

Tesis de Posgrado

Ontogénesis y plasticidad del receptor Benzodiazepínico en el sistema visual de las aves

Gravielle, María Clara

1992

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:

Gravielle, María Clara. (1992). Ontogénesis y plasticidad del receptor Benzodiazepínico en el sistema visual de las aves. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2469_Gravielle.pdf

Cita tipo Chicago:

Gravielle, María Clara. "Ontogénesis y plasticidad del receptor Benzodiazepínico en el sistema visual de las aves". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2469_Gravielle.pdf

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

Tema de Tesis

**ONTOGENESIS Y PLASTICIDAD DEL
RECEPTOR BENZODIAZEPINICO
EN EL SISTEMA VISUAL DE LAS AVES**

Autor

María Clara Gravielle

Director de Tesis

Dra. Sara Fiszer de Plazas

Lugar de trabajo

Instituto de Biología Celular

Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de Doctor en

Ciencias Biológicas

1992

*Tesis.
2469
y.2.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco

a la Dra. Sara Fiszer de Plazas por el constante apoyo y estímulo brindado durante la dirección de esta tesis;

al Dr. Vladimir Flores por su asesoramiento en los aspectos embriológicos involucrados en esta tesis;

a mis compañeros de trabajo, Alba Mitridate de Novara y Dra. Nélide González por su invaluable colaboración;

al resto de los miembros del Instituto de Biología Celular;

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por el financiamiento de este trabajo.

ABREVIATURAS

Ac-S-Co A	Acetil coenzima A
ARN	Acido ribonucleico
B_{max}	Número máximo de sitios receptores
BZ	Benzodiazepina
BZD	Benzodiazepínico
BZD ₁	Receptor benzodiazepínico de tipo I
BZD ₂	Receptor benzodiazepínico de tipo II
BZD _T	Total de sitios receptores benzodiazepínicos
°C	Grados centígrados
C _i	Curie
α CG	Acido α -cetoglutárico
FNZ	Flunitrazepam
g	gramo
μ g	microgramo
GABA	Acido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	Glutámico decarboxilasa
Glu	Acido glutámico

[³ H]	Tritio
hs	Horas
IC ₅₀	Concentración de droga que causa el 50 % de inhibición de la unión del ligando radioactivo
K _d	Constante de disociación
K _i	Constante de inhibición
K _{i1}	Constante de inhibición de los sitios receptores benzodiazepínicos de tipo I
K _{i2}	Constante de inhibición de los sitios receptores benzodiazepínicos de tipo II
L	Grupo de animales expuestos a luz permanente durante el desarrollo postnatal
μl	Microlitro
M	Molar
μM	Micromolar
ME	Modulador endógeno
mg	Miligramo

ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
N	Grupo de animales expuesto a condiciones normales de iluminación durante el desarrollo postnatal
n Hill	Coefficiente de Hill
nM	Nanomolar
O	Grupo de animales expuesto a oscuridad constante durante el desarrollo postnatal
OA	Acido oxalacético
pmol	Picomol
POPOP	2,2'-p-fenil-bis (5-feniloxazol)
Post	Postnatal
PPO	2,5-difeniloxazol
Pre	Prenatal
prot	Proteína
RN	Recién nacido
SC	Acido succínico
S.E.M.	Desviación standard media
SSA	Semialdeído del ácido succínico

SSDH	Deshidrogenasa del semialdeído del ácido succínico
TPZ	Triazolopiridazina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	Unidades

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
1 Neurotransmisión GABAérgica	1
2 Estructura molecular del complejo receptor GABA _A /BZ	7
3 Ontogénesis y plasticidad del receptor BZD	10
3.1 Vía visual del pollo	10
3.2 El lóbulo óptico de pollo: modelo experimental de desarrollo	12
3.3 Heterogeneidad de sitios receptores	18
3.4 Plasticidad del receptor: Efecto de la estimulación luminosa	22
3.5 Efecto moduladorio de factores endógenos sobre la unión específica de BZ	25
OBJETIVOS	29
1) Ontogénesis del receptor BZD	29
2) Plasticidad receptora	30
3) Efecto moduladorio de factores endógenos	30

	Pág.
MATERIALES Y METODOS	31
1 Drogas	31
2 Animales	31
2.1 Animales criados en condiciones ambientales normales	31
2.2 Animales sometidos a diferentes grados de iluminación ambiental	32
3 Preparación de membranas sinápticas	33
4 Ensayo de unión específica de [³H]FNZ	35
5 Estimación de los parámetros cinéticos del receptor	36
5.1 Experimentos de saturación de la unión específica de [³H]FNZ	36
5.2 Experimentos de inhibición de la unión específica de [³H]FNZ	36
5.2.1 Análisis de Hill	36
5.2.2 Análisis de Hofstee	37
6 Determinación de proteínas	38
7 Moduladores endógenos	38
7.1 Obtención	38
7.2 Actividad inhibitoria	39
7.3 Estabilidad al calor	39

	Pág.
8 Análisis estadísticos	39
RESULTADOS	40
1 Ontogénesis y caracterización farmacológica del receptor BZD en el lóbulo óptico de pollo	40
1.1 Desarrollo del contenido de proteínas sinápticas	40
1.2 Perfil de desarrollo del receptor BZD	42
1.3 Parámetros cinéticos de la unión específica de [³H]FNZ	45
1.4 Caracterización farmacológica de los sitios receptores BZD	48
2 Desarrollo de diferentes subtipos de receptores BZD en el lóbulo óptico de pollo	51
3 Plasticidad del receptor: Efecto de la hipo e hiperestimulación luminosa	60
3.1 Contenido de proteínas sinápticas y peso del lóbulo óptico durante el desarrollo de pollos sometidos a diferentes condiciones de iluminación	60
3.2 Perfil de desarrollo de los sitios receptores BZD en el lóbulo óptico de pollos L, N y O	62

	Pág.
3.3 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³ H]FNZ en el lóbulo óptico de pollos L, N y O	66
4 Efecto moduladorio de factores endógenos sobre la unión de BZ durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo	69
4.1 Efecto de lavados exhaustivos de membranas sinápticas sobre la unión específica de [³ H]FNZ	69
4.2 Efecto del ME aislado de embriones de 16 días sobre la unión de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio	75
4.3 Efecto del ME aislado de pollos adultos sobre la unión de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de diferentes estadios del desarrollo	77
4.4 Efecto de ME aislados en diferentes estadios del desarrollo sobre la unión de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de pollos de 2 días de edad	79

	Pág.
4.5 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³ H]FNZ sobre membranas exhaustivamente lavadas, en presencia y ausencia de ME	81
4.6 Efecto del ME sobre las moléculas de [³ H]FNZ	83
4.7 Estabilidad al calor del ME	86
DISCUSION	88
CONCLUSIONES	107
RESUMEN	109
REFERENCIAS	112

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Esquema de la sinapsis GABAérgica	5
Fig. 2 Esquema del complejo receptor GABA/BZ	6
Fig. 3 Estructura de las subunidades del complejo GABA/BZ	9
Fig. 4 Esquema de la vía visual del pollo	11
Fig. 5 Contenido proteico de la fracción de membranas sinápticas durante el desarrollo	41
Fig. 6 Desarrollo de los sitios receptores BZD expresado como pmol [³ H]FNZ unido por mg de proteína (A) y por lóbulo óptico (B)	44
Fig. 7 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³ H]FNZ en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo	46

	Pág.
Fig. 8 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³ H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de embriones de 13 días de incubación	55
Fig. 9 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³ H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 1 día de edad	56
Fig. 10 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³ H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 15 días de edad	57
Fig. 11 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³ H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 30 días de edad	58
Fig. 12 Perfil de desarrollo de los sitios BZD ₁ , BZD ₂ y BZD _r	59

- Fig. 13 Variaciones en el contenido proteico y en el peso del lóbulo óptico durante el desarrollo postnatal de pollos sometidos a condiciones normales de iluminación (●), luz permanente (○) y oscuridad permanente (●) 61
- Fig. 14 Desarrollo postnatal de los sitios receptores BZD en animales sometidos a luz permanente (luz), ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo) y oscuridad permanente (oscuridad) 64
- Fig. 15 Efecto de la adaptación a la luz y oscuridad constantes sobre el desarrollo postnatal de los sitios receptores BZD 65
- Fig. 16 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de animales de 2 días de edad adaptados a las siguientes condiciones de iluminación: luz permanente (luz), ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo) y oscuridad permanente (oscuridad) 67

	Pág.
Fig. 17 Unión específica de [^3H]FNZ en membranas sinápticas control y en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas aisladas durante el desarrollo	72
Fig. 18 Efecto de los lavados exhaustivos de las membranas sinápticas sobre la unión de [^3H]FNZ durante el desarrollo	73
Fig. 19 Análisis de Scatchard de la unión específica de [^3H]FNZ en membranas sinápticas control (M. control) y en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas (M. lavadas) aisladas a partir de embriones de 16 días	74
Fig. 20 Curva de inhibición de la unión específica [^3H]FNZ por cantidades crecientes de ME aislado a partir de embriones de 16 días en membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio	76

	Pág.
Fig. 21 Efecto del ME aislado a partir de pollos adultos sobre la unión de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de diferentes estadios del desarrollo	78
Fig. 22 Efecto del ME aislado en diferentes estadios del desarrollo sobre la unión de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de pollos de 2 días de edad	80
Fig. 23 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³ H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de día 16 prenatal en presencia y ausencia (control) del ME del mismo estadio	82

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I Análisis cinético de la unión específica de [³ H]FNZ en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo	47
Tabla II Inhibición por diferentes drogas de la unión específica de [³ H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 1 día de edad	50
Tabla III Análisis de Hill de la inhibición de la unión específica de [³ H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo	54
Tabla IV Análisis cinético de la unión específica de [³ H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 2 días de edad sometidos a las siguientes condiciones de iluminación: ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo), luz permanente (luz) y oscuridad permanente (oscuridad)	68

Tabla V	Efecto del ME aislado a partir de embriones de 14 días de incubación sobre la capacidad de unión de las moléculas de [³ H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas del mismo estadio del desarrollo	85
Tabla VI	Efecto del calor sobre la acción inhibitoria del ME aislado a partir de embriones de 16 días en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas del mismo estadio del desarrollo	87

INTRODUCCION

1 Neurotransmisión GABAérgica

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es uno de los más importantes neurotransmisores inhibitorios del Sistema Nervioso Central de vertebrados. Se estima que aproximadamente el 30 % de todas las sinapsis usan al GABA como neurotransmisor.

El GABA es sintetizado a partir del ácido glutámico por la enzima glutámico-decarboxilasa (GAD) en una subpoblación de neuronas llamadas GABAérgicas (Fig. 1). El GABA se almacena en vesículas sinápticas situadas en el terminal nervioso y se libera por exocitosis a la hendidura sináptica cuando el potencial de acción generado en el cuerpo neuronal alcanza el terminal. La inactivación del GABA se produce por recaptación, mediante transporte activo, en los terminales de neuronas GABAérgicas y en células gliales donde es metabolizado vía transaminación. El GABA liberado a la hendidura sináptica interactúa con el receptor GABAérgico ubicado en la membrana postsináptica.

Existen al menos dos tipos de receptores GABAérgicos, llamados GABA_A y GABA_B respectivamente. Estos receptores difieren en su afinidad por agonistas y antagonistas GABAérgicos así como en el mecanismo transductor de señal al cual están acoplados (Feltz y col., 1987).

El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico ya que está acoplado a un canal de Cl⁻ y la activación del receptor por medio de la unión del GABA produce un cambio conformacional del receptor que da como resultado la apertura del canal. En ausencia del GABA el canal se encuentra cerrado.

El receptor GABA_B, en cambio, es un receptor de tipo metabotrópico pues parece estar asociado a canales de Ca²⁺ o K⁺ a través de un sistema que involucra segundos mensajeros. Este tipo de receptor no es de interés para el estudio del receptor benzodiazepínico (BZD) pues las benzodiazepinas (BZ) no interactúan con él.

El receptor BZD es parte integral de la mayoría o todos los receptores GABA_A, constituyendo un sitio modulador alostérico. En efecto, las BZ aumentan la frecuencia de apertura del canal de Cl⁻ en presencia de GABA mientras que en ausencia de éste no presentan ningún efecto sobre la conductancia del ión. De este modo las BZ actúan facilitando la acción inhibitoria del GABA.

Los receptores BZD tienen una gran importancia farmacológica ya que existe una estrecha correlación entre la actividad ansiolítica, anticonvulsivante y relajante muscular de las BZ y su capacidad para inhibir la unión específica de [3 H]Diazepam o [3 H]Flunitrazepam ([3 H]FNZ) (Mackerer y col., 1978; Speth y col., 1978).

Diferentes evidencias sugieren que los receptores BZD estarían involucrados en procesos fisiológicos. Las mismas incluyen la especificidad de la unión de alta afinidad de las BZ en el tejido cerebral (Braestrup y Squires, 1977), la distribución regional de esta unión (Braestrup y col., 1977; Zezula y col., 1988), la especificidad filogenética de los receptores BZD (Nielsen y col., 1978) y la habilidad del GABA de aumentar la afinidad de las BZ por sus sitios receptores (Briley y Langer, 1978; Martin y Candy, 1978; Tallman y col., 1978; Chiu y Rosenberg, 1979; Karobath y Sperk, 1979; Fong y col., 1983; Mitchell y Wilson, 1983).

Además del sitio receptor BZD asociado al receptor GABA_A, llamado central, existe otro tipo de sitio receptor BZD, el sitio periférico, farmacológicamente distinto del primero. El sitio periférico se halla presente en células no neuronales dentro del Sistema Nervioso Central (células gliales y otros elementos) y en tejidos no nerviosos. Su

función fisiológica no se conoce completamente (Villiger, 1985; Anholt y col., 1986).

Existen además otros sitios modulatorios en el complejo receptor GABA_A sobre los cuales actúan diferentes drogas tales como convulsivantes (Ticku y col., 1978; Olsen y Leeb-Lundberg, 1981), el agente antihelmíntico avermectina B_{1a} (Supavilai y Karobath, 1981; Olsen y Snowman, 1985), algunos esteroides (Gee y col., 1987), ciertas pirazolopiridinas (Ticku y Davis, 1982) y barbitúricos (Trifiletti y col., 1985). Los barbitúricos, a diferencia de las BZ, facilitan la acción inhibitoria del GABA prolongando el tiempo durante el cual el canal iónico permanece abierto. Todos estos sitios interactúan alostéricamente entre sí indicando que el receptor GABA_A-BZ es una estructura molecular compleja regulada en forma múltiple (Fig 2).

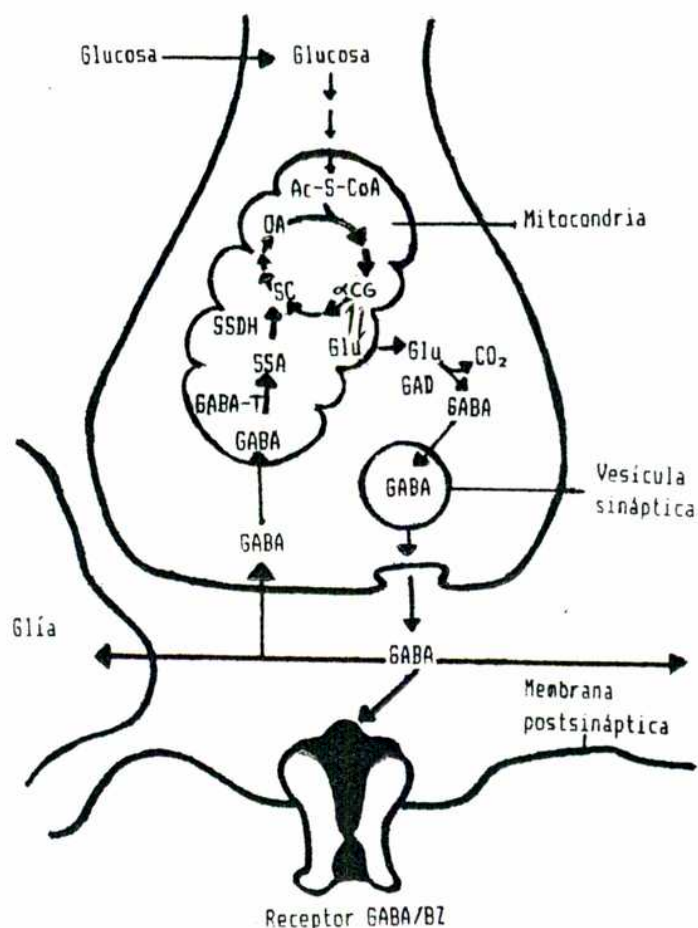


Fig. 1 Esquema de la sinapsis GABAérgica

Ac-S-Co A: acetil coenzima A; OA: ácido oxalacético; SC: ácido succínico; αCG: ácido α-cetoglutarico; SSA: semialdeído del ácido succínico; SSDH: deshidrogenasa del semialdeído del ácido succínico; GABA-T: GABA transaminasa; Glu: ácido glutámico.

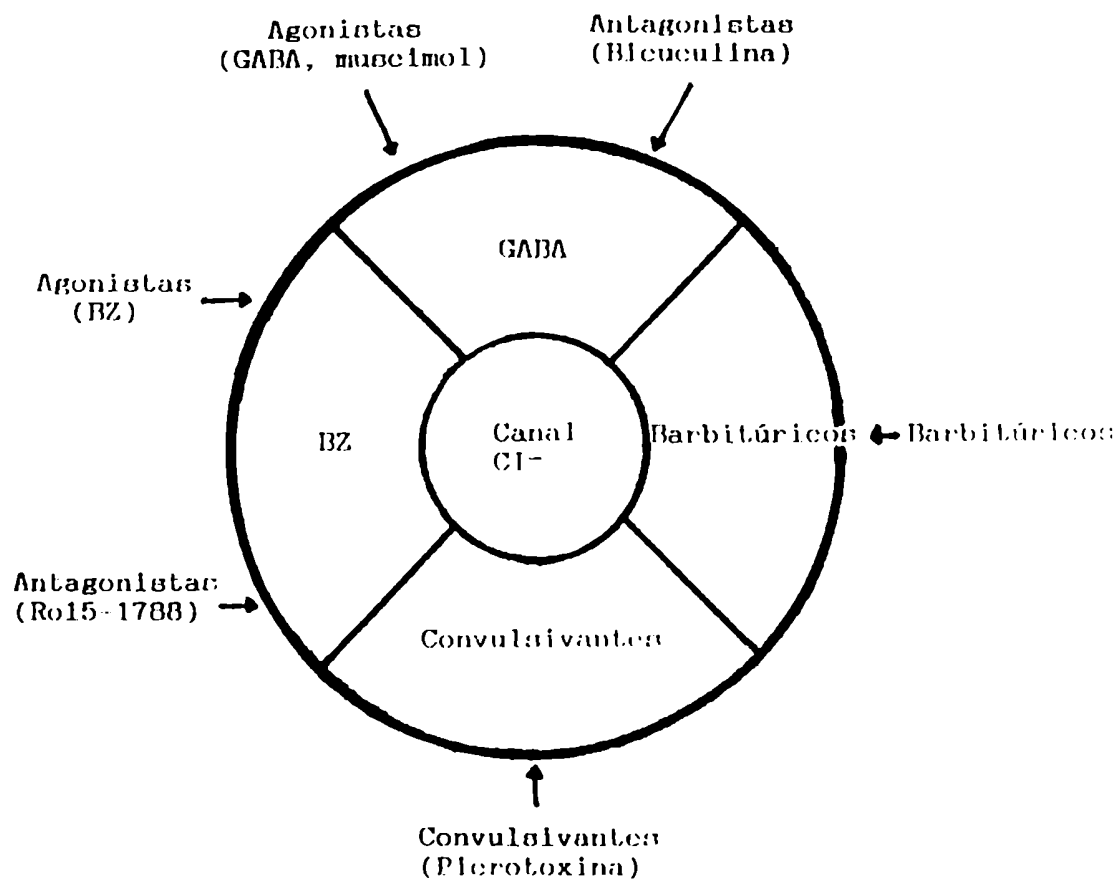


Fig. 2 Esquema del complejo receptor GABA/BZ

2 Estructura molecular del complejo receptor GABA/BZ

En los primeros trabajos de análisis de la composición del complejo GABA_A-BZ se encontraron dos subunidades proteicas, α y β respectivamente, formando parte del complejo (Sigel y col., 1983). El sitio de unión de las BZ estaría localizado en la subunidad α , en tanto que el sitio de unión del GABA se encontraría presente en la subunidad β (Casalotti y col., 1986).

Se determinó la secuencia de aminoácidos de estas dos subunidades y se clonaron los genes que las codifican (Schofield y col., 1987).

