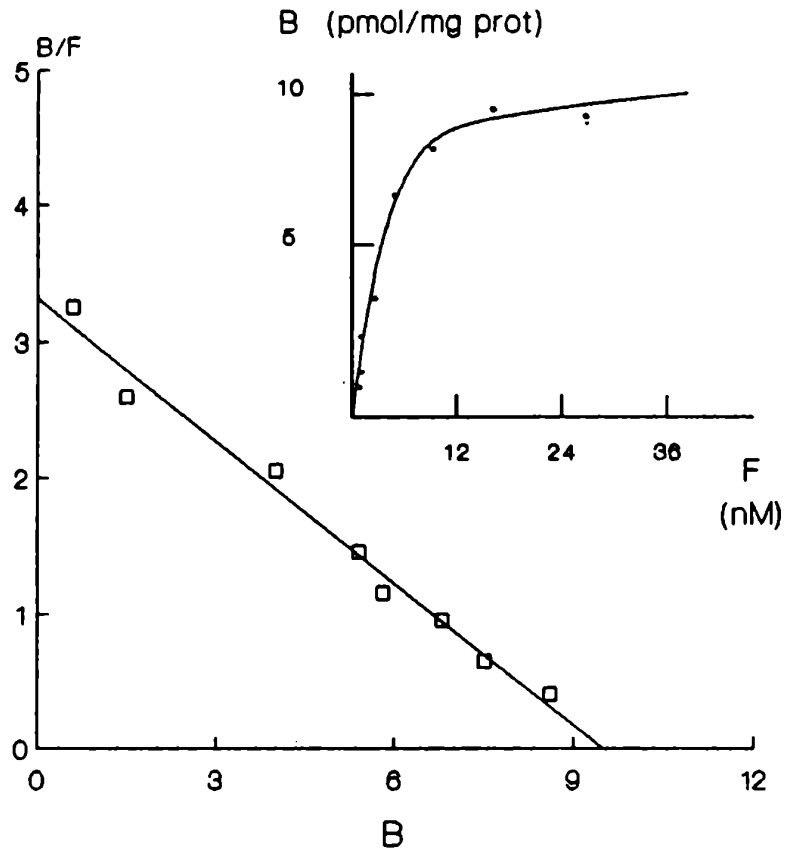
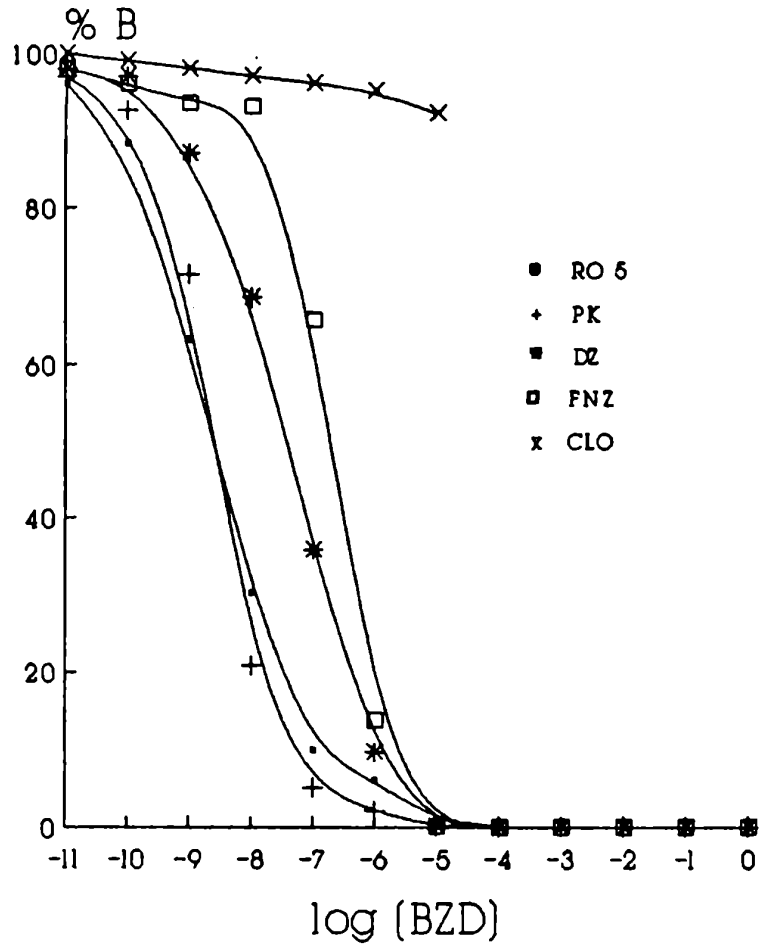


Fig 6



2) Influencia de iones inorgánicos y lípidos en la interacción ligando-receptor:

Han sido descritos diferentes tipos de modulación por iones inorgánicos en las interacciones ligando-receptor.

Esta regulación iónica en muchos casos puede ser importante para las acciones de neurotransmisores, hormonas y fármacos. Por ejemplo los aniones tienen efecto sobre las propiedades de reconocimiento en el receptor de glicina y de GABA, y algunos cationes son importantes para el caso de receptores a opiáceos y aminas biógenas (166 a 169 y 186 y 187).

Los receptores a BZDs de tipo central también son influenciados por iones. Diferentes aniones estimulan la fijación de agonista con eficacias disímiles y además son importantes en la actividad potenciadora alostérica de las BZDs sobre la neurotransmisión GABAérgica. Algunos cationes divalentes, como el Ca^{2+} muestran el mismo efecto y poseen sitios independientes (propios) de reconocimiento. Se sugiere la acción del K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y algunos otros cationes divalentes como agentes reguladores de este tipo con diferentes características y eficacias en su acción (cita). En vista de la vasta diversidad estructural encontrada para los RC-BZDs se hace evidente que tal modulación puede variar dependiendo del subtipo de receptor.

Contrariamente al RC-BZD el RP-BZD no es modulable por Cl^- (39), y otros iones inorgánicos como F^- , SO_4^{2-} y K^+ no tienen efecto sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864.

En el presente trabajo se analizó el efecto del calcio y otros cationes divalentes como manganeso, cobalto y magnesio, sobre la interacción del RO 5-4864 con el RP-BZD.

Además al formar parte de la membrana celular y en algunos casos constituir un microambiente, muchas veces los lípidos son importantes para la función normal de la proteína receptora, fundamentalmente debido a su ubicación en íntima relación con ella. Por otra parte, la activación celular posterior a la ocupación de receptores de membrana, en muchos casos puede estar asociada con reacciones metabólicas donde los fosfolípidos se encuentran involucrados pudiendo desencadenar fenómenos de señalización intracelular.

Es decir, tenemos por un lado diversos fosfolípidos que, fundamentalmente por su ubicación en la membrana, son importantes para el receptor desde un punto de vista exclusivamente estructural. En cambio otros originándose por pasos metabólico-regulatorios desempeñan funciones de otro tipo, que pueden tener relevancia fisiológica por ejemplo modulando la función de receptores u otras proteínas debido a fenómenos de señalización química intracelular. Por todo ello se analizó el efecto de algunos lípidos sobre los RP-BZDs.

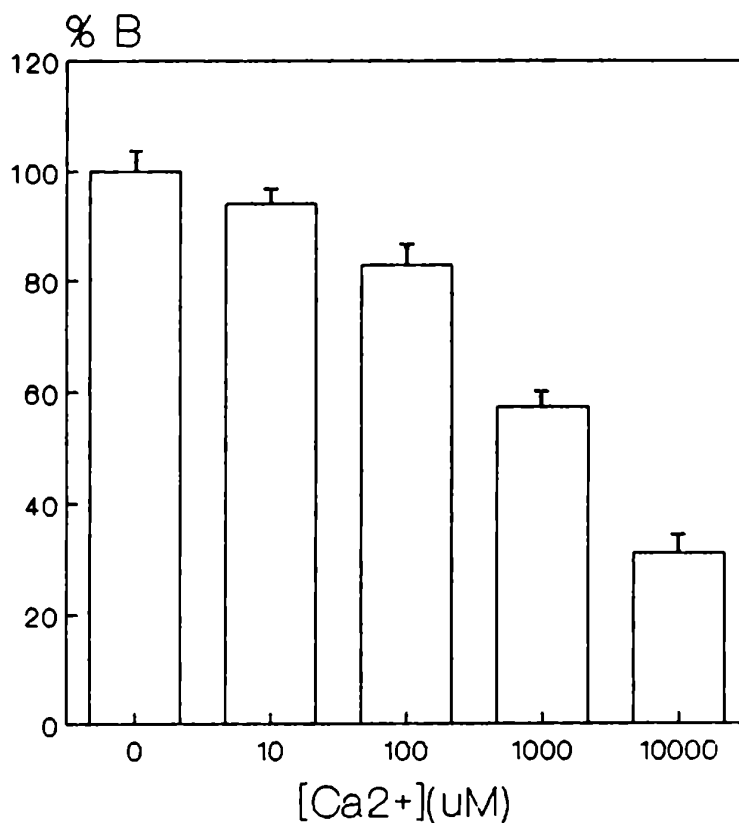
Resultados:

a) Interacción iónica:

La figura 7 muestra el efecto del Ca^{2+} sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 (0.6 nM) a membranas de una fracción mitocondrial cruda de riñón de rata. Las barras indican el porcentaje de unión con respecto al control, para concentraciones crecientes de CaCl_2 , en membranas preincubadas a 37°C durante 30 minutos. Los porcentajes de inhibición fueron respectivamente:

%I: Ca^{2+} 10 μM = $5,83 \pm 2,19$ % (n=11), Ca^{2+} 100 μM = $17,125 \pm 3,95$ % (n=8), Ca^{2+} 1mM = $42,72 \pm 1,87$ % (n=11), Ca^{2+} 10mM = $69,0 \pm 4,88$ % (n=4).

fig 7



Para que tenga lugar una disminución en la fijación del agonista, fue imprescindible la preincubación a 37°C ya que los experimentos realizados sin este tratamiento no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles que habían sido llevados a cabo en ausencia de la sal, la preincubación fue realizada en todos los casos durante 30 min debido a que a este tiempo se alcanzaba un plateau de inhibición.

En la figura 8 se puede ver que el quelante de Ca^{2+} , EGTA (1 mM) previene dicha caída.

En la figura 9 puede verse el efecto de diferentes cationes divalentes sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 (0.6 nM) a una fracción de membranas mitocondriales crudas de riñón de rata previamente incubada a 37°C por 30 min en presencia y ausencia de cationes divalentes en una concentración de 1 mM.

Los porcentajes de caída en la fijación específica de ^3H -RO 5-4864 con respecto al control para los diferentes iones fueron:

%I: Ca^{2+} = 42.72 ± 1.87 % (n=11), Mg^{2+} = 8.498 ± 4.46 % (n=5), Ba^{2+} = 19 ± 3.21 % (n=5), Cd^{2+} = 26.716 ± 8.00 % (n=5) y Co^{2+} = 31.09 ± 7.23 % (n=5).

Las barras indican el porcentaje de unión con respecto al control. Los experimentos realizados sin preincubación resultan en todos los casos idénticos al control.

Fig 8

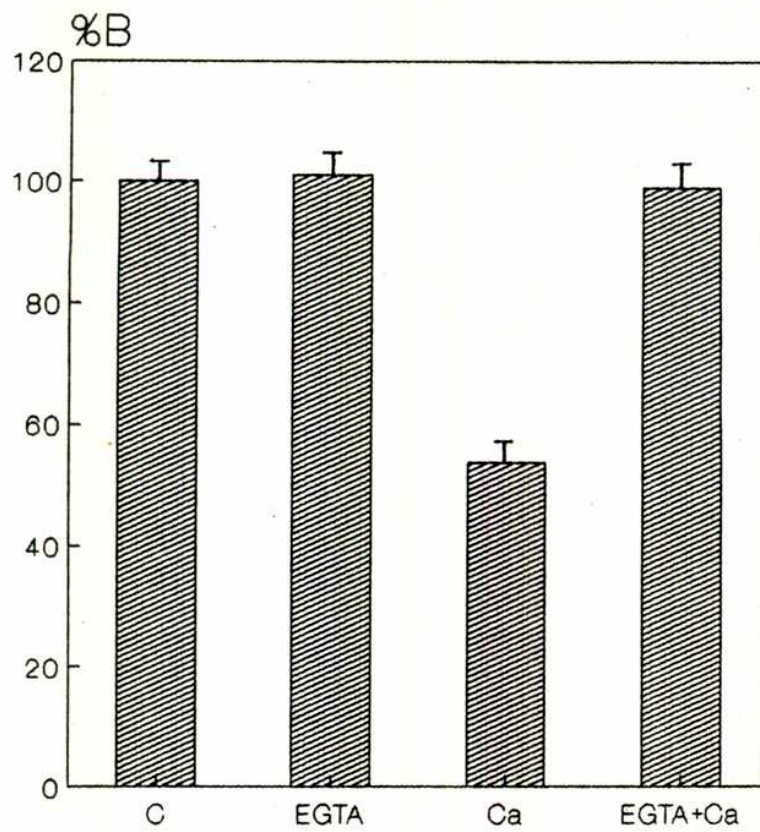
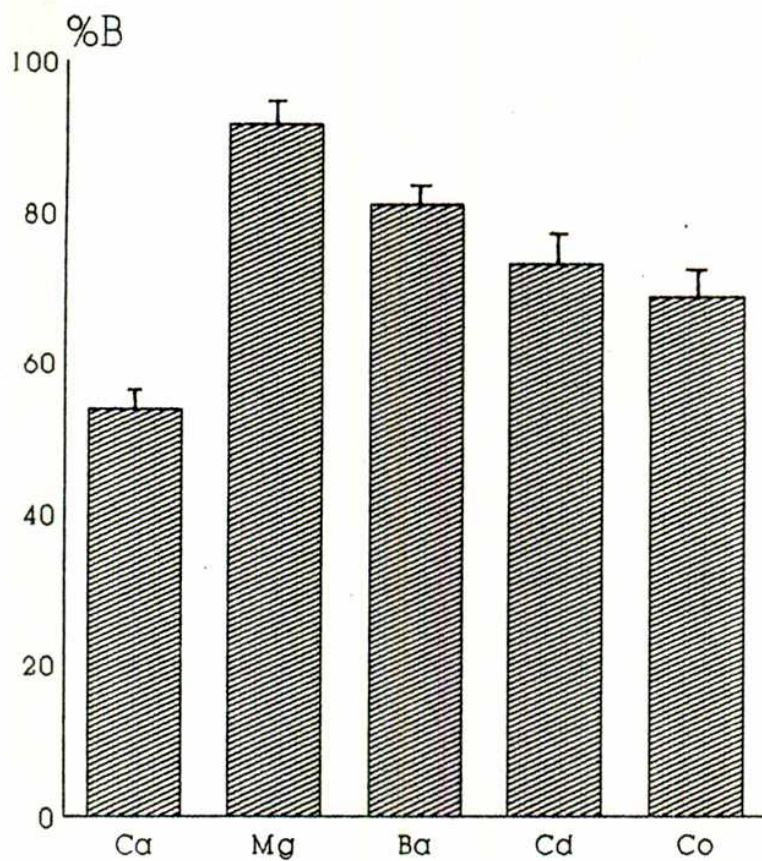


Fig 9

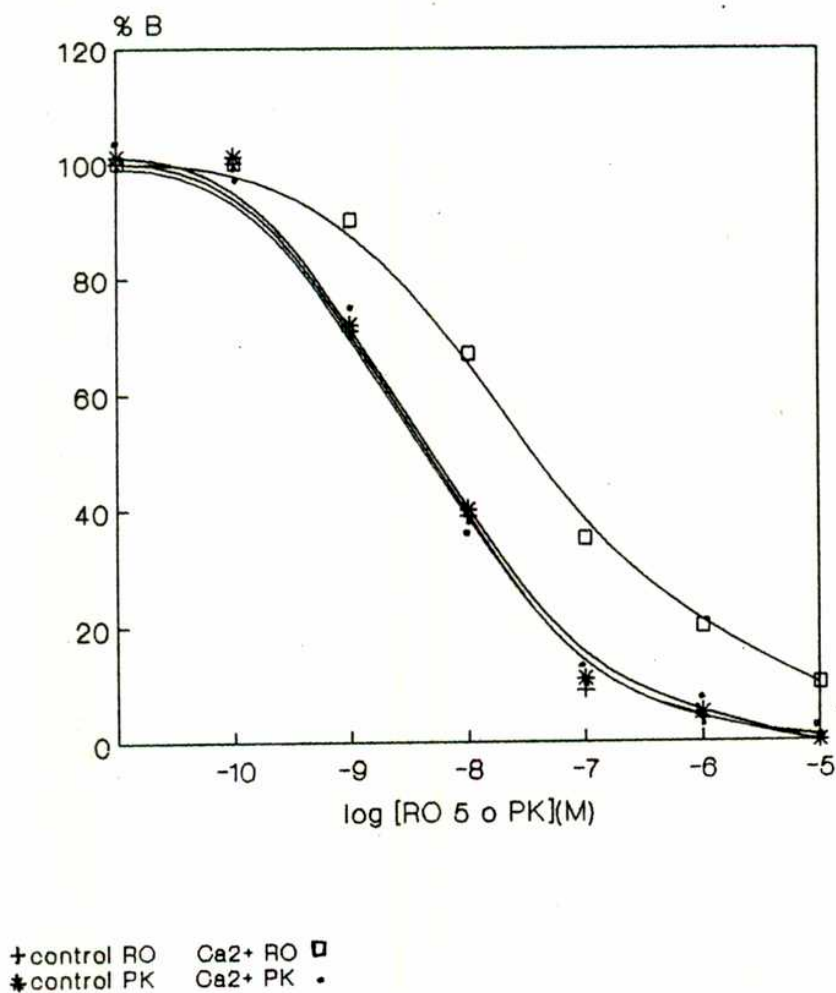


cationes divalentes 1 mM

Para caracterizar el tipo de interacción observada en presencia de Ca^{2+} se realizaron curvas de desplazamiento (Figura 10) de ^3H -RO 5-4864 (0.6 nM). Los compuestos utilizados para competir por la unión del agonista marcado fueron RO 5-4864 y PK 11195.

Los experimentos fueron llevados a cabo en presencia y ausencia de una concentración 1 mM CaCl_2 . Cada punto de la curva representa el promedio de cinco ensayos. Cabe recordar que aniones como Cl^- y SO_4^{2-} no tienen efecto sobre la fijación.

Fig 10



De la figura 10 puede establecerse que la inhibición observada en presencia de Ca^{2+} se debe a un cambio en la afinidad del RP-BZD por el agonista RO 5-4864, mientras que permanece sin cambios la afinidad por el antagonista PK 11195.

IC_{50} control RO 5: 3nM vs. IC_{50} Ca^{2+} RO 5: 40nM.

La tabla 6 muestra los resultados del análisis de Scatchard de las curvas de saturación de ^3H -RO 5-4864 en presencia y ausencia de Ca^{2+} 1 mM en donde se evidencia el cambio de la afinidad aparente de los RP-BZDs como resultado de la preincubación.

T A B L A 6:

	Control	Ca 1 mM
Bmax (fmol/mg)	7280 ± 860	7588 ± 978
Kd (nM)	4.88 ± 0.55	7.07 ± 1.00

(n=4)

En la figura 11 puede verse el efecto de la calmodulina (CaM) sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 (0.6 nM) a membranas mitocondriales crudas de riñón de rata. Las barras indican el porcentaje de unión con respecto al control, sin CaM.

Los experimentos se realizaron preincubando las membranas por 30 min a 37°C solo con CaM (0.6 μM) o CaM en presencia de Ca^{2+} 100 μM o 1 mM.

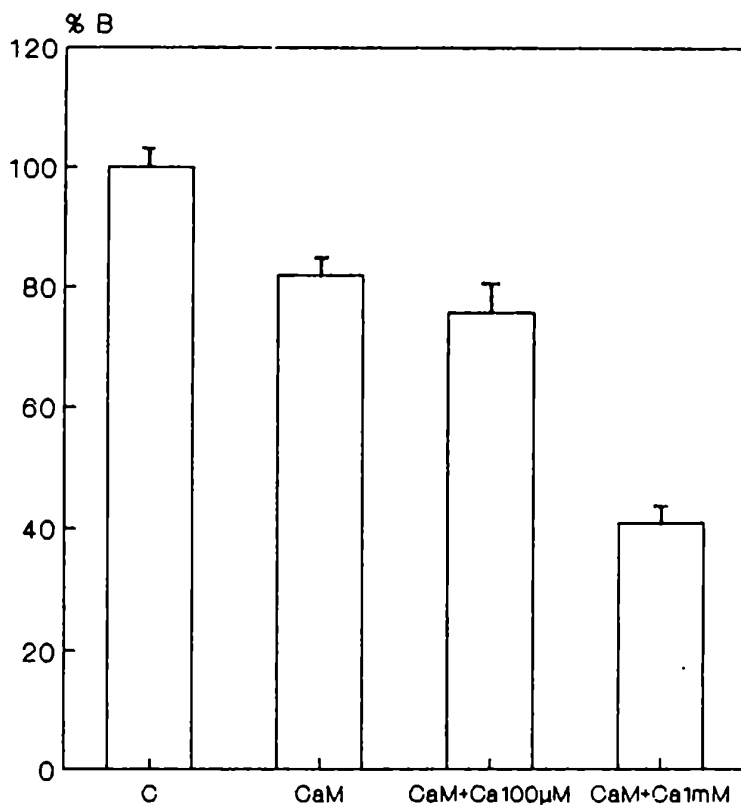
Los porcentajes de inhibición fueron:

%I: CaM= 18.20 ± 3.72 (n=5), CaM+ Ca^{2+} 100 μM = 24.33 ± 8.13 (n=6) y CaM+ Ca^{2+} 1mM= 59.20 ± 4.21 (n=5).

El bloqueante de iones K^+ tetraetilamonio (TEA= 20%) no tiene actividad inhibitoria sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864.

%I: 3.5 ± 0.24 % (n=3).

Fig 11



Conclusiones:

Sobre los experimentos de interacción iónica puede concluirse que el Ca^{2+} disminuye la fijación del agonista ^3H -RO 5-4864 al RP-BZD. Este efecto depende de la temperatura, del tiempo de preincubación y de la concentración de CaCl_2 presente en el ensayo. La inhibición se debe a una caída de la afinidad por el receptor y se previene incubando con EGTA. La afinidad del antagonista PK 11195 no es afectada por el mismo tratamiento.

Otros cationes divalentes muestran un comportamiento similar que el Ca^{2+} , tal es el caso del Co^{2+} y el Cd^{2+} , en tanto que Mg^{2+} y Ba^{2+} no parecen afectar la fijación de ^3H -RO 5-4864.

No es posible por el momento proponer mecanismos por los cuales estos cationes producen dichos efectos. Tampoco es posible correlacionar estos resultados en base a las propiedades farmacológicas conocidas de diferentes canales de calcio. Sin embargo puede afirmarse que los RP-BZDs difieren marcadamente en este aspecto con respecto a los RC-BZDs (la modulación de su actividad por iones es un tema que fue minuciosamente estudiado en este tipo de receptor). En los RC-BZDs el CaCl_2 provoca un aumento de la fijación del agonista ^3H -FNZ siendo a la vez este efecto independiente de la preincubación.

El hecho de que para los RP-BZDs la omisión de la preincubación no permite obtener inhibición significativa puede sugerir un posible paso enzimático mediando el efecto observado.

El efecto inhibitorio de CaM parece ser de naturaleza independiente de aquel observado en la preincubación con Ca^{2+} ya que muestran aditividad.

La demostración de que el ^3H -RO 5-4864 se une a la CaM (159) podría hacer sostener que en realidad la inhibición de CaM de la fijación

de ^3H -RO 5-4864 se debe a una competencia de CaM con el RP-BZD. La baja afinidad de la CaM por el ^3H -RO 5-4864 (644 nM) y la baja concentración de CaM utilizada en nuestros ensayos nos hacen creer en la existencia de un mecanismo distinto involucrado. En el caso de la CaM, como antes para el Ca^{2+} , es necesaria la preincubación de las membranas para observar la inhibición. También aquí entonces puede sugerirse algún paso de naturaleza enzimática mediando la interacción.

Las curvas de saturación de ^3H -RO 5-4864 en presencia y ausencia de 1mM Ca^{2+} analizadas por Scatchard sugieren que este catión provoca una disminución en la afinidad aparente para el agonista, y las curvas de desplazamiento de la fijación de ^3H -RO 5-4864 revelan además de la disminución de la afinidad para el el agonista RO 5-4864, que no ocurren cambios de afinidad para el antagonista PK 11195.

En conclusión el Ca^{2+} produce una disminución, concentración y temperatura dependiente, de la afinidad de los agonistas del RP-BZD.

b) Interacción con lípidos:

Los receptores son proteínas intrínsecas de membrana embebidas en una matriz fosfolipídica. Este ambiente lipídico se asume que es importante para la regulación de la interacción ligando-receptor; esto es, los eventos moleculares iniciados por el neurotransmisor o la hormona pueden ser sensible a la composición lipídica de la membrana.

Cuando se inyectan fosfolípidos (PLs) en forma de liposomas a animales, pueden ejercer una acción directa sobre las proteínas receptoras u originar derivados de vida media corta llamados endocoides (188) que poseen poderosas acciones farmacológicas.

De los varios fosfolípidos presentes en las membranas, aquellos que están negativamente cargados como los fosfolípidos de serina o inositol, pueden jugar un rol importante en la producción de endocoides a través de la acción de fosfolipasas.

Los efectos farmacológicos de la fosfatidilserina (PS) han sido ampliamente descritos por Bruni y col.(189). Este PL se encuentra normalmente en la cara interna de la membrana plasmática en una posición oculta; sin embargo, si se expone a la hemimembrana externa puede hacerse activo produciendo lisoderivados por acción de la fosfolipasa A_2 . Este derivado llamado liso PS es soluble y puede ser muy activo transmitiendo señales a células blanco:

El presente estudio intentó estudiar la acción de PS extraída de corteza cerebral bovina sobre los RP-BZDs después de una administración crónica por inyecciones en forma de liposomas.

Cuando estos PLs ácidos son inyectados en ratas producen muchos cambios en el metabolismo del SNC y en el comportamiento del animal. Está demostrado que la PS incrementa el recambio de noradrenalina en el hipotálamo (190) y la liberación de acetilcolina en corteza

cerebral (191), antagoniza los efectos de escopolamina sobre la actividad electroencefalográfica (192), revierte los efectos amnésicos causados por escopolamina, etc. Muchos de estos efectos pueden ser debidos a cambios en la regulación de los receptores a neurotransmisores; al presente sin embargo, estos estudios se hayan en etapa experimental in vitro e in vivo.