A partir de estos estudios se propuso inicialmente una estructura tetramérica para el complejo receptor constituida por dos subunidades α y dos subunidades β (Sigel y col., 1983).

Más recientemente se encontraron dos subunidades adicionales, llamadas τ y δ (Shivers y col., 1989). La subunidad τ sería necesaria para la expresión del efecto modulador de las BZ (Pritchett y col., 1989b). La estructura probable del complejo GABA_A/BZ sería de tipo pentamérica con la siguiente composición: 2(α),2(β),1(τ),

siendo α la subunidad τ o δ (Shivers y col., 1989; Schofield, 1989).

Estas subunidades presentan regiones homólogas de importancia y características estructurales semejantes: segmentos de transmembrana, sitios de glicosilación, ubicación del sitio receptor en la región amino terminal, etc (Fig. 3).

La complejidad del análisis estructural aumenta con el hallazgo de diferentes subtipos de cada subunidad. En efecto han sido encontradas las subunidades α_1 - α_6 , β_1 - β_3 , τ_1 y τ_2 (Schofield y col., 1987; Fuchs y col., 1988; Fuchs y Sieghart, 1989; Olsen y col., 1990; Endo y Olsen, 1991). Esta heterogeneidad de subunidades indicaría la existencia de diferentes combinaciones de las mismas formando por lo tanto distintos complejos GABA_A/BZ.

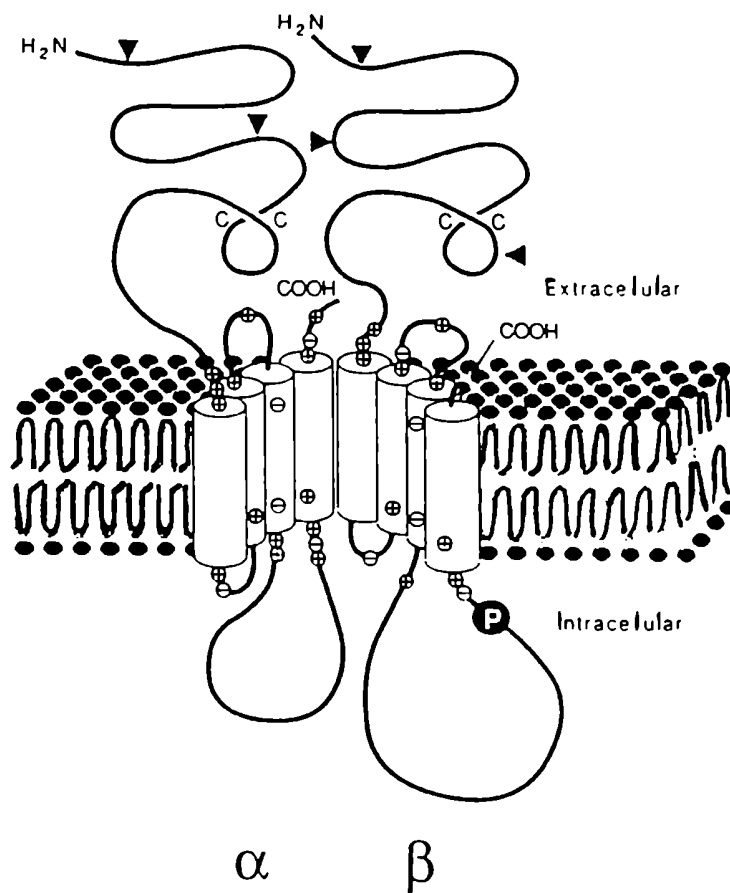


Fig. 3 Estructura de las subunidades del complejo GABA/BZ

▼ Sitios de fosforilación

3 Ontogénesis y plasticidad del receptor BZD

3.1 Vía visual del pollo

La ruta visual del pollo ha sido esquematizada en la Fig. 4.

Los mensajes provenientes de los elementos fotosensibles de la retina, los bastones y los conos, atraviesan dos a cuatro sinapsis relacionándose con otros tipos de células retinianas antes de arribar a las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares se empaquetan entre sí formando el nervio óptico. Las fibras del nervio óptico se dirigen hacia los lóbulos ópticos donde forman sinapsis. Las células del lóbulo óptico envían, a su vez, sus axones hacia centros visuales superiores.

Como resultado del entrecruzamiento de los nervios ópticos en el quiasma óptico, cada lóbulo óptico recibe la mayor parte de las aferencias del ojo contralateral.

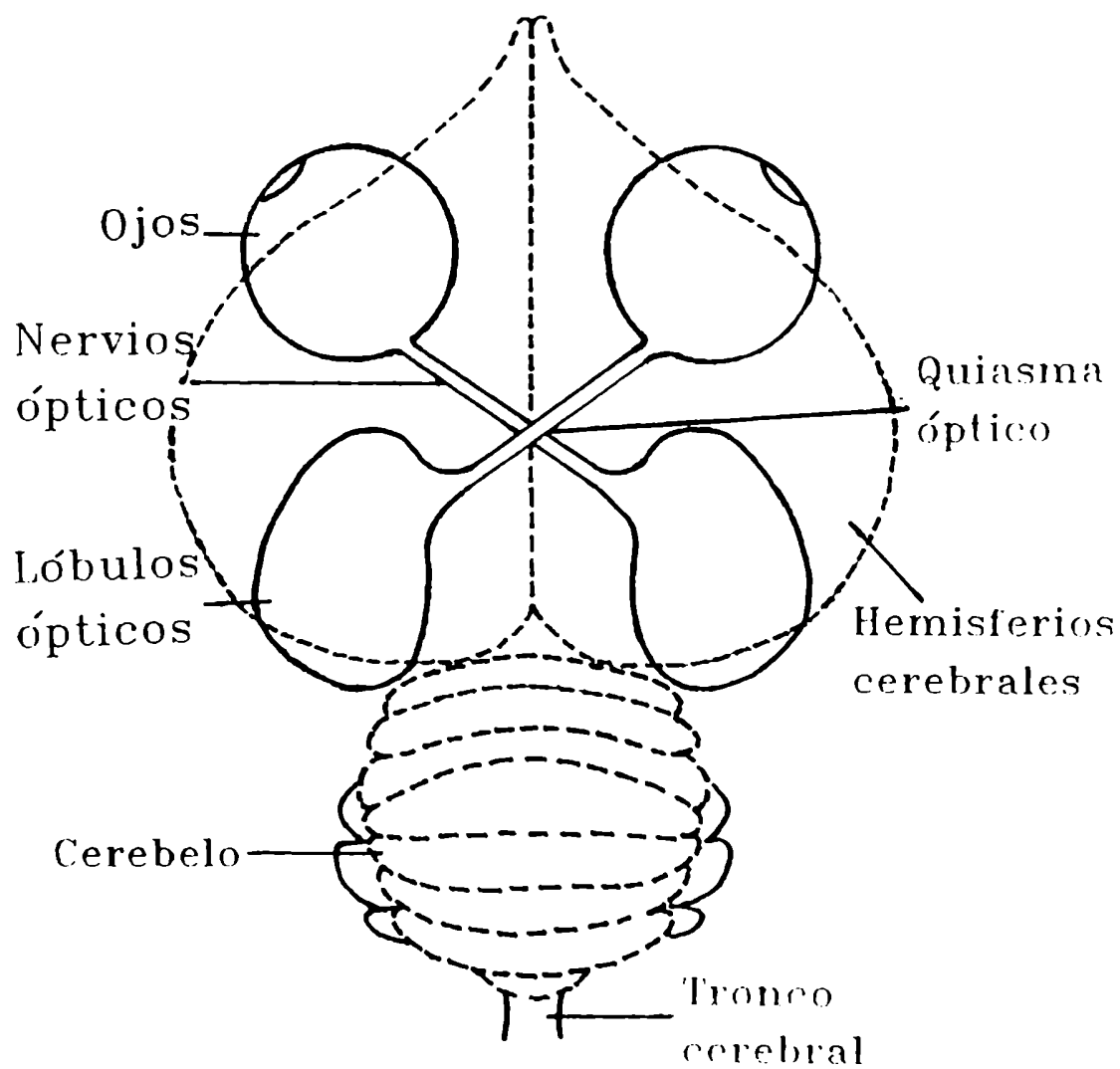


Fig. 4 Esquema de la vía visual del pollo

3.2 El lóbulo óptico de pollo: modelo experimental de desarrollo

El lóbulo óptico de pollo es un modelo atractivo para el estudio del desarrollo del sistema visual por las siguientes razones:

1) Es una estructura laminada (15 capas), lo cual es de interés para estudios citoarquitectónicos y de factores involucrados en la regulación de la proliferación y migración celular en el Sistema Nervioso.

2) Existe una representación notablemente precisa de la retina en la superficie del lóbulo óptico y por lo tanto es un sistema apropiado para el análisis de los patrones de conexión durante el desarrollo embrionario.

3) Recibe su principal proyección aferente del ojo contralateral, siendo ideal para investigar el efecto de la de-aferentación sobre la proliferación, diferenciación, migración y mantenimiento celular.

4) Hay abundante información sobre el desarrollo ontogenético del lóbulo óptico de pollo y por consiguiente es posible correlacionar la ontogénesis de diferentes componentes sinápticos, tales como los receptores sinápticos, con la de otros elementos neuronales.

El desarrollo embrionario del lóbulo óptico de pollo puede dividirse en tres fases principales (La Vail y Cowan, 1971):

1° Fase (entre los días 3 a 6 de incubación):

En este período la proliferación celular es máxima.

El lóbulo óptico está constituido por el epitelio neural original y por células que se diferenciaron tempranamente localizadas externamente a esta capa.

2° Fase (entre los días 6 a 12 de incubación):

Está caracterizada por la migración a partir del epitelio neural de gran número de células diferenciadas.

En particular en el día 12 de incubación los eventos principales son los siguientes:

1) Cesa la proliferación celular.

ii) Las 6 capas principales y la mayoría de las subdivisiones de estas capas son identificables.

iii) Las fibras retinales han invadido todas las regiones del lóbulo óptico.

iv) Hasta el día 12 el lóbulo óptico es completamente independiente de influencias tróficas del ojo. A partir del día 12 o 14 de incubación cuando se remueve la vesícula o copa óptica unilateral de los embriones de pollo se produce una atrofia neuronal progresiva en el lóbulo óptico.

3° Fase (entre el día 12 de incubación y el nacimiento):

Se produce un crecimiento celular en todas las capas y se completa la diferenciación citoarquitectónica de todas las regiones del lóbulo óptico.

Los días 17-18 de incubación son críticos para el desarrollo de las conexiones retinales y de otras conexiones sinápticas pues es el momento en el cual puede ser registrada en el lóbulo óptico la primera respuesta fótica evocada. En dicho momento se establecerían los contactos sinápticos funcionales entre las fibras retinales y las células del lóbulo óptico.

La maduración de las neuronas, el crecimiento de sus procesos y el establecimiento de conexiones sinápticas

definitivas dentro del lóbulo óptico continúan probablemente durante algún tiempo más, posterior al nacimiento.

El GABA cumple un rol inhibitorio en la vía visual de una diversidad de vertebrados (Graham, 1972). Estudios electrofisiológicos han demostrado la importancia del sistema GABAérgico en los circuitos locales del lóbulo óptico de pollo (Cuenod y Streit, 1980).

En trabajos previos han sido descritos los patrones de desarrollo de los sitios receptores GABAérgicos (Flores y col., 1986; Ríos y col., 1987) y de la enzima que cataliza la formación del GABA, GAD (González y col., 1990), en el lóbulo óptico de pollo como marcadores bioquímicos de la maduración sináptica. Los sitios receptores GABAérgicos aumentan notablemente desde el día 12 prenatal hasta el día 6 postnatal y a partir de este estadio se produce un descenso y estabilización hasta alcanzar los valores del adulto alrededor del día 18 postnatal. Ha sido comprobada, además, la existencia de dos poblaciones de sitios receptores GABAérgicos que aparecen en diferentes estadios del desarrollo (Flores y col., 1986). En efecto, en los primeros estadios del desarrollo embrionario (días 11 a 16 prenatales) sólo se halla presente el sitio de baja afinidad y recién a

partir de los días 16-17 prenatales se encuentran ambos sitios presentes.

El perfil de desarrollo de la enzima de síntesis del neurotransmisor también presenta un período transitorio de máxima actividad pero alrededor de los días 2-3 postnatales.

Estos resultados sugieren que la maduración bioquímica de las sinapsis continúa durante algún tiempo más después del nacimiento, es decir luego del establecimiento de los contactos neuronales.

La existencia de receptores BZD ha sido revelada en diferentes áreas visuales del Sistema Nervioso (Sieghart y col., 1982; Zarbin y col., 1986; Schliebs y col., 1987) con propiedades farmacológicas bastante similares a las exhibidas por estos receptores en otras áreas (Braestrup y Nielsen, 1978; Tehrani y Barnes, 1986; Borden y col., 1987).

Numerosos trabajos han descrito la presencia de sitios receptores BZD de alta afinidad durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central de vertebrados (Palacios y col., 1979; Regan y col., 1980; Sher, 1983; Mehta y Ticku, 1988; Robbins e Ikeda, 1989; Reichelt y col., 1991) incluyendo las aves (Altstein y col., 1981; Chan y col., 1983; Batuecas y col., 1987). Un alto porcentaje de sitios receptores BZD se expresa en estadios tempranos del desarrollo del cerebro de

rata en relación a otros receptores neuronales cuyos perfiles ontogenéticos han sido estudiados (Candy y Martin, 1979).

Estudios recientes han revelado que el agregado "in vitro" de diazepam produce un aumento en la unión específica del [^3H]GABA al sitio de baja afinidad en el lóbulo óptico de pollo (Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990). Este efecto es mayor en estadios embrionarios y disminuye gradualmente a lo largo del desarrollo. Este aumento es debido a cambios en la afinidad del receptor mientras que el número máximo de sitios permanece inalterado. Estos resultados sugieren que sólo los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad estarían asociados a los receptores BZD. También se ha demostrado en diferentes áreas del Sistema Nervioso de vertebrados que el agregado de GABA produce un aumento, edad-dependiente, en la afinidad de las BZ por su sitio receptor (Mallorga y col., 1980; Daval y col., 1991).

En el presente trabajo se estudiaron las características farmacológicas y el perfil ontogenético del receptor BZD en el lóbulo óptico de pollo. Los datos obtenidos permitieron establecer una correlación temporal entre los diferentes componentes del sistema GABAérgico.

3.3 Heterogeneidad de sitios receptores

Mientras los primeros estudios sobre los sitios de unión específica de las BZ en el Sistema Nervioso Central describían la existencia de una población homogénea de receptores (de tipo central) (Braestrup y Squires, 1977; Möhler y Okada, 1977) evidencias posteriores sugieren la presencia de al menos dos tipos de receptores BZD distintos, definidos como tipo I (BZD₁ o w₁) y tipo II (BZD₂ o w₂) (Regan y col., 1981; Hunt, 1982; Lippa y col., 1982; Dubnick y col., 1983; Squires, 1983; Langer y Arbilla, 1990).

Esta heterogeneidad de receptores fue inicialmente revelada mediante el uso de una serie de triazolopiridazinas (TPZ) las cuales se unen con alta afinidad a los sitios BZD₁ y con baja afinidad a los sitios BZD₂. En cambio, las BZ se unen con alta afinidad a ambos subtipos.

Estas dos clases de receptores son distinguibles por sus propiedades bioquímicas (Lo y col., 1982; Dubnick y col., 1983; Bacon y Viennot, 1990). En efecto, el sitio BZD₁ es termolábil mientras que el sitio BZD₂ es más estable al calor. Además, el GABA protege a los sitios BZD₁ de la inactivación térmica y sólo parcialmente a los BZD₂. Los

receptores BZD₂ son solubles en el detergente no iónico Triton X-100 en tanto que los receptores BZD₁ requieren altas concentraciones de sal para ser solubilizados por el detergente.

Ha sido demostrado que estos dos tipos de receptores presentan una distribución regional diferencial en el Sistema Nervioso Central de mamíferos. En el cerebelo se encuentra predominantemente el sitio BZD₁, en tanto que en el hipocampo se encuentra en mayor proporción el sitio BZD₂. En otras áreas los porcentajes de cada sitio presentan valores intermedios (Niehoff y col., 1982; Stapleton y col., 1982; Volicer y Biagioni, 1982; Luzzani y col., 1984; Santi y col., 1988; Giorgi y col., 1989).

Otros estudios sugieren que los sitios BZD₁ y BZD₂ poseen una diferente localización subcelular. Los receptores BZD₁ estarían situados preferencialmente en la membrana postsináptica y en cambio los receptores BZD₂ se localizarían principalmente en los terminales nerviosos (Lo y col., 1983; Trifiletti y Snyder, 1985).

Como ya ha sido mencionado en el punto 2 de esta introducción, los estudios en los cuales se purificaron las subunidades que forman el complejo receptor GABA/BZ revelaron la existencia de varias subunidades α que unen

específicamente [^3H]BZ (α_1 - α_3) (Hebebrand y col., 1986; Sato y Neale, 1987, 1989b). Estos resultados concuerdan con la existencia de una población heterogénea de receptores BZD.

El estudio de las propiedades farmacológicas que poseen las diferentes subunidades del complejo receptor, a través de experimentos de expresión de ARN mensajeros en oocitos de anfibios, ha permitido dilucidar una posible composición estructural de los sitios receptores BZD₁ y BZD₂ (Pritchett y col., 1989a). Un complejo receptor con estructura 2(α_1),2(β_1),(τ_2) exhibe propiedades similares a los sitios BZD₁ mientras que el complejo 2(α_2),2(β_1),(τ_2) y 2(α_3),2(β_1),(τ_2) presenta las propiedades de los sitios BZD₂. De acuerdo a estos resultados, las diferencias entre los dos subtipos de receptor BZD aparentemente estarían basadas en la presencia de distintas variantes de la subunidad α del receptor GABA/BZ.

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de diferentes proteínas a las cuales el [^3H]FNZ se puede unir irreversiblemente mediante experimentos de marcado por fotoafinidad con luz ultravioleta (Hebebrand y col., 1986, 1987a). La correspondencia entre estas proteínas y las variantes de la subunidad α aún no se ha establecido.

Existen trabajos que sugieren que la glicosilación diferencial de proteínas (y otras modificaciones post-traduccionales) puede constituir un factor adicional de variabilidad (Sweetnam y Tallman, 1986).

Una de las características más interesantes de los sitios BZD₁ y BZD₂, que ha sido demostrada en el Sistema Nervioso Central de roedores, es que cada uno de ellos exhibe un perfil de desarrollo diferente (Lippa y col., 1981; Chisholm y col., 1983; Bacon y col., 1991). Además, tanto las diversas proteínas irreversiblemente marcadas por [³H]FNZ como las distintas subunidades α presentan una ontogenia distinta (Eichinger y Sieghart, 1986; Hebebrand y col., 1987b; Vitorica y col., 1990).

Mediante experimentos de inhibición de la unión de [³H]FNZ por CL 218872, una TPZ de la serie antes mencionada, se estableció el patrón de desarrollo de los sitios receptores BZD₁ y BZD₂ en el lóbulo óptico de pollo y su relación con el curso temporal de expresión de los sitios receptores GABAérgicos de alta y baja afinidad.

3.4 Plasticidad del receptor: Efecto de la estimulación luminosa

Durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central se produce una compleja interacción entre factores ambientales (epigenéticos) y factores genéticos.

El efecto de la estimulación ambiental es remarcable durante estadios tempranos del desarrollo llamados períodos críticos o sensitivos (Movshon y Van Sluyters, 1981; Mower y col., 1983). Los cambios producidos durante estos períodos permanecen como efectos de larga duración.

En particular para el sistema visual ha sido demostrado que el desarrollo normal depende de una adecuada estimulación luminosa. Las modificaciones en dichos estímulos conducen a alteraciones estructurales y fisiológicas (Hickel, 1981; Wiesel, 1982; Kato, 1990).

Los receptores sinápticos, componentes claves en la propagación del estímulo nervioso a través de la sinapsis, pueden mediar cambios en dicha propagación. La plasticidad de estos receptores puede tener un rol especial tanto en la organización como en los procesos de adaptación del Sistema Nervioso (Klein y col., 1989).

Las neuronas GABAérgicas forman parte de los circuitos locales que se encuentran interpuestos en las vías de proyección. Los mismos se consideran los circuitos más plásticos del Sistema Nervioso Central de los organismos superiores.