Por otra parte es conocido el efecto del colesterol sobre la fluidez de las membranas biológicas y su consabida acción sobre la función de proteínas integrales, y en particular los receptores. Además, debido al probable papel de los RP-BZD en el aporte de colesterol a las enzimas mitocondriales (172) decidimos estudiar el efecto del mismo sobre el reconocimiento del agonista RO 5-4864 en el RP-BZD. También se estudio el efecto del ácido araquidónico sobre los RP-BZD en virtud de su presencia en fenómenos regulatorios de eventos que involucran receptores y mensajes químicos celulares (193).

Resultados:

La inyección de PS produjo cambios significativos en la fijación de ^3H -Flunitrazepam (8 nM), agonista benzodiazepínico central en corteza cerebral, y no se observaron cambios en el cerebelo.

Corteza cerebral= control: 1078 ± 36 fmol/mg prot, PS: 1414 ± 75 fmol/mg prot; Cerebelo= control: 472 ± 34 fmol/mg prot, PS: 483 ± 55 fmol/mg prot (n=12).

El análisis de Scatchard de las curvas de saturación (^3H -Flu: 0.6-8 nM) reveló un incremento en la Bmax del 58% en los animales tratados.

El efecto de la PS es específico para los RC-BZD ya que la fijación de ^3H -RO 5-4864 a membranas mitocondriales no muestra diferencias por el tratamiento ni en corteza cerebral, ni en cerebelo.

Corteza cerebral= control: 0.92 ± 0.13 fmol/mg prot, PS: 0.98 ± 0.09 fmol/mg prot; Cerebelo= control: 0.427 ± 0.024 fmol/mg prot, PS: 0.433 ± 0.021 fmol/mg prot (n= 5).

Por otra parte se realizaron experimentos de fijación de ^3H -RO 5-4864 en presencia de colesterol. Los resultados de los mismos muestran una leve tendencia inhibitoria solo a altas concentraciones.

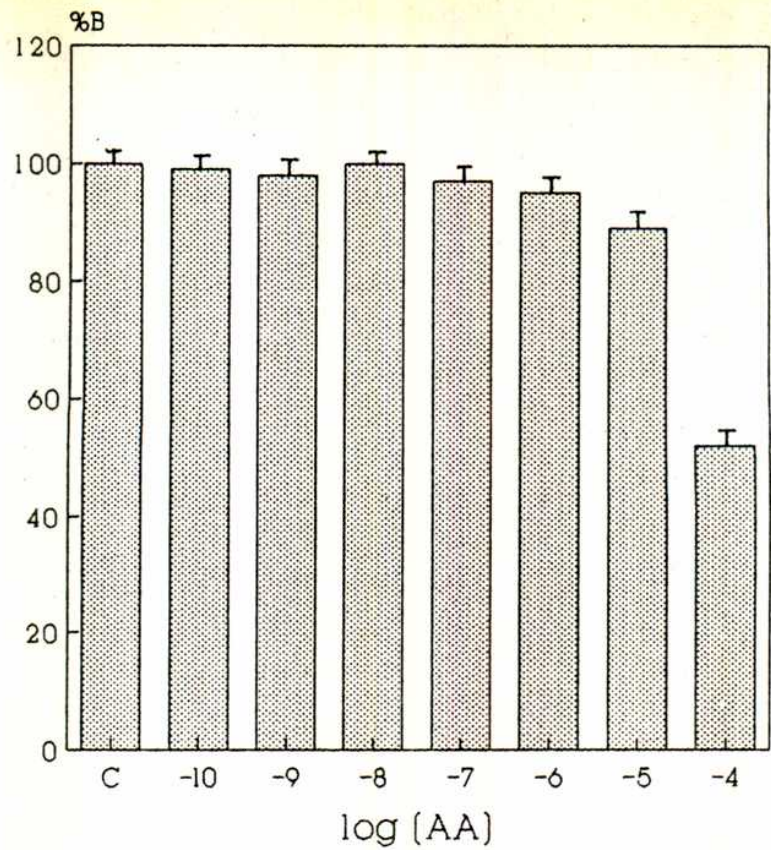
Colesterol= 10^{-6}M : 0%, 10^{-5}M : 3%, 10^{-4} : 20.3%.

La figura 12 muestra el efecto del ácido araquidónico sobre la fijación del agonista periférico ^3H -RO 5-4864.

Los RP-BZD no son sensibles a las bajas concentraciones encontrándose una caída significativa en la fijación de ligando a AA: 10^{-4}M de aproximadamente el 50%.

La tabla 7 resume los resultados del estudio de los parámetros de fijación del RP-BZD en presencia y ausencia de AA 10^{-4}M demostrando que tal inhibición es por causa de una disminución de la afinidad por el radioligando.

Fig 12



T A B L A 7 :

	control	AA 10 ⁻⁴ M	
Bmax	5.42 ± 1.07	4.68 ± 1.13	(pmol/mgπ)
Kd	2.22	4.78	(nM)

(n=8)

Conclusiones:

Es conocida la importancia de los PLs de las biomembranas en la neurotransmisión y fenómenos de membrana tales como el mantenimiento de los gradientes iónicos, conducción eléctrica, almacenado liberación y uptake de neurotransmisores, exposición de receptores y acoplamiento a sistemas de segundos mensajeros.

Un gran número de evidencias experimentales sugieren que PS muestra una variedad de propiedades regulatorias de membrana y algunas de ellas pueden ser beneficiosas desde el punto de vista terapéutico como por ejemplo en el envejecimiento celular. La fosfatidilserina (PS), un fosfolípido aniónico abundante en células eucariotes, es también un precursor de compuestos moduladores de membrana. PS rinde un lisoderivado activo capaz de atravesar las membranas celulares con mayor facilidad que la PS en liposomas. Liso PS, el derivado deacilado de PS, también muestra como la PS alta actividad farmacológica cuando es administrado por inyección en ratones o ratas. Estas propiedades se cree que es la razón principal para la alta distribución de PS en membranas celulares de los organismos. Diferentes proporciones de PS se encontraron en distintos tejidos. Dado que PS es constituyente de la mielina se encuentra en cantidad en el tejido nervioso.

La PS y liso PS modulan la fijación de ligandos benzodiazepínicos centrales al receptor de GABA/BZDs. Alteraciones de la conformación tridimensional y de la movilidad lateral en la bicapa fosfolipídica podrían ser responsables de tales modificaciones. (194 a 196). Por el contrario los RP-BZDs se muestran insensibles al tratamiento con PS a la misma dosis.

Por otra parte los derivados de la acción de la fosfolipasa C como el ácido araquidónico regulan la interacción ligando RP-BZD por un mecanismo no conocido. Una disminución significativa de la afinidad por el agonista pudo observarse en estos ensayos.

El colesterol a diferencia de otros compuestos de naturaleza lipídica como los ácidos grasos, o alcoholes de otro tipo como los alifáticos, que ha sido demostrado inhiben con distinta eficacia la fijación de ^3H -RO 5-4864 (197), no afecta significativamente las propiedades de interacción de los RP-BZDs. Estos resultados son coherentes con las evidencias previas debido a que existe una gran correlación entre la potencia inhibitoria de los lípidos y el grado de insaturaciones, y es sabido que el grado de insaturación lipídica tiende a incrementar la fluidez de membrana, mientras que el colesterol posee un efecto opuesto sobre las propiedades de membrana.

3) Sustancias que interaccionan o modifican las propiedades del RP-BZD:

Como se ha visto, los receptores a hormonas y neurotransmisores en general, y los receptores a benzodiazepinas en forma particular pueden ser influenciados en su funcionamiento por diferentes drogas. En muchos casos por este motivo se los ha elegido como blanco para el estudio de los mecanismos de acción de diversos compuestos. Una vasta lista de compuestos químicos han sido utilizados para estudiar el efecto que poseen sobre los RC-BZDs.

Como muestra la figura 2 de la introducción, compuestos de diversa naturaleza química muestran efectos distintos sobre la funcionalidad del complejo receptor de GABA/BZDs. Las diferencias estructurales a lo largo de la serie de compuestos confieren propiedades diversas de modulación alostérica en la macromolécula receptora.

En los RP-BZDs no se ha realizado un análisis tan detallado de la acción de diferentes drogas no solo por su descubrimiento más reciente sino también por el desconocimiento de su estructura molecular y además por no estar íntimamente aclarada la respuesta biológica mediada por los mismos (temas que está siendo analizados actualmente en diferentes laboratorios).

De todas maneras fueron descriptos efectos de algunas drogas sobre los RP-BZDs en distintos modelos experimentales encontrándose incluso algunas que modulaban los parámetros de fijación del agonista marcado ^3H -RO 5-4864 como es el caso de la lidocaína, insecticidas piretroides, octanoato de sodio, fenol, DIDS, nifedipina, etc. (198 a 202).

Debido a lo anteriormente citado uno de los aspectos encarados en este trabajo de tesis se relaciona con el análisis de la posible

regulación de los sitios de reconocimiento de BZDs periféricas por drogas, fármacos u otras sustancias que revisten algún tipo de interés farmacológico.

a) Influencia del Etanol sobre las propiedades del RP-BZD:

El etanol (EtOH) es el agente psicoactivo más antiguo y más comunmente usado. Se ha descrito que el EtOH comparte muchos de los efectos farmacológicos de las BZDs a nivel central y son campo de un intenso estudio sus mecanismos de acción en relación a estas drogas (203 a 209).

Se sabe que el EtOH, como las BZDs y los barbitúricos, potencia la neurotransmisión GABAérgica por aumento en el flujo de Cl^- a través del complejo receptor de GABA-BZDs pero no está claro su efecto a nivel de receptores de BZDs de tipo periférico.

Este complejo receptor provee a la aproximación reduccionista de un sistema más o menos "simple" para el estudio de similitudes y diferencias en las acciones de estas drogas con efectos sobre el sistema nervioso.

Las acciones de BZDs y barbitúricos han sido estudiadas extensamente durante la década pasada tal cual hemos visto, pero los estudios relacionados con las acciones del etanol sobre el sistema nervioso en general y sobre los receptores benzodiazepínicos en particular son mucho más recientes y menos numerosos y el mecanismo preciso por el cual el etanol lleva a cabo sus acciones sobre estos receptores es un tema que todavía permanece en gran parte sin aclarar.

Un motivo por el cual las descripciones de las acciones del etanol a nivel de los RC-BZDs en muchos casos no han sido coincidentes puede ser la heterogeneidad observada para los receptores de GABA/BZD; de esta manera, isoformas del receptor que serían sensibles al etanol

coexistirían con otras insensibles contribuyendo entonces a enmascarar la respuesta medida (209 a 212).

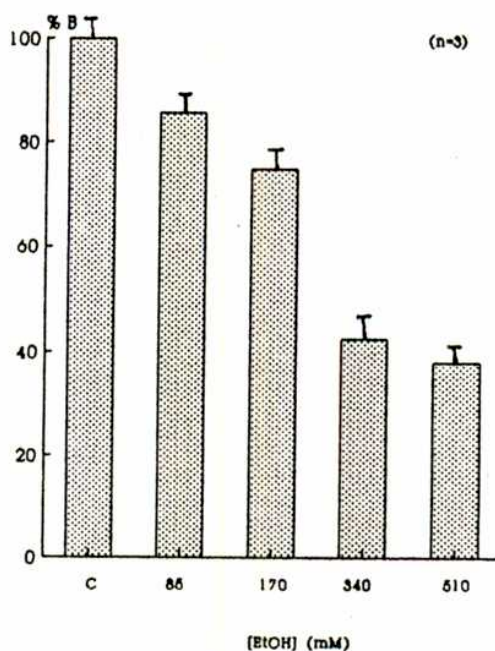
Debido al desconocimiento del efecto del etanol sobre los RP-BZDs se han realizado una serie de experimentos en este sentido estudiando la acción del EtOH in vitro en distintos tejidos.

Resultados:

La figura 13 muestra el efecto de la concentración de EtOH sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 a membranas de riñón de rata (IC_{50} aproximadamente 230 mM).

En la figura 14 puede apreciarse el mismo perfil, pero en membranas de corteza cerebral (IC_{50} = 620 mM).

Fig 13



El gráfico de Scatchard de la figura 15 muestra el efecto del EtOH sobre los parámetros de la fijación en riñón, realizando el experimento a una concentración de EtOH correspondiente a 170 mM.

Fig 14

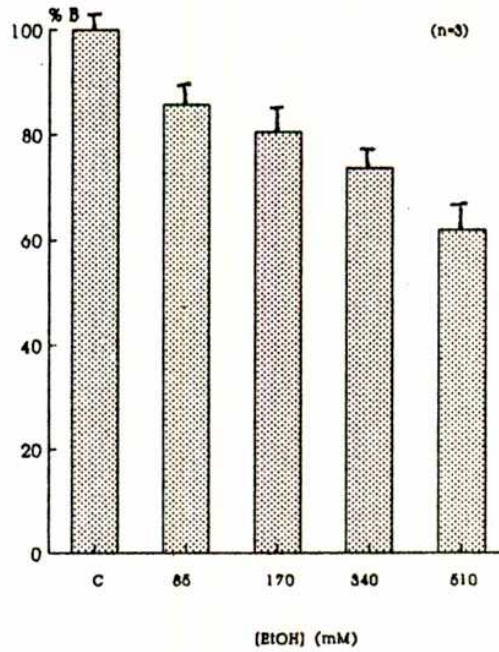
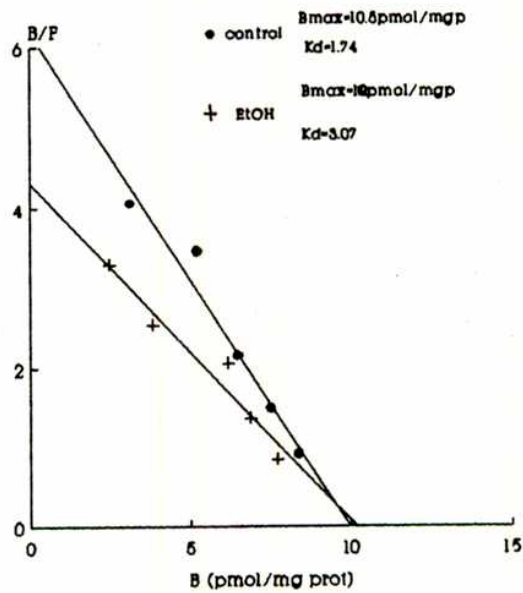


Fig 15



Conclusiones:

El EtOH muestra un efecto inhibitorio in vitro, sobre la fijación de agonista ^3H -RO 5-4864 tanto en membranas mitocondriales crudas de riñón como en las de corteza cerebral. Aunque estos tejidos exhiben una sensibilidad diferencial, ya que el EtOH es aproximadamente cinco veces más potente a nivel del RP-BZD con respecto al RC-BZD (IC_{50} riñón = 230 mM vs. IC_{50} Cx = 620 mM).

La inhibición de la fijación de ^3H -RO 5-4864 en corteza cerebral por EtOH (IC_{50} = 620 mM) difiere marcadamente de los resultados observados para los RC-BZDs donde se alcanza una disminución de la fijación de BZDs al RC-BZD de alrededor del 50% con una concentración de EtOH de aproximadamente entre 15 y 50 mM.

Como se vió anteriormente el etanol ejerce una modulación de tipo alostérica en los receptores a BZDs de tipo central (estimulación del flujo de Cl^-) (204), para el caso de los RP-BZD se obtiene una inhibición debida a una disminución de la afinidad aparente del receptor por su radioligando agonista.

b) Influencia de compuestos de origen natural sobre los RP-BZDs:
Flavonoides:

Han sido descubiertos muchos compuestos de origen natural no relacionados estructuralmente con las BZDs, que interactúan con los receptores de GABA/BZDs.

Muscimol, un potente agonista del receptor de GABA es sintetizado en el hongo *Amanita muscaria* por decarboxilación del ácido iboténico; el alcaloide convulsivante bicuculina antagonista del GABA fue extraído de una especie de *Cordyalis*; la picrotoxina una droga convulsivante que inhibe la función del canal de cloruro asociado al receptor BZD central se obtuvo de semillas de *Anamirta cocculus*; avermectina B_{1a}, un producto antelmíntico que modula el binding de GABA y BZDs a sus receptores se aisló de *Streptomyces avermitilis*.

Amentoflavona, un flavonoide natural fue la primer sustancia descrita con alta afinidad por el receptor benzodiazepínico de cerebro que no contiene nitrógeno en su estructura química. Su afinidad es comparable a la del diazepam pero no discrimina subtipos 1 y 2 del receptor. Por otro lado la amentoflavona muestra una inhibición muy pequeña del binding in vivo de ³H-flunitrazepam lo que demuestra que o bien la sustancia es rápidamente metabolizada, o bien no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. De modo que la interacción con receptores benzodiazepínicos en este caso no puede explicar los efectos farmacológicos o clínicos de la amentoflavona (213 a 215).

El motivo principal por el cual se han elegido a los flavonoides como potenciales moduladores de los RP-BZDs es la descripción previa de su efecto in vitro sobre los RC-BZD y algunas de sus propiedades farmacológicas (213).

Por un lado permiten establecer nuevas diferencias entre los

receptores a BZDs y por otra parte brindan la posibilidad de encontrar sustancias que reconozcan estos sitios con alta afinidad y en algún caso mostrar propiedades farmacológicas de importancia.

Recientemente se ha descrito que algunos flavonoides extraídos de plantas compiten por el RC-BZD (213). En nuestro laboratorio se aisló un flavonoide de una planta llamada *Passiflora coerulea* que presentaba actividad sobre los receptores benzodiazepínicos y fue identificado como crisina (216).

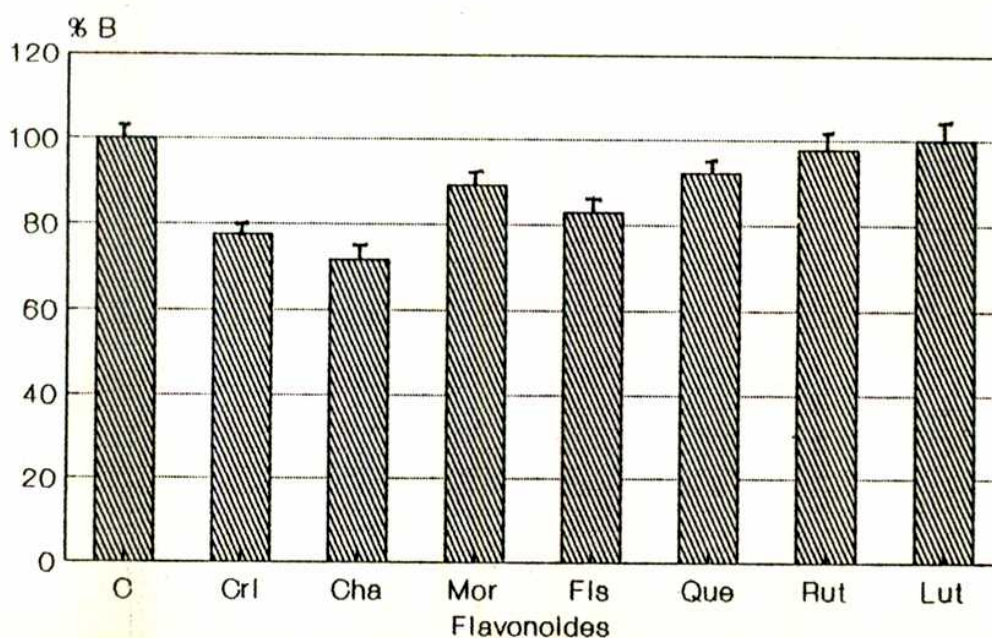
Se evaluó si éste u otros flavonoides interactuaban con el RP-BZD.

Resultados:

Se abordó la interacción de productos naturales de plantas con estos receptores. En particular de diferentes flavonoides.

La figura 16 muestra el efecto de diferentes flavonoides (1 μ M) sobre la fijación de 3 H-RO 5-4864 (1 nM) a membranas de riñón de rata. Se representó el porcentaje de fijación con respecto al control (1.6 ± 0.2 pmol/mg prot).

Fig 16



El promedio de las curvas de saturación (figura 17) fueron representadas en un gráfico de Scatchard donde se muestra el efecto de 10 μ M crisina sobre los parámetros de fijación del RP-BZD. Los valores se expresaron en fmol/mg prot.

La curva de desplazamiento correspondiente al rango 10^{-8} - 10^{-4} de crisina se encuentra graficada en la figura 18.

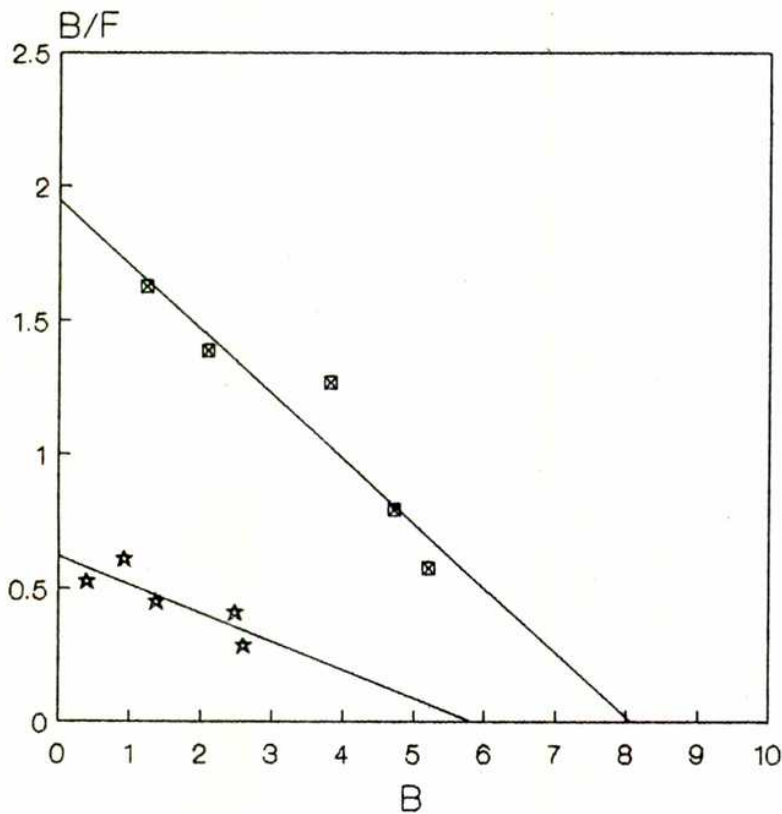
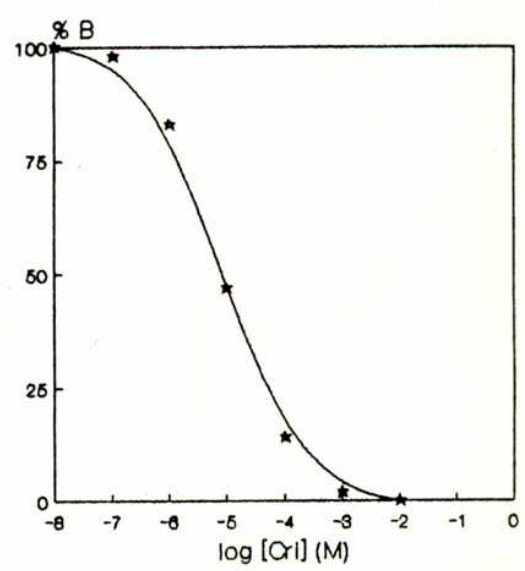


Fig 18

■ control
★ crl



Conclusiones:

Se analizó el efecto del flavonoide crisina sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 y además un grupo de análogos estructurales.

Crisina desplaza la fijación de ^3H -RO 5-4864 a membranas de riñón de rata con una K_i de 13 μM y un número de Hill de 0.82 ± 0.10 ($n=4$).

La interacción es de tipo mixto competitiva-no competitiva.

Entre los flavonoides elegidos, uno de ellos la chalcona muestra una moderada actividad sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864, con una K_i de 4 μM ($n=4$).

Como resultado del análisis de la posible regulación de estos sitios periféricos de reconocimiento de BZDs periféricas por drogas, fármacos u otras sustancias, puede decirse que es posible encontrar sustancias o productos naturales obtenidas a partir de distintos organismos (ej: animales o plantas) capaces de interactuar con los RP-BZD.

Esto permite profundizar el estudio de las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los RP-BZDs y posibilita la búsqueda y tal vez el descubrimiento de ligandos específicos que posean actividades farmacológicas o fisiológicas relevantes en éste área.

4) Aislamiento y purificación de compuestos que interactúan con los RP-BZDs: Posible modulación endógena.

Se ha discutido en la introducción, acerca de los esfuerzos que se están llevando a cabo para determinar si la acción farmacológica de las BZDs sobre la neurotransmisión puede también tener lugar fisiológicamente.

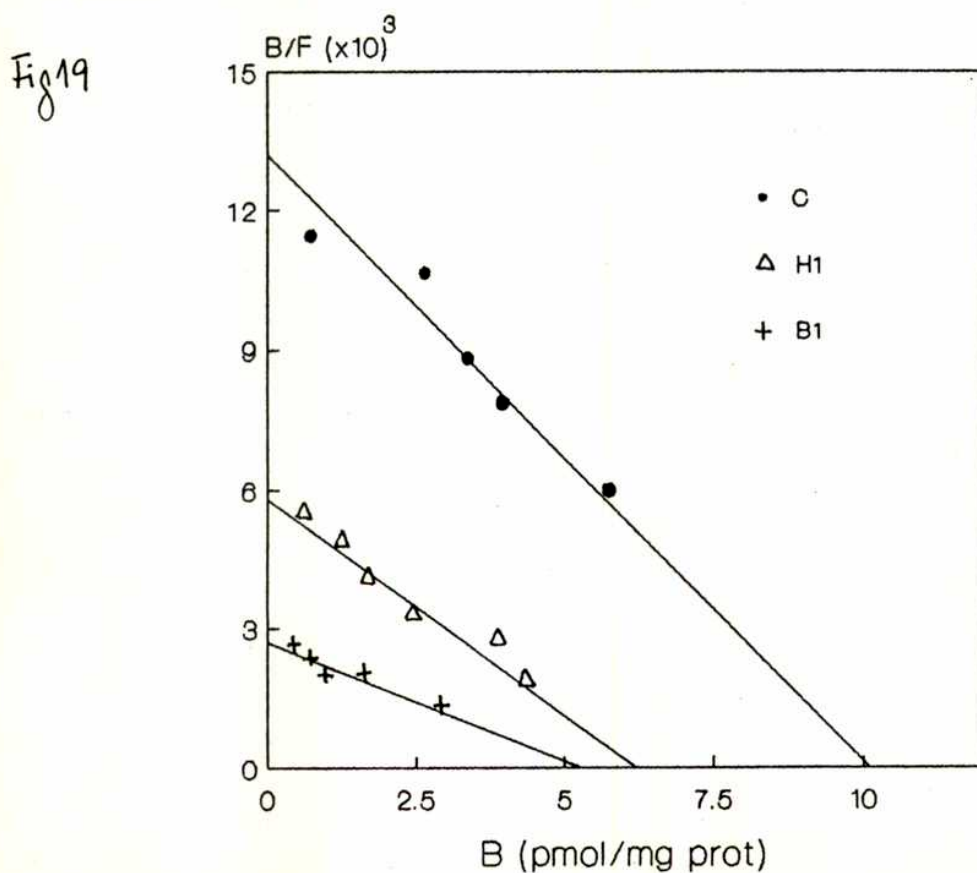
De modo similar para el caso de los receptores periféricos, si bien su rol biológico no está aún perfectamente establecido, se ha tratado de encontrar compuestos que, teniendo un origen endógeno, sean capaces de interactuar a nivel de estos sitios de reconocimiento.

Como se ya se vió, una gran cantidad de efectos farmacológicos están mediados por receptores a BZDs de tipo periférico (ver introducción ítem Modulación Endógena del RP-BZD). Pero tales respuestas farmacológicas nunca fueron hasta ahora correlacionadas con la fijación de RO 5-4864 a los RP-BZDs.

Es así que el posible mecanismo de acción farmacológico y el probable papel en la fisiología celular que cumplen los RP-BZDs permanece sin aclarar. En base a ésto se hace evidente que un aspecto de lo más controvertido en relación a los RP-BZD consiste en la demostración de si estos sitios responden a un modulador o ligando endógeno, o contrariamente se trata de sitios aceptores sin rol fisiológico alguno. Se postularon como posibles moduladores endógenos de los RP-BZDs a distintas porfirinas (139 a 141). Partiendo de tal evidencia se procedió a aislar purificar y caracterizar bioquímicamente fracciones capaces de competir con el agonista de alta afinidad RO 5-4864 por la fijación al RP-BZD. Además de comparó el comportamiento de diferentes porfirinas (Pfs) en su interacción con estos sitios periféricos de reconocimiento.

Resultados:

La figura 19 muestra el análisis de Scatchard de dos curvas de saturación de ^3H -RO 5-4864 realizadas en presencia y ausencia de las fracciones parcialmente purificadas a partir de bazo y glándula harderiana de rata. Para los experimentos de fijación se utilizaron membranas mitocondriales crudas de riñón de rata. Las fracciones representadas en la figura 19 corresponden a B1 y H1 (ver protocolo de purificación). El cambio observado tanto en H1 como en B1 con respecto al control C es el que corresponde a una interacción de tipo mixto. Esto se debe probablemente a que la purificación es parcial y entonces no puede descartarse que haya más de una sustancia influyendo en la interacción del ^3H -RO 5-4864 con el RP-BZD. Por otro lado B2 y H2 muestran también actividad inhibitoria sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864, aunque aún no ha sido caracterizada la interacción.

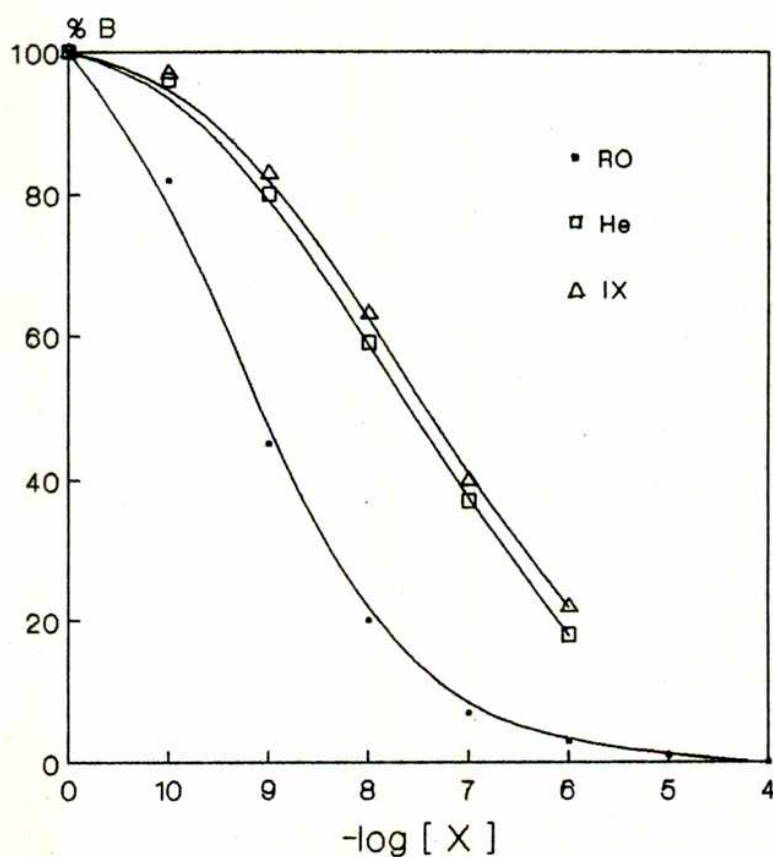


Porfirinas tales como He y IX desplazan la fijación del agonista de alta afinidad por el RP-BZD ^3H -RO 5-4864 con una IC_{50} de 500 y 200 nM respectivamente en membranas mitocondriales de riñón.

La interacción es del tipo competitiva. Esto puede verse en la figura 20 en donde se comparan las curvas de desplazamiento de ^3H -RO 5-4864 (0.8 nM) en membranas de riñón de rata por RO 5-4864 (RO), Hemina (He) y Protoporfirina IX (IX). Se utilizaron membranas de una fracción mitocondrial de riñón lavada, las concentraciones utilizadas fueron: [RO] [He] [IX]: 10^{-10} a 10^{-6} M (\bullet \square Δ). Los puntos de la curva representan el promedio de cinco experimentos independientes. Las IC_{50} son aproximadamente 1, 500 y 200 nM respectivamente.

Las fracciones B1 y H1 anteriormente comentadas, mostraron un R_f similar al correspondiente para la He en una cromatografía en capa fina (ver materiales y métodos).

Fig 20

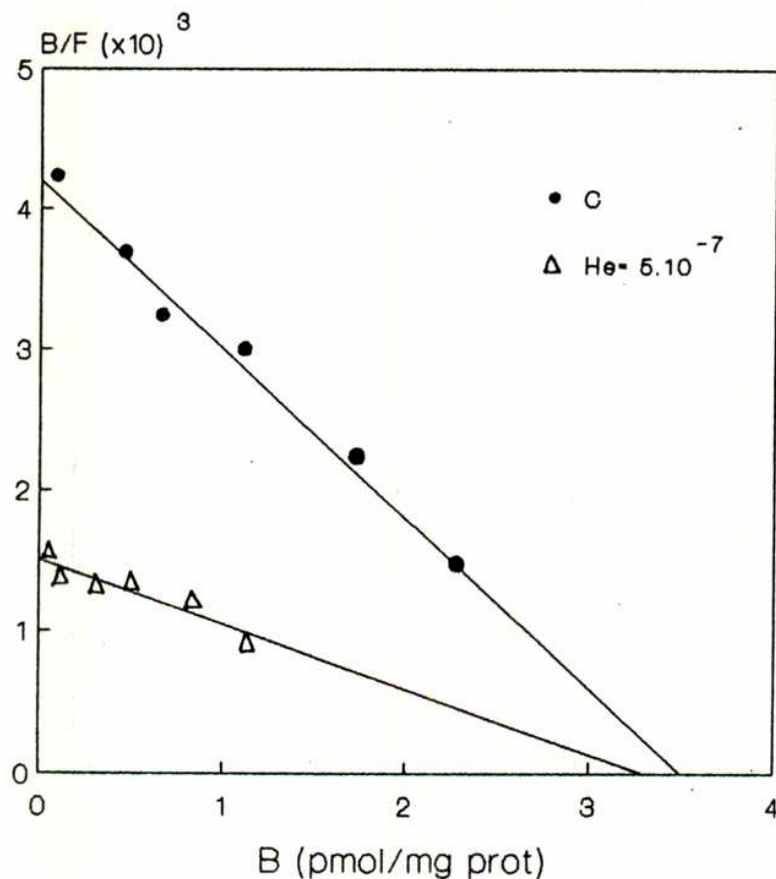


Para establecer las características de la interacción de la hemina con los RP-BZDs se realizaron experimentos de saturación con ^3H -RO 5-4864 (0.4 a 13 nM) en presencia y ausencia de He 500 nM en membranas de riñón. Esto se muestra en la figura 21.

La figura 21 es el análisis de Scatchard de el promedio de 5 curvas de saturación mostrando la inhibición producida por He ($5 \cdot 10^{-7}$). La fijación inespecífica se calculó en presencia de 10^{-6}M RO.

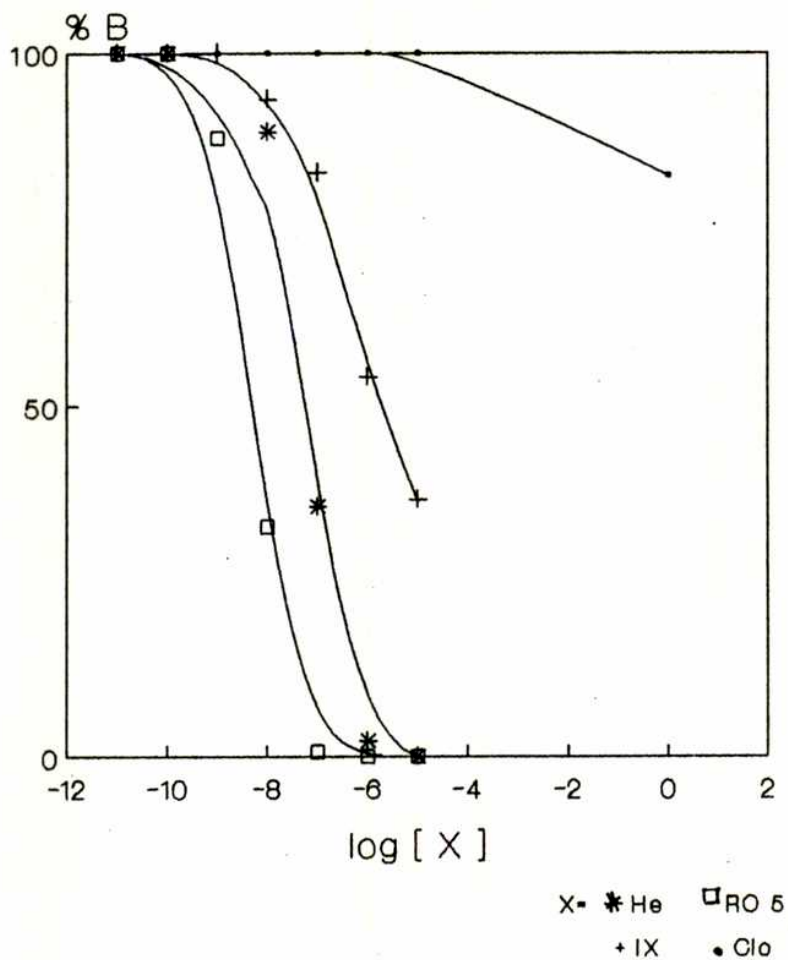
Nótese que el cambio es en la afinidad y no en el número de sitios, sugiriendo que la He actuaría de un modo competitivo.

Fig 21



En la figura 22 se muestra el efecto de las Pfs He y XI (10^{-9} - 10^{-3}) en experimentos realizados en células intersticiales testiculares de rata. Se utilizó una fracción mitocondrial cruda, en condiciones similares a los estudios llevados a cabo en riñón. Las fracciones B1 y H1 también muestran actividad inhibitoria en estas células, y las IC_{50} para HE y XI fueron similares a las encontradas en riñón.

Fig 22



Conclusiones:

Las fracciones parcialmente purificadas a partir de bazo y glándula harderiana de rata inhiben la fijación de radioligando, tanto en membranas de riñón como en células de Leydig purificadas, de modo que en ciertos tejidos de la rata podrían sintetizarse moléculas capaces de interactuar con este receptor. Por sus características cromatográficas una de estas fracciones contendría la hemina corroborando lo publicado por Verma y col. (140).

Porfirinas tales como He y IX desplazan la fijación del agonista de alta afinidad por el RP-BZD, ^3H -RO 5-4864, con una IC_{50} de 500 y 200 nM respectivamente, esto también se cumple en los dos tipos celulares estudiados. La interacción es competitiva para el caso de He y la potencia del desplazamiento parece ser baja para ambas Pfs estudiadas comparada con la que muestran RO 5-4864 y PK 11195.

5) Caracterización farmacológica y localización subcelular de los RP-BZDs en células intersticiales testiculares:

Este estudio se realizó fundamentalmente por dos motivos.

a) Por un lado la posible heterogeneidad de los RP-BZD obliga a establecer las propiedades farmacológicas de los sitios de fijación cada vez que se comienza su estudio en un nuevo tejido, y en este caso en particular estas células fueron elegidas y tomadas como un modelo para el estudio de una posible respuesta celular mediada por los RP-BZDs (ver capítulo de Función de los RP-BZDs).

b) Además fue necesario no solamente demostrar bioquímicamente la existencia de tales receptores en estas células, sino también estudiar su distribución subcelular ya que este trabajo nunca antes había sido llevado a cabo utilizando células intersticiales testiculares. Luego sí podría intentarse correlacionar la fijación de RO 5-4864 a una respuesta biológica dada, como es la síntesis y liberación de hormonas esteroideas sexuales con una base más concreta (98-99).

Resultados:

a) Caracterización farmacológica:

Con el objeto de demostrar la presencia y caracterizar farmacológica y bioquímicamente los sitios de fijación presentes en estas células se realizaron experimentos de fijación de radioligandos utilizando nuevamente el agonista marcado ^3H -RO 5-4864 para el estudio de los RP-BZDs testiculares.

En la figura 23 puede observarse una curva de saturación típica para ^3H -RO 5-4864 realizada en células intersticiales testiculares.

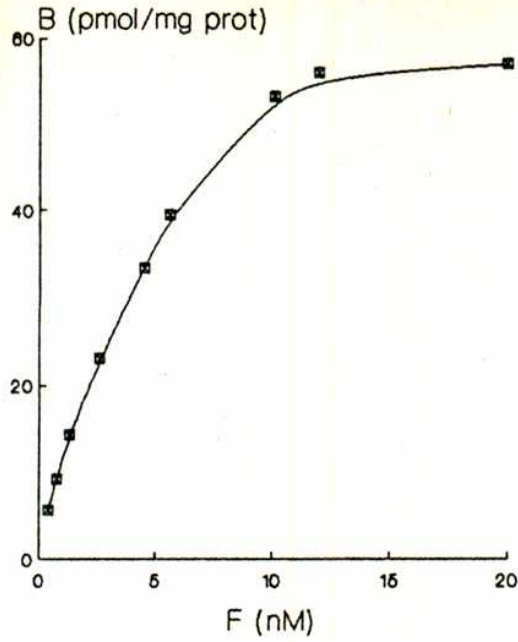
La figura 24 muestra el análisis de Scatchard del promedio de cinco curvas de saturación de ^3H -RO 5-4864 realizada en una fracción mitocondrial cruda de células intersticiales testiculares.

En la misma puede observarse una población homogénea de sitios saturable y específica con un $B_{\text{max}} = 77,6 \pm 9,1$ pmol/mg prot y una afinidad aparente de $5,02 \pm 0,86$ nM (5 experimentos independientes).

La figura 25 muestra una familia de curvas de desplazamiento de ^3H -RO 5-4864 revelando el perfil farmacológico de estos sitios receptores. Para tal fin se utilizaron además del agonista RO 5-4864 y el antagonista PK 11195, otras BZDs de interés farmacológico como son diazepam, flunitrazepam y clonazepam, con el objeto de establecer la especificidad de unión.

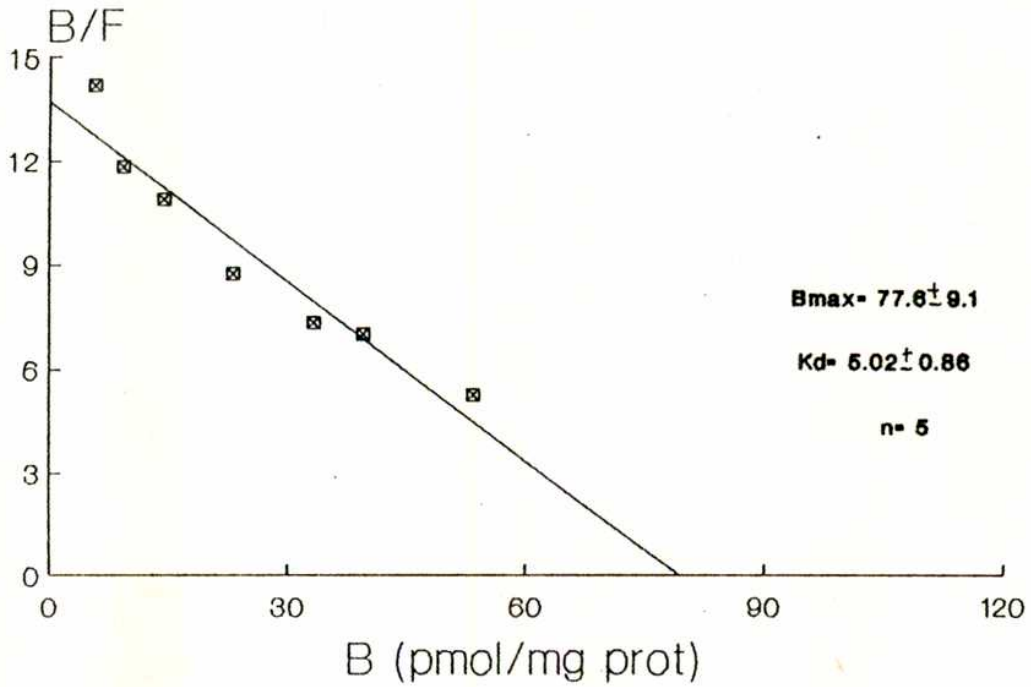
Las IC_{50} obtenida para los diferentes compuestos fueron las siguientes: RO = $3,53 \cdot 10^{-7}$ M, PK = $4,40 \cdot 10^{-7}$, DZ = $1,59 \cdot 10^{-7}$, FNZ = $3,53 \cdot 10^{-7}$ y CLO $> 10^{-6}$ (n=5).

Fig 23

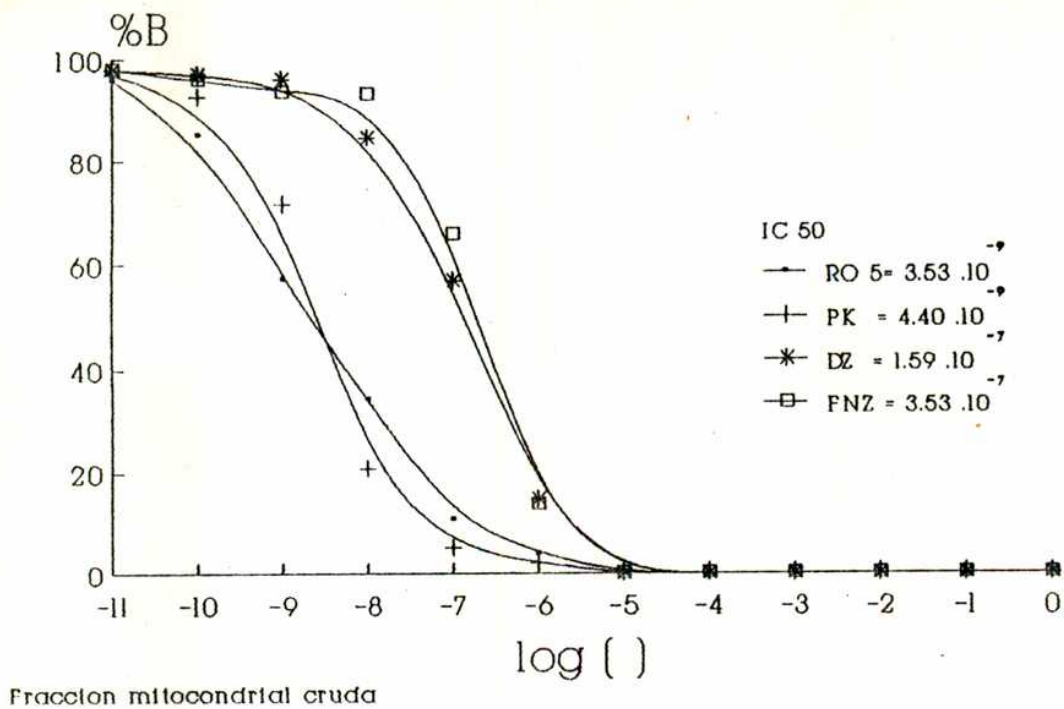


Curva de Saturación de ³H-RO 5-4864

Fig 24



Curva de Desplazamiento de ³H-RO 5-4864



T A B L A 8 :

Receptores Benzodiazepínicos Periféricos
pmoles/mg prot

Telido	n° sitios
Riñón	9.10 ± 0.70
Corazón	4.10 ± 0.30
Bulbo Olfatorio	1.10 ± 0.10
Corteza Cerebral	0.23 ± 0.05
Células de Leydig	77.60 ± 0.86

Mit cruda

Conclusion:

Estos resultados demuestran que las células intersticiales testiculares poseen una gran densidad de receptores periféricos a BZDs, la mayor encontrada hasta el momento para cualquier tejido estudiado. En la tabla 8 se compara con otros tejidos estudiados en nuestro laboratorio, y fracciones subcelulares equivalentes (fracción mitocondrial cruda).

Los sitios de reconocimiento de BZDs periféricas descritos en CIT corresponden inequívocamente a receptores benzodiazepínicos de tipo periférico debido a que presentan un perfil farmacológico típico de estos sitios receptores como lo son su gran afinidad para RO y PK y menor afinidad (y decreciendo) para DZ FNZ y CLO respectivamente.

Resultados:

b) Localización subcelular:

Una vez demostrada la existencia de RP-BZD en CIT se procedió a estudiar la localización subcelular mediante técnicas de fraccionamiento subcelular.

Para este estudio se echó mano de una técnica de fraccionamiento subcelular descrita en materiales y métodos.

En la figura 27 se encuentra representado el porcentaje de enriquecimiento de la fijación de radioligando agonista, resultado del fraccionamiento. La fracción mitocondrial parcialmente purificada es la más rica en RP-BZD y alcanza prácticamente a duplicar la concentración de sitios encontrada en mitocondrias crudas (aumento en la actividad específica resultado del mayor número de mitocondrias por mg de proteína), en tanto que la fracción nuclear es la segunda en importancia, aunque probablemente esto es así debido a la impurificación mitocondrial (la fracción nuclear lavada pierde parte de la fijación de radioligando).

La figura 28 muestra el mismo experimento realizado a una concentración saturante de ^3H -RO 5-4864 y los porcentajes obtenidos son muy similares.