Diversos trabajos demuestran que modificaciones en diversos factores ambientales conducen a cambios en los receptores GABAérgicos del sistema visual de pollo. La adaptación de pollos a la luz y a la oscuridad durante periodos breves de tiempo (5 hs) causaron respectivamente un aumento y una disminución en la afinidad del GABA por su sitio receptor en la retina de pollo (Fischer de Plazas y col., 1986). En cambio, en experimentos de hiper e hipoestimulación luminosa durante periodos largos de tiempo (2 semanas) se observó un aumento y una disminución, respectivamente, en el número máximo de sitios receptores del lóbulo óptico de pollo mientras que la afinidad de los mismos permaneció inalterada (Ríos y col., 1987).

En experimentos recientes se demostró también que la exposición a un patrón visual simple provoca un aumento en el número total de sitios receptores GABAérgicos del lóbulo óptico de pollo (Fischer de Plazas y col., 1991).

Todos estos resultados nos sugieren que variaciones tanto en la afinidad como en la densidad del receptor GABAérgico están relacionadas a cambios adaptativos del sistema visual en respuesta a variaciones en la estimulación ambiental.

Ha sido comprobado que los receptores BZD poseen un rol funcional en el sistema visual. En efecto, en la retina de rata, las BZ exógenas producen cambios en otros sistemas de neurotransmisores. La administración sistémica de flurazepam inhibe el incremento en el recambio de dopamina y la inyección intraocular suprime el incremento en la síntesis de dopamina producidos por la estimulación luminosa (Kamp y Morgan, 1982).

Se ha demostrado que los niveles de receptores BZD, en estructuras visuales de la rata, pueden ser modificados mediante adaptación a la luz y a la oscuridad (Rothe y col., 1985). A partir de estos resultados se postuló que estos receptores pueden poseer un rol en los mecanismos de adaptación a cambios en la estimulación ambiental.

En el presente trabajo se analizó la plasticidad del receptor BZD en respuesta a variaciones en los niveles de iluminación ambiental durante el desarrollo postnatal del lóbulo óptico de pollo.

3.5 Efecto moduladorio de factores endógenos sobre la unión específica de BZ

La estimación de los parámetros cinéticos que caracterizan a un receptor, tales como la afinidad y el número máximo de sitios receptores, se ve afectada por la presencia de factores endógenos que modulan la unión del ligando a su sitio receptor. Es por eso que variaciones en los procedimientos que se utilizan para preparar las membranas sinápticas empleadas en los ensayos de unión del radioligando afectan la caracterización del receptor. La presencia de diversos moduladores endógenos en las distintas preparaciones de membranas es la causa principal de las diferencias observadas.

Fue inicialmente demostrado que el procedimiento de congelación-descongelación y posterior tratamiento con el detergente no iónico Triton X-100 de la fracción de membranas sinápticas permite detectar la presencia de los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad (Toffano y col., 1978; Flores y col., 1986). Se postuló entonces la existencia de una proteína, la GABA-modulina, que enmascaraba estos sitios de unión y la cual era extraída mediante el uso del detergente (Vaccharino y col., 1985).

Un importante modulador endógeno del receptor GABAérgico es el GABA mismo. Ha sido comprobado que la aplicación de procedimientos que permiten eliminar gran parte del neurotransmisor endógeno tales como los lavados exhaustivos con buffer de las membranas sinápticas, han producido un aumento en la afinidad del GABA por el sitio de baja afinidad y también la expresión del sitio de alta afinidad (Napias y col., 1980; Gardner y col., 1981).

En trabajos recientes se comparó el efecto de los lavados exhaustivos con buffer, de la congelación-descongelación seguida por tratamiento con Triton X-100 y la combinación de los dos métodos sobre la unión de [^3H]GABA en membranas aisladas durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo (Fiszer de Plazas y col., 1990). Se observó que el tratamiento con Triton X-100 es más efectivo en aumentar el número máximo de sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad que el método de los lavados con buffer. Sin embargo, cuando se trató a las membranas con el detergente a continuación del procedimiento de los lavados con buffer el efecto es menor con respecto al tratamiento con el detergente solamente. Esto podría sugerir que a través de los lavados se está extrayendo algún compuesto endógeno que posiblemente esté involucrado en el efecto del Triton X-100. Además este

incremento en el número de sitios de unión del GABA de alta afinidad por el detergente es mayor en estadios tempranos del desarrollo (día 14 prenatal) que en animales recién nacidos.

Estos resultados parecen sugerir la existencia de factores endógenos que afectan los parámetros cinéticos del receptor GABAérgico en el lóbulo óptico de pollo, los cuales son extraídos diferencialmente por los distintos procedimientos utilizados y además se expresan en distintos momentos del desarrollo.

Es interesante también que el efecto estimulador del diazepam sobre la unión del [^3H]GABA en el lóbulo óptico de pollo (Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990) fue observado sólo cuando las membranas sinápticas fueron sometidas a exhaustivos lavados con buffer. Este efecto no fue detectado cuando las membranas fueron tratadas con Triton X-100. Es decir que la interacción alostérica entre los sitios receptores BZD y de GABA parecería estar afectada por la presencia de determinadas sustancias endógenas.

Numerosas evidencias demuestran que la unión específica de las BZ a sus sitios específicos de alta afinidad en el cerebro, está regulada por factores endógenos. En efecto, ha sido demostrado que la unión específica de [^3H]BZ es aumentada por el GABA endógeno (Mc Cabe y col., 1988; Miller

y col., 1988) y disminuída por diversos factores endógenos, extraídos a partir de homogenatos de cerebro, tales como: purinas y nucleósidos de purinas (Skolnick y col., 1978; Asano y Spector, 1979), nicotinamida (Möhler y col., 1979), β -carbolinas (Braestrup y col., 1980; Peña y col., 1986), BZ (De Blas y Sangameswaran, 1986) y diferentes péptidos y proteínas (Colello y col., 1978; Davis y Cohen, 1980; Woolf y Nixon, 1981; Guidotti y col., 1983).

En el presente estudio se determinó la presencia de factores endógenos en el lóbulo óptico de pollo capaces de interactuar con el receptor BZD durante el desarrollo así como las características de esta interacción.

OBJETIVOS

1) Ontogénesis del receptor BZD:

En este trabajo se determinó el patrón de desarrollo y las características farmacológicas del receptor BZD en el lóbulo óptico de pollo. Los resultados obtenidos podrán ser comparados con los trabajos previos en los cuales se analizó el desarrollo del receptor GABAérgico en esta misma área del sistema visual. Esto permitirá conocer la interacción entre los sitios receptores BZD y de GABA durante el desarrollo a fin de establecer el acoplamiento temporal entre estos dos sitios relacionados fisiológicamente.

Además se estudió la expresión temporal de los subtipos de receptores BZD, tipo I y II con el propósito de analizar la asociación durante el desarrollo entre cada uno de estos sitios y los sitios receptores GABAérgicos de alta y baja afinidad.

2) Plasticidad receptora:

Se investigó el efecto de la hipo e hiperestimulación luminosa sobre la expresión del receptor BZD durante el desarrollo postnatal del lóbulo óptico de pollo. De esta forma se analizó la plasticidad receptora en respuesta a variaciones ambientales y se determinó si la misma está restringida a algún período particular del desarrollo.

3) Efecto modulador de factores endógenos:

En el presente trabajo se analizó la aparición durante el desarrollo de factores endógenos que modulan la unión específica de las BZ en el lóbulo óptico de pollo así como el mecanismo de su interacción con los receptores BZD.

MATERIALES Y METODOS

1 Drogas:

(Metil-³H)FNZ (80 Ci/mmol) fue provisto por New England Nuclear.

FNZ, Clonazepam y Clordiazepóxido fueron donadas por el laboratorio Roche.

Ro15-1788, Ro5-4864 y CL 218872 fueron obsequiadas por el Dr. E. De Robertis.

Todos los reactivos utilizados fueron de un grado de pureza analítica.

2 Animales:

2.1 Animales criados en condiciones ambientales normales:

Huevos fértiles de la raza White Leghorn fueron incubados a 37°C con una humedad relativa del 60 %.

A partir del nacimiento los pollos fueron mantenidos a temperatura ambiente, con agua y alimento "ad libitum" y bajo

condiciones normales de iluminación ambiental (12 hs de luz-12 hs de oscuridad).

Los animales fueron sacrificados en diferentes estadios del desarrollo desde el día 10 prenatal hasta el día 30 postnatal.

Los animales criados en estas condiciones fueron usados en todos los experimentos excepto en aquellos donde se estudió el efecto de la hipo e hiperestimulación luminosa.

2.2 Animales sometidos a diferentes grados de iluminación ambiental:

Huevos fértiles de la raza White Leghorn fueron incubados en las mismas condiciones que se describieron antes. En el momento del nacimiento los animales fueron divididos en tres grupos, en cajas individuales y mantenidos a temperatura ambiente con agua y alimento "ad libitum". Un grupo de animales fue expuesto a condiciones normales de iluminación (12 hs de luz- 12 hs de oscuridad, N), otro grupo fue mantenido en oscuridad constante (con luz roja, O) y el resto fue expuesto a luz permanente (L). La intensidad de la luz en el interior de la caja del grupo de animales N

(durante el período de luz) y L (permanentemente) fue de 900 lux.

A partir de cada uno de los tres grupos, los animales fueron sacrificados en el momento del nacimiento y en los días 1, 2, 3, 6, 10 y 15 postnatales.

3 Preparación de membranas sinápticas:

En diferentes estadios del desarrollo, embriones y pollos fueron decapitados y cada lóbulo óptico fue removido inmediatamente después. La preparación de membranas sinápticas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por De Robertis y col. (1962). Un número suficiente de lóbulos ópticos fue acumulado y homogeneizado en sacarosa 0,32 M, pH 7,1. Luego de centrifugar a 900 g durante 10 minutos se descartó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos. El segundo sedimento, una fracción mitocondrial, se rehomogeneizó en agua bidestilada, (pH 7,1) y se centrifugó a 20.200 g durante 30 minutos. Este tercer sedimento constituye una fracción enriquecida en membranas sinápticas (M_1). Excepto en los experimentos donde se estudió el efecto de factores

modulatorios solubles, el sedimento M₁ fue lavado 2 veces por homogeneización en buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 y centrifugación a 100.000 g durante 20 minutos.

En los estudios sobre el efecto de factores modulatorios solubles se emplearon membranas sinápticas control y membranas sinápticas exhaustivamente lavadas, las cuales fueron obtenidas por medio de 2 y 10 lavados, respectivamente, de la fracción M₁ con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 seguidos por centrifugación a 100.000 g durante 20 minutos.

Todas las homogeneizaciones efectuadas durante esta preparación se realizaron en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflon, durante 1 minuto y se emplearon 10 ml de solución por cada gramo de tejido (es decir al 10 %).

Todo el fraccionamiento subcelular se realizó a bajas temperaturas (0-4°C).

Los sedimentos finales en todos los estudios fueron congelados a -20 °C durante por lo menos 24 hs antes de ser usados.

4 Ensayo de unión específica de [^3H]FNZ:

Los sedimentos congelados de membranas sinápticas se descongelaron y se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. El ensayo de unión del [^3H]FNZ se realizó por medio de la técnica convencional de filtración (Braestrup y Squires, 1977). Alícuotas de esta suspensión fueron incubadas por cuadruplicado, en 1 ml de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 con 0,5 nM de [^3H]FNZ sólo o en presencia de 3 μM de FNZ durante 40 minutos a 0°C. Luego de esta incubación las muestras se diluyeron con 5 ml de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 e inmediatamente fueron filtradas bajo vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B). Los filtros se lavaron 2 veces con 5 ml de buffer, se secaron y la radioactividad retenida fue medida en un contador de centelleo líquido con una solución centellante de tolueno que contiene 0,4 % de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0,01 % de 2,2'-p-fenil-bis(5-feniloxazol)(POPOP).

La unión específica de [^3H]FNZ fue calculada restando la cantidad de ligando unido en presencia de 3 μM de FNZ (unión inespecífica) de la unión total (medida con [^3H]FNZ sólo).

5 Estimación de los parámetros cinéticos del receptor:

5.1 Experimentos de saturación de la unión específica de [³H]FNZ:

Los experimentos de saturación de la unión específica de [³H]FNZ se realizaron con concentraciones de ligando en el rango de 0,05 a 8 nM.

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de regresión lineal del gráfico de Scatchard (1949) con el objeto de calcular el número máximo de sitios receptores (E_{max}) y la constante de disociación (K_d).

5.2 Experimentos de inhibición de la unión específica de [³H]FNZ:

5.2.1 Análisis de Hill:

Los estudios de inhibición de la unión específica de [³H]FNZ (0.5 nM) por diferentes agonistas y antagonistas del receptor BZD fueron analizados a través del análisis de Hill (1910) a fin de estimar los valores de IC_{50} (concentración de

droga que causa el 50 % de inhibición de la unión del ligando radioactivo) y del coeficiente de Hill (n Hill).

El rango de concentraciones empleadas de Clonazepam, FNZ, Ro15-1788, Ro5-4864 y Clordiazepóxido fue de 10^{-11} a 10^{-6} M, mientras que las concentraciones de CL 218872 usadas se encontraron dentro del rango de 10^{-9} a 10^{-4} M.

5.2.2 Análisis de Hofstee:

Los experimentos de inhibición de la unión específica de 0,5 nM de [3 H]FNZ por diferentes concentraciones de CL 218872 (desde 10^{-9} a 10^{-4} M) se analizaron también por el método de Hofstee (1952) que permite calcular los parámetros cinéticos (constante de inhibición, K_i y E_{max}) de la unión de la TPZ a cada subtipo de receptor utilizando un análisis computarizado (Rodbard y col., 1980).

6 Determinación de proteínas:

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951) usando albúmina de suero bovina como control.

7 Moduladores endógenos:

7.1 Obtención:

En diferentes estadios del desarrollo pre y postnatal del lóbulo óptico de pollo, los sobrenadantes resultantes de los 10 lavados de la fracción M₁ fueron reunidos y liofilizados. Luego fueron disueltos en agua bidestilada, pH 7,4 (reduciendo entre 20 y 40 veces los volúmenes de sobrenadante iniciales) y centrifugados a 100.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron como fuente de moduladores endógenos (ME).

7.2 Actividad inhibitoria:

Se definió 1 unidad inhibitoria como la cantidad de sobrenadante capaz de inhibir en un 50 % la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas.

7.3 Estabilidad al calor:

Los ME provenientes de embriones de 16 días de incubación (1,55 unidades inhibitorias) fueron calentados a 95°C durante 15 minutos antes de ser agregados en el ensayo de unión de [³H]FNZ.

8 Análisis estadísticos:

Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo por medio del test de Student.

RESULTADOS

1 Ontogénesis y caracterización farmacológica del receptor BZD en el lóbulo óptico de pollo:

1.1 Desarrollo del contenido de proteínas sinápticas:

En la Fig. 5 se observa el contenido de proteínas de la fracción de membranas sinápticas durante el desarrollo pre y postnatal del lóbulo óptico de pollo.

En el primer estadio examinado, el día 12 prenatal, la proteína sináptica presentó un valor de $3,10 \pm 0,30$ mg/g tejido fresco. A partir de este día la concentración de proteína aumentó 4 veces hasta alcanzar un valor de $12,12 \pm 1,20$ mg/ g tejido fresco en el día 2 postnatal. Después de este estadio el incremento observado fue muy leve alcanzando un valor de $16,08 \pm 0,27$ mg/ g tejido fresco en el día 30 postnatal.

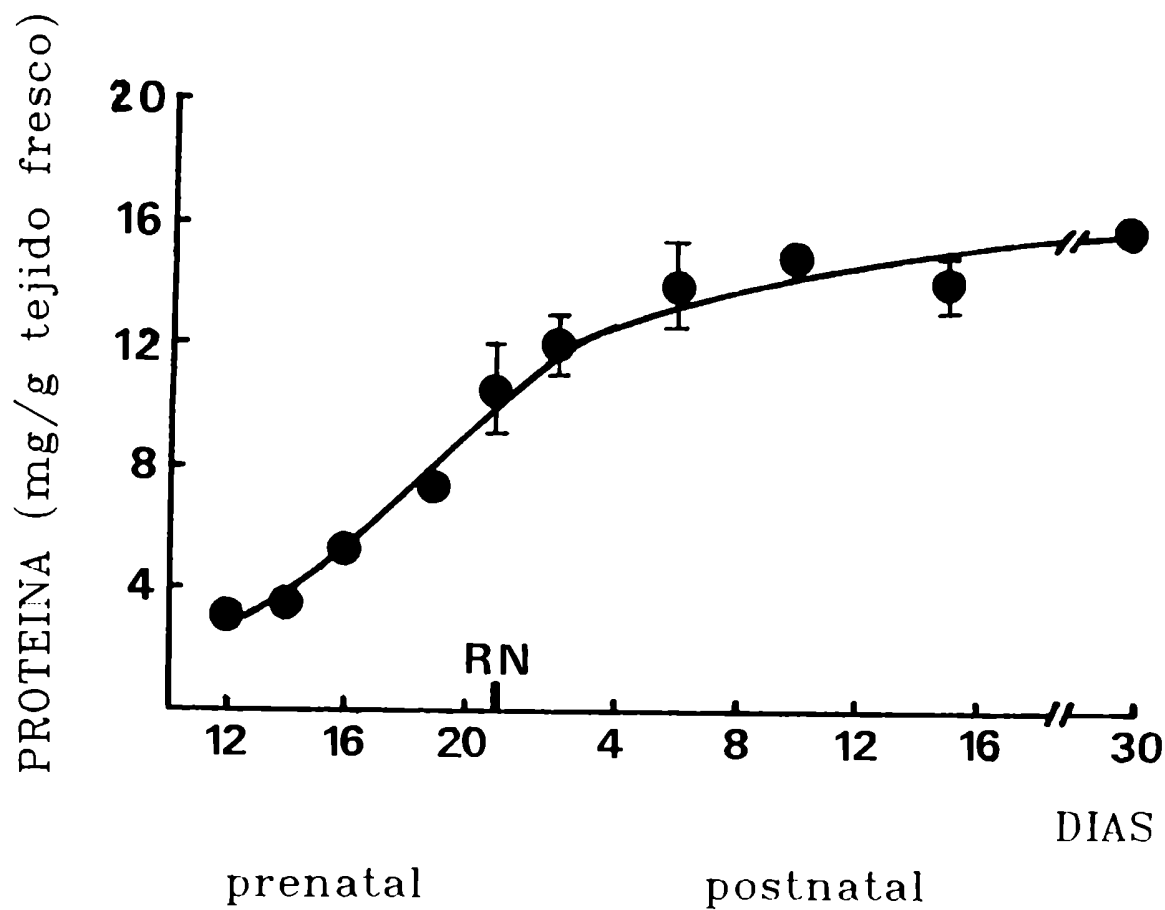


Fig. 5 Contenido proteico de la fracci3n de membranas sin3pticas durante el desarrollo.

Cada punto representa la media \pm S.E.M. de 4-6 experimentos, cada uno de los cuales se realiz3 por cuadruplicado.

RN: reci3n nacido.

1.2 Perfil de desarrollo del receptor BZD:

La Fig. 6 muestra el perfil de desarrollo de los sitios receptores BZD en el lóbulo óptico de pollo. Se utilizaron dos formas de expresión de los resultados: la curva A refleja las variaciones en la densidad receptora en relación al contenido proteico de la fracción de membranas sinápticas (pmol [3 H]FNZ unido/ mg proteína) y la curva B expresa los cambios en la cantidad total de sitios de unión de [3 H]FNZ en el lóbulo óptico de pollo (pmol [3 H]FNZ unido/ lóbulo óptico).

En el día 12 prenatal, el estadio más temprano analizado, la densidad receptora fue un 30,9 % (0,05 pmol/ mg proteína) de la concentración del adulto. En cambio, en ese estadio la cantidad total de sitios de unión de [3 H]FNZ por lóbulo óptico fue un 3,7 % ($0,01 \pm 0$ pmol/ lóbulo óptico) del valor del adulto.

En el día 16 prenatal la densidad receptora alcanzó el valor del adulto ($0,16 \pm 0,01$ pmol/ mg proteína) en tanto que en ese momento la cantidad total de sitios receptores sólo representó el 31,8 % del valor del adulto ($0,06 \pm 0$ pmol/ lóbulo óptico).

A partir de este estadio, de acuerdo a las dos formas de expresión, se observó un pico transitorio de máxima expresión de los sitios receptores BZD. La densidad receptora aumentó dos veces alcanzando un valor máximo en el día del nacimiento de $0,33 \pm 0,01$ pmol/ mg proteína mientras que la cantidad total de sitios de unión de [3 H]FNZ presentó un incremento de 4,5 veces hasta alcanzar el mayor valor en el día 2 postnatal ($0,28 \pm 0$ pmol/ lóbulo óptico).