Fig 27

Localizacion de Receptores Perifericos a Benzodiazepinas en Celulas de Leydig

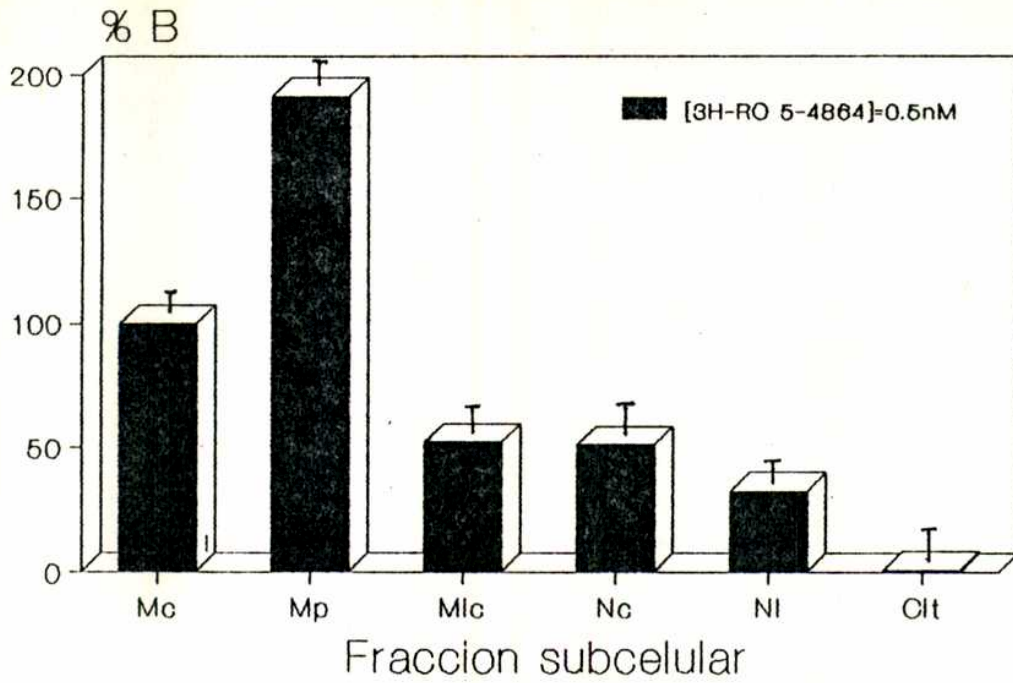
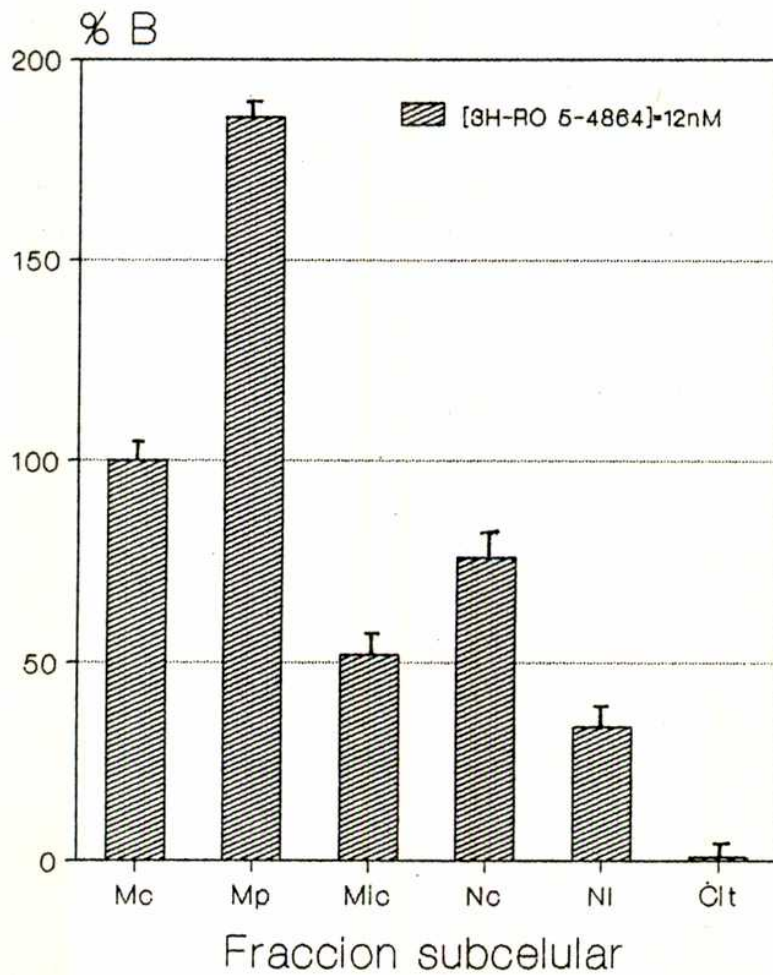


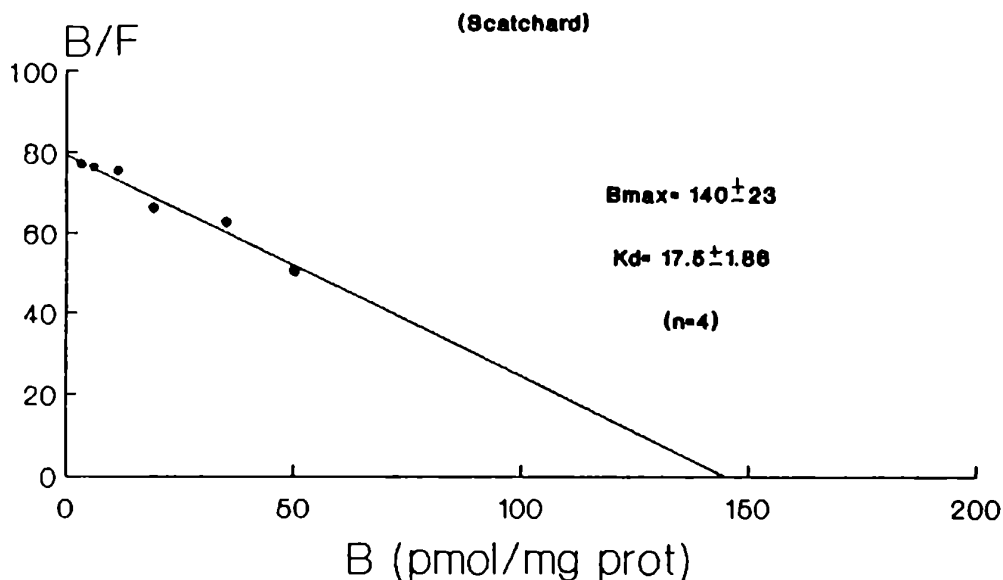
Fig 28



La figura 29 muestra el análisis de Scatchard de una curva de saturación de ^3H -RO 5-4864, realizada en una fracción mitocondrial enriquecida de células intersticiales testiculares. Puede observarse una población homogénea de sitios saturable y específica con un $B_{\text{max}} = 140 \pm 23$ pmol/mg prot y una afinidad aparente de 17.5 ± 1.86 nM. El cambio en el K_d con respecto a los experimentos realizados en fracciones mitocondriales crudas, podría deberse a la pérdida de algún factor endógeno durante el procedimiento de purificación. La figura representa el promedio de 4 experimentos independientes.

Fig 29

Curva de Saturación de ^3H -RO 5-4864 en Células de Leydig



Fracción mitocondrial purificada

Conclusión:

Estos resultados demuestran que las células de Leydig de rata poseen la más alta densidad de RP-BZD de todo el organismo, siendo ésta una población homogénea. Su localización es preferentemente mitocondrial y se encuentran altamente concentrados en esta fracción, en concordancia con trabajos de otros autores realizados en otros tejidos esteroideogénicos como ovario y placenta (224 y 225).

El fraccionamiento subcelular reveló un enriquecimiento ($>$ de 4 veces) en el número de sitios específicos de ^3H -RO 5-4864 en membranas mitocondriales purificadas.

Por lo tanto los presentes experimentos también sugieren que las células intersticiales testiculares de rata ofrecen un modelo para el estudio del papel de los RP-BZDs en la fisiología celular.

Regulacion de los receptores perifericos

de Benzodiazepinas

1) Estudio de la regulación de los RP-BZDs durante una situación de stress agudo:

Las situaciones que resultan de una exagerada estimulación pueden alterar la homeostasis y por consiguiente producir cambios en las propiedades bioquímicas, comportamentales y fisiológicas del organismo. Algunos de estos cambios han sido ampliamente estudiados y son característicos del síndrome de stress (217). Por ejemplo, se han estudiado alteraciones en la síntesis y liberación de diversos neurotransmisores, cambios en los niveles sanguíneos de determinadas hormonas y también se encontraron en muchos casos modificaciones en el número de ciertos tipos de receptores (218 y 219).

En este trabajo se empleó un modelo de stress agudo por natación forzada para el estudio de los RP-BZD.

Resultados:

El histograma de la figura 29 muestra los cambios porcentuales en el número de RP-BZDs encontrados en el riñón (K), corazón (H), bulbo olfatorio (OB) y corteza cerebral (CX) de las ratas que fueron sometidas a un stress agudo. Fue tomado como 100% el valor encontrado para los animales control y los datos corresponden a experimentos realizados en condiciones de saturación (Bmax).

En esta figura se puede ver un aumento en Bmax del 50% en riñón y del 37% en bulbo olfatorio, en tanto que en corazón y corteza cerebral los valores permanecen iguales a los encontrados en los animales control (línea de puntos en la figura). Los valores absolutos de Bmax en los controles expresados como pmol/mg de proteína son respectivamente:

K: 9.1 ± 0.7 ; H: 4.1 ± 0.3 ; OB: 1.1 ± 0.1 ; CX: 0.23 ± 0.05 ; siendo 10, 6, 10 y 6 el número de experimentos realizados.

Fig 29

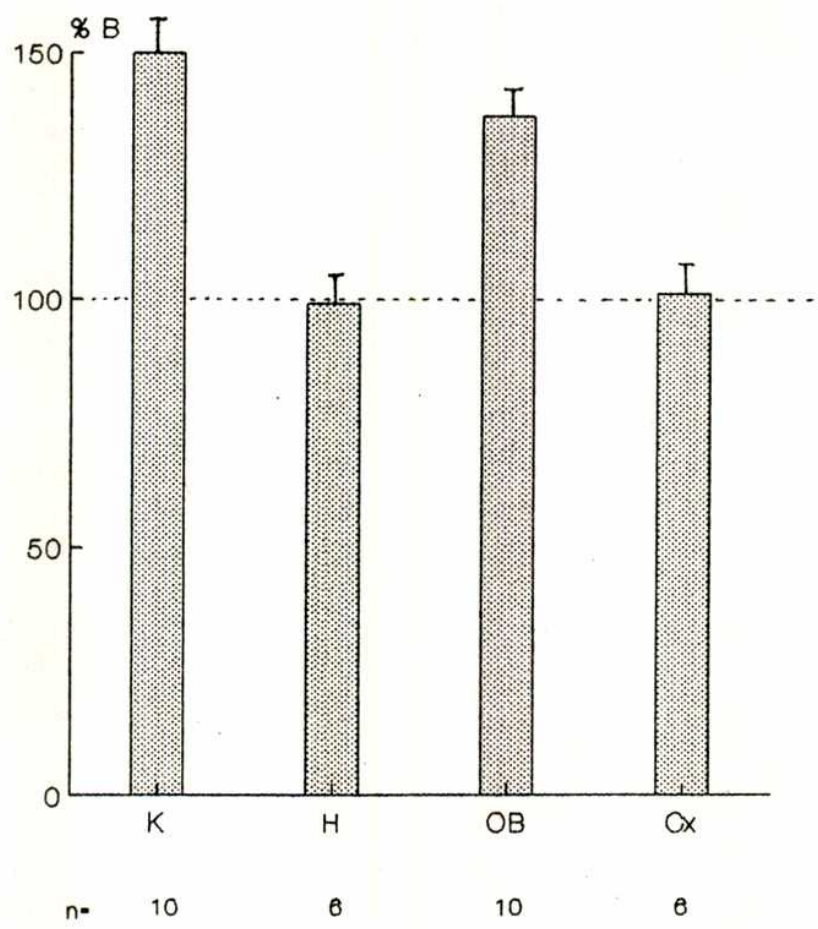
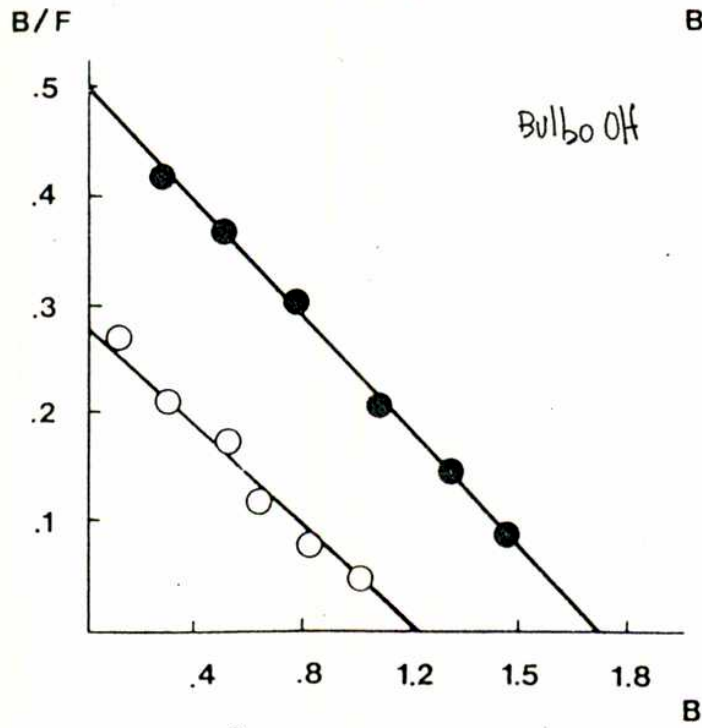
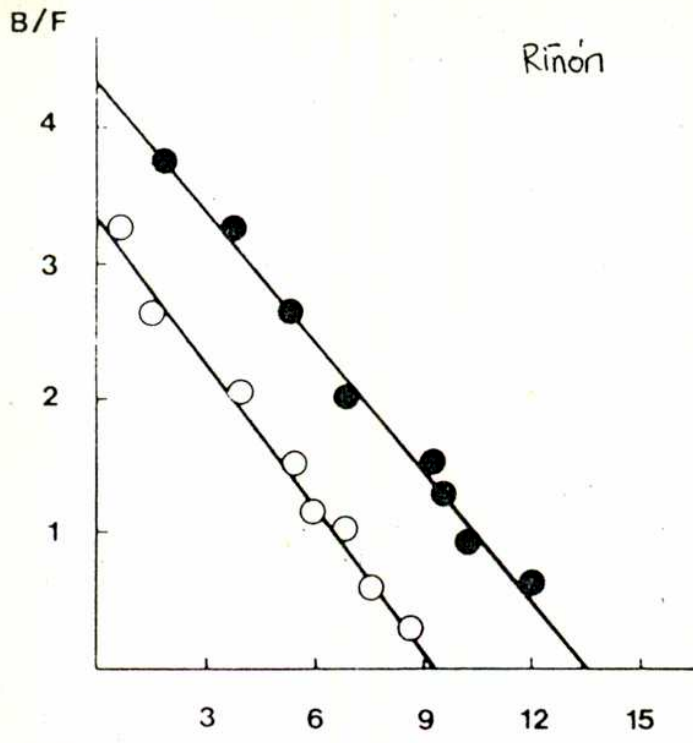


Fig 30



○ CONTROL
● STRESS

En el análisis de Scatchard de la figura 30 se puede evaluar que los cambios encontrados en la fijación de ^3H -RO 5-4864 resultan ser en el número de receptores medidos y no en la afinidad aparente de los RP-BZDs de K y OB.

Las Kds medidas son, para el control, en K: $3,7 \pm 0,5$ nM y en OB: $3,9 \pm 0,4$ nM. En las ratas estresadas, K: $4,5 \pm 0,5$ nM y en OB: $4,1 \pm 0,3$ nM.

Conclusión:

Como parte del estudio de la regulación de los RP-BZDs en el presente estudio se utilizó una situación inescapable de stress para evaluar la capacidad de estos sitios de reconocimiento para ser modulados ante una situación fisiopatológica.

Contrariamente a una situación de escapabilidad, en la cual dependiendo de la intensidad del estímulo los parámetros neuroquímicos pueden readaptarse a la situación cambiante, en el modelo experimental usado aquí tal adaptación no es posible.

El stress agudo provoca un aumento en el número de RP-BZD en rión y bulbo olfatorio de ratas sin cambios en la afinidad aparente. En corteza cerebral y corazón no ocurre lo mismo, permaneciendo los valores similares al control.

Estos cambios sugieren la posibilidad de que los RP-BZD sean receptores propiamente dichos y no que se trate de aceptores sin un determinado rol fisiológico, aunque evidentemente no constituye un argumento definitivo (220).

Otros autores encuentran que una situación estresante inescapable distinta, como es la aplicación de choques eléctricos en la cola del animal administrados por un tiempo determinado y a intervalos

animal administrados por un tiempo determinado y a intervalos regulares, producen una disminución del Bmax en los RP-BZD en riñón de rata (221 a 223). La contradicción aparente de estos resultados con los observados en nuestros experimentos no es tal al estar demostrado que la magnitud y dirección de los cambios en la fijación de $^3\text{H-RD 5-4864}$ depende de distintos factores tales como la duración e intensidad del estímulo estresante.

Cabe destacar entonces, que los experimentos expuestos aquí demuestran una regulación de los receptores benzodiazepínicos periféricos durante una situación de stress agudo. Por el momento no es posible dar una explicación sobre los mecanismos involucrados en los cambios que se observan en los RP-BZD. El hecho de que tengan lugar rápidamente podría permitirnos descartar el turn-over del RP-BZD (síntesis de nuevos receptores) como una posibilidad, ya que serían necesarios tiempos más prolongados para que ocurra tal síntesis. Otros mecanismos más rápidos como por ejemplo el desenmascaramiento o exteriorización debido a una posible transición conformacional, con el consiguiente cambio de la ubicación o las relaciones del receptor en la membrana, podrían explicar mejor este incremento.

2) Efecto del tratamiento crónico con BZDs sobre los RP-BZDs:

Los tratamientos crónicos con diferentes drogas o fármacos modifican las propiedades de los receptores a hormonas y neurotransmisores. Es así que fenómenos de desensibilización o hipersensibilidad están ampliamente estudiados para distintos sistemas ligando-receptor (226 a 228).

Los receptores benzodiazepínicos posiblemente estén sujetos a este tipo de regulación. Los RC-BZDs fueron estudiados, en un amplio número de estructuras, luego de la administración de fármacos de diversa naturaleza. También lo fueron los RP-BZDs, pero como su descubrimiento es más reciente esto continúa siendo un tema de análisis.

Tratamientos tales como adrenalectomía, hipofisectomía, administración crónica de neurolépticos como la clorpromazina o haloperidol, o la exposición a diferentes hormonas como estradiol, progesterona o T3 y T4 regulan de manera diferente los RP-BZDs comparado con los receptores a BZDs centrales, y esto por mucho tiempo fue un criterio tenido en cuenta para argumentar la existencia de diferentes tipos de receptores (142, 143 y 229 a 235). Debido a que las BZDs son drogas de gran uso en la clínica nos pareció apropiado investigar que efecto tiene la administración crónica de algunas de ellas sobre los receptores RP-BZD. Para ello se realizaron inyecciones diarias de diferentes BZDs (ip) durante 5 ó 14 días. Las BZDs elegidas para el tratamiento muestran entre todas ellas grandes diferencias en cuanto a sus propiedades de reconocimiento del RP-BZD, incluso una de ellas solo es capaz de interactuar específicamente con los RC-BZDs (ver introducción). En la primera parte se presentan los resultados de los experimentos realizados en riñón. Luego se muestran aquellos correspondientes a

corazón de rata.

Finalmente se analiza la acción del diazepam sobre los RP-BZDs de células intersticiales testiculares (CIT) como un primer paso en el estudio de correlacionar los eventuales cambios observados en la densidad de RP-BZDs con una respuesta biológica medible, todo esto enmarcado en la hipótesis de la posible existencia de propiedades modulatorias por parte de los RP-BZDs sobre la esteroidogénesis testicular (ver más adelante).

Resultados:

a) Efecto del tratamiento por 5 días con diferentes BZDs sobre los RP-BZDs de riñón de rata:

Este estudio consistió en analizar los parámetros de fijación para los RP-BZDs de riñón luego de la administración por 5 días consecutivos de diferentes BZDs.

La tabla 9 muestra los valores de fijación de ^3H -RO 5-4864 (0.75 nM) a membranas mitocondriales crudas de riñón de rata luego de 5 inyecciones diarias de RO 5-4864, Diazepam, Flunitrazepam y Clonazepam respectivamente. Se expresan también los porcentajes de aumento encontrados en tal fijación con posterioridad al tratamiento.

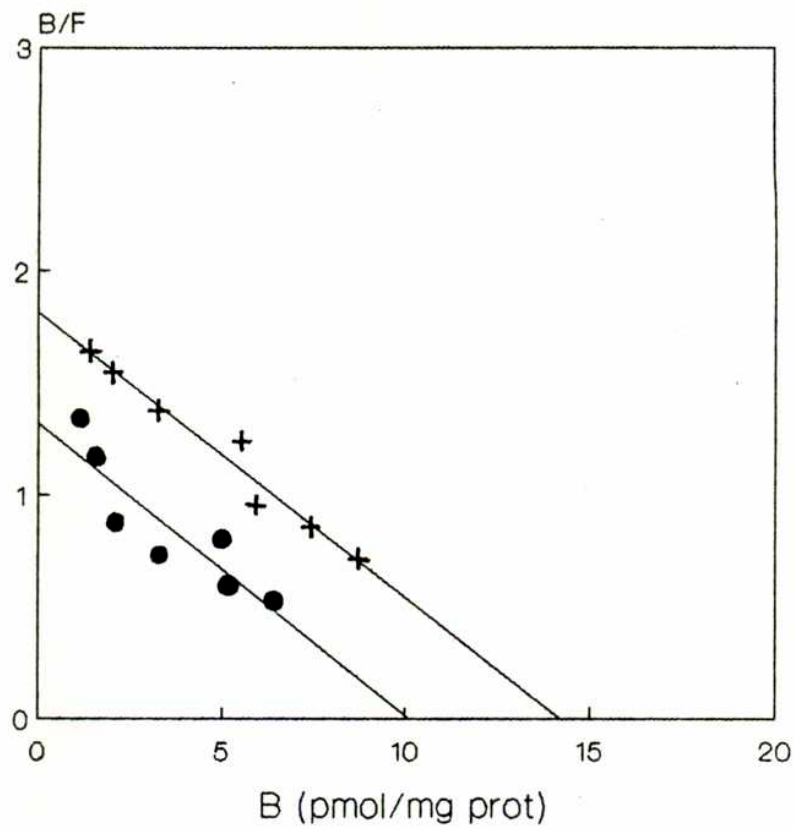
TABLA 9

Tratamiento 5 días con BZDs

	pmol/mg prot	n	%↑
V	0.8455 ± 0.0784	10	-
RO	1.2269 ± 0.1120 **	10	45.11
DZ	1.2194 ± 0.1235 **	9	44.22
Flu	1.1736 ± 0.1517 *	5	38.80
Clo	1.0562 ± 0.0822	9	24.92

La figura 31 muestra el análisis de Scatchard del promedio de 5 curvas de saturación, control (●) y tratamiento de 5 días con RO 5-4864 (+), obteniéndose los siguientes resultados en los parámetros medidos: control: Bmax= 10 pmol/mg prot, Kd= 7.69 nM; RO 5: Bmax= 14 pmol/mg prot, Kd= 7.77 nM.

Fig 31



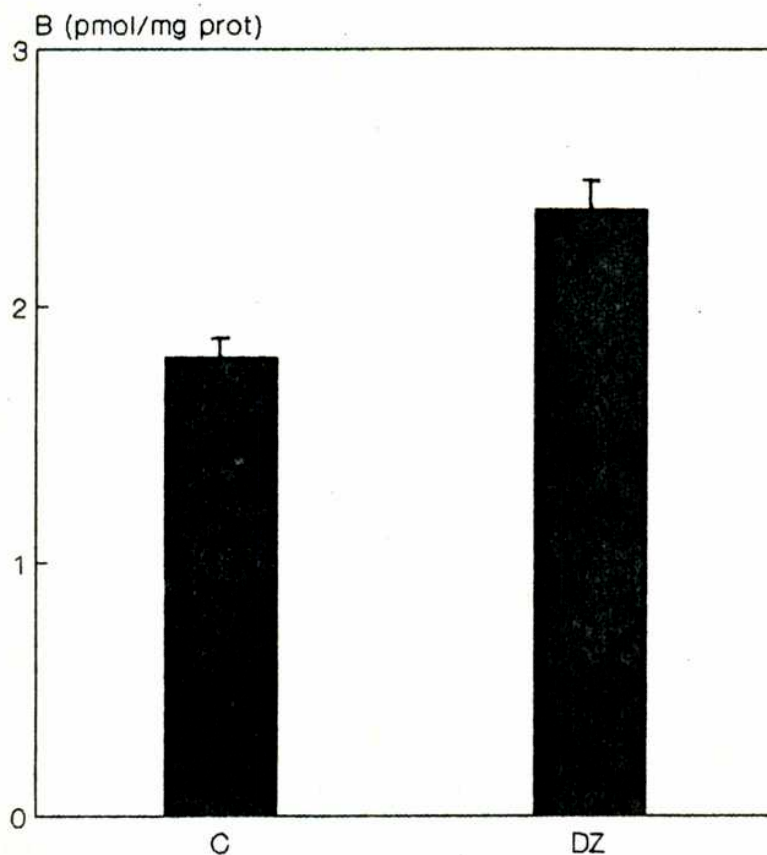
● control
+ RO 5

b) Efecto del tratamiento por 14 días con diazepam sobre los RP-BZDs de riñón de rata:

Como la administración crónica de DZ modifica sustancialmente el número de sitios RP-BZDs y debido a su amplio uso terapéutico en forma prolongada, se procedió a estudiar los parámetros de fijación para los RP-BZDs de riñón luego de la administración por 14 días consecutivos de diazepam.

En la figura 32 se puede ver la fijación de ^3H -RO 5-4864 (0.75 nM) a membranas mitocondriales crudas de riñón de rata antes y después del tratamiento con DZ. La figura 33, ídem pero en condiciones saturantes, (^3H -RO 5-4864: 12nM).

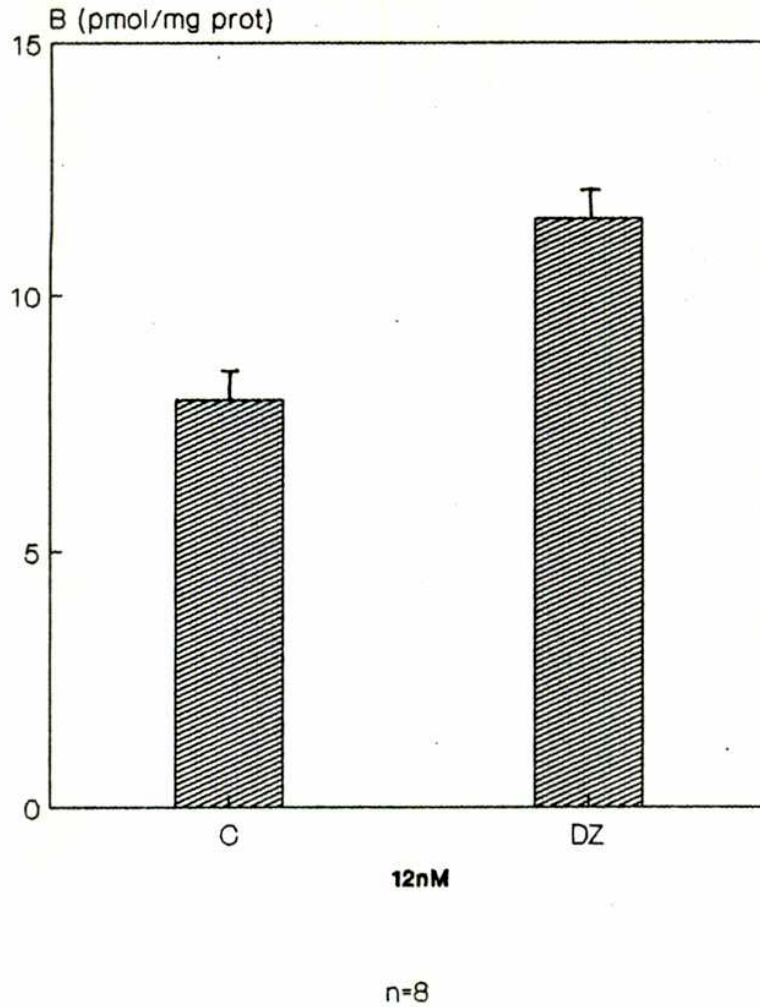
Fig 32



0.75nM

n=7

Fig 33



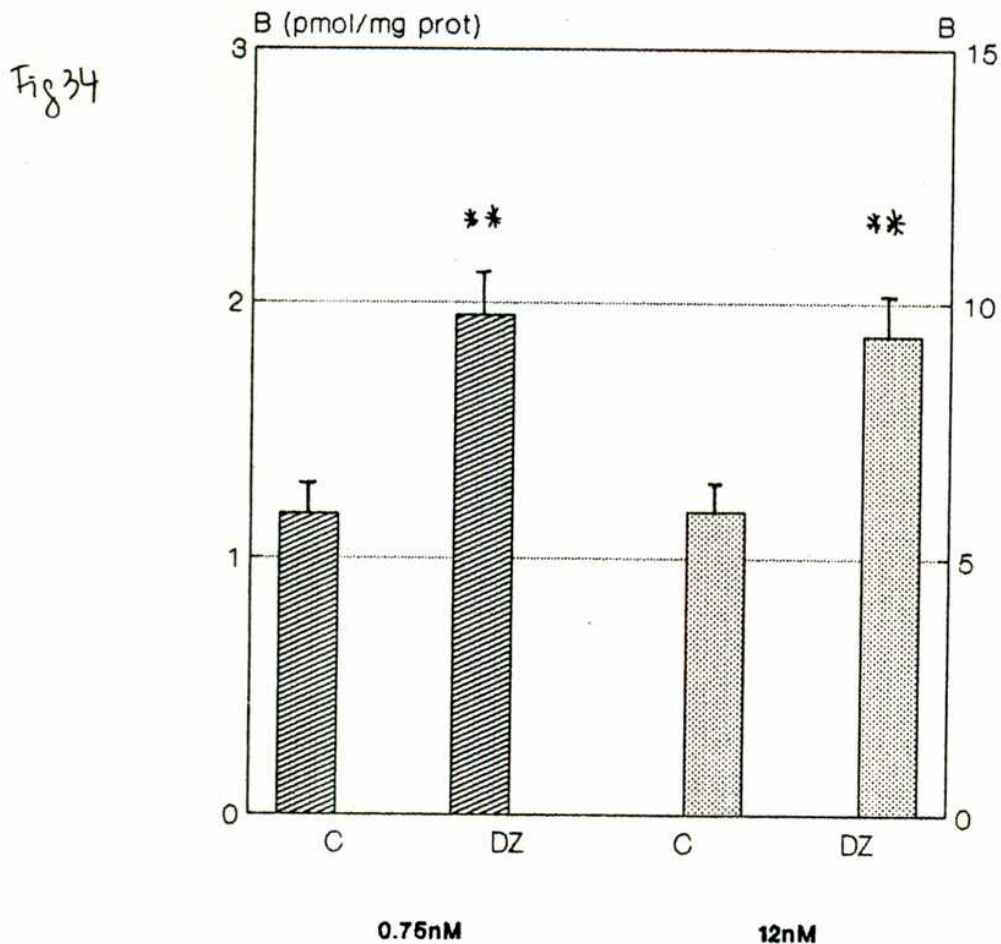
Los valores representados en las figuras fueron los siguientes:

Control: 0.75 nM= 1.797 ± 0.111 pmol/mg prot (n=7), 12 nM= 7.965 ± 0.723 pmol/mg prot (n=8).