En el día 8 postnatal los dos parámetros, densidad y cantidad total de sitios receptores, disminuyeron su valor hasta el del adulto ($0,17 \pm 0,02$ pmol/ mg proteína y $0,19 \pm 0,02$ pmol/ lóbulo óptico).

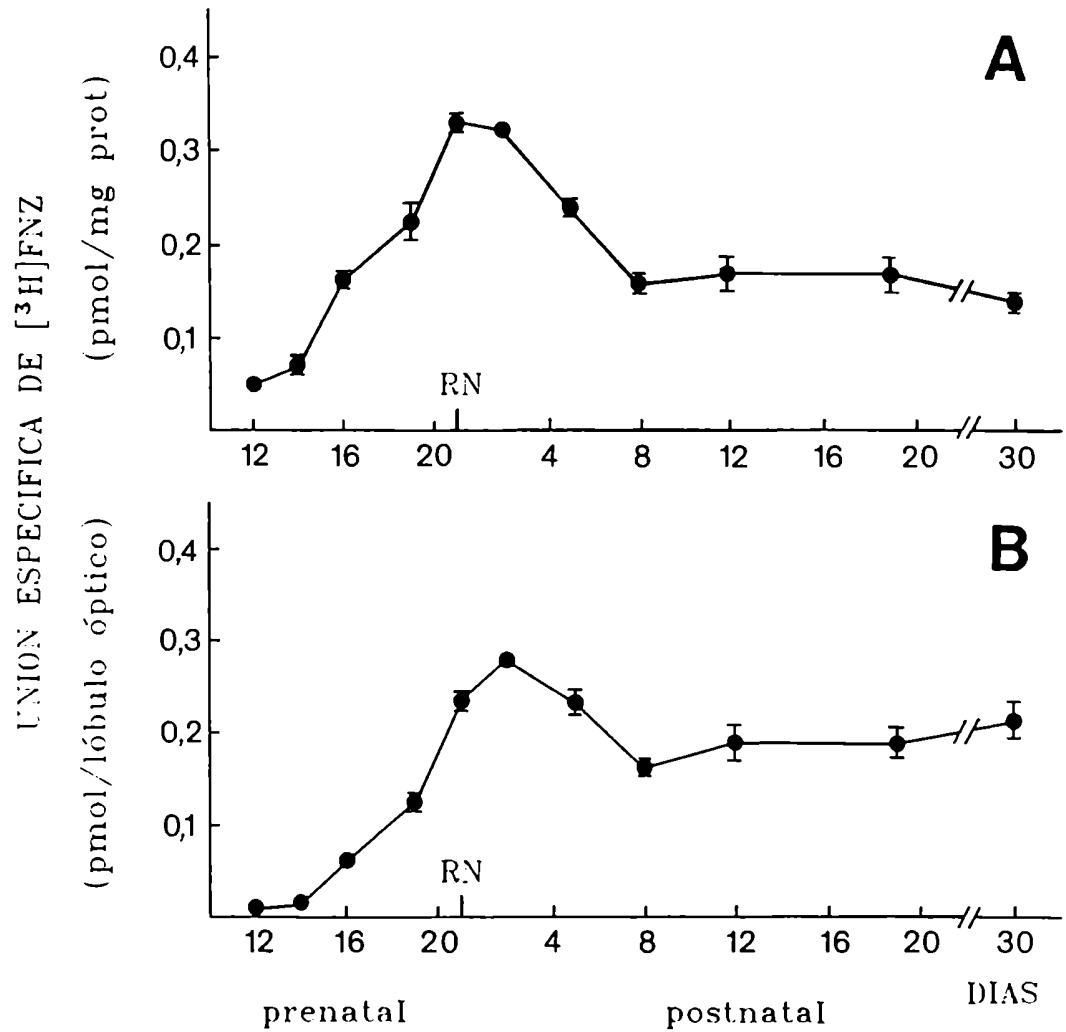


Fig. 6 Desarrollo de los sitios receptores BZD expresado como pmol [3 H]FNZ unido por mg de proteína (A) y por lóbulo óptico (B).

Los valores representados corresponden a la media \pm S.E.M. de 4-6 experimentos realizados cada uno por cuadruplicado.

RN: recién nacido.

1.3 Parámetros cinéticos de la unión específica de [³H]FNZ:

La Fig. 7 muestra la representación gráfica del análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico de pollo en los días 12 prenatal y 1, 15 y 30 postnatales. En todos estos estadios se obtuvo una recta como resultado de esta representación, indicando la presencia de un sólo sitio de unión. Los valores de K_d y B_{max} calculados a partir de este análisis son presentados en la Tabla I.

El número máximo de sitios de unión de [³H]FNZ (B_{max}) aumentó durante el desarrollo desde un valor de $0,79 \pm 0,02$ pmol/ mg proteína en el día 12 prenatal hasta $1,48 \pm 0,38$ pmol/ mg proteína en el adulto. Sin embargo, en el día 1 postnatal se observó un aumento transitorio en el número máximo de sitios receptores, alcanzando un valor de B_{max} de $2,90 \pm 0,09$ pmol/ mg proteína.

La afinidad (K_d) de la unión de [³H]FNZ no cambió significativamente a lo largo del desarrollo. En efecto, los valores obtenidos en los días 12 prenatal y 1, 15 y 30 postnatales fueron $3,02 \pm 0,10$, $3,36 \pm 0,27$, $2,91 \pm 0,18$ y $3,08 \pm 0,17$ nM, respectivamente.

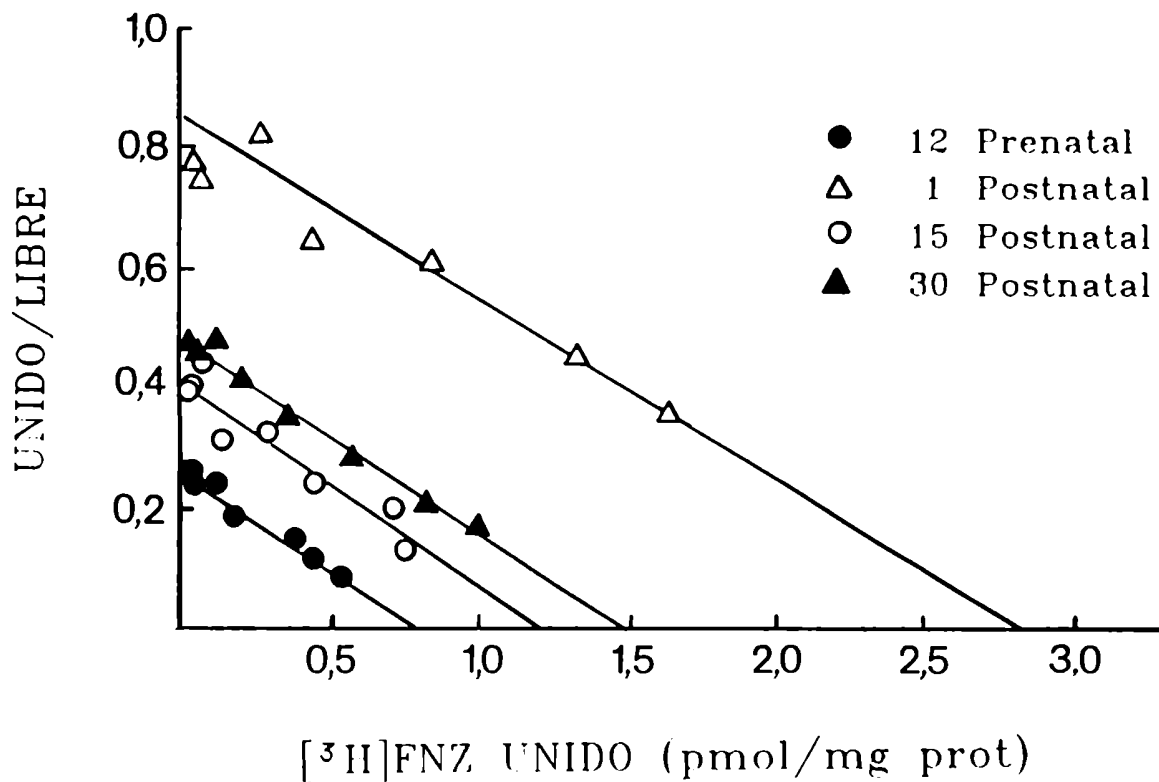


Fig. 7 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo.

La concentración del ligando se encontró dentro del rango de 0,05 a 8 nM.

Tabla I Análisis cinético de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo

Estadio	K _d (nM)	E _{max} (pmol/mg prot)
12 prenatal	3,02 ± 0,10	0,79 ± 0,02
1 postnatal	3,36 ± 0,27	2,90 ± 0,09
15 postnatal	2,91 ± 0,18	1,20 ± 0,05
30 postnatal	3,08 ± 0,17	1,48 ± 0,38

El rango de concentraciones del ligando fue de 0,05 a 8 nM. Los datos representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos efectuados cada uno por cuadruplicado.

1.4 Caracterización farmacológica de los sitios receptores BZD:

En la Tabla II se muestra la afinidad de diferentes drogas por los sitios de unión de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas de lóbulo óptico de pollos de 1 día de edad. Mediante el análisis de Hill de la inhibición de la unión específica de [³H]FNZ se estimaron los valores de IC₅₀ (concentración de droga que causa el 50 % de inhibición) y de los coeficientes de Hill (n Hill) para Clonazepam, FNZ, Clordiazepóxido y Ro15-1788.

Clonazepam, FNZ y el antagonista del receptor BZD, Ro15-1788 fueron muy potentes en la inhibición de la unión del [³H]FNZ (IC₅₀: 3,02 ± 0,06, 4,30 ± 0,36 y 0,32 ± 0,09 nM, respectivamente). Clordiazepóxido fue menos potente (IC₅₀: 4.778,64 ± 31,30 nM).

El Ro5-4864, el cual es un potente inhibidor de la unión de las BZ a los sitios receptores BZD periféricos, no presentó ningún efecto sobre la unión de [³H]FNZ en el rango de concentraciones empleadas (10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M) demostrando la presencia de sitios BZD de tipo central únicamente en el lóbulo óptico de pollo.

Todos los coeficientes de Hill fueron cercanos a la unidad, sugiriendo la presencia de un sólo sitio de unión.

Tabla II Inhibición por diferentes drogas de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 1 día de edad

Compuesto	IC ₅₀ (nM)	n Hill
Clonazepam	3,02 ± 0,06	0,92 ± 0,00
Flunitrazepam	4,30 ± 0,36	0,88 ± 0,02
Ro15-1788	0,32 ± 0,09	0,82 ± 0,09
Clordiazepóxido	4778,64 ± 31,30	0,95 ± 0,00
Ro5-4864 (*)	_____	_____

El rango de concentraciones empleadas de las drogas es de 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M. Los datos representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados cada uno por cuadruplicado.

(*) No se observó ninguna inhibición dentro del rango de concentraciones utilizadas.

2 Desarrollo de diferentes subtipos de receptores BZD en el lóbulo óptico de pollo:

En diferentes estadios del desarrollo pre y postnatal del lóbulo óptico de pollo, se efectuaron experimentos de inhibición de la unión específica de [3 H]FNZ por diferentes concentraciones de CL 218872 (desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M). En la Tabla III se muestra el resultado de estos experimentos, analizados por el método de Hill.

Se observaron cambios durante el desarrollo, tanto en los valores de IC_{50} como en los coeficientes de Hill. La menor potencia de la TPZ para inhibir la unión de la BZ fue observada en el día 13 prenatal, el estadio más temprano que se analizó (IC_{50} : $1,09 \pm 0,03 \mu\text{M}$). A partir de este estadio su potencia aumentó gradualmente alcanzando un valor de IC_{50} de $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ en el día 30 postnatal. Los coeficientes de Hill fueron menores que la unidad en todos los estadios. Los valores mínimos fueron hallados en los días 1 y 30 postnatales (n Hill: $0,46 \pm 0,01$ en ambos estadios). En los días 13 prenatal y 15 postnatal los valores del coeficiente de Hill fueron de $0,69 \pm 0,01$ y $0,64 \pm 0,03$, respectivamente.

Estos experimentos de inhibición fueron también analizados por el método de Hofstee (Fig. 8 a 11). Se observó

la existencia de dos subtipos de receptores BZD a los cuales CL 218872 se une con diferente afinidad (BZD₁ de alta afinidad y BZD₂ de baja afinidad).

La afinidad de la TPZ por los sitios BZD₁ (K₁₁) y BZD₂ (K₁₂) no mostró cambios significativos (P<0,05) durante el desarrollo. Los valores de K₁₁ fueron 4,19 ± 0,29, 3,09 ± 0,37 y 3,71 ± 0,02 nM en los días 1, 15 y 30 postnatales, respectivamente. Los valores de K₁₂ fueron 889,22 ± 53,33, 951,93 ± 49,36, 1016,49 ± 60,61 y 974,38 ± 65,20 nM en los días 13 prenatal y 1, 15 y 30 postnatales, respectivamente.

En la Fig. 12 se muestran las variaciones, durante el desarrollo, tanto en el número máximo del total de los sitios BZD (BZD_r) (calculado a través del análisis de Scatchard de la unión de [³H]FNZ) como en el número máximo de los sitios BZD₁ y BZD₂ (estimados a partir del análisis de Hofstee que se representó en las Fig. 8 a 11).

Cada subtipo de receptor presentó un patrón de desarrollo distinto, lo cual condujo a cambios en las cantidades relativas de cada uno de estos sitios durante la ontogenia. En el día 13 prenatal estuvieron presentes en forma casi exclusiva los sitios BZD₂ (98,23 %) con un E_{max} de 0,77 ± 0 pmol/ mg proteína. A partir de este momento comenzaron a expresarse los sitios BZD₁ alcanzando un valor

de B_{max} de $0,98 \pm 0$ pmol/ mg proteína en el día 1 postnatal, correspondiendo al 31,48 % del total de sitios de unión. Durante este mismo período de tiempo, los sitios BZD₂ aumentaron 3 veces su B_{max} ($2,13 \pm 0,03$ pmol/ mg proteína en el día 1 postnatal). Posteriormente el patrón de desarrollo de los sitios BZD₁ mostró una transitoria disminución en el número máximo de sitios presentando un B_{max} de $0,28 \pm 0,01$ pmol/ mg proteína en el día 15 postnatal. Esta disminución causó una ligera reducción en el porcentaje de estos sitios (23,56 % en el día 15 postnatal). A partir de este estadio el número máximo de sitios BZD₁ aumentó nuevamente hasta alcanzar un B_{max} de $0,93 \pm 0$ pmol/ mg proteína y un porcentaje del 62,88 % en el día 30 postnatal. Por el contrario, el número máximo de sitios BZD₂ disminuyó gradualmente desde el día 1 postnatal hasta un valor de B_{max} de $0,55 \pm 0$ pmol/ mg proteína en el día 30 postnatal (37,12 % del total de sitios).

Tabla III Análisis de Hill de la inhibición de la unión específica de [³H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas en diferentes estadios del desarrollo

Estadio	IC ₅₀ (μM)	n Hill
13 prenatal	1,09 ± 0,03	0,69 ± 0,01
1 postnatal	0,50 ± 0,04	0,46 ± 0,01
15 postnatal	0,43 ± 0,15	0,64 ± 0,03
30 postnatal	0,04 ± 0,01	0,46 ± 0,01

El rango de concentraciones de CL 218872 utilizadas fue de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M. Los datos representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos efectuados por cuadruplicado.

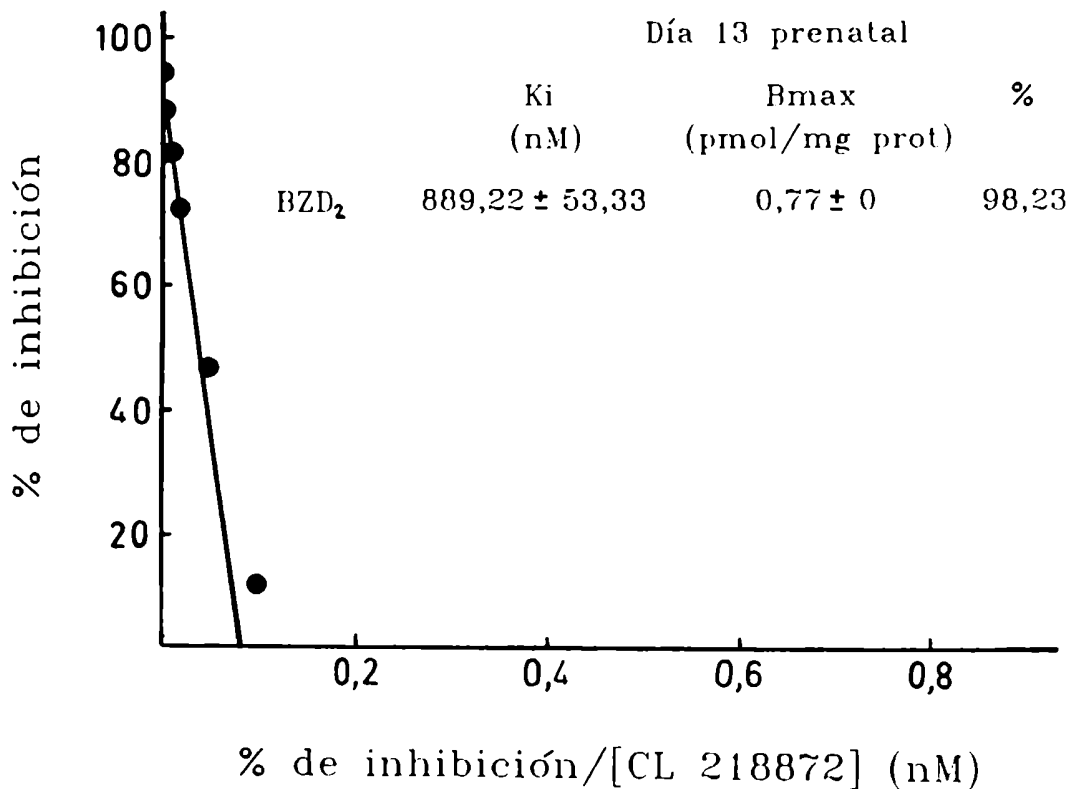


Fig. 8 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de embriones de 13 días de incubación.

Los valores de K_i y B_{max} representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados por cuadruplicado.

El rango de concentraciones de CL 218872 utilizado fue de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M.

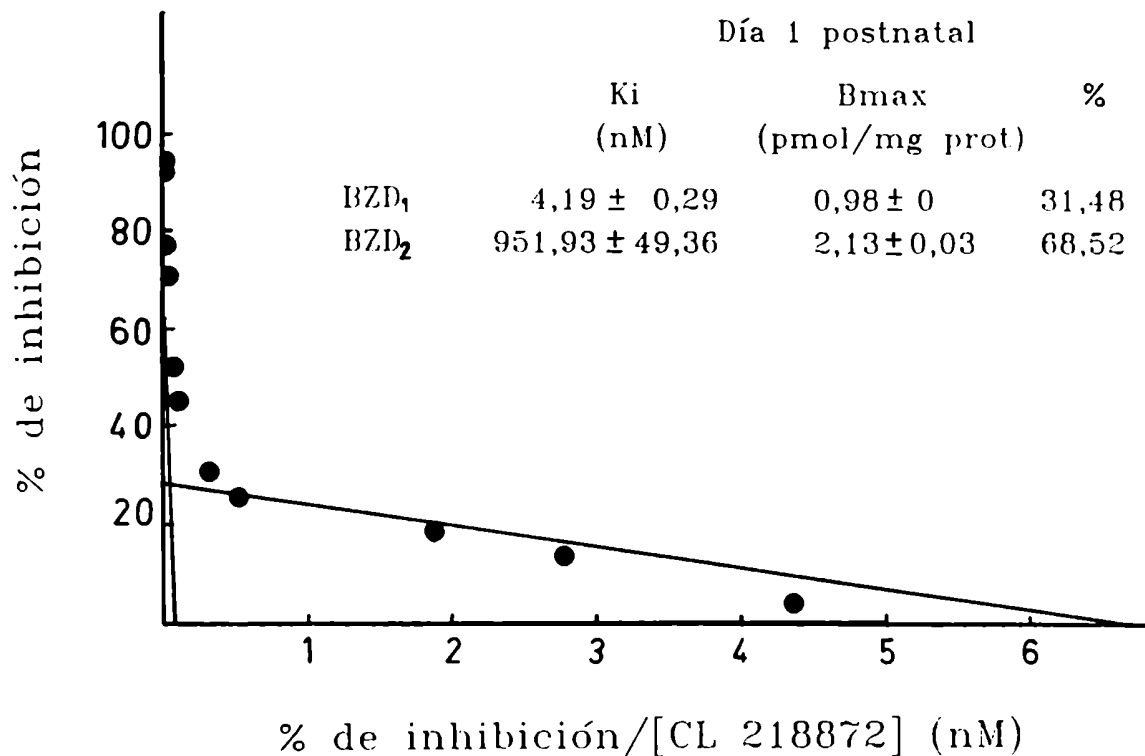


Fig. 9 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de $[^3\text{H}]\text{FNZ}$ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 1 día de edad. Los valores de K_i y B_{max} representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos realizados por cuadruplicado. El rango de concentraciones de CL 218872 utilizado fue de 10^{-9} a 10^{-4} M.

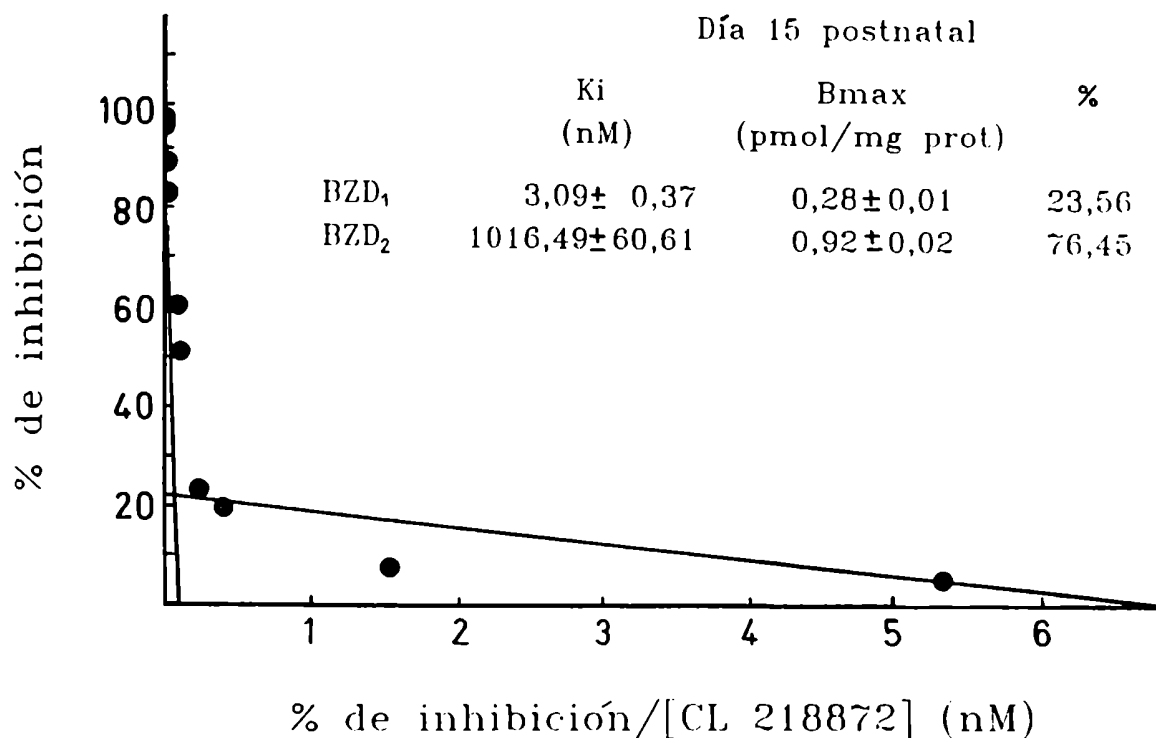


Fig. 10 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 15 días de edad. Los valores de K_i y B_{max} representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados por cuadruplicado. El rango de concentraciones de CL 218872 utilizado fue de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M.

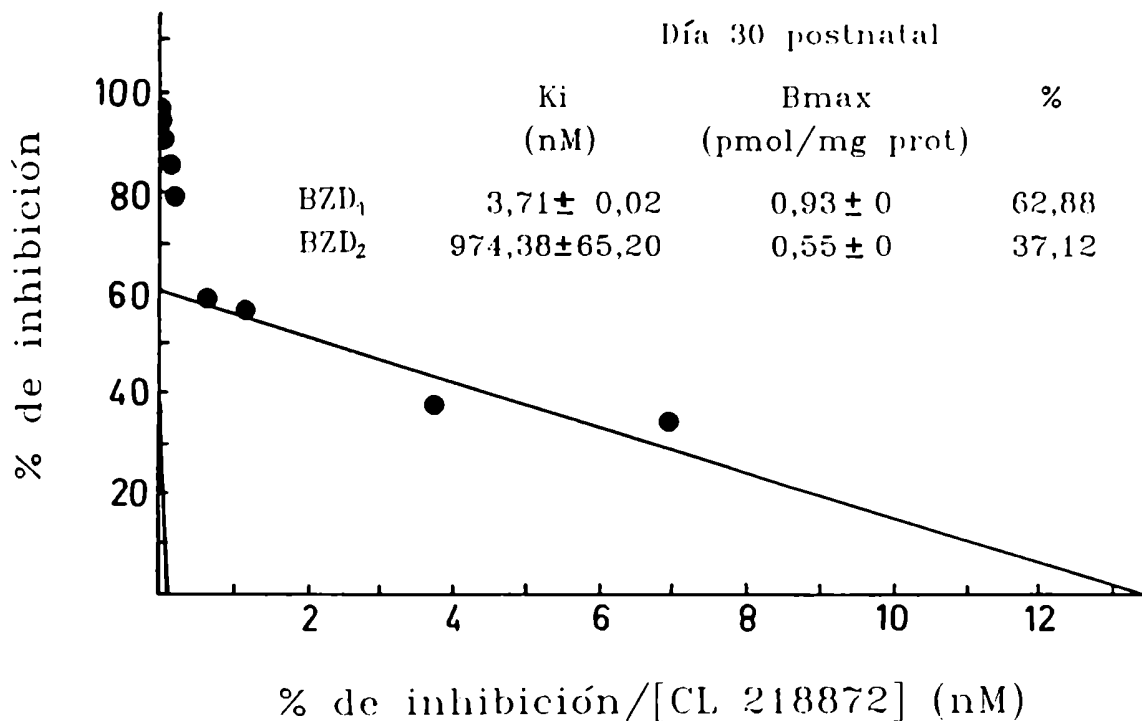


Fig. 11 Análisis de Hofstee de la inhibición de la unión de [³H]FNZ por CL 218872 en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 30 días de edad. Los valores de K_i y B_{max} representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados por cuadruplicado. El rango de concentraciones de CL 218872 utilizado fue de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M.

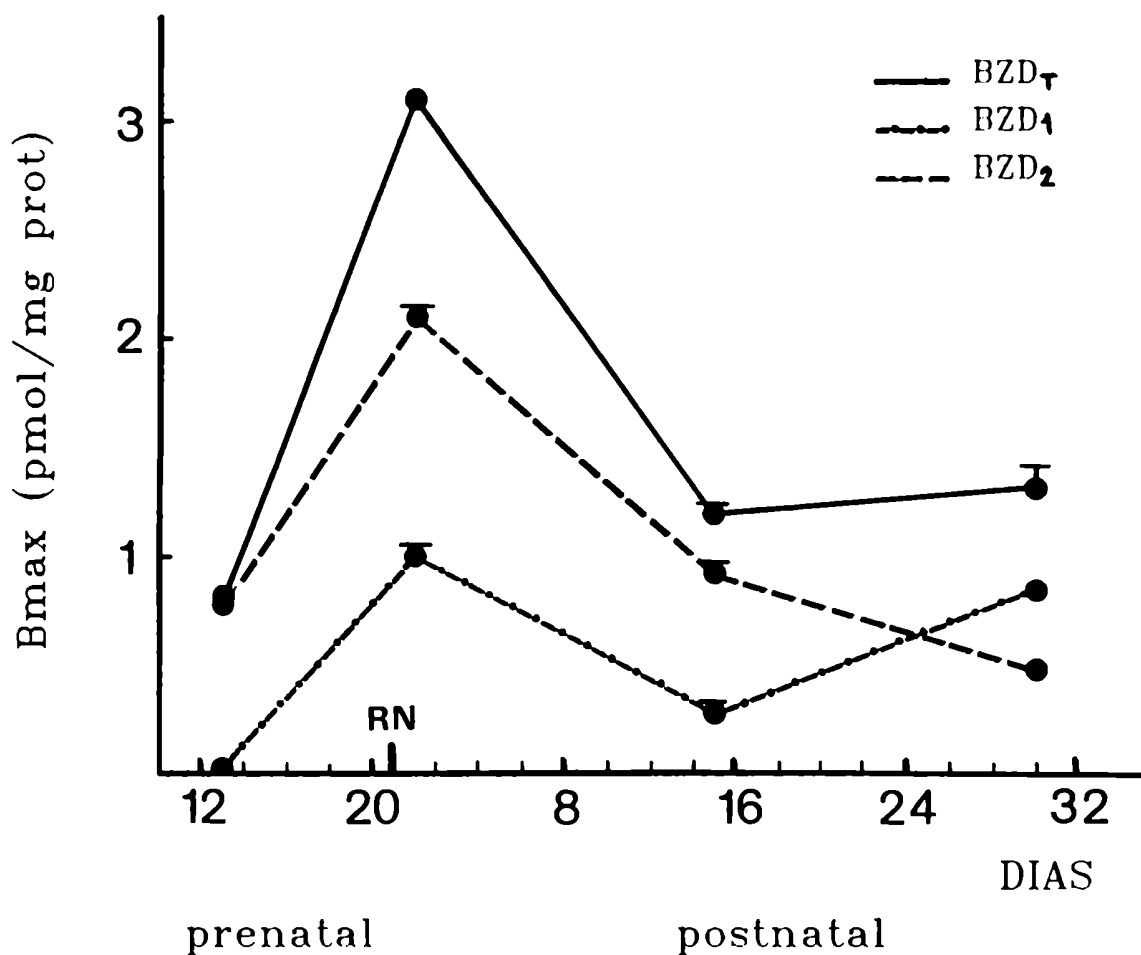


Fig. 12 Perfil de desarrollo de los sitios BZD₁, BZD₂ y BZD_T.

Los valores de B_{max} para los sitios BZD₁ y BZD₂ se obtuvieron a partir del análisis de Hofstee (Fig. 8-11). Los valores de B_{max} para los sitios BZD_T se calcularon a partir del análisis de Scatchard (Fig. 7).

RN: recién nacido.

3 Plasticidad del receptor: Efecto de la hipo e hiperestimulación luminosa

3.1 Contenido de proteínas sinápticas y peso del lóbulo óptico durante el desarrollo de pollos sometidos a diferentes condiciones de iluminación:

La Fig. 13 muestra el incremento en el peso total y en el contenido de proteínas del lóbulo óptico en animales de los grupos L, N y O durante el desarrollo postnatal.

El peso del lóbulo óptico aumentó gradualmente desde un valor de 80 mg en el nacimiento hasta un promedio de 110 mg en el día 15 postnatal. Sin embargo, no se observaron cambios significativos ($P < 0,001$) en cualquiera de las tres condiciones ambientales analizadas.

El contenido proteico de la fracción de membranas sinápticas mostró un pequeño incremento desde 10 hasta 16 mg proteína/ g tejido fresco durante las dos primeras semanas del desarrollo postnatal. Tampoco se hallaron diferencias en los valores del contenido proteico entre los grupos de animales L, N y O ($P < 0,001$).

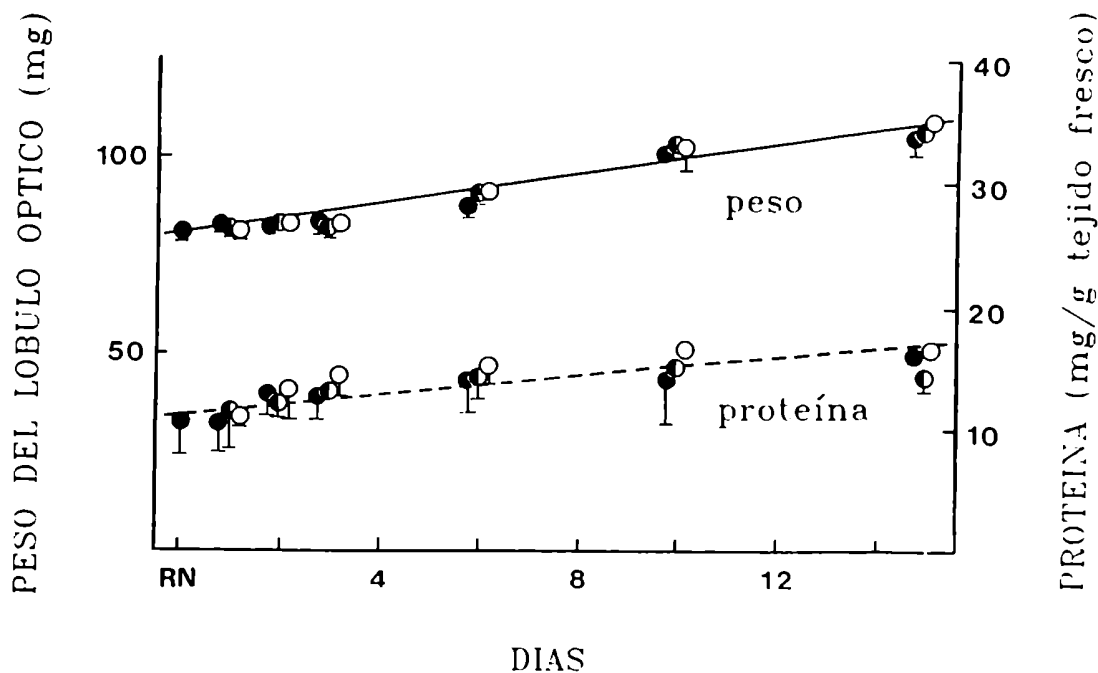


Fig. 13 Variaciones en el contenido proteico y en el peso del lóbulo óptico durante el desarrollo postnatal de pollos sometidos a condiciones normales de iluminación (◐), luz permanente (○) y oscuridad permanente (●).

Los resultados representan la media \pm S.E.M. de 4 determinaciones efectuadas en cada caso por cuadruplicado.

RN: recién nacido.

3.2 Perfil de desarrollo de los sitios receptores BZD en el lóbulo óptico de pollos L, N y O:

En la Fig. 14 se muestra el perfil de desarrollo postnatal de los sitios receptores BZD en el lóbulo óptico de pollos L, N y O, expresado en términos de pmol [^3H]FNZ unido/mg proteína sináptica. Un perfil muy similar se obtuvo cuando los resultados se expresaron como pmol/lóbulo óptico (datos no mostrados).

La Fig. 15 muestra los valores de la unión específica de [^3H]FNZ en los animales L y O, expresados como porcentaje del valor del grupo control (N) considerado como 100 % en cada día del desarrollo.

Durante el primer día postnatal se produjo un incremento en la unión del [^3H]FNZ del 39 % en los pollos N y L, alcanzando ambos grupos un valor de $0,32 \pm 0,01$ pmol/mg proteína. Un aumento menor (21 %) se observó en los animales O presentado un valor de $0,28 \pm 0,01$ pmol/mg proteína en el mismo estadio. Este valor fue un 13 % más bajo que el del grupo control.

Mientras que entre el día 1 y 2 postnatal la unión específica de [^3H]FNZ en los animales N se mantuvo constante, en los animales L se observó un incremento adicional del 19 %

alcanzando un valor de $0,38 \pm 0$ pmol/mg proteína. En cambio, en los animales O se produjo una disminución del 25 % durante este período, obteniéndose un valor de $0,21 \pm 0$ pmol/mg proteína. Esto significa que en el día 2 postnatal la unión específica de [3 H]FNZ en los animales L es un 17 % mayor y en los animales O un 34 % menor con respecto a los animales control (N). Durante el día siguiente se observó una disminución en la unión de [3 H]FNZ en los tres grupos de animales presentando los siguientes valores $0,19 \pm 0$, $0,17 \pm 0$ y $0,14 \pm 0,01$ pmol/mg proteína en los animales L, N, y O, respectivamente. En este momento el valor obtenido en los animales L y N es bastante similar a los observados en el día 15 postnatal. Sin embargo, en los animales O el valor alcanzado en el día 3 postnatal fue un 30 % menor que el exhibido en el día 15 postnatal.

Como se observa en la Fig. 15 hubo un aumento y una disminución significativos ($P < 0,05$) en la unión de [3 H]FNZ en los animales L y O, respectivamente, con respecto a los animales control (N) hasta el día 6 postnatal. Estas diferencias fueron máximas en el día 2 postnatal y disminuyeron gradualmente hasta obtenerse valores casi idénticos en los tres grupos experimentales en el día 10 postnatal.

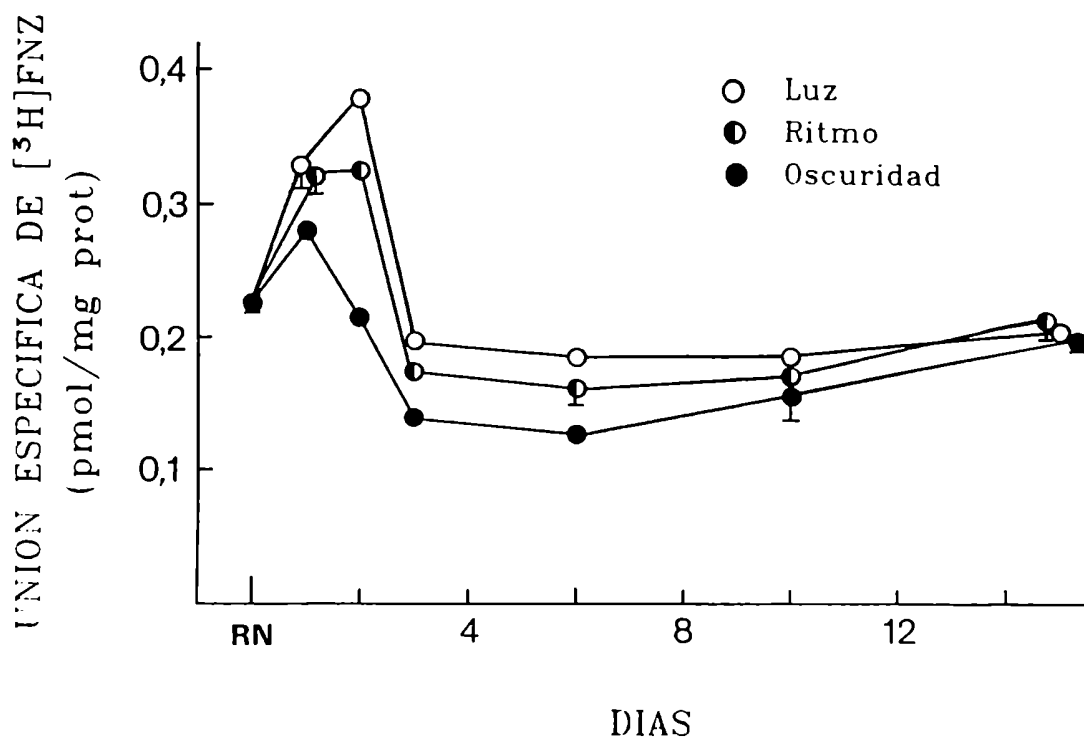


Fig. 14 Desarrollo postnatal de los sitios receptores BZD en animales sometidos a luz permanente (luz), ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo) y oscuridad permanente (oscuridad).

Los puntos graficados representan los valores medios \pm S.E.M. de 4-6 experimentos realizados cada uno por cuadruplicado.