DZ 14 días: 0.75 nM= 2.383 ± 0.207 pmol/mg prot (n=7) (32.61 % de aumento en la fijación específica con respecto al valor control) y 12 nM= 11.515 ± 0.926 pmol/mg prot (n=8) (44.56 % de aumento).

c) Efecto del tratamiento por 14 días con diazepam sobre los RP-BZDs de corazón de rata:

La figura 34 muestra los resultados promediados de 3 experimentos independientes. Se utilizó una fracción mitocondrial cruda de corazón de rata como fuente de receptor.



n=3

p < 0.05

Los valores representados en la figura fueron los siguientes:

Control: 0.75 nM= 1.17 ± 0.28 pmol/mg prot (n=3), 12nM= 5.8956 ± 0.40 pmol/mg prot (n=3).

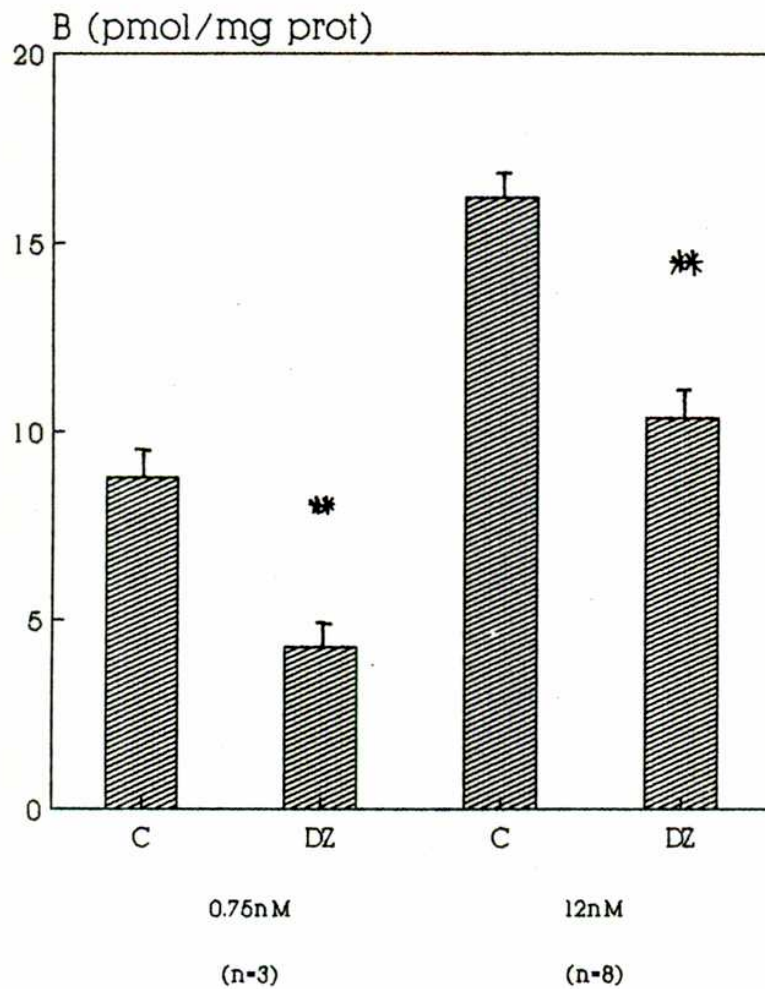
DZ 14 días: 0.75 nM= 1.9506 ± 0.40 pmol/mg prot (n=3) (66.39 % de aumento en la fijación específica con respecto al valor control, 12 nM= 9.3512 ± 1.13 pmol/mg prot (n=3) (58.61 % de aumento).

d) Efecto del tratamiento crónico con BZDs sobre los RP-BZDs de células intersticiales testiculares de rata:

Los resultados de este estudio se encuentran representados en la figura 35.

Se utilizó una fracción mitocondrial cruda de células intersticiales testiculares de rata como fuente de receptor.

Fig 35



$p < 0.05$

Los valores de los parámetros medidos fueron los siguientes:

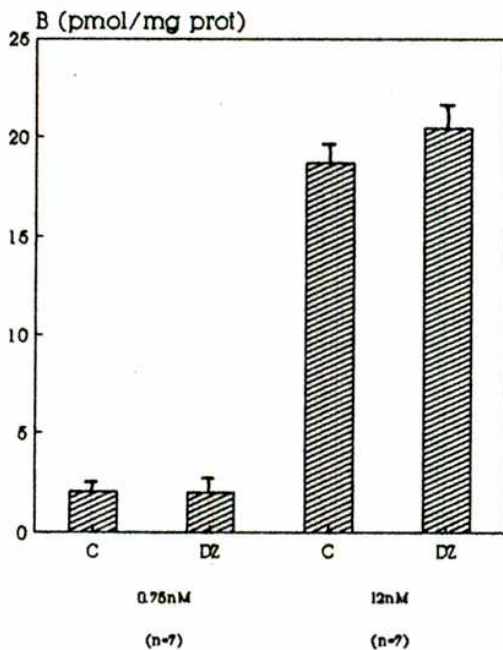
Control: 0.75 nM= 8.798 ± 0.062 pmol/mg prot (n=3), 12nM= 16.179 ± 1.464 pmol/mg prot (n=8).

DZ 14 días: 0.75 nM= 4.289 ± 1.899 pmol/mg prot (n=3) (48.74 % de disminución en la fijación específica con respecto al valor control, 12 nM= 10.379 ± 1.262 pmol/mg prot (n=8) (40.91 % de caída).

El tratamiento agudo con DZ (una sola inyección de DZ 1 hora antes del sacrificio de los animales para el posterior estudio), no provocó cambios en los parámetros medidos.

En la figura 36 pueden verse los resultados obtenidos para el tratamiento agudo con DZ: 3 mg/kg.

Fig 36



Los valores de los parámetros fueron los siguientes:

Control: 0.75 nM= 2.022 ± 0.023 pmol/mg prot (n=3), 12nM= 18.722 ± 0.968 pmol/mg prot (n=7).

DZ agudo: 0.75 nM= 1.975 ± 0.194 pmol/mg prot (n=3), 12 nM= 20.438 ± 1.246 pmol/mg prot (n=7).

Conclusiones:

De acuerdo a los resultados descriptos en esta sección, pueden hacerse una serie de comentarios.

El tratamiento prolongado con diferentes BZDs modifica los RP-BZDs de distintos tejidos de la rata.

Por un lado la administración por 5 días consecutivos de RO 5, DZ o Flu provocan un aumento significativo de los RP-BZDs de riñón de rata, en tanto que Clo, una BZD que es incapaz de interactuar con los RP-BZD, no altera significativamente los parámetros de este receptor. Los cambios observados en los RP-BZDs por efecto del RO 5 son en la densidad de receptores, observándose un fenómeno de up-regulation de receptor. Por otra parte la magnitud de tal regulación "up" guarda cierta correlación con el grado de afinidad de la BZD administrada, de tal manera que el RO 5 siendo la más potente sobre los RP-BZDs por su afinidad provoca el aumento mayor (45.11 %).

El tratamiento con DZ durante 14 días, en riñón, muestra resultados muy similares (aumento del número de RP-BZD de alrededor del 44.56 %). En corazón la dirección de los cambios es la misma a pesar de que la sensibilidad al tratamiento es un tanto mayor (aumento del 58.61 %).

Por el contrario, el tratamiento crónico con diazepam, que es una de las BZDs utilizada más frecuentemente en clínica, provoca una disminución significativa en la fijación del agonista periférico 3 H-RO 5-4864 en células intersticiales testiculares ($40.91 \pm 4.01\%$) en condiciones de saturación. También en este caso parece tratarse de un fenómeno de aumento en la cantidad de receptores. El tratamiento agudo no tiene consecuencias sobre los parámetros de fijación medidos.

Los RP-BZDs parecen capaces de ser regulados frente a tratamientos prolongados con BZDs, modificándose la densidad o número de sitios receptores encontrados.

Si bien los mecanismos subyacentes a la regulación aún distan de estar aclarados puede decirse que los distintos tejidos estudiados difieren en cuanto a la sensibilidad e incluso la dirección de los cambios provocados por la administración de BZDs.

El caso de las CIT podría tener especial importancia y será considerado separadamente en la sección "Función de los RP-BZDs".

3) Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre los RP-BZDs:

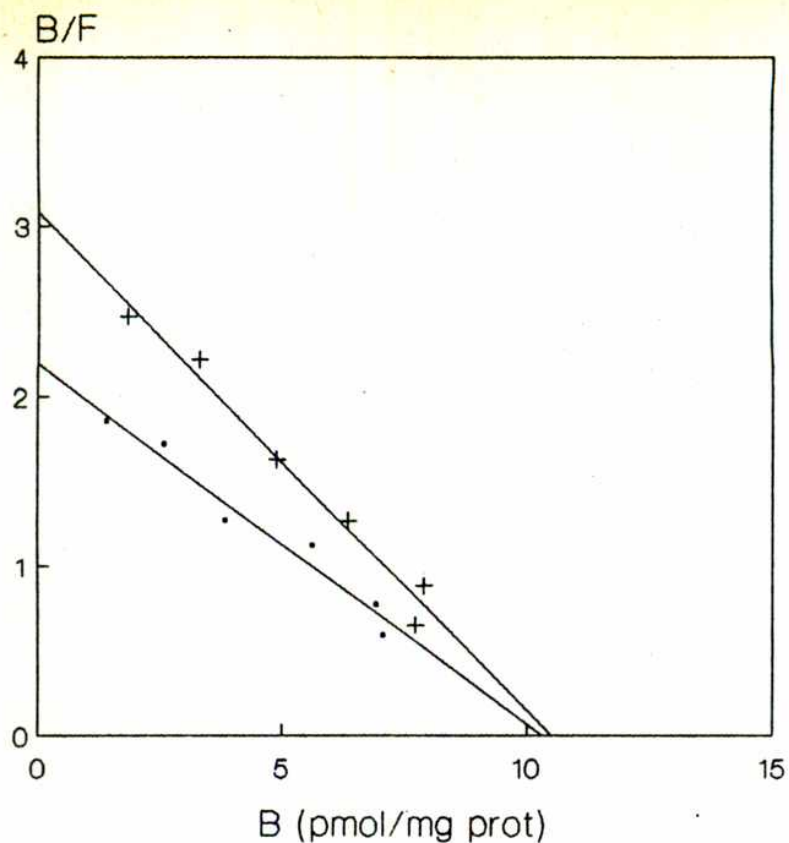
Es sabido que la exposición crónica de animales al etanol produce tolerancia y dependencia física, y el estudio de los mecanismos subyacentes y los efectos de éste sobre los sistemas receptores sigue siendo campo de intenso estudio.

Debido a que se encontró un efecto inhibitorio del etanol in vitro sobre la fijación de ^3H -RO 5-4864 tanto en membranas mitocondriales de riñón como de corteza cerebral de rata; que además el etanol es un modulador positivo del receptor de $\text{GABA}_A/\text{BZDs}$, siendo este receptor uno de los principales blancos de acción del etanol en el SNC (203 a 206 y 236 a 238); y dentro del marco de estudio de la regulación de los RP-BZDs se procedió a analizar el efecto del tratamiento crónico con EtOH sobre los RP-BZDs.

Resultados:

En la figura 37 se muestran los resultados de los experimentos en donde la dosis usada de EtOH fue de 15% durante 30 días, curvas de saturación realizadas en membranas mitocondriales de riñón de rata son representadas en un gráfico de Scatchard.

Fig 37



.control
+tratado

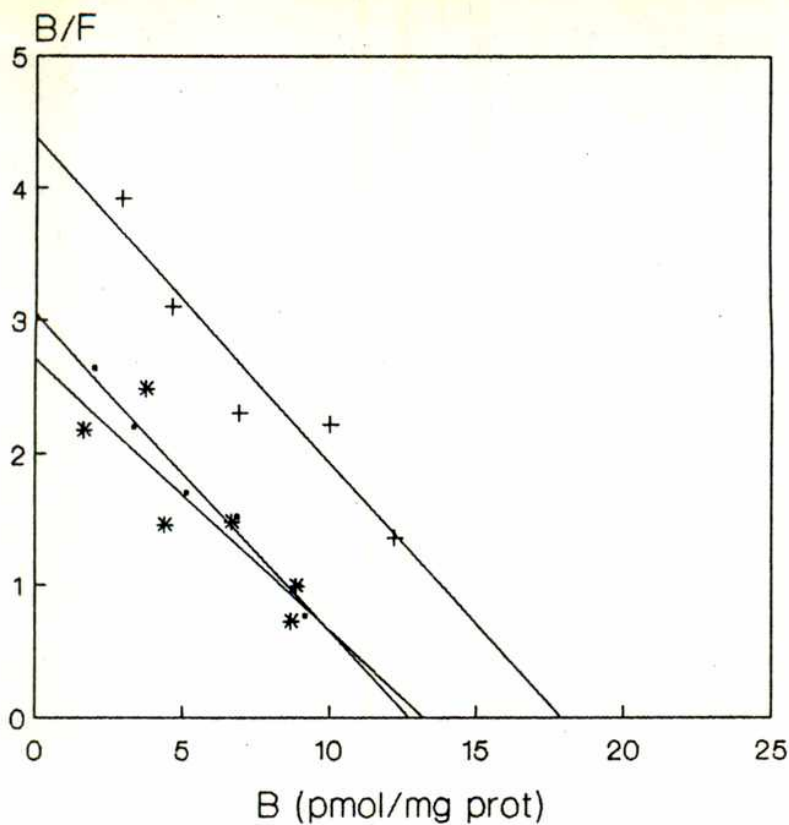
Los valores de los parámetros medidos fueron los siguientes:

Control: $B_{max} = 10.43 \pm 0.82$ pmol/mg prot y $K_d = 4.76$ nM (n=3).

15% EtOH: $B_{max} = 10.62 \pm 0.79$ pmol/mg prot y $K_d = 3.45$ nM (n=3).

La figura 38 muestra los resultados encontrados para la fijación de 3H -RO 5-4864 en membranas mitocondriales de riñón de rata, con un tratamiento por 12 semanas con EtOH 10 o 30%.

Fig 38



.control
+10% EtOH
•30% EtOH

Los valores de los parámetros medidos fueron los siguientes:

Control: $B_{max} = 12.50 \pm 1.64$ pmol/mg prot y $K_d = 4.16$ nM (n=3).

10% EtOH: $B_{max} = 17.50 \pm 1.29$ pmol/mg prot y $K_d = 4.07$ nM (n=3).

30% EtOH: $B_{max} = 13.01 \pm 1.37$ pmol/mg prot y $K_d = 4.64$ nM (n=3).

Conclusiones:

El tratamiento crónico con etanol provoca diferentes efectos sobre los RP-BZD de acuerdo a la duración. Mientras que para los animales que fueron tratados por 30 días con EtOH 15% se encontró un aumento de aproximadamente el 28% en la afinidad aparente de los RP-BZDs con respecto al control, las diferencias encontradas luego de una administración de EtOH más prolongada (de 12 semanas al 10%) fueron en el número de RP-BZDs. Por ahora se desconocen los motivos de las diferencias encontradas entre los tratamientos de 10 y 30% de EtOH crónico y será motivo de investigaciones futuras.

Se concluye que no solo los RC-BZDs son un blanco de acción del etanol, sino que también los RP-BZDs lo son.

El efecto del etanol en los RP-BZDs del sistema nervioso central (239 a 241) ha sido estudiado por otros autores, y se encuentra que en los animales tratados crónicamente hay un aumento en la fijación de ^3H -RO 5-4864 de entre el 20 y el 50% con relación a los controles.

Por otra parte estudios realizados en plaquetas de individuos alcohólicos muestran una reducción significativa en el número de RP-BZDs (240). Por lo tanto existen una serie de evidencias que nos permiten sugerir una modulación de los RP-BZDs luego de una administración prolongada de EtOH.

Funcion de los receptores perifericos

de Benzodiazepinas

Función de los RP-BZDs:

1) Elección de un modelo experimental que permita relacionar la ocupación de los receptores a BZDs de tipo periférico con una determinada respuesta biológica:

Uno de los puntos centrales en el estudio de las propiedades de los receptores periféricos a BZDs se refiere a la posibilidad de que la interacción de estos receptores con el ligando agonista RO 5-4864 desencadene posteriormente la activación de una respuesta biológica. Una serie de trabajos fueron realizados en este sentido (98, 99, 173 a 175).

Diferentes preparaciones en distintos tipos celulares y con diversas aproximaciones experimentales fueron escogidas y utilizadas para intentar dilucidar los posibles mecanismos intracelulares que pudieran otorgarle finalmente a estos receptores algún tipo de relevancia fisiológica.

Hipótesis actuales en discusión:

a) Acción sobre canales de calcio:

La mayor parte de estos experimentos fueron realizados en una preparación de corazón de cobayo y tienden a demostrar un acoplamiento de los RP-BZDs con canales de calcio, basándose principalmente en que el RO 5-4864 provoca una disminución de la duración de los potenciales de acción en estas células, evidenciándose por un aumento en la velocidad de repolarización. Además se observa una disminución, dependiente de la dosis y

antagonizable por PK 11195, de la contractibilidad de este tejido in vitro. Por otra parte estos autores demuestran la independencia del GABA para estos efectos y un perfil farmacológico claramente correspondiente a receptores benzodiazepínicos de tipo periférico, aunque los experimentos con agonistas de Ca^{2+} como BAY K 8644 o antagonistas como las dihidropiridinas arrojan resultados no del todo claros. Su baja potencia en ensayos de desplazamiento del binding de 3H -RO 5-4864, sumado a los resultados en ensayos de fotomarcado y separación en geles, en donde no se encuentra una correlación entre las bandas correspondientes a la fijación covalente de BZDs y las de antagonistas de Ca^{2+} son algunas de las objeciones más serias a esta hipótesis.

En este modelo experimental las diferencias encontradas entre la potencia biológica y la de fijación fueron explicadas por la presencia de la membrana plasmática como barrera de acceso a los RP-BZD de ubicación intracelular (242 a 250).

b) Acción sobre el metabolismo energético:

Basándose en la evidencia de que los RP-BZDs se hayan localizados mayoritariamente en la membrana mitocondrial externa se hipotetizó sobre su posible función como moduladores del metabolismo energético celular en virtud del papel central de esta organela en tales procesos.

Algunos trabajos fueron realizados en este sentido y demuestran la influencia de los ligandos benzodiazepínicos de tipo periférico sobre la función respiratoria mitocondrial y la fosforilación oxidativa de mitocondrias de riñón, hígado y adrenal de rata (251). Además en este modelo fue posible correlacionar su afinidad in vitro en la fijación de radioligandos y el efecto farmacológico observado

con la exposición de las mitocondrias a las BZDs de tipo periférico. Los autores concluyen que estas BZDs provocan una inhibición del control respiratorio mitocondrial debido a una disminución de la tasa de fosforilación oxidativa, mostrando una gran correlación con la afinidad de unión de las BZDs; además la magnitud del efecto del RO 5-4864 sobre la respiración se incrementa en paralelo con la densidad de receptores benzodiazepínicos mitocondriales en hígado, riñón y adrenal. Por otra parte observan un incremento en la velocidad de degradación de sustrato respiratorio.

Plantean entonces la posibilidad de que la interacción descrita pueda explicar los efectos pleiotrópicos de los ligandos de este receptor en una gran variedad de células intactas (41).

c) Modulación de la esteroidogénesis testicular:

En suspensiones de células intersticiales testiculares el agonista benzodiazepínico periférico RO 5-4864 estimula la producción de testosterona in vitro, tanto en forma basal como en condiciones de estimulación por gonadotropina coriónica humana (hCG), una hormona usada por su efecto similar-LH. Además el derivado isoquinolínico postulado como antagonista del RP-BZD, PK 11195, bloquea este efecto. Por otra parte los agonistas del RC-BZD no mostraron actividad (98 y 99).

Ya había sido demostrado mediante el uso técnicas autoradiográficas una localización preferencial de los RP-BZDs en tejidos que están involucrados en procesos relacionados con la esteroidogénesis (53). En la presente tesis, teniendo en cuenta las evidencias previas de la acción estimuladora del RO 5-4864 sobre la esteroidogénesis testicular, se eligió al testículo como posible blanco de acción de BZDs periféricas y a los RP-BZDs como posibles mediadores de los

efectos encontrados sobre la producción de esteroides en este órgano (99 y 252).

Cabe destacar que en este caso no existen diferencias observables entre la potencia biológica y la afinidad in vitro en la fijación de radioligandos. A pesar de la presencia de la membrana plasmática como barrera de acceso a los RP-BZD de ubicación intracelular.

En suma, nuestro modelo de producción de esteroides in vitro, serviría como bioensayo para evaluar la posibilidad de que el efecto farmacológico observado sea en verdad mediado por los RP-BZDs.

d) Efectos nucleares:

Existen trabajos que demuestran la localización nuclear de los RP-BZD y le asignan a los mismos diferentes roles en la función celular (50 y 65). La mayor parte de tales evidencias provienen de experimentos realizados en cultivos celulares y fueron ya oportunamente citadas en la introducción (ver Efectos del RO 5-4864).

Aquellas descripciones emparentadas con las acciones sobre la proliferación de distintos tipos celulares plantean fundamentalmente un mecanismo de acción que supone al núcleo como blanco de estas drogas (94 a 96). Está descrito un efecto estimulatorio sobre la síntesis de DNA en células C6 de una línea de glioma medido por incorporación de ^3H -Timidina al mismo tiempo que se observa incrementado el crecimiento celular. Contrariamente, el RO 5-4864 inhibe la proliferación en células de timoma de ratón y la captación de ^3H -Timidina. El RO 5-4864 también muestra una potenciación de la síntesis de DNA inducida por estradiol en la hipófisis anterior aumentando así mismo la incorporación de ^3H -Timidina (253 y 254).

2) Correlación entre los cambios en los RP-BZDs y la respuesta esteroidogénica testicular:

Hemos descrito el efecto estimulador del agonista benzodiazepínico periférico RO 5-4864, sobre esteroidogénesis. Dicho efecto podría estar mediado por receptores específicos (RP-BZD) los cuales, como se describió (en el ítem 5 de Caracterización de los RP-BZDs, en resultados), se hayan localizados principalmente en la fracción mitocondrial de células intersticiales testiculares (CIT). En el presente estudio se examinó el efecto del tratamiento crónico con BZD (DZ) sobre la respuesta esteroidogénica testicular y su modulación por ligandos benzodiazepínicos periféricos, con el objeto de correlacionar las posibles modificaciones encontradas en la respuesta medida in vitro con los parámetros de fijación ya descritos para este tipo de tratamiento.