RN: recién nacido

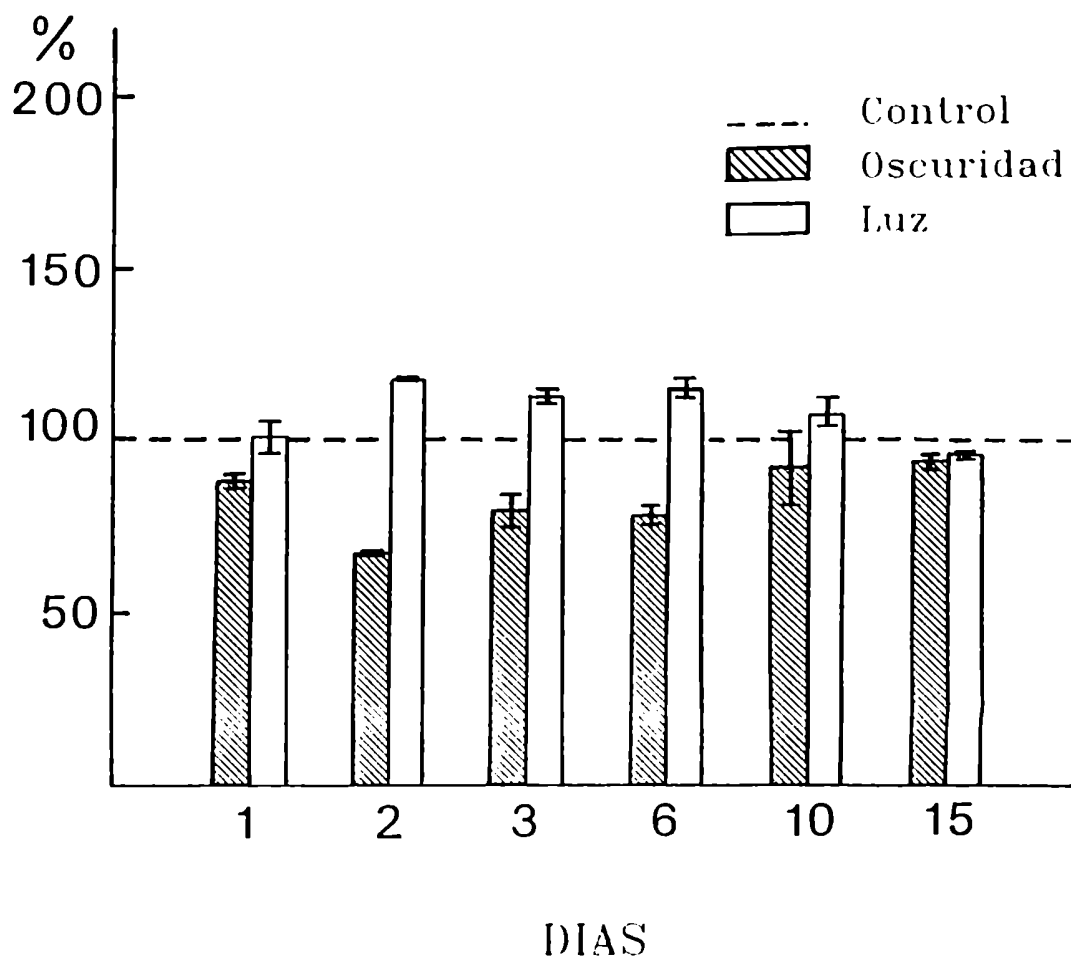


Fig. 15 Efecto de la adaptación a la luz y oscuridad constantes sobre el desarrollo postnatal de los sitios receptores BZD.

Los resultados fueron expresados como la media de los porcentajes (\pm S.E.M.) obtenidos a partir de 4-6 experimentos realizados por cuadruplicado.

3.3 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en el lóbulo óptico de pollos L, N y O:

Con el objeto de determinar posibles diferencias en los parámetros cinéticos (K_d y B_{max}) del receptor BZD entre los tres grupos de animales, se efectuaron experimentos de saturación de la unión específica de [³H]FNZ en pollos de 2 días de edad. El análisis de Scatchard (Fig. 16) reveló que el aumento en la unión específica de [³H]FNZ en los animales L y la disminución en los animales O, con respecto al grupo N, fue debido a cambios en el número máximo de sitios receptores mientras que la afinidad se mantuvo constante. En efecto, como se muestra en la Tabla IV el B_{max} fue de $2,76 \pm 0,03$, $3,40 \pm 0,01$ y $1,46 \pm 0,11$ pmol/ mg proteína en los pollos N, L y O, respectivamente. La K_d , en cambio, no se vio alterada ($3,80 \pm 0,18$, $4,23 \pm 0,27$ y $2,86 \pm 0,11$ nM en los pollos N, L y O).

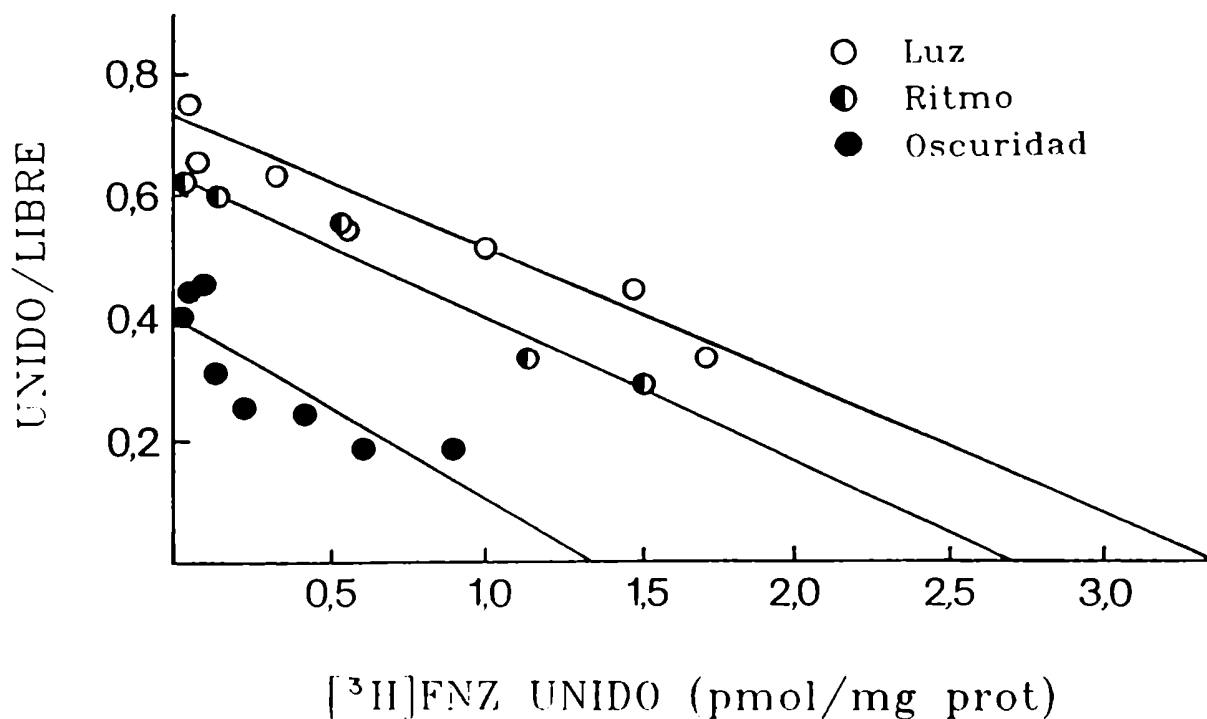


Fig. 16 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de animales de 2 días de edad adaptados a las siguientes condiciones de iluminación: luz permanente (luz), ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo) y oscuridad permanente (oscuridad). El rango de concentraciones del ligando fue de 0,05 a 8 nM.

Tabla IV Análisis cinético de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas aisladas a partir de pollos de 2 días de edad sometidos a las siguientes condiciones de iluminación: ritmo normal de luz/oscuridad (ritmo), luz permanente (luz) y oscuridad permanente (oscuridad).

Condiciones de iluminación	K _d (nM)	E _{max} (pmol/mg prot)
Ritmo	3,80 ± 0,18	2,76 ± 0,03
Luz	4,23 ± 0,27	3,40 ± 0,01
Oscuridad	2,86 ± 0,11	1,46 ± 0,11

El rango de concentraciones del ligando fue de 0,05 a 8 nM. Los datos representan la media ± S.E.M. de 4 experimentos realizados cada uno por cuadruplicado.

4 Efecto moduladorio de factores endógenos sobre la unión de BZ durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo:

4.1 Efecto de lavados exhaustivos de membranas sinápticas sobre la unión específica de [³H]FNZ:

La Fig. 17 muestra el perfil de desarrollo de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas (fracción M₁ sometida a 10 lavados con buffer) y en membranas sinápticas control (fracción M₁ sometida a sólo 2 lavados con buffer). Se observó que los lavados exhaustivos con buffer produjeron un aumento significativo ($P < 0,02$) en la unión específica de [³H]FNZ. En la Fig. 18 se muestra dicho aumento durante el desarrollo expresado en términos de porcentaje de la unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas con respecto a las membranas control.

En el día 10 prenatal, el estadio más temprano que se estudió, los lavados tuvieron muy poco efecto sobre la unión específica de [³H]FNZ, observándose un valor de $0,037 \pm 0$ pmol/ mg proteína en las membranas control y $0,040 \pm 0$ pmol/ mg proteína en las membranas exhaustivamente lavadas, es decir, sólo un 6,74 % de aumento. A partir de este estadio,

la acción de los lavados aumentó considerablemente. El efecto máximo se observó entre los días 14 y 16 prenatales, momento en el cual la unión de [^3H]FNZ en las membranas exhaustivamente lavadas incrementó aproximadamente un 80 % con respecto a las membranas control. En efecto, en los días 14 y 16 prenatales se observaron valores de unión específica de [^3H]FNZ de $0,07 \pm 0,01$ y $0,16 \pm 0,01$ pmol/ mg proteína, respectivamente, en las membranas control, en tanto que en las membranas exhaustivamente lavadas se obtuvieron los siguientes valores: $0,13 \pm 0,03$ pmol/ mg proteína (día 14 prenatal) y $0,29 \pm 0,04$ pmol/ mg proteína (día 16 prenatal). A partir de este estadio estas diferencias fueron disminuyendo gradualmente a lo largo del desarrollo hasta hacerse no significativas ($P < 0,02$) alrededor del día 15 postnatal.

A raíz de estos resultados se estudió el efecto de los exhaustivos lavados sobre los parámetros cinéticos del receptor. A tal fin se realizó el análisis de Scatchard de la unión de [^3H]FNZ en membranas control y en membranas exhaustivamente lavadas de día 16 prenatal (Fig. 19).

En membranas sinápticas control se obtuvieron los siguientes valores: K_a $3,02 \pm 0,10$ nM y B_{max} $1,03 \pm 0,13$ pmol/ mg proteína. Los exhaustivos lavados produjeron un

aumento en la afinidad (K_a $1,99 \pm 0,11$ nM) mientras que el número máximo de sitios receptores permaneció inalterado (E_{max} $1,07 \pm 0,08$ pmol/ mg proteína).

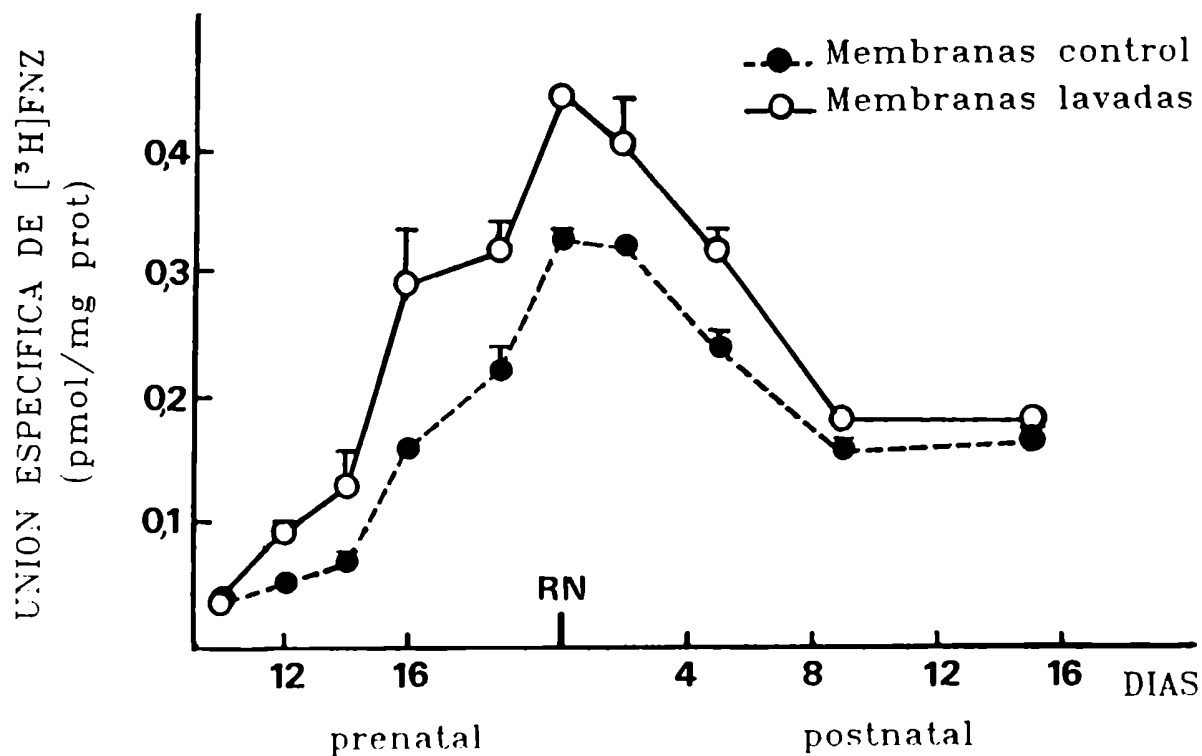


Fig. 17 Unión específica de [³H]FNZ en membranas sinápticas control y en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas aisladas durante el desarrollo.

Los valores graficados representan la media \pm S.E.M. de 4 experimentos efectuados por cuadruplicado.

RN: recién nacido.

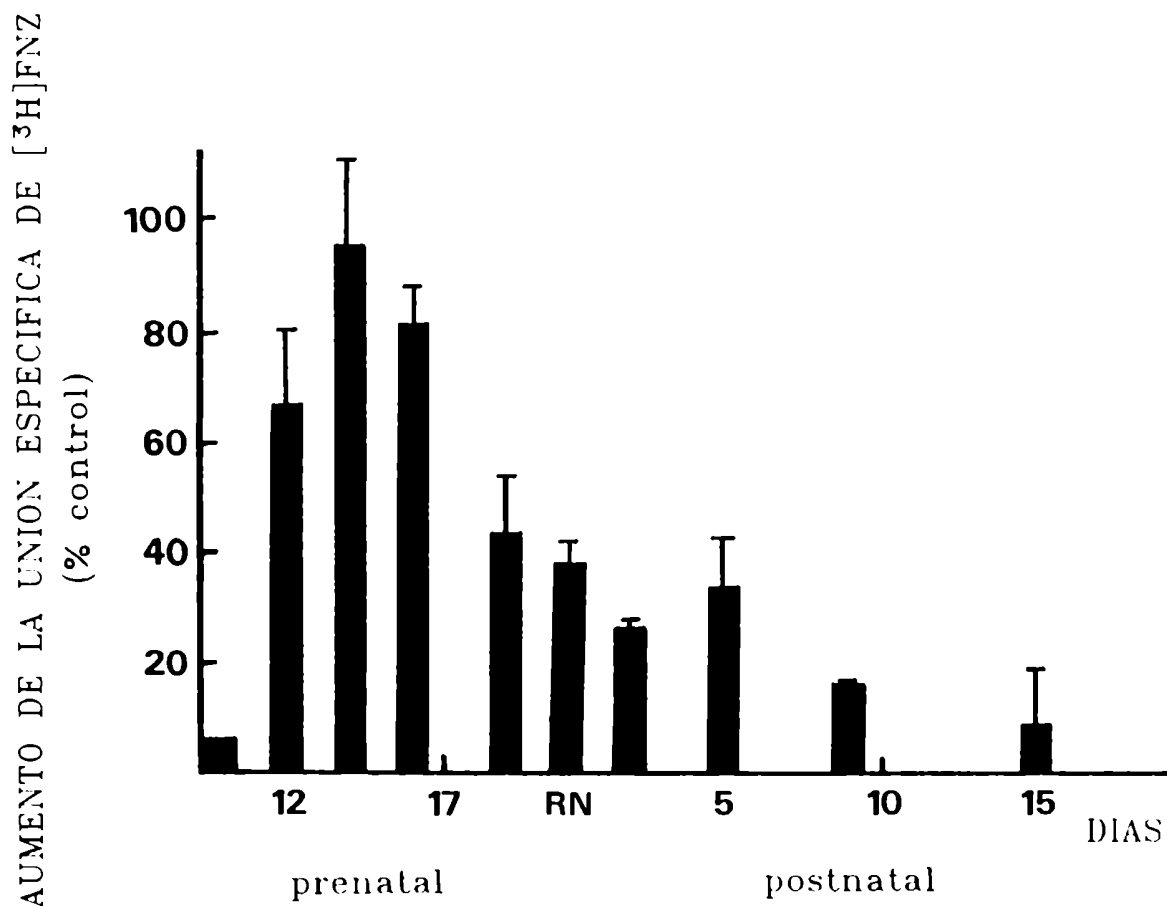


Fig. 18 Efecto de los lavados exhaustivos de las membranas sinápticas sobre la unión de [³H]FNZ durante el desarrollo.

Los resultados fueron expresados como la media de los porcentajes (± S.E.M.) obtenidos a partir de 4 experimentos realizados por cuadruplicado.

RN: recién nacido.

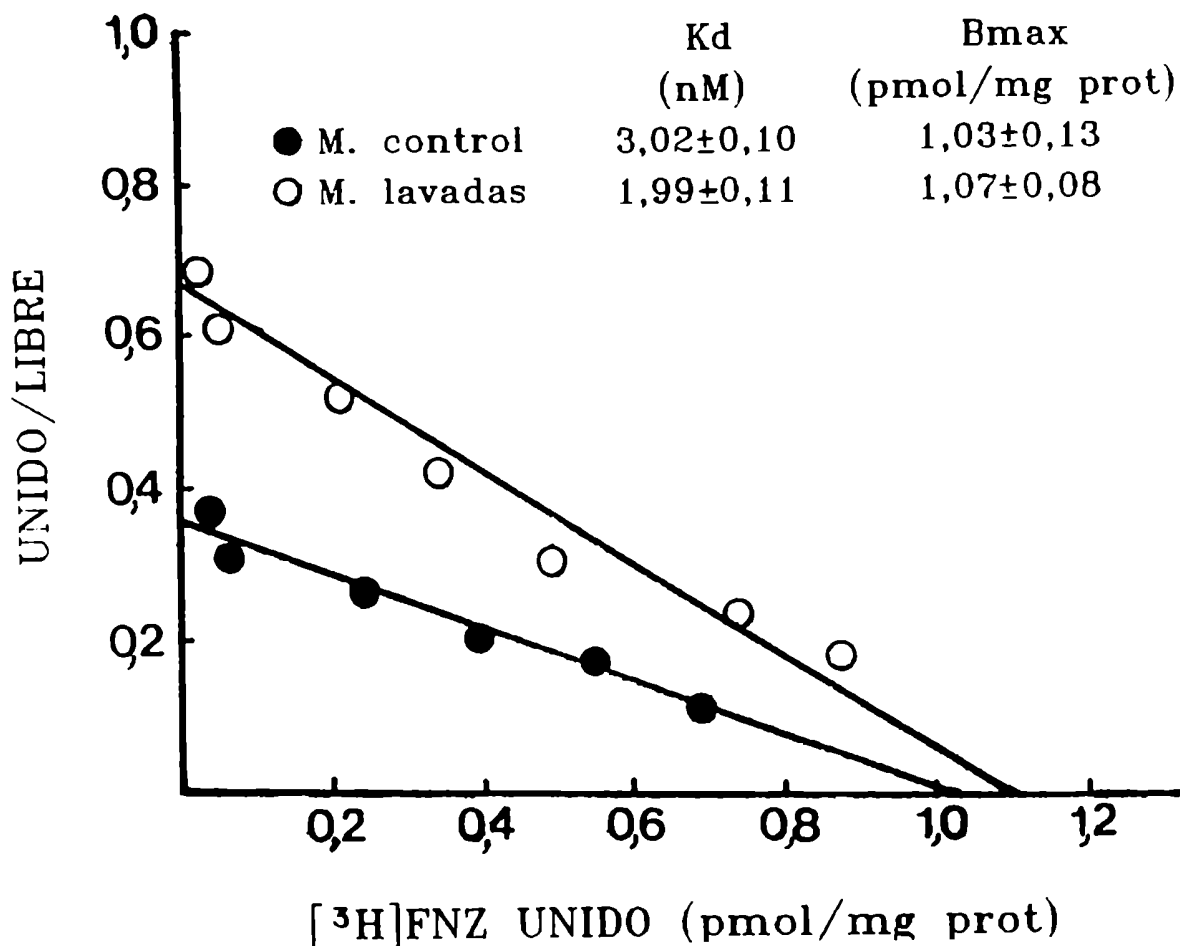


Fig. 19 Análisis de Scatchard de la unión específica de $[^3\text{H}]\text{FNZ}$ en membranas sinápticas control (M. control) y en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas (M. lavadas) aisladas a partir de embriones de 16 días.

Los valores de K_d y B_{max} representan las medias (\pm S.E.M.) de 3 experimentos efectuados por cuadruplicado.

El rango de concentraciones del ligando fue de 0,05 a 8 nM.

4.2 Efecto del ME aislado de embriones de 16 días sobre la unión de [^3H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio:

En la Fig. 20 se muestra la unión específica de [^3H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas, aisladas a partir del lóbulo óptico de embriones de día 16 de incubación, en presencia de cantidades crecientes de ME (sobrenadantes provenientes de los lavados de dichas membranas).

Los resultados se expresaron como porcentaje de la unión específica de [^3H]FNZ considerando como 100 % de unión al valor obtenido en ausencia de sobrenadante.

Se observó una curva de inhibición de la unión específica de [^3H]FNZ dependiente del volumen del sobrenadante adicionado al ensayo.

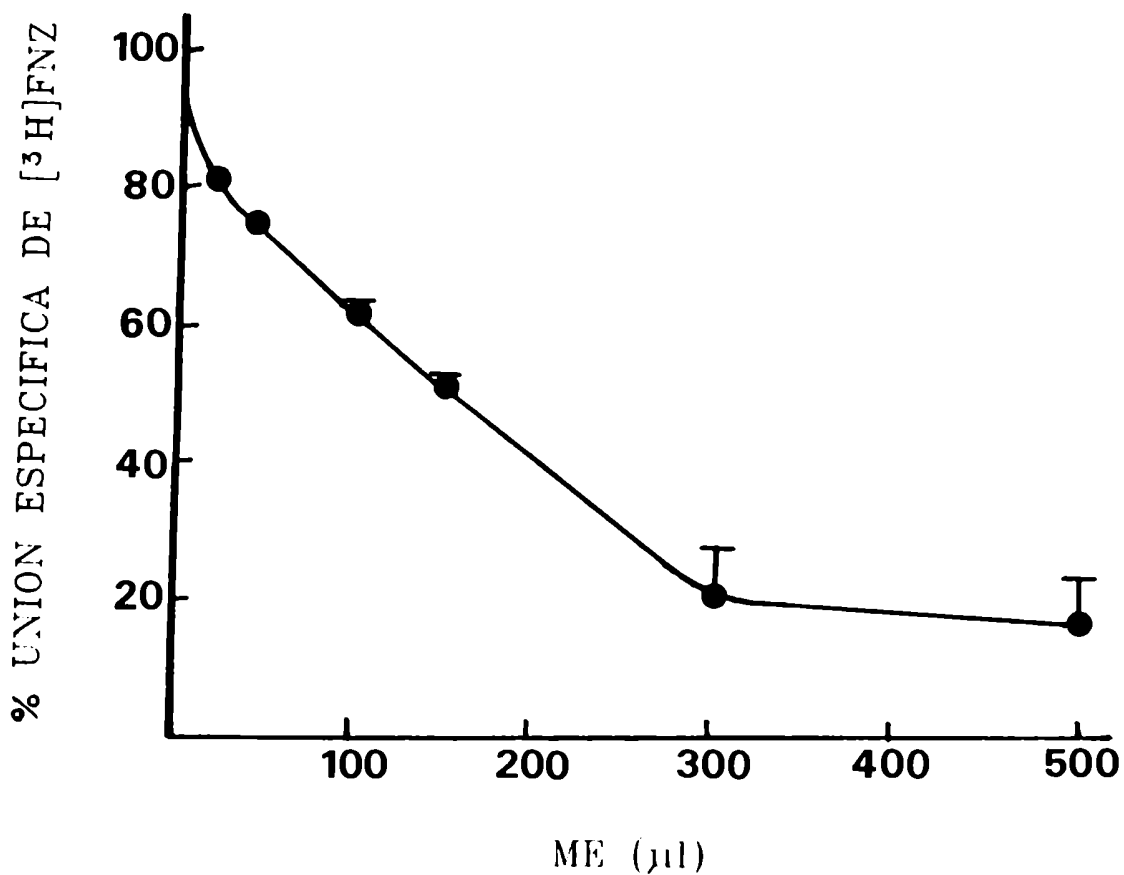


Fig. 20 Curva de inhibición de la unión específica de $[^3\text{H}]\text{FNZ}$ por cantidades crecientes de ME aislado a partir de embriones de 16 días en membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio. Los valores graficados representan la media \pm S.E.M. de 3 experimentos efectuados por cuadruplicado.

4.3 Efecto del ME aislado de pollos adultos sobre la unión de [³H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de diferentes estadios del desarrollo:

A fin de analizar la sensibilidad del receptor BZD a la acción del ME a lo largo del desarrollo se estudió el efecto inhibitorio de 200 µl de sobrenadante (proveniente de 0,53 lóbulos ópticos) obtenido a partir de pollos adultos, sobre la unión específica de [³H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de diferentes estadios del desarrollo (Fig. 21).

En estadios muy tempranos (día 10 prenatal) el ME redujo la unión específica de [³H]FNZ a un 53 % (46,11 % de inhibición) mientras que en los estadios posteriores analizados la inhibición fue mayor, alcanzando un valor de aproximadamente un 30 % de unión (70 % de inhibición).

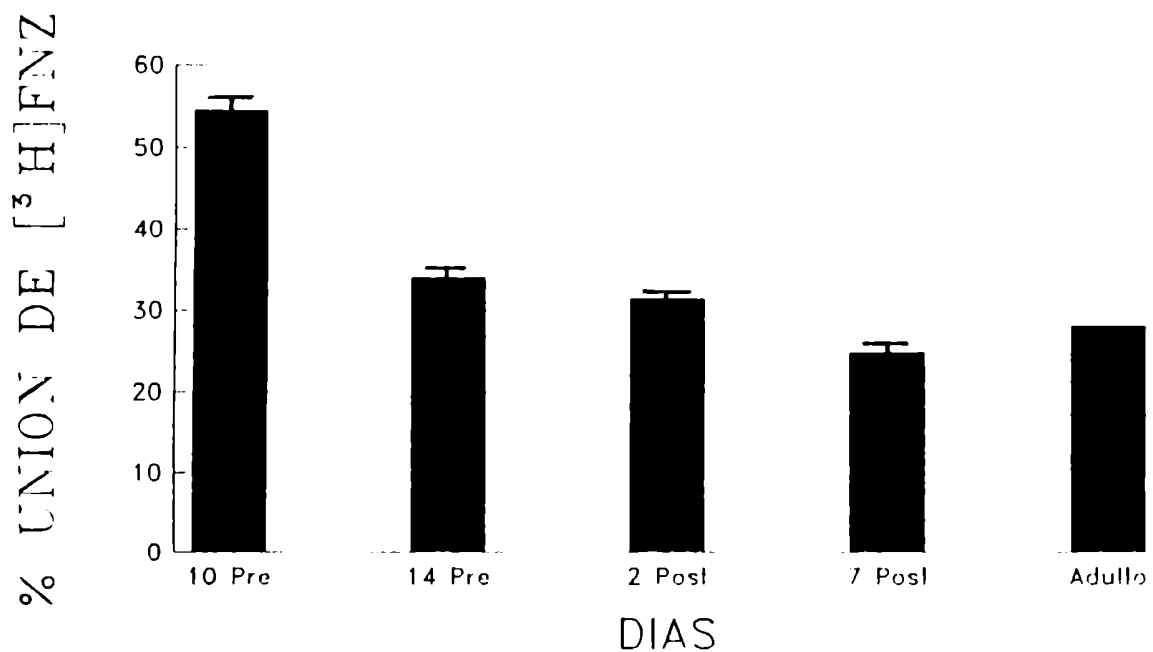


Fig. 21 Efecto del ME aislado a partir de pollos adultos sobre la unión de [³H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de diferentes estadios del desarrollo.

Los datos representan la media (\pm S.E.M.) de 3 determinaciones efectuadas por cuadruplicado.

Pre: prenatal; Post: postnatal.

4.4 Efecto de ME aislados en diferentes estadios del desarrollo sobre la unión de [³H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de pollos de 2 días de edad:

Con el objeto de comparar la capacidad de inhibición de los ME aislados en diferentes estadios del desarrollo se midió la actividad inhibitoria de los distintos ME en membranas exhaustivamente lavadas de día 2 postnatal (Fig. 22). Se definió 1 unidad inhibitoria (U) como la cantidad de sobrenadante capaz de producir una inhibición del 50 % en la unión específica de [³H]FNZ. Los resultados se expresaron como U/lóbulo óptico y como U/mg proteína de la fracción de membranas.

Se observó que la actividad inhibitoria del ME expresada por lóbulo óptico descendió desde el día 10 prenatal ($1,10 \pm 0,02$ U/lóbulo óptico) hasta el día 2 postnatal ($0,32 \pm 0,01$ U/lóbulo óptico) y aumentó nuevamente hasta alcanzar un valor de $2,78 \pm 0$ U/lóbulo óptico en animales adultos. En cambio, la actividad inhibitoria expresada por mg de proteína disminuyó gradualmente durante el desarrollo desde un valor de $4,71 \pm 0,11$ U/mg proteína en el día 10 prenatal hasta $0,70 \pm 0$ U/mg proteína para ME de pollos adultos.

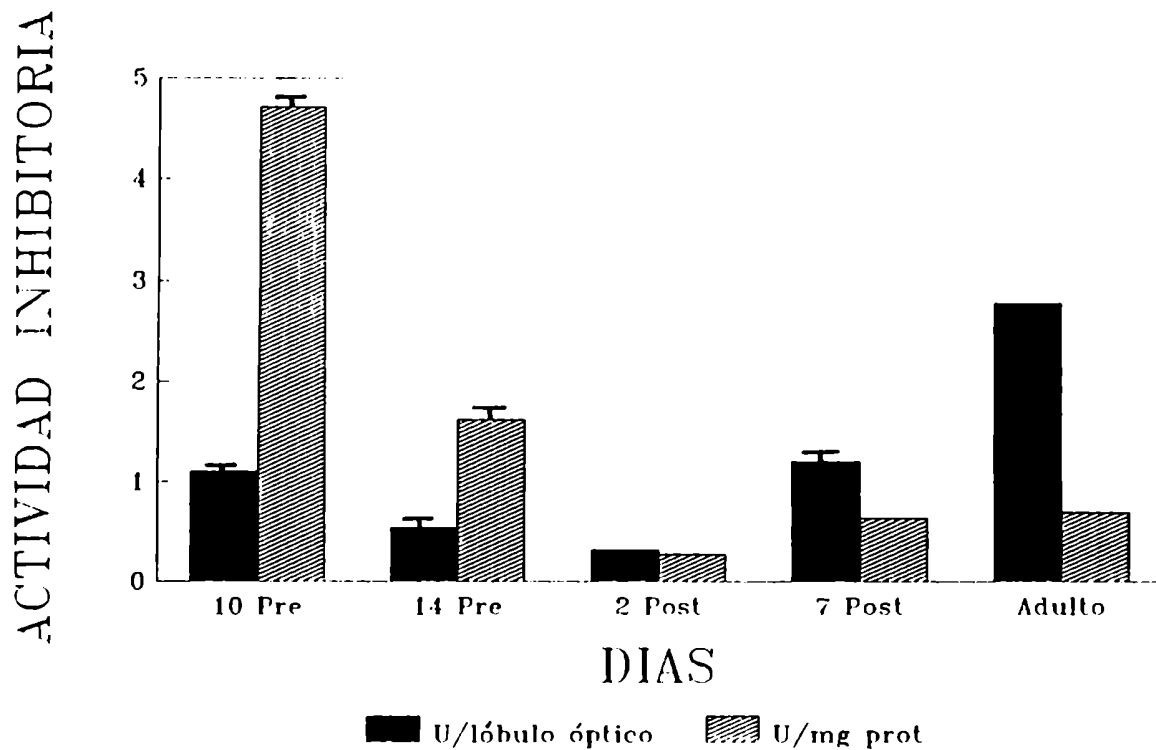


Fig. 22 Efecto del ME aislado en diferentes estadios del desarrollo sobre la unión de [^3H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de pollos de 2 días de edad.

Los valores representan la media (\pm S.E.M.) de 3 experimentos llevados a cabo por cuadruplicado.

Pre: prenatal; Post: postnatal.

4.5 Análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ sobre membranas exhaustivamente lavadas, en presencia y ausencia de ME:

Con el objeto de analizar la influencia de factores endógenos sobre los parámetros cinéticos del receptor BZD (K_a y B_{max}) se realizó un análisis de Scatchard de la unión específica de [³H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de embriones de 16 días de incubación. El análisis cinético se efectuó en ausencia y presencia de 1,17 U de ME del mismo estadio (Fig. 23).

Se observó que el agregado del ME produjo una disminución en la afinidad de los sitios receptores BZD. En efecto, la K_a obtenida en ausencia de ME fue de $1,99 \pm 0,11$ nM mientras que en presencia del ME fue de $4,92 \pm 0,13$ nM. Los B_{max} obtenidos en las dos condiciones del ensayo fueron similares, presentando valores de $1,07 \pm 0,08$ y $1,05 \pm 0,20$ pmol/mg proteína en ausencia y presencia de ME, respectivamente.

Estos resultados indicarían que la inhibición de la unión específica de [³H]FNZ por el ME es de tipo competitivo.

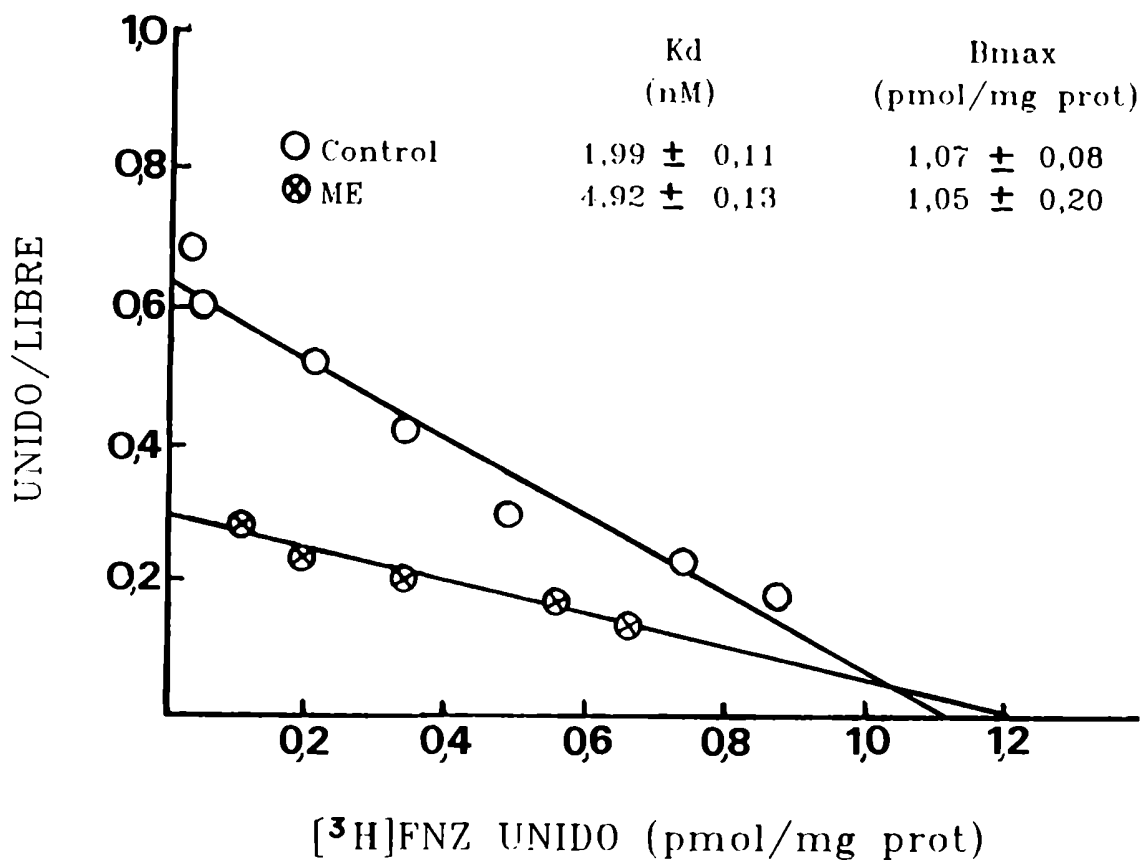


Fig. 23 Análisis de Scatchard de la unión específica de $[^3\text{H}]$ FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de día 16 prenatal en presencia y ausencia (control) del ME del mismo estadio.

Los valores de K_d y B_{max} corresponden a la media (\pm S.E.M.) de 3 experimentos realizados por cuadruplicado.

El rango de concentraciones del ligando fue de 0,05 a 8 nM.

4.6 Efecto del ME sobre las moléculas de [³H]FNZ:

Un posible mecanismo de acción de este ME aislado a partir del lóbulo óptico de pollo es que interactúe con las moléculas de [³H]FNZ (degradándolas y/o modificándolas) agregadas en el ensayo de unión al receptor BZD y dando como resultado la observada disminución en la unión específica del ligando radioactivo. Esta posibilidad no contradice la inhibición competitiva demostrada en la Fig. 23.

Para verificar si esta hipótesis es o no cierta, se efectuó un ensayo de unión de 1 nM de [³H]FNZ en presencia de 1,78 U inhibitorias de ME aislado a partir de embriones de 14 días, sobre membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio (Tabla V, experimento 1). Luego de la filtración con la que se culminó el período de incubación del ensayo, el filtrado resultante fue colectado. Este filtrado constituyó una fuente de [³H]FNZ (ligando libre) que estuvo en contacto con el ME y fue empleado en un segundo ensayo de unión sobre membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio (Tabla V, experimento 2). La concentración de [³H]FNZ en este segundo experimento fue de 0,1 nM debido a la dilución sufrida durante la filtración (ver punto 4 de Materiales y métodos).

Se observó que en el experimento 1, el ME produjo una inhibición del 73,63 % de la unión específica de [³H]FNZ. Sin embargo, en el experimento 2, la solución de [³H]FNZ (filtrado del experimento 1) mostró un valor de unión específica similar a la solución control de la misma concentración (97,89 % del control).

Estos resultados indican que el ME no afectó a las moléculas de [³H]FNZ exógenas en su capacidad de unión al receptor BZD.

Tabla V Efecto del ME aislado a partir de embriones de 14 días de incubación sobre la capacidad de unión de las moléculas de [³H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas del mismo estadio del desarrollo

Condiciones del ensayo	Ensayo de unión	
	[³ H]FNZ unido (pmol/mg prot)	% del control
Control 1 (1 nM [³ H]FNZ)	0,252 ± 0,025	100,00
Experimento 1 (1 nM [³ H]FNZ + 50 µl ME)	0,067 ± 0,002	26,38
Control 2 (0,1 nM [³ H]FNZ)	0,016 ± 0,003	100,00
Experimento 2 (0,1 nM [³ H]FNZ obtenido del filtrado del experimento 1)	0,015 ± 0,004	97,89

Los datos representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados por cuadruplicado.

4.7 Estabilidad al calor del ME:

En la Tabla VI se muestra el efecto del calor sobre la acción inhibitoria del ME de embriones de 16 días de incubación en membranas exhaustivamente lavadas del mismo estadio.

Se observó que la exposición a 95 °C durante 15 minutos no modificó el efecto del ME sobre la unión de la BZ obteniéndose una inhibición del 63,57 %, similar a la hallada en el experimento control con ME no calentado (62,72 %).

Tabla VI Efecto del calor sobre la acción inhibitoria del ME aislado a partir de embriones de 16 días en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas del mismo estadio del desarrollo

Adiciones	Unión de [³ H]FNZ	
	(pmol/mg prot)	% control
Buffer Tris-HCl (control)	0,252 ± 0,01	100,00
ME	0,094 ± 0,00	37,28
ME calentado a 95°C	0,092 ± 0,01	36,43

Los datos representan la media ± S.E.M. de 4 experimentos realizados por cuadruplicado.

DISCUSION

Uno de los aspectos más importantes del perfil de desarrollo del receptor BZD que ha sido revelado en el presente trabajo, es la presencia en el lóbulo óptico de pollo de un período transitorio en el cual la expresión del receptor es mayor que en el estadio adulto. Este período de sobre-expresión receptora corresponde a un lapso de tiempo comprendido entre el día 16 prenatal y el día 8 postnatal, con un valor máximo alrededor del nacimiento. Este patrón de desarrollo no varió demasiado cuando se lo representó de dos formas diferentes: en términos de pmol [3 H]FNZ unido/ mg proteína o pmol [3 H]FNZ unido/ lóbulo óptico.

La curva de desarrollo del contenido de proteínas de la fracción de membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico de pollo (Fig. 5) mostró un abrupto incremento (4 veces) desde el día 12 prenatal hasta el nacimiento. Es interesante destacar que este aumento coincide con un marcado incremento en el número de sinapsis inhibitorias (Mc Graw y col., 1980).