Resultados:

a) Estimulación de la producción de esteroides testiculares por BZDs:

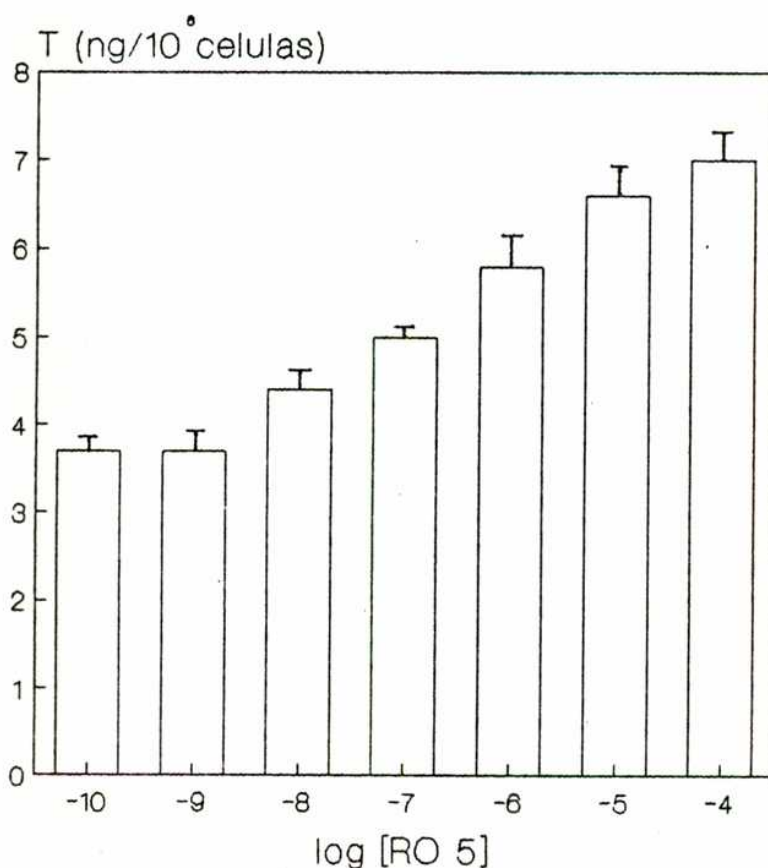
La hipótesis de trabajo en este caso fue que si los RP-BZDs poseen un papel en cierto modo importante en la modulación de la esteroidogénesis testicular, un cambio en sus propiedades de reconocimiento específico del radioligando ^3H -RO 5-4864 se podría ver reflejado en la respuesta que, se propone, es mediada por ellos. Para ello inicialmente se corroboró el efecto estimulador del RO 5-4864 sobre la producción de testosterona en CIT descrito previamente (98), y a posteriori se estudió el efecto del

tratamiento crónico con BZDs sobre la producción de esteroides in vitro y se lo analizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos donde se estudiaron los parámetros de fijación de los RP-BZDs luego del mismo tratamiento.

En la figura 39 puede verse que los niveles de producción basal de T, se ven aumentados con el incremento de la concentración de RO 5-4864.

El rango de acción de RO 5-4864 es del orden nanomolar y el PK 11195, posible antagonista del RP-BZD, bloquea la estimulación.

Fig 39



b) Efecto de la administración crónica de diazepam sobre la respuesta esteroidogénica testicular.

Para este estudio se administró diazepam (DZ) a una dosis de 3 mg/Kg durante 14 días en ratas, evaluándose el efecto sobre los RP-BZD testiculares y la modulación de la respuesta in vitro al RO 5-4864. La administración crónica de DZ causó una inhibición de la producción basal de testosterona (T) por las CIT (figura 40), observándose una leve estimulación en respuesta al aumento de la concentración de RO 5-4864 sólo con concentraciones elevadas ($>10^{-9}$ M). En las CIT del grupo control se observó una estimulación de la T producida, dependiente de la concentración de RO 5-4864 a partir de 10^{-7} M.

Además el tratamiento crónico provocó, como vimos anteriormente, una disminución del 41% (16.79 ± 1.46 vs. 10.38 ± 1.26 pmol/mg prot) en el número de RP-BZD, sin cambios en la afinidad.

Para el tratamiento con DZ en forma aguda, la producción in vitro de T por CIT fue ligeramente superior en el grupo tratado pero sin embargo la respuesta al RO 5-4864 fue comparable a los controles.

En la figura 41 se comparan los resultados obtenidos en los tres grupos distintos a saber: control, tratamiento crónico y agudo en cuatro condiciones experimentales distintas como son producción basal o estimulada con hCG en presencia o ausencia de RO 5 10^{-7} M.

Fig 40

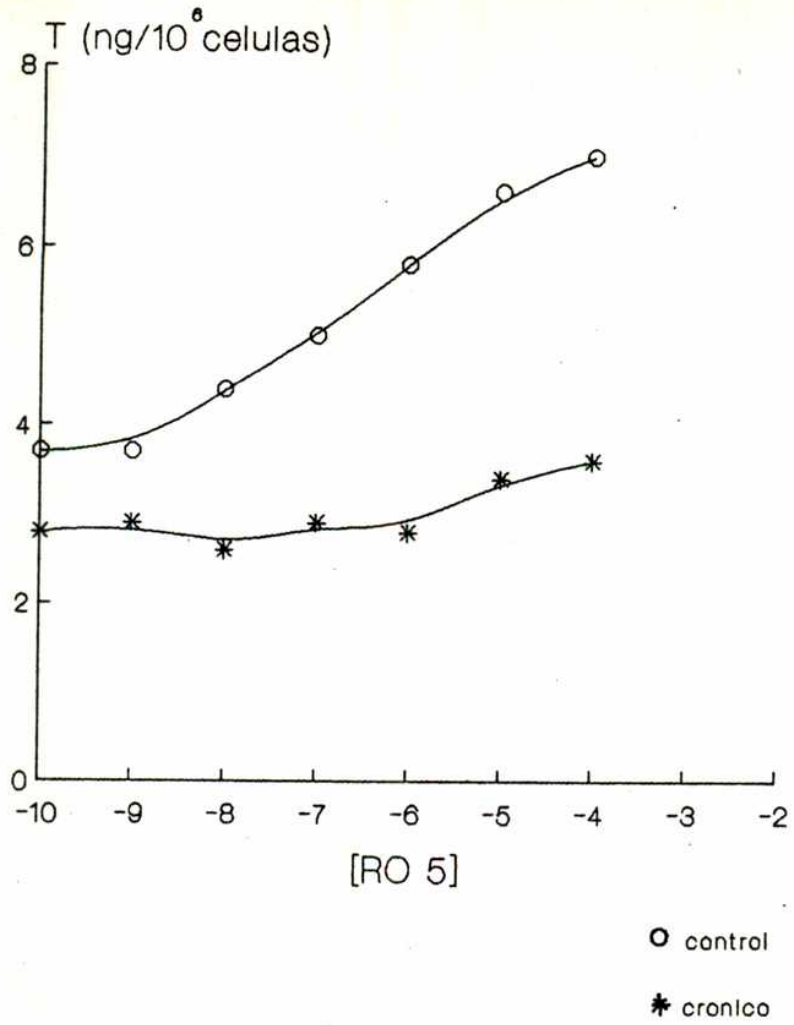
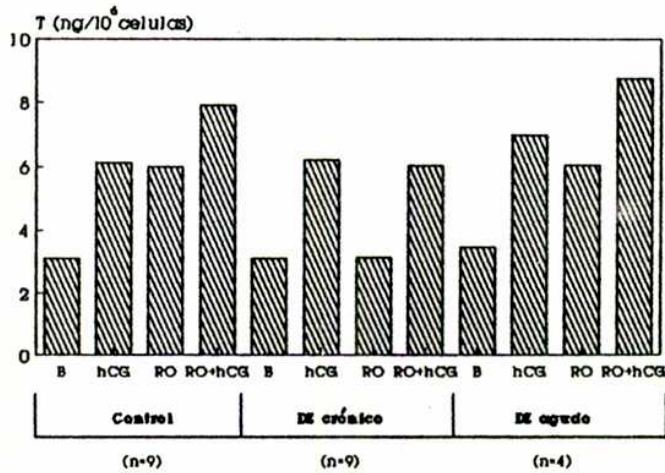


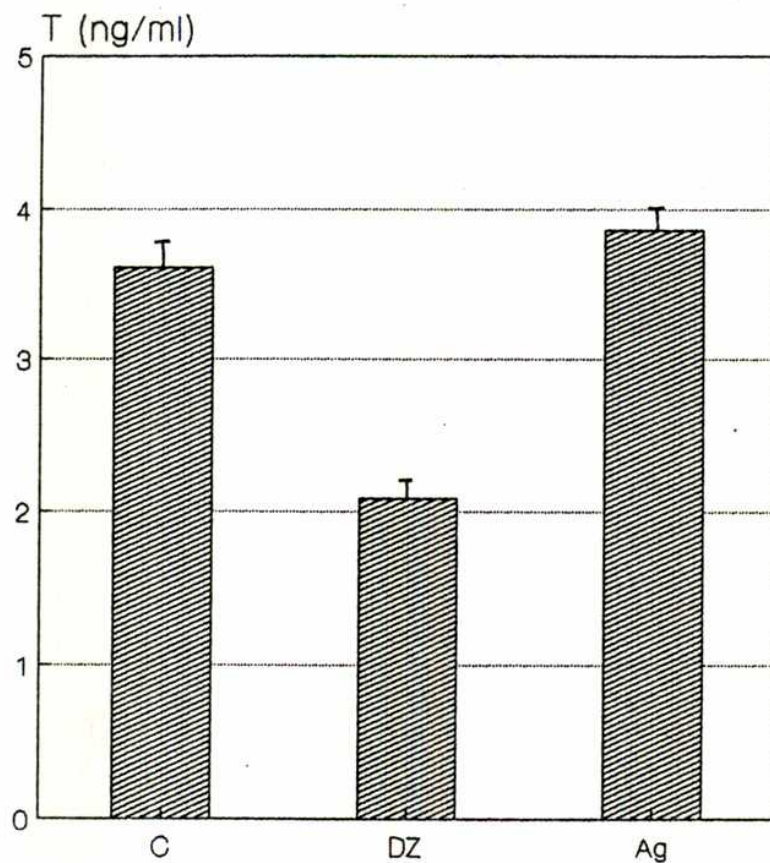
Fig 41

Efecto del Tratamiento crónico con DZ sobre la producción de Testosterona



Por otra parte, la administración prolongada de DZ produjo una disminución significativa en los niveles séricos de T (3.61 ± 0.34 vs. 2.09 ± 0.19), como puede verse en la figura 42 y no modificó significativamente los niveles plasmáticos de LH (tabla 10).

Fig42



La administración de una única dosis de DZ, tratamiento agudo, provocó un aumento en los niveles séricos de T (1.57 ± 0.20 vs. 3.86 ± 0.20), (tabla 10) y no modificó la LH periférica.

T A B L A 10 :

	T (ng/ml)	LH (ng/ml)
control	3.61 ± 0.34	2.88 ± 0.87
DZ crónico	2.09 ± 0.19 **	2.49 ± 0.54
control	3.57 ± 0.20	1.87 ± 0.18
DZ agudo	3.86 ± 0.19	1.61 ± 0.11

(n=8)

p(0.05)

Conclusiones:

En el presente estudio se corrobora el efecto estimulador de RO 5-4864 sobre la producción de esteroides testiculares y posteriormente se demuestra una disminución de la producción in vitro de T en CIT debido a la administración prolongada de DZ, una BZD ampliamente utilizada como ansiolítica en terapéutica.

Tanto la producción basal de T como la estimulación de ésta por RO 5-4864 son sensibles al tratamiento, no siendo así la capacidad estimuladora de la hCG, la cual permanece inalterada.

La falta de respuesta de las CIT a bajas concentraciones de RO 5-4864 puede correlacionarse con la reducción (40%) de la densidad de RP-BZDs en estas células como resultado del tratamiento crónico.

El tratamiento crónico con DZ no causa alteraciones de los niveles plasmáticos de LH sugiriendo un efecto testicular directo del DZ más que una modificación producida por alteraciones a nivel del SNC, sin embargo no se puede descartar que el tratamiento crónico con DZ pueda alterar uno ó más de los muchos otros factores que tienen influencia sobre la esteroidogénesis testicular.

Discussion

Discusión:

Se acepta en forma generalizada que las BZDs ejercen sus efectos sedantes, ansiolíticos y anticonvulsivantes sobre el SNC a través de su interacción de alta afinidad con los RC-BZDs. Algunas BZDs se unen también con alta afinidad y gran especificidad a receptores ubicados en numerosos tejidos periféricos, mostrando una relación estructura-actividad que difiere marcadamente de la encontrada para los receptores de tipo central. Estos receptores periféricos (RP-BZD) tienen una afinidad nM por DZ e interactúan débilmente con algunas drogas que son potentes a nivel del RC-BZD como el RO 15-1788 y el clonazepam, mientras que otra BZD como el RO 5-4864 tiene una potencia varios órdenes de magnitud mayor para los RP-BZDs que para los RC-BZDs (42 y 255).

Además como se ha visto, existen diferencias en cuanto a la distribución tisular y la localización subcelular.

El presente trabajo de tesis tuvo por objeto estudiar aspectos de los RP-BZDs tales como su caracterización, regulación y función en diferentes tejidos de la rata.

El análisis farmacológico y bioquímico de las preparaciones de membrana obtenidas de los distintos tejidos de la rata reveló que los RP-BZDs se encuentran concentrados en la fracción mitocondrial, mostrando un particular enriquecimiento en células de Leydig.

Este sistema ofrece un buen modelo para estudiar la acción de las BZDs sobre la esteroidogénesis. Los tejidos utilizados a lo largo de los distintos experimentos de esta tesis resultaron ser homogéneos con respecto a los RP-BZD en cuanto a sus propiedades farmacológicas.

El calcio participa de un gran número de procesos fisiológicos y se han demostrado distintas interacciones a nivel de las acciones de drogas hipnótico sedantes (256). Los RP-BZDs también son modulables por Ca^{2+} y otros cationes divalentes como Ca^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} .

Por otro lado algunos compuestos de interés clínico y farmacológico como el etanol y algunos flavonoides, muestran acciones diferenciales sobre los RP-BZDs y eficacias disímiles.

Los RP-BZDs parecen capaces de ser regulados frente a diversos tratamientos prolongados modificándose en algunos casos la densidad o número de sitios receptores y en otros la afinidad de los mismos. Si bien los mecanismos subyacentes a la regulación aún distan de estar aclarados, puede decirse que los distintos tejidos estudiados difieren a veces en la sensibilidad e incluso la dirección de los cambios provocados por la administración de fármacos.

Como surge de evidencias previas y de experimentos realizados en esta tesis, los RP-BZDs están sujetos a distintos mecanismos de control. Estos pueden ser esencialmente de naturaleza neural, farmacológica y hormonal.

Los RP-BZDs pueden estar involucrados en la respuesta del organismo al stress. De los experimentos que han sido presentados surge que los RP-BZDs son sensibles a cambios en el organismo (situaciones fisiopatológicas), pero sin embargo por medio de estos estudios no puede ser determinado si las alteraciones en los RP-BZDs se deben a la interrupción de influencias tróficas o regulatorias de centros de control locales o incluso superiores, o son el resultado de un desequilibrio fisiológico en general. Las respuestas de los RP-BZDs observadas bien pueden ser el reflejo de ajustes fisiológicos a condiciones cambiantes en el sistema debido a su alejamiento de la homeostasis endógena, o tal vez conformar una respuesta adaptativa

al stress en sí mismo. Varias manipulaciones neurales alteran la densidad de RP-BZD (257 y 258). Como hemos visto, a pesar de la designación de receptores periféricos, que originalmente resultó de su relativa ausencia en el cerebro, el desarrollo de radioligandos con mayor especificidad demostró posteriormente la existencia de estos sitios en el SNC. Las autoradiografías de cerebro de rata muestran un bajo y difuso nivel de binding por todo el parénquima cerebral, con una localización preferencial en el canal del epéndimo los plexos coroideos y las neuronas olfatorias. A pesar de que normalmente los cerebros de rata muestran bajos niveles de RP-BZDs luego de varios insultos al cerebro se puede observar un rápido y sustancial incremento en la densidad de RP-BZDs. Por ejemplo un aumento del 400% luego de una inyección intraestriatal o sistémica de excitotoxinas neuronales como el ácido kainico (259) o el 40 a 50% de aumento encontrado con el tratamientos con etanol crónico. Esta inducción rápida de RP-BZDs por insultos en el SNC pueden reflejar una respuesta metabólica de adaptación del cerebro análoga a la inducción de enzimas detoxificantes en el hígado. Por otra parte, la asociación de los RP-BZD a la glía en proliferación puede dar cuenta de los aumentos luego de la destrucción neuronal, y la gliosis asociada, ya que en tumores gliales se ha encontrado alta densidad de RP-BZD (40). Los tratamientos crónicos con BZDs modulan a los RP-BZD, esto podría indicar, en casos como el observado para células de Leydig, un proceso de desensibilización, pero los mecanismos precisos y el significado de tales cambios deben continuar siendo analizados (261, 271 y 272).

Dado que el DZ tiene una afinidad en el rango nM por estos sitios y que luego de un tratamiento con dosis terapéuticas de esta droga se alcanzan concentraciones circulantes del orden micromolar de DZ esto

podría influenciar a los RP-BZDs. Las funciones endócrinas también parecen regular a los RP-BZDs como lo demuestran los resultados encontrados en animales adrenalectomizados e hipofisectomizados (ver introducción). Hormonas como progesterona o gonadotrofinas y estrógenos ejercen una modulación de los RP-BZD cuando se administran exógenamente (262).

Aquí se demostró que el tratamiento crónico con DZ modula el número de RP-BZD y la estimulación de la producción in vitro de testosterona en respuesta al agonista RO 5-4864 tanto en condiciones basales como en presencia de hCG. En el presente estudio además, por primera vez se establece un correlato funcional entre ambos parámetros ya que se vieron modificados en forma simultánea en los animales inyectados crónicamente con DZ.

Evidencias previas y los presentes resultados sugieren un rol modulador de los RP-BZD en la respuesta hormonal esteroideogénica en células intersticiales testiculares (99 y 263 a 265).

Si bien es cierto que los valores de producción de hormonas esteroideas ante la clásica estimulación por LH son varias veces mayores que el rango de modulación mostrado por las BZDs, pueden tener gran importancia fenómenos de "sintonía fina" como mecanismos responsables de corto y largo plazo para alcanzar esta regulación.

La administración de BZDs por tiempos prolongados es ampliamente usada en terapias corrientes para evitar estados de ansiedad. Los estudios aquí presentados sugieren que estas drogas pueden influenciar las funciones endócrinas periféricas además de provocar los efectos bien conocidos a nivel del SNC (266 y 267).

En realidad la administración in vivo de DZ da resultados en gran medida conflictivos sobre la función endócrina sexual.

Argüelles y Rosner (268) encontraron que los niveles plasmáticos de testosterona estaban significativamente aumentados en seres humanos

que habian consumido de 10 a 20 mg/Kg de DZ durante 2 semanas. Por otra parte se ha reportado que el tratamiento crónico con altas dosis de DZ (50 mg/Kg) no provoca cambios en los niveles plasmáticos de LH, FSH o testosterona (269). Sin embargo otros autores encontraron que el mismo tratamiento determina una reducción significativa de los niveles de testosterona plasmática conjuntamente con una marcada reducción del peso de la parte ventral de la próstata (268). Como se citó anteriormente en nuestras manos una única inyección de DZ causa un incremento transitorio de los niveles plasmáticos de T apoyando de este modo la hipótesis de un efecto estimulador directo de las BZDs sobre la esteroidogénesis testicular. La razón de la discrepancia observada en los diferentes trabajos comentados puede encontrarse en que los distintos protocolos experimentales las dosis y las especies animales varían y serían necesarios experimentos adicionales para establecer los mecanismos detalladamente.

Sin embargo es importante también tener presente la posibilidad de otros tipos de interacciones de las BZDs sobre el sistema neuroendócrino, en virtud de la presencia de receptores a BZDs centrales y periféricos en áreas claves de este sistema como son hipotálamo, hipófisis y glándula pineal (266 y 267).

Establecer la identidad de los ligandos endógenos de estos sitios facilitaría en gran medida profundizar el estudio de la función de los RP-BZDs. Nosotros hemos purificado fracciones con actividad inhibitoria de algunos tejidos de la rata y en base a nuestros experimentos y a evidencias previas postulamos a algunas Pfs como responsables de la actividad inhibitoria. Algunos aspectos de la acción de las Pfs sobre los receptores sugieren que tienen un rol fisiológico en asociación con estos sitios (271 y 272). En contraste con la potencia micromolar de DBI-endozepina, las Pfs tienen

acciones en el rango nM. Por otro lado, la potencia relativa de un amplio número de Pfs varía marcadamente, y las más potentes tienen actividad fisiológica. Por ejemplo Hemo, Protoporfirina IX, mesoporfirina IX deuteroporfirina IX son Pfs de origen natural con afinidad sustancial por estos receptores, los precursores copro y uroporfirina son mucho más débiles que la IX así como también los productos de degradación biliverdina y bilirrubina.

El concepto de Pfs como ligandos endógenos del receptor también ajusta con la localización mitocondrial de los RP-BZDs. Los pasos iniciales y finales de la biosíntesis de Pfs tienen lugar en esta organela y por lo tanto los precursores de IX y heme deben cruzar la membrana mitocondrial. Algunas proteínas citosólicas usan Pfs como grupo prostético y otras mitocondriales como los citocromos podrían tener cierta relevancia o asociación con los RP-BZDs. Los citocromos contienen hemo y se ubican en la membrana interna y la membrana externa mitocondrial. La alta densidad de RP-BZD en la corteza adrenal y en células productoras de esteroides de testículo y ovario puede estar asociada a esto ya que los citocromos están involucrados en la biosíntesis de esteroides adrenales y gonadales. Proteínas como la triptofanopirrolasa une hemo en forma no covalente y el nivel de saturación de pfs determina la actividad enzimática (43) y posiblemente algo así module al RP-BZDs.

A pesar de los esfuerzos realizados por diferentes grupos de investigación para dilucidar lo/s compuestos naturales que modulen endógenamente al RP-BZD, no se han encontrado hasta el presente ligandos fisiológicos que desempeñen tal papel.

Resumen:

a) Caracterización de los RP-BZDs:

1) Se caracterizó a los RP-BZDs de diferentes tejidos de la rata por fijación de ^3H -RO 5-4864.

2) Cationes divalentes como Ca^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} modulan la fijación de ^3H -RO 5-4864, sin alterar la unión de antagonistas. Esta regulación es temperatura dependiente.

Algunos lípidos modulan al RP-BZD como el AA, el cual muestra un efecto similar al calcio. Estudios futuros podrían estudiar más detalladamente tal interacción.

3) Productos farmacológicos o de origen natural como el etanol o los flavonoides reconocen con potencia variada a los RP-BZDs.

4) Se purificó parcialmente una fracción capaz de desplazar la fijación de ^3H -RO 5-4864 con R_f similar a algunas Pfs naturales. Se especula sobre la posible existencia de ligandos endógenos fisiológicos del RP-BZD.

5) Se estudió la localización subcelular de los RP-BZD en células intersticiales testiculares y se los caracterizó farmacológicamente. Los RP-BZDs resultaron estar especialmente concentrados en las mitocondrias de este tipo celular.

Regulación de los RP-BZDs:

1) Durante el stress agudo aumenta la densidad de RP-BZDs en rión y bulbo olfatorio.

2) El tratamiento crónico con BZDs regula diferencialmente las propiedades de los RP-BZD en distintos tejidos.

3) El tratamiento crónico con etanol modula las propiedades de los RP-BZD.


Función de los RP-BZDs:

1) Se seleccionó un modelo experimental para el estudio de la función de los RP-BZDs: células testiculares de Leydig.

Se propone y discute el rol de las BZDs periféricas sobre la respuesta esteroidogénica. El RO 5-4864 provoca una estimulación de la producción basal o hCG inducida de testosterona.

2) La disminución en el número de RP-BZDs resultado del tratamiento crónico con diazepam correlaciona con una reducción marcada en la estimulación de la producción de testosterona por RO 5-4864.


DANIEL J. CALVO


Dr. JORGE H. MEDINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FISIOLÓGIA CELULAR
FACULTAD DE MEDICINA
PABELLÓN 1156 (C.P. 1121)
Buenos Aires - Argentina

Bibliografia

- 1) Receptors for the age of anxiety: pharmacology of the BZDs.
Tallman J.P., Paul S.M., Skolnick P. y Gallager D.W. Science 207,
pp: 274-280 (1980).
- 2) Pharmacology of BZDs.
Haefely W., Kyburz E., Gerecke M. y Möhler H. Advances in drug
research Academic Press vol 14, pp: 165-283(1985).
- 3) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Hipnóticos y
sedantes. Harvey S.
Goodman y Gilman 7^o Edición, Cap 17, pp: 335-345 (1986).
- 4) The psychosedative properties of methaminodiazepoxide.
Randall L., Schallek W., Heise G., Keith E. y Bagdon R. J Pharm Exp
Ther 129, pp: 163-171 (1960).
- 5) Natural BZDs in the brain. Possible biological roles.
Medina J.H. Comunicaciones Biológicas vol 8, pp: 217-234 (1990).
- 6) Electrophysiology of Benzodiazepine Receptor Ligands: Multiple
mechanisms and sites of actions.
Polc P. Progress in Neurobiology 31, pp: 349-423 (1988).
- 7) The effect of diazepam on atrial automaticity is not mediated by
BZDs receptors.
Ruiz F., Hernandez J. y Perez D. Arch Int Pharm & Ther 299, pp:
77-85 (1989).
- 8) Benzodiazepine RO 5-4864 increases coronary flow.
Grupp I.L., French J.F. y Matlib M.A. Eur J Pharm 143, pp: 143-147
(1987).
- 9) Non-benzodiazepine anxiolytics and hypnotics.
Proceedings of a Symposium at the Istituto Superiore di Sanita. Roma
Italia. Ed: Pharm Biochem & Behav 29, pp: 759-833 (1988).
- 10) Pharmacology of the allosteric modulation of GABA_A receptors by
BZD receptor ligands.
Haefely W.E. Allosteric modulation of aminoacids receptors:
Therapeutic implications. Ed. Barnard y Costa, Raven Press pp: 47-69
(1989).
- 11) Pharmacology of the BZD receptor.
Haefely W. Eur Arch Psychiat Neurol Sci 238, pp: 294-301 (1989).
- 12) Heterogeneity of BZD binding sites: a review of recent research.
Hirsch J.D., Garret K.M. y Beer B. Pharm Biochem & Behav vol 23,
681-685 (1985).
- 13) Die wirkung von diazepam auf die präsynaptische hemmung und
andere rückenmarksreflexe.
Schmidt R., Vogel M. y Zimmerman M. Arch Exp Patjol Pharmacol 253,
pp: 69-82 (1967).
- 14) The effect of chlorodiazepoxide, diazepam and nitrazepam on
catecholamine metabolism in regions of the rat brain.
Taylor K. y Laverty R. Eur J Pharm 8, pp: 296-301 (1969).

- 15) Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system.
Young A. y Snyder S. Proc Natl Acad Sci USA 70, pp: 2832-2836 (1973).
- 16) The effect of diazepam on spinal cord activities: possible sites and mechanisms of action.
Polc P., Möhler H. y Haefely W. Naunyn Schm Arch Exp Path Pharm 284, pp: 319-337 (1974).
- 17) Diazepam and its anomalous p-Chloro-derivative Ro 5-4864: Comparative effects on mouse neurons in cell culture".
Skerritt J.H., M.A. Werz , M.J. McLean y R.L. Macdonald. Brain Res 310, pp: 99-105 (1984).
- 18) The role of gamma-aminobutyric acid in the action of 1,4-benzodiazepines.
Costa E. Trends in Pharmacological Sciences, pp: 41-44 Octubre (1979).
- 19) Molecular mechanisms in the receptor action of BZDs.
Costa E. y Guidotti A. Ann Rev Pharmacol Toxicol 19, pp: 531-545 (1979).
- 20) Inhibition of rat brain adenylate ciclase activity by BZD through the effects on Gi and catalitic proteins.
Danura T., Kurokawa T. y Ishibashi S. Life Sci 42, pp: 469-475 (1988).
- 21) Benzodiazepine inhibition of the Calcium-Calmodulin Protein Kinase system in brain membrane.
De Lorenzo R.J., S. Burdette y J. Holderness. Science Vol 213, pp: 546-549 (1981).
- 22) Identification of a high-affinity peripheral-type BZD binding site in rat aortic smooth muscle membranes.
French J.F. y Matlib M. J Pharm Exp Ther 247, pp: 23-28 (1988).
- 23) The in vitro effects of BZDs on the rat diaphragm. Structure-activity relationships.
Driessen J., Van Egmond J., Vrei T., Boou L. y Crul J. Can J Physiol Pharmacol 63, pp: 444-448 (1984).
- 24) Specific BZD receptors in the rat brain characterized by high-affinity 3 H-Diazepam binding.
Braestrup C y R.E. Squires. Proc Natl Acad Sci USA vol 74, pp: 3805-3809 (1977).
- 25) Benzodiazepine receptors in the rat brain.
Squires R.F. y Braestrup C. Nature 266, pp: 732-734 (1977).
- 26) Benzodiazepine receptors: Demonstration in the central nervous system.
Möhler, H. y T. Okada. Science vol 198, pp: 849-851 (1977).
- 27) Criteria for receptor sites in binding studies.
Laduron P. Biochem Pharmacol 33, pp: 833-839 (1984).

- 28) The GABA_A receptor-gated ion channel: Biochemical and pharmacological studies of structure and function.
Schwartz R. Biochem Pharm vol 37 N^o18, pp: 3369-3375 (1988).
- 29) Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily.
Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse A., Seeburg P.H. y Barnard E.A. Nature 328, pp: 221-227 (1987).
- 30) Differences in the negative allosteric modulation of GABA receptors elicited by RO 5-4864 and by a β -carboline-3-carboxylate ester: a study with natural and reconstituted receptors.
Puja G., Santi M, Vicini S., Pritchett D., Seeburg P. y Costa E. Proc Natl Acad Sci USA 86, pp: 7275-7279 (1989).
- 31) Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition.
Verdoorn T., Seeburg P. y Sakmann B. Neuron 4, pp: 919-928 (1990).
- 32) Benzodiazepine receptors.
Squires R.F. Handbook of Neurochemistry vol 6, Receptors in the nervous system. Cap. 10, pp: 261-306 (1984).
- 33) GABAergic neurotransmission: an overview.
De Robertis E. GABA and endocrine function, Ed. Racagni y Donoso Raven Press, pp: 1-12 (1986).
- 34) A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system.
Dutar P. y Nicoll R. Nature 332, pp: 156-158 (1988).
- 35) Characterization of peripheral-type BZD binding sites in brain using ³H-RO 5-4864.
Marangos P.J., Patel J., Boulenger J.P. y Clark-Roseberg R. Mol Pharmacol 22, pp: 26-32 (1982).
- 36) Central and peripheral-type BZD receptors.
Martini C., Lucacchini A., Hrelia S. y Rossi C.A. GABAergic transmission and Anxiety Ed. Biggio, Costa. Raven Press. pp: 1-10 (1986).
- 37) Peripheral-type BZD binding sites in rat adrenals: binding studies with ³H-PK 11195 an autoradiographic localization.
Benavides J., Malgouris C., Imbault F., Begassat F., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M.C., Gueremy C. y Le Fur G. Arch Int Pharmacodyn Therapie 266, pp: 38-49 (1983).
- 38) Specific high-affinity binding sites for ³H-RO 5-4864 in rat brain and kidney.
Schoemaker H., R.G. Boles, W. Dale Horst y H.I. Yamamura. J Pharm Exp Ther Vol 225 N^o1, pp: 61-69 (1983).
- 39) Specific high-affinity saturable binding of ³H-RO 5-4864 to BZD binding sites in the rat cerebral cortex.
Schoemaker H., Bliss M. y Yamamura H.I. Eur J Pharm 71, pp: 173-175 (1981).

- 40) Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human cerebral tumors.
Ferrarese C., Appollonio I., Frigo M. y Frattola L. *Ann Neurol* 26, pp: 564-568 (1989).
- 41) Mitochondrial BZD receptors as potential modulators of intermediary metabolism.
Anholt R.R.H. *Trends in Pharmacological Sciences*, Diciembre, pp: 506-511 (1986).
- 42) Characteristics of an atypical benzodiazepine, RO 5-4864.
Pellow S. y File S. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* vol 8, pp: 405-413 (1984).
- 43) Peripheral-type BZD receptors.
Verma A. y Snyder S. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29, pp: 307-322 (1989).
- 44) Electrophysiological pharmacology of GABA and diazepam in cultured CNS neurons.
Barker J.L. y Owen D.G. *Receptor Biochemistry and Methodology* vol 5, Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels. Structural and functional properties. Cap 6, pp: 135-165 (1986).
- 45) Modulation of the chloride ionophore by BZD receptor ligands: Influence of GABA and ligand efficacy.
Gee K., L. Lawrence y H. Yamamura. *Mol Pharm* vol 30, pp: 218-225 (1986).
- 46) Comparison of typical and atypical benzodiazepines on the central and peripheral benzodiazepine receptors.
Watanabe Y., T. Shibuya, S. Khatami y B.C Salafsky. *Japan J Pharmacol* 42, pp: 189-197 (1986).
- 47) Differential effects of GABA on peripheral and central type BZD binding sites in brain.
Patel J. y Marangos P.J. *Neurosci Letters* 30, pp: 157-160 (1982).
- 48) Peripheral-type BZD receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats.
Anholt R.R.H., De Souza E.B., Oster-Granite M.L. y Snyder S.H. *J Pharm Exp Ther* vol 233 N°2, pp: 517-526 (1985).
- 49) The peripheral-type BZD receptor: localization to the mitochondrial outer membrane.
Anholt R.R.H., Pedersen P.L., De Souza E.B. y Snyder S.H. *J Biol Chem* vol 261 N°2, pp: 576-583 (1986).
- 50) Subcellular localization of peripheral-type binding sites for BZD in rat brain.
Basile A.S. y Skolnick P. *J Neurochem* 46, pp: 305-308 (1986).
- 51) The subcellular location in rat kidney of the peripheral BZD acceptor.
O'Beirne G.B. y Williams D.C. *Eur J Biochem* 175, pp: 413-421 (1988).

- 52) Characterization of ligand binding to mitochondrial BZD receptors.
Hirsch J.D., Beyer C.F., Malkowitz L. y Blume A.J. Mol Pharm 34, pp: 164-172 (1988).
- 53) Peripheral-type BZD receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis.
De Souza E.B., Anholt R.R.H., Murphy K.M.M., Snyder S.H. y Kuhar M.J. Endocrinology vol 116 N°2, pp: 567-573 (1985).
- 54) Peripheral BZD binding sites in human brain and kidney: autoradiographic studies.
Pazos A., Cymerman U., Probst A. y Palacios J.M. Neurosci Lett 66, pp: 147-152 (1986).
- 55) Benzodiazepine receptors along the nephron: ^3H -PK 11195 binding in rat tubules.
Butlen D. FEBS Letters Vol 169 N° 2, pp: 138-142 (1984).
- 56) Peripheral-type BZD receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves.
Anholt R.R.H., Murphy K.M.M., Mack G.E. y Snyder S.H. J Neurosci vol 4 N°2, pp: 593-603 (1984).
- 57) Regional distribution of a RO 5-4864 binding site that is functionally coupled to the γ -aminobutyric acid/BZD receptor complex in rat brain.
Gee K., R. Brinton y B. McEwen. J Pharm Exp Ther vol 244 N°1, pp: 379-383 (1988).
- 58) Characterization of BZD binding sites of neural origin.
Syapin P.J. y Skolnick P. J Neurochem 32, pp: 1047-1051 (1979).
- 59) Characterization of BZD receptors in the bovine pineal gland: evidence for the presence of an atypical binding site.
Basile A.S., Klein D.C. y Skolnick P. Mol Brain Res 1, pp: 127-135 (1986).
- 60) Labeling of peripheral-type BZD binding sites in the rat brain by using ^3H -PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization.
Benavides J., Quarteronet D., Imbault F., Malgouris C., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M.C., Guérémy C. y Le Fur G. J Neurochem 41, pp: 1744-1750 (1983).
- 61) Micromolar affinity BZD receptors: identification and characterization in central nervous system.
Bowling A.G. y De Lorenzo R.J. Science 216, pp: 1247-1250 (1982).
- 62) Binding sites for a peripheral type BZD antagonist (^3H -PK 11195) in human iris.
Valtier D., Malgouris C. y Meyer P. Neuropharmacology 26, pp: 549-552 (1987).
- 63) Characterization of a peripheral type BZD binding site on human circulating lymphocytes.
Moingeon P.H., Bidart J.M., Alberici G.F. y Bohuon C. Eur J Pharm 92, pp: 147-149 (1983).

- 64) Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes.
Olson J.M.M., B.J. Ciliax, W.R. Mancini y A.B. Young. Eur J Pharm 152, pp: 47-53 (1988).
- 65) ^3H -RO 5-4864 binding sites in the nucleus of rat lymphocytes.
Rägo L., Adojaan A. y Masso R. Eur J Pharm 187, pp: 561-562 (1990).
- 66) Interaction of benzodiazepines with mouse macrophages.
Zavala F., J. Haumont y M. Lenfant. Eur J Pharm 106, pp: 561-566 (1985).
- 67) Inhibition of platelet aggregation by some benzodiazepines.
Cuparencu B., I. Trif, J. Horak, M. Cucuianu, L. Balazs, C. Lo Sasso, M.G. Matera, A. Loffreda y E. Marmo. Current Therapeutic Research Vol 45 N02 (1989).
- 68) Properties of two BZD binding sites in spinal cord.
Del Zompo M., Post R.M. y Tallman J.F. Neuropharmacology 22, pp: 115-118 (1983).
- 69) Modification of the peripheral-type BZD receptor by arachidonate, diethylpyrocarbonate and thiol reagents.
Skowronski R., Beaumont K. y Fanestil D.D. Eur J Pharm 143, pp: 305-314 (1988).
- 70) Differential sensitivity of central and peripheral type BZD receptors to phospholipase A_2 .
Havoundjian H., Cohen R.M., Paul S.M. y Skolnick P. J Neurochem 46, pp: 804-811 (1986).
- 71) Purification and characterization of an endogenous protein modulator of radioligand binding to peripheral-type BZD receptors and dihydropyridine calcium channel antagonist binding sites.
Mantione C., Goldman M., Martin B., Bolger G. y Skolnick P. Biochem Pharm 37, pp: 339-347 (1988).
- 72) Solubilization and reassembly of the mitochondrial BZD receptor.
Anholt R.R.H., Aebi U., Pedersen P.L. y Snyder S.H. Biochemistry 25 N08, pp: 2120-2125 (1986).
- 73) Solubilization of peripheral-type benzodiazepine binding sites from cat cerebral cortex.
Awad M. y M. Gavish. J Neurochem 52, pp: 1880-1885 (1989).
- 74) Differential effect of detergents on ^3H -RO 5-4864 and ^3H -PK 11195 binding to peripheral-type benzodiazepine binding sites.
Awad M. y M. Gavish. Life Sci Vol 43, pp: 167-175 (1988).
- 75) Solubilization and characterization of the liver peripheral-type benzodiazepine receptor.
Parola A.L., C.W. Putnam, D. Haddock Russell y H.E. Laird. J Pharm Exp Ther vol 250 N03, pp: 1149-1155 (1989).
- 76) In situ molecular weight determination of brain and peripheral BZD binding sites.
Paul S.M., Kempner E.S. y Skolnick P. Eur J Pharm 76, pp: 465-466 (1981).

- 77) Partial purification and pharmacology of peripheral-type benzodiazepine receptors.
Doble A., M.C. Burgevin, J. Ménager, O. Ferris, F. Bégassat, C. Renault, M.C. Dubroeuq, C. Guérémy, A. Uzan y G. Le Fur. Journal of Receptor Research vol 7 N^o1-4, pp: 55-70 (1987).
- 78) Photoaffinity labeling of peripheral-type BZD binding sites.
Doble A., Ferris O., Burgevin M.C., Ménager J., Uzan A., Dubroeuq M.C., Renault C., Guérémy C. y Le Fur G. Mol Pharmacol 31, pp: 42-49 (1987).
- 79) Photoaffinity labeling of peripheral-type BZD receptors in rat kidney mitochondria with ³H-PK 14105.
Skowronski R., Fanestil D.D. y Beaumont K. Eur J Pharm 148, pp: 187-193 (1988).
- 80) AHN 086: an irreversible ligand of peripheral benzodiazepine receptors.
Lueddens H.W.M., A.H. Newman, C.K. Rice y P.A Skolnick. Mol Pharm 29, pp: 540-545 (1986).
- 81) Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands.
Antikiewicz-Michaluk L.A., Guidotti y K.E. Krueger. Mol Pharm 34, pp: 272-278 (1988).
- 82) Purification and characterization of a protein associated with peripheral-type benzodiazepine binding sites.
Antikiewicz-Michaluk L., A.G. Mukhin, A. Guidotti y K.E.J. Krueger. J Biol Chem vol 263 N^o33, pp: 17317-17321 (1988).
- 83) Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes.
Benz R. C.R.C. Crit Rev Biochem 19, pp: 145-190 (1985).
- 84) The 35 KDa DCCD-binding protein from pig heart mitochondria is the mitochondrial porin.
De Pinto V., Tommasino M., Benz R. y Palmieri F. Biochim & Biophys Acta 813, pp: 230-242 (1985).
- 85) The peripheral high affinity BZD binding site is not coupled to the cardiac calcium channel.
Holck M. y Osterrieder W. Eur J Pharm 118, pp: 293-301 (1985).
- 86) Gene structure and regulation of the peripheral-type BZD receptor.
Casalotti S., Pelaia G. y Krueger K. Biological Psychiatry 29, pp: 178-179 (1991).
- 87) Molecular biology of human peripheral BZD receptors.
Le Fur G. Biological Psychiatry 29, pp: 178-179 (1991).
- 88) Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral BZD receptors in a guinea-pig heart preparation.
Mestre M., Carriot T., Belin C., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M.C., Guérémy C. y Le Fur G. Life Sci 35, pp: 953-962 (1984).
- 89) Peripheral BZD binding sites: efect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolin ecarboxa mide. I in vitro studies.

Le Fur G., Perrier M., Vaucher N., Imbault F., Flamier A., Benavides J., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M.C. y Guérémy C. Life Sci 32, pp: 1839-1847 (1983).

90) Stereoselective inhibition of the binding of ^3H -PK 11195 to peripheral-type BZD binding sites by a quinolinepropanamide derivative.

Dubroeuq M.C., Benavides J., Doble A., Guilloux F., Allam D., Vaucher N., Bertrand P., Guérémy C., Renault C., Uzan A. y Le Fur G. Eur J Pharm 128, pp: 269-272 (1986).

91) Benzodiazepine receptor occupancy in vivo. Correlation with brain concentrations and pharmacodynamic actions.

Miller L., Greenblatt D., Paul S. y Shader R. J Pharm Exp Ther 240, pp: 516-522 (1987).

92) Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral benzodiazepine receptors in a guinea pig heart preparation.

Mestre M., Carriot C., Belin C., Uzan A. y Le Fur G. Life Sci 35, pp: 953-962 (1984).

93) Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active BZDs.

Curran T. y Morgan M. Science 229, pp: 1265-1268 (1985).

94) Benzodiazepines have high-affinity binding sites and induce melanogenesis in B16/C3 melanoma cells.

Matthew E., J.D. Laskin, E.A. Zimmerman, I.B. Weinstein, K.C. Hsu y D.L. Engelhardt. Proc Natl Acad Sci USA Vol 78, pp: 3935-3939 (1981).

95) Effects of benzodiazepines on thymus cell proliferation.

Stepien H., A. Pawlikowska y M. Pawlikowski. Thymus 12, pp: 117-121 (1988).

96) Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation.

Wang J.K.T., J.I. Morgan y S. Spector. Proc Natl Acad Sci USA Vol 81, pp: 753-756 (1984).

97) Differential effects of BZDs on phospholipid methylation in hippocampus and cerebellum of rats.

Tacconi M.T. y Salmona M. Life Sci 42, pp: 525-531 (1988).

98) Effect of GABA and BZD on testicular androgen production.

Ritta M.N., Campos M.B. y Calandra R.S. Life Sci 40, pp: 791-798 (1987).

99) Testicular interstitial cells as targets for peripheral benzodiazepines.

Ritta M.N. y Calandra R.S. Neuroendocrinology 49, pp: 262-266 (1989).

100) PK 11195 an antagonist of peripheral BZD receptors reduces ventricular arrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion in the dog.

Mestre M., Bouetard G., Uzan A. y Le Fur G. Eur J Pharm 112, pp: 257-260 (1985).

101) Peripheral benzodiazepine binding sites in Nb 2 node lymphoma cells: Effects on prolactin-stimulated proliferation and ornithine decarboxylase activity.

Laird H.E., K.E. Gerrish, K.C. Duerson, C.W. Putnam y D. Haddock Russell. Eur J Pharm 171, pp: 25-35 (1989).

102) Effect of PK 11195, an antagonist of benzodiazepine receptors, on platelet aggregation en a model of anxiety in the rat.

Serrano J.S., A. Hevia, A. Fernández-Alonso y J.R. Castillo. Gen Pharmacol Vol 19 N^o4, pp: 573-577 (1988).

103) Antagonism of flurazepam and other effects of RO 15-1788, PK 8165 and RO 5-4864 on the GABA_A receptor complex in rat cuneate nucleus.

Simmonds M.A. Eur J Pharm 117, pp: 51-60 (1985).

104) Effect of benzodiazepines on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro.

Pawlikowski M., K. Lysón, J. Kunert-Radek y H. J. Stepién. Neural Transm 73, pp: 161-166 (1988).

105) Peripheral-type BZD influence ornithine decarboxylase levels and neurite outgrowth in PC 12 cells.

Morgan J., Johnson M., Wang J. y Spector S. Proc Natl Acad Sci USA 82, pp: 5223-5226 (1985).

106) Differentiation of Friend erythroleukemia cells induced by benzodiazepines.

Wang J.K.T., J.l. Morgan y S. Spector. Proc Natl Acad Sci USA vol 81, pp: 3770-3772 (1984).

107) Pyruvate dehydrogenase interaction with peripheral-type benzodiazepine receptors.

Daval J., R.M. Post y P.J. Marangos. J Neurochem 53, pp: 110-115 (1989).

108) Benzodiazepine inhibition of nucleoside transport in human erythrocytes.

Hammond J., Jarvis S., Paterson A. y Clanachan A. Biochem Pharmacol 32, pp: 1229-1235 (1983).

109) Platelet-activating factor-induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines.

Kornecki E, Ehrlich Y. y Lenox R.H. Science 226, pp: 1454-1456 (1984).

110) Effects of peripheral BZDs upon the O₂ consumption of neuroblastoma cells.

Larcher J., Vayssiere J. y Crizat B. Eur J Pharm 161, pp: 197-202 (1989).

111) High-affinity BZD binding sites on rat peritoneal mast cells and RBL-1 cells: binding characteristics and effects on granule secretion.

Miller L., Greenblatt D.J. y Theoharides T. Pharmacology 36, pp: 52-60 (1988).

- 112) Modulation of the chloride ionophore by BZD receptor ligands: influence of GABA and ligand efficacy.
Gee K., Lawrence L. y Yamamura H. Mol Pharm 30, pp: 218-225 (1986).
- 113) Regional distribution of a RO 5-4864 binding site that is functionally coupled to th GABA/BZD receptor complex in rat brain.
Gee K., Brinton R. y McEwen B. J Pharm Exp Ther 244, pp: 379-383 (1987).
- 114) Benzodiazepines enhance the muscimol-dependent activation of phospholipase A₂ in glioma C₆ cells.
Majewska M.D. y D.M. Chuang. J Pharm Exp Ther vol 232 N^o 3, pp: 650-655 (1985).
- 115) Phenylquinolines PK 8165 and PK 9084 allosterically modulate [³⁵S]t-Butylbicyclophosphorothionate binding to a chloride ionophore in rat brain via a novel RO 5-4864 binding site.
Gee K. J Pharm Exp Ther vol 240 N^o3, pp: 747-753 (1987).
- 116) Electrophysiological and pharmacological actions of the convulsant BZD RO 5-4864.
Weissman B., Cott J., Paul S. y Skolnick P. Eur J Pharm 97, pp: 257-263 (1984).
- 117) The search for hipnogenic center.
Mendelson W. Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat vol 24, pp: 1-12 (1990).
- 118) Evidence for involvement of the astrocytic benzodiazepine receptor in the mechanism of action of convulsant and anticonvulsant drugs.
Bender A. y L. Hertz. Life Sci 43, pp: 477-484 (1988).
- 119) Peripheral type binding sites for BZDs in brain: relationship to the convulsant actions of RO 5-4864.
Weissman B., Cott J., Bolger G., Paul S. y Skolnick P. J Neurochem 44, pp: 1494-1499 (1985).
- 120) Molecular substrates of anxiety: Clues from the heterogeneity of BZD receptors.
Lippa A.L., Meyerson y B. Beer. Life Sci vol 31, pp: 1409-1417 (1982).
- 121) Endogenous ligands for high-affinity recognition sites of psychotropic drugs.
Barbaccia M.L., Costa E. y Guidotti A. Ann Rev Pharmacol Toxicol (1988).
- 122) New developments on the search for the endogenous ligand(s) of central BZD receptors.
De Robertis E., Peña C., Paladini A.C. y Medina J.H. Neurochem Int vol 13 N^o 1, pp: 1-11 (1988).
- 123) Diazepam binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain.
Alho H., E. Costa, P. Ferrero, M. Fujimoto, D. Cosenza-Murphy y A. Guidotti. Science 229, pp: 179-182 (1985).

- 124) Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumors.
Ferrarese C., I. Appollonio, M. Frigo, S.M. Gaini, R. Piolti y L. Frattola. *Annals of Neurology* Vol 26 No 4, 564-568 (1989).
- 125) Isolation and characterization of a rat brain TTN, a posttranslational product of DBI: specific action at the RO 5-4864 recognition site.
Slobodyansky E., Guidotti A., Wambebe C., Berkovich A. y Costa E. *J Neurochem* 53, 1276-1284 (1989).
- 126) A natural processing product of rat diazepam binding inhibitor, Triakontatetrapeptide (Diazepam Binding Inhibitor 17-50) contains an α -Helix, which allows discrimination between BZD binding site subtypes.
Berkovich A., McPhie P., Campagnone M., Guidotti A. y Hensley P. *Mol Pharm* 37, pp: 164-172 (1990).
- 127) Study of an octadecaneuropeptide derived from DBI: biological activity and presence in the brain.
Ferrero P., Santi M.R., Conti-Tronconi B., Costa E. y Guidotti A. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, pp: 827-831 (1986).
- 128) Endogenous ligands for BZD recognition sites.
Costa E. y Guidotti A. *Biochem Pharmacol* 34, pp: 3399-3403 (1985).
- 129) Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor.
Peña C., Medina J.H., Novas M.L., Paladini A.C. y De Robertis E. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, pp: 4952-4956 (1986).
- 130) Acute stress induces an increase in rat cerebral cortex levels of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, an endogenous BZD binding inhibitor.
Medina J.H., Peña C., Novas M.L., Paladini A.C. y De Robertis E. *Neurochem Int* 11, pp: 255-259 (1987).
- 131) Urinary and brain β -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain BZD receptors.
Braestrup C., Nielsen M. y Olsen C.E.. *Proc Natl Acad Sci USA* 4, pp: 2288-2292 (1980).
- 132) Endogenous ligands for the BZD receptor.
Haefely W. *Pharmacopsychiat* 21, pp: 43-46 (1988).
- 133) Localization of BZD-like molecules in the rat brain. A light and electron microscopy immunohistochemistry study with an anti-BZD monoclonal antibody.
De Blas A. y Sotelo C. *Brain Res* 413, pp: 275-284 (1987).
- 134) Presence of BZD-like molecules in mammalian brain and milk.
BBRC 152, pp: 534-537 (1988).
- 135) Do the intrinsic actions of BZD receptor antagonists imply the existence of an endogenous ligand for BZD receptors?
File S. y Pellow S. *GABAergic transmission and anxiety*, Raven Press, pp: 98-107 (1986).

136) Endogenous inhibitors of RO 5-4864 binding to peripheral sites for BZDs.

Mantione C.R., Weissman B.A., Goldman M.E., Paul S.M. y Skolnick P. Febs Lett. 176 N° 1, pp: 69-73 (1984).

137) The effect of freezing and thawing or of detergent treatment on peripheral BZD binding: the possible existence of an endogenous ligand.

Gavish M. y Fares F. Eur J Pharm 107, pp: 283-284 (1985).

138) Inhibitors of peripheral-type BZD receptors present in human urine and plasma ultrafiltrates.

Beaumont K., Cheung A.K., Geller M.L. y Fanestil D.D. Life Sci. 33, pp: 1375-1384 (1983).

139) Characterization of porphyrin interactions with peripheral-type BZD receptors.

Verma A. y S.H. Snyder. Mol Pharm 34, pp: 800-805 (1988).

140) Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) BZD receptor.

Verma A., Nye J.S. y Snyder S.H. Proc Natl Acad Sci USA 84, pp: 2256-2260 (1987).

141) The peripheral-type BZD receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands.

Snyder S.H., Verma A. y Trifiletti R.R. Faseb J. 1, pp: 282-288 (1987).

142) Adrenalectomy reduces the density of peripheral type binding sites for BZD in the rat kidney.

Basile A.S. Paul S.M., Skolnick P. Eur J Pharm 110, pp: 149-150 (1985).

143) Depletion of peripheral-type BZD receptors after hypophysectomy in rat adrenal gland and testis.

Anholt R.R.H., De Souza E.B., Kuhar M.J. y Snyder S.H. Eur J Pharm 110, pp: 41-46 (1985).

144) Modulation of peripheral BZD binding sites following chronic estradiol treatment.

Gavish M., Okun F., Weiszman A. y Youdim M.B.H. Eur J Pharm 127, pp: 147-151 (1986).

145) Modulatory effects of thyroxine treatment on central and peripheral BZD receptors in the rat.

Gavish M., Weiszman A., Okun F. y Youdim M.B.H. J Neurochem 47, pp: 1106-1110 (1986).

146) Inescapable shock reduces ^3H -RO 5-4864 binding to peripheral type BZD receptors in the rat.

Drugan R.C., Basile A.S., Crawley J.N., Paul S.M. y Skolnick P. Pharm Biochem & Behav vol 24, pp: 1673-1677 (1986).

147) Increase of peripheral type benzodiazepine binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats.

Novas M.L., Medina J.H., Calvo D.J. y De Robertis E. Eur J Pharm 135, pp: 243-246 (1987).

- 148) Increase in central and peripheral BZD receptors following surgery.
Okun F., Weizman R., Katz Y., Bomzon A., Youdim M.B.H. y Gavish M. Brain Res 458, pp: 31-36 (1988).
- 149) Tissue specific regulation of peripheral BZD receptor density after chemical sympathectomy.
Basile A. y Skolnick P. Life Sci 42, pp: 273-283 (1987).
- 150) Decreased peripheral BZD binding sites in platelets of neuroleptic-treated schizophrenics.
Gavish M., Weiszman A., Karp L., Tyano S. y Tanne Z. Eur J Pharm 121, pp: 275-279 (1986).
- 151) Peripheral and central type BZD receptors in Maudsley rats.
Tamborska E., Insel T. y Marangos P. Eur J Pharm 126, pp: 281-287 (1986).
- 152) Renal BZD binding increases during deoxycorticosterone/salt hypertension in rats.
Regan J.W., Yamamura H.I., Yamada S. y Roeske W.R. Eur J Pharm 67, pp: 167-168 (1980).
- 153) High affinity renal ^3H -Flunitrazepam binding: characterization, localization and alteration in hypertension.
Regan J.W., Yamamura H.I., Yamada S. y Roeske W.R. Life Sci 28, pp: 991-998 (1981).
- 154) Characterization of peripheral type benzodiazepine binding sites in human and rat platelets by using ^3H -PK 11195. Studies in hypertensive patients.
Benavides J., D. Quarteronet, P. Plouin, F. Imbault, T. Phan, A. Uzan, C. Renault, M. Dubroeuq, C. G r my and G. Le Fur. Biochem Pharm vol 33 N  15, pp: 2467-2472 (1984).
- 155) Changes in the density of peripheral BZD binding sites in genital organs of the female rat during the oestrous cycle.
Fares F., Bar-Ami S., Brandes J.M. y Gavish M. J. Reprod. Fert. 83, pp: 619-625 (1988).
- 156) Binding of ^3H -RO 5-4864 and ^3H -PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species, differences and heterogeneity in peripheral BZD binding sites.
Awad M. y Gavish M. J Neurochem 49, pp: 1407-1414 (1987).
- 157) Evidence for species differences in peripheral BZD receptors: an autoradiographic study.
Cymerman U., Pazos A. y Palacios J.M. Neurosci Lett 66, pp: 153-158 (1986).
- 158) Heterogeneity between rat and calf peripheral-type benzodiazepine binding sites: differential sensitivity to triton X-100.
Awad M. y M. Gavish. J Rec Res 9, pp: 369-384 (1989).
- 159) Characterization of ^3H -RO 5-4864 binding to calmodulin using a rapid filtration technique.
Morgan P.F., Patel J. y Marangos P.J. Biochem Pharm vol 36 N  24, pp: 4257-4262 (1987).

- 160) La señal del calcio.
Carafoli E. y Penniston J.T. Investigación y ciencia Noviembre, pp: 28-37 (1985).
- 161) Calmodulina.
Cheung W.Y. Sci American, pp: 28-37 (1984).
- 162) Calmodulina: an overview.
Cheung W.Y. Fed Proc 41, pp: 2253-2257 (1982).
- 163) Calmodulin and the adenylate cyclase-phosphodiesterase system.
Cheung W.Y. Cell Calcium 2, pp: 263-280 (1981).
- 164) Calmodulin.
Klee C.B., Crouch T.H. y Richman P.G. Ann Rev Biochem 49, pp: 489-515 (1980).
- 165) Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function.
De Lorenzo R.J. Fed Proc 41, pp: 2265-2272 (1982).
- 166) Ligand and ion site interactions in GABA and BZD receptor complexes.
Squires R.F. Receptor Biochemistry and Methodology vol 5, Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels. Structural and functional properties. Cap 10, pp: 209-224 (1986).
- 167) GABA receptors modulate cation binding sites coupled to independent BZD, picrotoxin and anion binding sites.
Squires R.F. y Saederup E. Mol Pharm 22, pp: 327-334 (1982).
- 168) Differential effects of some transition metal cations on the binding of β -carboline-3-carboxylate and diazepam.
Mizuno S., Ogawa N. y Mori A. Neurochem Res vol 8 N° 7, pp: 873-880 (1983).
- 169) Two distinct solubilized BZD receptors: differential modulation by ions.
Lo M. y Snyder S. J Neurosci 3, pp: 2270-2279 (1983).
- 170) The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein.
Yanagibashi K., Ohno Y., Kawamura M y Hall P. Endocrinology 123 N°4, pp: 2075-2082 (1988).
- 171) Peripheral-type BZD receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria.
Yanagibashi K., Ohno Y., Tou S. y Kawamura M. J Biochem 106, pp: 1026-1029 (1989).
- 172) Identification of des-(Gly-Ile)-endoneurozepam as an effector of corticotropin dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral BZD receptor.
Besman M.J., Yanagibashi K., Lee T.D. Kawamura M., Hall P. y Shively J.E. Proc Natl Acad Sci USA 86, pp: 4897-4901 (1989).
- 173) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis.
Mukhin A.G., Papadopoulos V., Costa E. y Krueger K.E. Proc Natl Acad Sci USA 86, pp: 9813-9816 (1989).

- 174) Effect of the BZD diazepam, des-N-methyldiazepam and midazolam on corticosteroid biosynthesis in bovine adrenocortical cells in vitro; location of site of action.
Holloway C., Kenyon C., Fraser R. J Steroid Biochem 33, pp: 219-225 (1989).
- 175) Modulatory action of BZD on human term placental steroidogenesis in vitro.
Barnea E.R., Fares F. y Gavish M. Mol Cel Endocrinol 64, pp: 155-159 (1989).
- 176) Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology.
Schumacher M. Trends in Neurosci 13, N09, pp: 359-361 (1990).
- 177) Rapid actions of steroids on CNS neurones.
Harrison N., Majewska M.D. y Barker J. Neural control of reproductive function, pp: 137-166 Alan Liss Inc. (1989).
- 178) Inhibition of noradrenaline release by 5 β -progestins in cerebral cortex slices.
Kubli-Garfias C. y H. Ponce-Morter. Proc West Pharmacol Soc 26, pp: 135-138 (1983).
- 179) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: Structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action.
Gee K., M. Bolger, R. Brinton, H. Coirini y B. McEwen. J Pharm Exp Ther vol 246 N02, pp: 803-812 (1988).
- 180) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor.
Majewska M.D., Harrison N., Schwartz R., Barker J. y Paul S. Science 232, pp: 1004-1007 (1986).
- 181) Neurosteroids act on recombinant human GABA_A receptors.
Puja G., Santi M., Vicini S., Pritchett D., Paul S., Seeburg P.H. y Costa E. Neuron 4, pp: 759-765 (1990).
- 182) Neurosteroids: cytochrome P450_{sc} in rat brain.
Le Goascogne C., Robel P., Guezou M. y Waterman M. Science 237, pp: 1212-1214 (1987).
- 183) Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat.
Suescun M., Gonzalez S., Chiauzzi V. y Calandra R. J Androl 6, pp: 77-86 (1985).
- 184) EBDA.
McPherson (1980).
- 185) Ligand.
Munson P. Biomedical computing technology information center. (1979).
- 186) Effects of heavy metal cations and other sulfhydryl reagents on brain D1 receptors: evidence for involvement of a thiol group in the conformation of the active site.
Braestrup C. y Andersen P. J Neurochem 48, pp: 1667-1672 (1987).

187) ^3H -MK 801 binding to the NMDA receptor/ionophore complex is regulated by divalent cations: evidence for multiple regulatory sites.

Reynolds I. y Miller R. Eur J Pharm 151, pp: 103-112 (1988).

188) Serine phospholipids as endocoids.

Bruni A., Palatini P., Battistella A. y Toffano G. Endocoids, Alan Liss, pp: 507-514 (1985).

189) Pharmacological effects of phosphatidylserine liposomes.

Bruni A., Toffano G. y Leon A. Nature (London) 260, pp: 331-333 (1976).

190) Modification of noradrenergic hypothalamic system in rats injected with phosphatidylserine liposomes.

Toffano G., Leon A., Mazzari S. y Orlando P. Life Sci 23, pp: 1093-1102 (1978).

191) Effect of PS on acetylcholine output from the cerebral cortex of the rat.

Casamenti F., Mantovani F., Amaducci L. y Pepeu G. J Neurochem 32, pp: 529-533 (1979).

192) A quantitative EEG study at cortical and subcortical level of the effects of brain cortical PS in rats, and of its interaction with scopolamine.

Aporti F., Nelsen J. y Goldstein L. Res CommuPsychol Psychiat Behav 7, pp: 131-143 (1982).

193) Araquidonic acid metabolism in the nervous system.

Annals of the New York Academy of Science vol 559. Ed. Bazán N. (1989).

194) Action in vivo of phosphatidylserine on BZD and muscarinic receptors of rat brain.

De Robertis E., Medina J.H., Raskovsky S., Levi M., Wolfman C., Jerusalinsky D. y Calvo D.J. Phospholipids in the nervous system, biochemical and molecular pathology. Fidia Research Series 17, pp: 35-42 (1989).

195) Modulation of ^3H -Flunitrazepam binding to rat cerebellar BZD receptors by phosphatidylserine.

Hammond J. y Martin I. Eur J Pharm 137, pp: 49-58 (1987).

196) Phospholipids and BZD recognition sites of brain synaptic membranes.

Ueno A. y Kuriyama K. Neuropharmacol 20, pp: 1169-1176 (1984).

197) Interaction of lipids with peripheral-type BZD receptors.

Beaumont K., Vaughn D. y Fanestil D. Biochem Pharmacol 37, pp: 1009-1014 (1988).

198) Lidocaine binds with high affinity to peripheral-type BZD receptors.

Clark M. y R. Post. Eur J Pharm 179, pp: 473-475 (1990).

199) Action of pyrethroids on the peripheral BZD receptor.

Ramadan A., Bakry N. y Eldefrawi M.E. Pesticide Biochemistry and Physiology 32, pp: 106-113 (1988).

- 200) Peripheral-type BZD receptors in the kidney: regulation of radioligand binding by anions and DIDS.
Luëddens H. y Skolnick P. Eur J Pharm 133, pp: 205-214 (1987).
- 201) Effect of phenol and sodium octanoate on the astrocyte BZD receptor.
Ducis I., Norenberg L. y Norenberg M.D. Brain Res 514, pp: 349-351 (1990).
- 202) Interaction of calcium channel blockers with non-neuronal BZD binding sites.
Cantor E., Semenuk K. y Spector S. Proc Natl Acad Sci USA 81, pp: 1549-1552 (1984).
- 203) Ethanol specifically potentiates GABA-mediated neurotransmission in feline cerebral cortex.
Nestoros J.N. Science 209, pp: 208-210 (1980).
- 204) Ethanol stimulates GABA receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes.
Suzdak P., Schwartz R., Skolnick P. y Paul S. Proc Natl Acad Sci USA 83, pp: 4071-4075 (1986).
- 205) Ethanol and the GABA/BZD receptor complex.
Greenberg D., Cooper E., Gordon A. y Diamond I. J Neurochem 42, pp: 1062-1068 (1984).
- 206) Molecular mechanisms of alcohol.
Sun G.Y. y Sun A.Y. Neurobiology and Metabolism, Humana Press, 1981, pp: 49-55 (1990).
- 207) A selective imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat.
Suzdak P.D., Glowa J.R., Crawley J.N., Schwartz R.D., Skolnick P. y Paul S.M. Science 234, pp: 1243-1247 (1986).
- 208) Evidence that ethanol and pentobarbital enhance ³H-Diazepam binding at the BZD/GABA receptor ionophore complex indirectly.
Ticku M.K. y Davis W.C. Eur J Pharm 71, pp: 521-522 (1981).
- 209) Molecular interactions of ethanol with GABAergic system and potential of RO 15-4513 as an ethanol antagonist.
Ticku M.K. y Kulkarni S.K. Pharm Biochem & Behav 30, pp: 501-510 (1988).
- 210) Do alcoholics have abnormal BZD receptors?
Missak S.S. Medical Hypotheses 32, pp: 59-60 (1990).
- 211) Distinct actions of alcohols, barbiturates and BZDs on GABA-activated chloride channels.
Adron Harris R. Alcohol 7, pp: 273-275 (1990).
- 212) Localization and heterogeneity of central BZD receptors.
De Robertis E. y J.H. Medina. Neurochem Res vol 10 (6), pp: 857-863 (1985).

213) High affinity of the naturally occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain BZD receptors in vitro.
Nielsen M., Frokjaer S. y Braestrup C. *Biochem Pharmacol* 37, pp: 3285-3287 (1988).

214) A neuropsychopharmacological study of *Syzygium cuminii*.
Chakraborty D., Mahapatra P. y Chaudhuri A. *Planta Medica* 2, pp: 139-143 (1985).

215) Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*.
Sperom E. y Minghetti A. *Planta Medica* 6, pp: 488-491 (1989).

216) Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for BZD receptors, with anticonvulsant properties.
Medina J.H., Paladini A.C., Wolfman C., Levi M., Calvo D.J., Díaz L. y Peña C. *Biochem Pharm* 40, pp: 2227-2232 (1990).

217) Stress hormones: their interaction and regulation.
Axelrod J. y Reisine T.D. *Science* 224, pp: 452-459 (1984).

218) Cholinergic muscarinic receptor in rat cerebral cortex, basal ganglia and cerebellum undergo rapid and reversible changes after acute stress.
Estévez E.E., Jerusalinsky D., Medina J.H. y De Robertis E. *Neuroscience* vol 13 N°4, pp: 1353-1358 (1984).

219) Increased GABA binding in mouse brain following acute swim stress.
Skerritt J.H., Trisdikoon P. y Johnston G.A.R. *Brain Res* 215, pp: 398-403 (1981).

220) Central and peripheral BZD receptors: involvement in an organism's response to physical and psychological stress.
Drugan R. y Holmes P. *Neurosci & Biobehav Reviews* 15, pp: 277-298 (1990).

221) Characterization of stress-induced alterations in ^3H -RO 5-4864 binding to peripheral BZD receptors in rat heart and kidney.
Drugan R.C., Basile A.S., Crawley J.N., Paul S.M. y Skolnick P. *Pharm Biochem & Behav* vol 30, pp: 1015-1020 (1988).

222) Inescapable shock reduces ^3H -RO 5-4864 binding to peripheral BZD receptors in the rat.
Drugan R.C., Basile A.S., Crawley J.N., Paul S.M. y Skolnick P. *Pharm Biochem & Behav* vol 24, pp: 1673-1677 (1986).

223) Increase of peripheral type BZD binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats.
Novas M.L., Calvo D.J., Medina J.H. y De Robertis E. *Eur J Pharm* 135, pp: 243-246 (1987).

224) Characterization of a peripheral-type BZD binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells.
Riond J., Vita N., Le Fur G. y Ferrara P. *FEBS Letters* 245 N°1-2, pp: 238-244 (1989).

- 225) Characterization of peripheral BZD binding sites in human term placenta.
Fares F. y Gavish M. Biochem Pharmacol 35, pp: 227-230 (1986).
- 226) Different roles of D-1 and D-2 dopamine receptors involved in locomotor activity of supersensitive mice.
Rubinstein M., Gershanik O. y Stefano F. Eur J Pharm 148, pp: 419-426 (1988).
- 227) GABA_A receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors.
Stelzer A, Kay A. y Wong R. Science 241, 339-341 (1988).
- 228) β -Adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase. Biochemical mechanisms and regulation
Sibley D. y Lefkowitz R. Molecular Neurobiology 1, pp: 121-154 (1987).
- 229) Effect of chronic chlorpromazine treatment on peripheral BZD binding sites in heart, kidney and cerebral cortex of rats.
Gavish M. y Weizman R. J Neurochem 52, pp: 1553-1558 (1989).
- 230) Effect of chronic haloperidol treatment on peripheral BZD binding sites in cerebral cortex of rats.
Gavish M., Weizman A., Becker D. y Tanne Z. J Neural Transm 74, pp: 109-116 (1988).
- 231) Hormonal regulation of peripheral BZD binding sites in female rat adrenal gland and kidney.
Fares F., Bar-Ami S., Haj-Yehia Y. y Gavish M. J Rec Res 9, pp: 143-157 (1989).
- 232) Regulation of central and peripheral BZD receptors in progesterone-treated rats.
Gavish M., Weizman A., Youdim M.B.H. y Okun F. Brain Res 409, pp: 386-390 (1987).
- 233) Chronic phenobarbital administration affects GABA and BZD receptors in the brain and periphery.
Weizman A., Fares F., Pick C. y Gavish M. Eur J Pharm 169, pp: 235-240 (1989).
- 234) Peripheral BZD binding sites on striated muscles of the rat: properties and effect of denervation.
Müller W.E., Ickstadt A. y Hopf H. J Neural Transmission 61, pp: 35-42 (1985).
- 235) Regulation of renal peripheral BZD receptors by anion transport inhibitors.
Basile A., Harmut W., Lueddens W. y Skolnick P. Life Sci 42, pp: 715-726 (1987).
- 236) Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: effects on GABA_A receptor function and expression in brain.
Morrow A.L., Montpied P., Lingford-Hughes A y Paul S.M. Alcohol 7, pp: 237-244 (1990).

- 237) GABA receptors are increased in brains of alcoholics.
Tran V.T., Snyder S.H., Mayor L.F y Hawley R. *Annals of Neurology* 9
N°3, pp: 289-292 (1981).
- 238) Benzodiazepine receptors remains unchanged after chronic
ethanol administration.
Karobath M., Rogers J. y Bloom F. *Neuropharmacology* 19, pp: 125-128
(1980).
- 239) Effects of chronic ethanol exposure on the GABA/BZD receptor
complex in rat brain.
Hillmann M., Wilce P. y Shanley B. *Neurochem Int* 13, pp: 69-73
(1988).
- 240) Decreased density of peripheral benzodiazepine binding sites on
platelets of currently drinking but not abstinent alcoholics.
Suranyi-Cadotte B., Lafaille F., Dongier M., Dumas M. y Quirion R.
Neuropharmacology 27, N°4, pp: 443-445 (1988).
- 241) Brain BZD binding sites in ethanol dependent and withdrawal
states.
Tamborska E. y Marangos P. *Life Sci* 38, pp: 465-472 (1986).
- 242) Micromolar affinity BZD receptors regulate voltage sensitive
calcium channels in nerve terminal preparation.
Taft W. y De Lorenzo R. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, pp: 3118-3122
(1984).
- 243) Dihydropyridine and peripheral type BZD binding sites:
subcellular distribution and molecular size determination.
Doble A., y Le Fur G. *Eur J Pharm* 119, pp: 153-167 (1985).
- 244) Pharmacological evidence that the non-neuronal diazepam binding
site in primary cultures of glial cells is associated with a calcium
channel.
Bender A. y Hertz L. *Eur J Pharm* 110, pp: 287-288 (1985).
- 245) Correlation of the hypnotic potency of BZD with inhibition of
voltage-dependent calcium uptake into mouse brain synaptosomes.
Leslie S., Chandler L. y Swinyard E. *Eur J Pharm* 126, pp: 129-134
(1986).
- 246) Evidence that the peripheral-type BZD receptor ligand RO 5-4864
inhibits β -endorphin release from AtT-20 cells by blockade of
voltage-dependent calcium channels.
Bisserbe J.C., Patel J. y Eskay R.L. *J Neurochem* 47, pp: 1419-1424
(1986).
- 247) Interactions between peripheral type BZD receptor ligands and
an activator of voltage-operated calcium channels.
Bolger G., Abraham S., Oz N. y Weissman A. *Can J Physiol Pharmacol*
68, pp: 40-45 (1989).
- 248) Benzodiazepines and calcium channel function.
Rample D. y Triggler D. *Tips* Noviembre, pp: 461-464 (1986).

- 249) Inhibition of calcium conductance in identified leech neurones by BZDs.
Johansen J., Taft W, y De Lorenzo R. Proc Natl Acad Sci USA 82, pp: 3935-3939 (1985).
- 250) Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral type BZD receptors are coupled to calcium channels in the heart.
Mestre M., Carriot T., Belin C., Uzan A. y Le Fur G. Life Sci 36, pp: 391-400 (1985).
- 251) Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control.
Hirsch J.D., C.F. Beyer, L. Malkowitz, B. Beer y A.J. Blume. Mol Pharmacol 34, pp: 157-163 (1988).
- 252) Diazepam potentiates the corticoidogenic response of bovine adrenal fasciculata cells to dibutyryl cyclic AMP.
Yanagibashi K., Ohno Y. y Kawamura M. Japan J Pharmacol 51, pp: 347-355 (1989).
- 253) Enhancement of estradiol-induced DNA synthesis in the anterior pituitary gland by the peripheral-type BZD receptor ligand RO 5-4864.
Stepien H. y Pawlikowski M. J Neural Transmission 66, pp: 303-307 (1986).
- 254) Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine.
Ikezaki K. y K.L. Black. Cancer Letters 49, pp: 115-120 (1990).
- 255) Chiral recognition by central BZD receptors.
Simonyi M. Acta Pharm Nord vol 2 N93, pp: 145-154 (1990).
- 256) Calcium and sedative-hypnotic drug action.
Carlen P. y Wu P. International Review of Neurobiology 29, pp: 161-189 (1988).
- 257) Differential regulation of central and peripheral BZD binding sites in the rat olfactory bulb.
Bolger G., Mezey E., Cott J. y Paul S. Eur J Pharm 105, pp: 143-148 (1984).
- 258) Regulation of peripheral type binding sites for BZDs in the pineal gland.
Weissman B., Skolnick P. y Klein D. Pharmacol Biochem & Behav 21, pp: 821-824 (1984).
- 259) Alteration in BZD and GABA receptor binding in rat brain following systemic injection of kainic acid.
Kish S., Sperk G. y Hornykiewicz O. Neuropharmacology 22, pp: 1303-1309 (1983).
- 260) Effect of chronic ethanol consumption on central and peripheral-type BZD binding sites in mouse brain.
Schoemaker H., Smith T. y Yamamura H. Brain Res 258, pp: 347-350 (1983).

- 261) Effect of chronic diazepam on peripheral-type benzodiazepine receptors and testicular steroidogenesis.
Calvo D.J., Campos M., Calandra R., Medina J.H. y Ritta M. Life Sci 49 (7), pp: 519-525.
- 262) Gonadotropin and estrogen induced increase of peripheral type BZD binding sites in the hypophyseal-genital axis of rats.
Fares F., Bar-Ami S., Brandes J. y Gavish M. Eur J Pharm 133, pp: 97-102 (1987).
- 263) Diazepam inhibits potassium-induced aldosterone secretion in adrenal glomerulosa cell.
Shibata H., Kojima I. y Ogata E. BBRC 135, pp: 994-999 (1986).
- 264) The peripheral-type BZD receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis.
Papadopoulos J Biol Chem 265, No7, pp: 3772-3779 (1990).
- 265) Peripheral-type benzodiazepine receptors are highly concentrated in mitochondrial membranes of rat testicular interstitial cells.
Calvo D.J., Ritta M.N., Calandra R.S. y Medina J.H. Neuroendocrinology 52, pp: 350-353 (1990).
- 266) Actions of BZDs on the neuroendocrine system.
Grandison L. Neuropharmacology 22, pp: 1505-1510 (1983).
- 267) Interactions of anxiolytic and antidepressant drugs with hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.
File S. Pharm Ther 46, pp: 357-375 (1990).
- 268) Diazepam and plasma-testosterone levels.
Argüelles A. y Rosner J. Lancet ii, pp: 607 (1975).
- 269) Chronic treatment with diazepam fails to affect the reproductive system of the male rat.
Wilkinson M., Moger W. y Grovestine D. Life Sci 27, pp: 2285-2291 (1980).
- 270) Protein measurement with the folin phenol reagent.
Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. J Biol Chem 193, pp: 473-481 (1951).
- 271) Chronic BZD administration: effects in vivo and in vitro.
Miller L., Greenblatt D. y Shader R. GABA and BZD receptor subtypes Ed. Biggio y Costa, pp: 167-175 (1990).
- 272) Down-regulation of ^3H -RO 5-4864 binding sites after exposure to peripheral-type BZD in vitro.
Johnson M., Wang J., Morgan J. y Spector S. J Pharm Exp Ther 228, pp: 855-859 (1986).
- 273) The attractions of proteins for small molecules and ions.
Scatchard G. Ann NY Acad Sci, 51, pp: 660-672 (1949).

Abreviaturas:

ACN: acetonitrilo

A: Amstrong

BZD: benzodiazepinas

B_{max}: n^o máximo de sitios receptores.

°C: grado centigrado

cm: centímetro

Ci/mmol: curie por milimol

cpm: cuentas por minuto

dpm: desintegraciones por minuto

fmol: femtomol

FNZ: flunitrazepam

DZ: diazepam

GABA: ácido γ-aminobutírico

g: gramos

³-H: tritio

HCl: ácido clorhídrico

K_d: constante de disociación

K_i: constante de inhibición

l: litros

nm: nanometro

nM: nanomolar

min: minutos

mCi: milicurie

mg: miligramo

ml: mililitro

mmol: milimol

M: molar

pmol: picomol

PM: peso molecular

pH: $-\log [H^+]$

Pfs: Porfirinas

PK: PK 1195, antagonista del receptor periférico de BZDs

RO: RO 5-4864, agonista del receptor periférico de BZDs

RP-BZD: receptor periférico de benzodiazepinas

SNC: sistema nervioso central

TLC: cromatografía en capa delgada

μg : microgramo

μl : microlitro

μM : micromolar

μCi : microcurie

vol: volumen