El análisis cinético reveló la presencia en el lóbulo óptico de pollo de una única población de sitios de unión específica de [3 H]FNZ. Las variaciones en la unión de la BZ

observadas durante el desarrollo fueron debidas a cambios en el número máximo de sitios receptores mientras que la afinidad permaneció inalterada. Estos resultados concuerdan con los descriptos previamente en el lóbulo óptico y cerebro de pollo (Tehrani y Barnes, 1986; Batuecas y col., 1987) y en el cerebro de rata (Mallorga y col., 1980; Massotti y col., 1980; Aldinio y col., 1981). De esta forma se demostró que la sobre-expresión transitoria de los sitios de unión de [3 H]FNZ se debió únicamente a un incremento en la capacidad receptora máxima.

Las potencias relativas mostradas por los agonistas y antagonistas del receptor BZD para inhibir la unión específica de [3 H]FNZ en el lóbulo óptico de pollo coinciden con los datos previamente publicados en diferentes áreas del cerebro de mamíferos (Möhler y Richards, 1981; Sieghart y Schuster, 1984). La incapacidad del Ro5-4864, un marcador de los sitios receptores BZD periféricos, para inhibir la unión del [3 H]FNZ señala la presencia en el lóbulo óptico de pollo de receptores BZD de tipo central únicamente.

En trabajos previos realizados en la retina de pollo en desarrollo (Altstein y col., 1981) se observó también que la densidad máxima del receptor BZD es alcanzada cerca del nacimiento (día 1 postnatal) pero sin embargo a partir de ese

estadio no se registraron cambios significativos. Otros estudios sobre el desarrollo del receptor BZD en hemisferios cerebrales de pollo mostraron un aumento gradual en la unión de [³H]FNZ hasta el estadio adulto (Tehrani y Barnes, 1986). En este último ejemplo, sin embargo, la preparación de membranas utilizada fue obtenida a partir de una mezcla de diferentes áreas. Cada una de estas áreas puede poseer un perfil de desarrollo distinto con variaciones transitorias en diferentes momentos del desarrollo, las cuales permanecerían enmascaradas.

En concordancia con este trabajo, la existencia de un período de sobre-expresión receptora fue también descrita en otras especies y en otros sistemas de neurotransmisores, en diferentes áreas del Sistema Nervioso Central (Schliebs y col., 1986a,b; Batuecas y col., 1987; Ríos y col., 1987; Schliebs y Rothe, 1988).

Con respecto a la fase descendente del pico de máxima expresión del receptor, pueden ser postuladas dos explicaciones alternativas: a) podría resultar a partir de cambios en la síntesis o degradación del receptor como fue propuesto por Rose y Stewart (1978) o b) podría ser la consecuencia de la eliminación de un número redundante de sinapsis generadas durante la fase ascendente, de acuerdo con

la hipótesis de estabilización selectiva de las sinapsis (Changeux y Danchin, 1976).

En recientes trabajos se demostró que la enzima GAD, que constituye un marcador presináptico del sistema GABAérgico, exhibe un perfil de desarrollo en el lóbulo óptico de pollo similar al de los receptores BZD presentado en este trabajo. En efecto, la curva de desarrollo de la GAD muestra un pico de máxima expresión entre los días 2-3 postnatales (González y col., 1990). Diversos trabajos han demostrado que los sitios receptores BZD poseen una localización tanto pre como postsináptica (Möhler y col., 1981; Sábato y col., 1981). Estas dos evidencias podrían sugerir que la curva de desarrollo de los sitios receptores BZD entre los días 16 prenatal y 2 postnatal refleja el desarrollo de receptores presinápticos.

Es interesante establecer una comparación entre el perfil de desarrollo de los receptores GABAérgicos y BZD cuya localización dentro del mismo complejo macromolecular ya fue descrita en la Introducción. Algunos investigadores han propuesto que el desarrollo de los receptores BZD precede al de los receptores GABAérgicos (Braestrup y Nielsen, 1978) mientras que otros postulan un paralelismo en la expresión temporal de ambos receptores (Candy y Martin, 1979; Aldinio y

col., 1981; Tehrani y Barnes, 1986). Estas conclusiones resultan de comparar valores de densidad receptora en estadios del desarrollo particulares elegidos arbitrariamente, por ejemplo el momento en el cual se alcanza el 50 % del valor del adulto. Sería más importante una comparación entre los patrones de desarrollo completos de ambos receptores. Comparando los perfiles de desarrollo en el lóbulo óptico de pollo del receptor GABAérgico, cuya descripción fue previamente realizada (Ríos y col., 1987) y el BZD se puede apreciar que ambos receptores manifiestan un período transitorio de sobre-expresión. Sin embargo los dos patrones difieren en el momento en el cual el pico de sobre-expresión tiene lugar. En efecto, el pico de máxima capacidad receptora del receptor GABAérgico se expresa alrededor del día 6 postnatal, es decir 5 días más tarde que el del receptor BZD. Por lo tanto estos resultados indican que el desarrollo de los receptores BZD precede al de los receptores GABAérgicos. Estas diferencias de tiempo en la aparición de ambos picos podría estar relacionada con eventos asociados con los mecanismos de formación y maduración de las sinapsis.

Si uno considera que los patrones de desarrollo analizados por medio de los experimentos de unión del radioligando reflejan variaciones en la cantidad de cada

componente del complejo receptor GABA/BZ, entonces en aquellos estudios donde se describen desarrollos paralelos para los dos sitios receptores la relación entre ellos se mantendría constante a lo largo del tiempo. Por el contrario, de acuerdo a nuestros resultados y a aquellos otros que también demuestran la existencia de perfiles de desarrollo independientes para cada sitio de unión, la estequiometría de los mismos sufre cambios drásticos a lo largo del desarrollo.

Los experimentos de inhibición de la unión de [^3H]FNZ por CL 218872 mostraron un aumento gradual en la potencia de la TPZ a lo largo del desarrollo del lóbulo óptico de pollo. Además, los valores de los coeficientes de Hill variaron durante la ontogenia pero en todos los estadios fueron menores a la unidad. Estos resultados indicarían la existencia de una población heterogénea de sitios receptores BZD cuya composición varía durante el transcurso del desarrollo.

El análisis de Hofstee de estos experimentos de inhibición reveló la existencia de dos subtipos de receptor BZD, BZD₁ y BZD₂. La TPZ se unió con alta afinidad a los sitios BZD₁ y con baja afinidad a los sitios BZD₂. Es importante notar que el [^3H]FNZ se unió con alta afinidad a ambos sitios impidiendo su diferenciación.

Cada uno de los subtipos del receptor presentó un perfil de desarrollo diferente de modo que la proporción de cada sitio fue variando a través del tiempo. En estadios tempranos del desarrollo (día 13 prenatal) los sitios BZD₂ estuvieron presentes en forma casi exclusiva coincidiendo con trabajos previos realizados en diferentes áreas del Sistema Nervioso de roedores (Lippa y col., 1981; Chisholm y col., 1983; Sato y Neale, 1989a; Bacon y col., 1991). Es interesante recordar que en este estadio en el lóbulo óptico de pollo sólo están presentes los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad y el efecto estimulatorio de las BZ sobre la afinidad del GABA a su receptor está restringido a esta población de sitios receptores GABAérgicos únicamente (Fischer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990). Tanto este efecto como el aumento producido por el GABA en la afinidad de las BZ a su sitio receptor (Mallorga y col., 1980) son mayores en estadios tempranos del desarrollo y disminuyen gradualmente a lo largo del tiempo. Estas evidencias sugieren que en estadios tempranos del desarrollo existiría un acoplamiento entre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad y los sitios receptores BZD₂ únicamente. Esta combinación de sitios dentro del complejo receptor macromolecular sería la que más favorecería la interacción alostérica entre ambos receptores.

En concordancia también con trabajos previos efectuados en ciertas regiones del Sistema Nervioso de roedores (Lippa y col., 1981; Chisholm y col., 1983; Bacon y col., 1991) los sitios BZD₁ se encontraron en mayor proporción en animales adultos.

De acuerdo a lo mencionado en la Introducción, aparentemente las diferencias entre los sitios BZD₁ y BZD₂ están basadas en la subclase de subunidad α que se halle presente en el complejo receptor GABA_A/BZ. Por lo tanto la expresión diferencial durante el desarrollo de estas distintas subclases estaría relacionada con el diferente perfil ontogenético de los dos subtipos de receptor BZD.

Se ha demostrado que una experiencia visual normal o adecuada durante la vida postnatal temprana es un requisito absoluto para que el sistema visual madure normalmente (Lund y Lund, 1972). Por lo tanto es probable que un estímulo visual normal sea requerido para que las interacciones neuronales involucradas en la maduración y estabilización sináptica se desarrollen normalmente.

En este trabajo se demostró que variaciones en la intensidad luminosa durante el desarrollo postnatal temprano modifican el patrón de desarrollo de los receptores BZD en el lóbulo óptico de pollo. Este efecto es máximo en el momento

de aparición del pico de sobre-expresión del receptor (día 2 postnatal). En efecto, durante este período la hiper e hipoestimulación luminosa causaron un incremento del 17 % y una disminución del 34 % en la unión específica de [³H]FNZ, respectivamente, con respecto a condiciones normales de iluminación. Estas variaciones fueron debidas a cambios en el número total de sitios receptores, en tanto que la afinidad de los mismos permaneció inalterada.

Comparando el efecto de las variaciones en las condiciones de iluminación sobre los patrones de desarrollo de los receptores BZD y de GABA (Ríos y col., 1987) se puede apreciar cierto grado de independencia en los mecanismos involucrados. En efecto, la exposición a luz y oscuridad permanentes durante los 2 primeros días cambió significativamente el patrón de desarrollo de los receptores BZD mientras que no se observó ningún cambio en el desarrollo de los receptores GABAérgicos. En cambio desde el día 3 postnatal hasta el día 17 postnatal los cambios en el grado de iluminación ambiental alteraron drásticamente el número de sitios receptores GABAérgicos, obteniéndose las mayores diferencias en el día 6 postnatal, en tanto que las variaciones en los niveles de los receptores BZD prácticamente desaparecieron.

Ambos receptores son sensibles a la estimulación ambiental exclusivamente durante el momento de su máxima expresión. Es decir que estos picos de sobre-expresión receptora corresponden a períodos de alta plasticidad, los cuales probablemente son anteriores al final del período crítico. En efecto, los cambios producidos por la adaptación de los animales a diferentes condiciones ambientales no permanecen como efectos de larga duración sino que son totalmente revertidos.

Pueden postularse varias hipótesis para explicar las diferencias en el perfil de desarrollo de los receptores BZD en las distintas condiciones ambientales: a) existen evidencias experimentales que demuestran que el número de sinapsis cambia en respuesta a la adaptación a la oscuridad de los animales (Bakkum y col., 1991), b) los cambios en la cantidad de receptores pueden reflejar variaciones en la velocidad de síntesis o degradación de las moléculas receptoras (Rose y Stewart, 1978) y c) es posible que cambios en los niveles de ciertos moduladores endógenos del receptor BZD, bajo las distintas condiciones ambientales analizadas, sean los responsables de las alteraciones observadas. En relación a esta tercera hipótesis, un posible candidato endógeno que module el número de sitios receptores es el GABA

mismo. Algunos trabajos han demostrado cambios en los niveles endógenos del GABA en la retina de pollo debidos a la adaptación a la luz y a la oscuridad (Pasantes-Morales y col., 1973). Por otro lado, estudios previos han demostrado que los niveles de GABA modulan la expresión del complejo receptor GABA/BZ. Mientras algunos investigadores han señalado una acción trófica del GABA (Madtes y Redburn, 1983; Meier y col., 1984) otros han mostrado que el GABA induce una reducción en el número de sitios receptores BZD y GABAérgicos, probablemente a través de un mecanismo de internalización de los mismos (Tehrani y Barnes, 1988, 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo pueden indicar que cambios en el contenido de GABA bajo nuestras condiciones experimentales producirían las variaciones observadas en la cantidad de sitios receptores BZD.

En trabajos previos realizados en otras especies también se ha demostrado que cambios en la estimulación luminosa conducen a variaciones a nivel del complejo GABA/BZ en diferentes estructuras visuales. Biggio y col. (1981) han demostrado, utilizando experimentos de corta duración en la rata, un aumento en la afinidad de los receptores BZD y de GABA en la retina de animales adaptados a la luz. Resultados similares fueron obtenidos por Rothe y col. (1985). Es

importante notar que estos cambios observados en la rata, un animal nocturno, son opuestos a los hallados previamente en el receptor GABAérgico de la retina de pollo, un animal diurno (Fiszer de Plazas y col., 1986). Sin embargo, en experimentos de larga duración, Schliebs y col. (1986b) describieron en la rata una disminución en la unión del [3 H]FNZ en el núcleo geniculado lateral y colículo superior en animales expuestos a oscuridad total durante el desarrollo postnatal. Si bien estos autores no analizaron qué parámetros cinéticos (K_a o E_{max}) se afectan, sus resultados serían comparables con los obtenidos en el lóbulo óptico de pollo en el presente trabajo.

A partir de todos estos resultados se puede concluir que la experiencia visual temprana juega un rol en el desarrollo de los mecanismos de neurotransmisión GABAérgica involucrados en el procesamiento y transferencia de información a través de la vía visual.

Ha sido demostrada la existencia en el cerebro de mamíferos de distintas sustancias endógenas que modulan la unión de las BZ a sus sitios receptores específicos. En el presente trabajo se analizó el efecto de un procedimiento de extracción de dichas sustancias, que consiste en lavados exhaustivos con buffer de una fracción de membranas

sinápticas, sobre la unión del [3 H]FNZ durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo. Dicho tratamiento fue el único que hizo posible la expresión de la modulación alostérica de las BZ exógenas sobre los sitios receptores GABAérgicos en el lóbulo óptico de pollo (Fischer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990).

Se observó que la unión específica de [3 H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas es significativamente mayor ($P < 0.02$) que en las membranas sinápticas control. El efecto de los lavados fue mayor en los días 14-16 prenatales (80 %) y disminuyó gradualmente a lo largo del desarrollo. Es decir que a través de este procedimiento se está extrayendo algún modulador endógeno (ME) que actúa como inhibidor de la unión de las BZ a su sitio receptor. El análisis cinético realizado en membranas sinápticas control y exhaustivamente lavadas de día 16 prenatal demostró que los lavados exhaustivos con buffer causaron un aumento en la afinidad de los receptores BZD sin modificar el número máximo de sitios de unión.

Los sobrenadantes provenientes de los lavados fueron reunidos y concentrados y constituyeron la fuente de ME. El agregado de ME de día 16 prenatal al ensayo de unión de [3 H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas del mismo

estadio produjo una inhibición proporcional al volumen de sobrenadante adicionado. Esto confirma la presencia de un inhibidor endógeno en dichos sobrenadantes.

Si bien la sensibilidad del receptor al efecto inhibitorio del ME proveniente de pollos adultos fue menor en el estadio más temprano que se estudió, día 10 prenatal, en el resto de los estadios analizados la sensibilidad receptora fue similar.

Cuando se comparó la actividad inhibitoria de los ME aislados en diferentes estadios del desarrollo sobre la unión de [³H]FNZ en membranas sinápticas exhaustivamente lavadas de día 2 postnatal, se registraron resultados diferentes de acuerdo a la forma de expresión de los mismos. Definiendo 1 unidad inhibitoria (U) como la cantidad de sobrenadante capaz de reducir en un 50 % la unión específica de [³H]FNZ, se observó que cuando los resultados se expresaron como U/mg proteína la capacidad inhibitoria de los ME disminuyó gradualmente durante el desarrollo. Esta disminución puede ser explicada por la existencia de un muy bajo contenido de proteínas en el lóbulo óptico en los primeros estadios del desarrollo el cual aumenta significativamente a lo largo de la ontogenia. En cambio, cuando los resultados se expresaron como U/lóbulo óptico si bien se observó una transitoria

disminución alrededor del nacimiento los valores hallados en el estadio adulto son significativamente mayores que los hallados en estadios tempranos del desarrollo.

A pesar de que en el día 10 prenatal la actividad del ME expresada por cualquiera de las dos formas mencionadas presenta valores considerables, el efecto de los lavados es prácticamente nulo. Esto es debido a la menor sensibilidad del receptor en este estadio.

El análisis de Scatchard de la unión de [^3H]FNZ en membranas exhaustivamente lavadas de día 16 prenatal en presencia y ausencia del ME demostró que este factor endógeno es un inhibidor de tipo competitivo. En efecto, el agregado del ME produjo una disminución en la afinidad de los sitios receptores sin cambiar el número máximo de sitios de unión. Por lo tanto este inhibidor endógeno interactuaría con los sitios receptores BZD directamente en el sitio de unión o indirectamente a través de un efecto alostérico.

Ha sido descartada la posibilidad que el ME ejerza su actividad inhibitoria por medio de la degradación y/o modificación de las moléculas de [^3H]FNZ exógenas utilizadas en los ensayos de unión al receptor BZD.

En los primeros intentos de caracterización del ME fue demostrado que se trata de una sustancia (s) termoestable.

Estos resultados demuestran la existencia de un factor endógeno durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo que inhibe competitivamente la unión de las BZ a su sitio receptor y cuya actividad es estable al calor.

Desde hace más de 10 años numerosos investigadores se han dedicado a la búsqueda de compuestos endógenos que puedan interactuar con el receptor BZD. Esta labor fue inspirada en el exitoso hallazgo de opioides endógenos, las endorfinas, dos años después de la demostración de la existencia de receptores para opioides en el cerebro.

Los primeros compuestos endógenos hallados con capacidad de unirse al receptor BZD fueron purinas, nucleósidos de purinas y nicotinamida (Skolnick y col., 1978; Asano y Spector, 1979; Möhler y col., 1979). La afinidad de estas sustancias por los sitios receptores BZD es demasiado baja como para que tengan una importancia fisiológica.

Otros posibles ligandos endógenos son las β -carbolinas. Si bien se demostró que algunos compuestos de este grupo, tales como el ester etílico del β -carbolin-3-carboxilato (Braestrup y col., 1980), fueron producidos artificialmente por el método de extracción, otros, como por ejemplo el ester butílico del β -carbolin-3-carboxilato (Peña y col., 1986) han pasado satisfactoriamente las pruebas que permiten verificar

su naturaleza endógena. Aunque estos compuestos se unen con alta afinidad a los receptores BZD aún no se han reunido todas las evidencias necesarias para demostrar su rol como ligandos endógenos, tal como el establecimiento de su camino biosintético.

Entre los compuestos endógenos de naturaleza proteica que inhiben la unión de las BZ a su sitio receptor, uno de los que ha tenido mayor importancia es el llamado inhibidor de la unión del diazepam (DBI por su sigla en inglés) (Guidotti y col., 1983). Esta sustancia es una proteína de 105 aminoácidos cuyo peso molecular es de 11.000 daltons. Se ha postulado que el compuesto activo sería un fragmento de la misma, de 18 aminoácidos que puede ser obtenido por digestión triptica a partir de la molécula original (Ferrero y col., 1986). Esta sustancia tiene sin embargo una baja afinidad por el receptor BZD. El DBI ha sido localizado en cerebro y órganos periféricos de rata y humanos y se lo ha hallado en neuronas GABAérgicas y no GABAérgicas. También se ha demostrado su liberación a partir de terminaciones nerviosas por potasio y veratridina en forma dependiente de calcio (Ferrarese y col., 1987). Recientemente ha sido encontrada una proteína que presenta un alto grado de homología con el DBI, la endozepina, que inhibe la unión de BZ a sus sitios

receptores (Marquardt y col., 1986). La afinidad de esta proteína por el receptor también es muy baja.

Los resultados obtenidos hasta el presente parecen indicar que el DBI no es un co-transmisor esencial del GABA en todas las sinapsis GABAérgicas ya que existe transmisión GABAérgica sin liberación de DBI. La presencia de DBI en neuronas no GABAérgicas y en órganos periféricos sugiere que esta proteína tendría funciones primarias no relacionadas con la transmisión GABAérgica (Haefely, 1988).

Estudios recientes revelaron que el cerebro de animales y ciertas plantas contienen cantidades pequeñas de BZ (por ejemplo N-desmetildiazepam) (De Blas y Sangameswaran, 1986; Stephenson, 1987). Además se ha demostrado que el núcleo benzodiazepínico puede ser sintetizado por microorganismos y plantas. Aún queda por comprobar si los animales son capaces de sintetizar BZ biológicamente activas (constituyendo BZ endógenas) o si la presencia de BZ en el cuerpo de los mismos proviene de fuentes naturales exógenas como plantas y microorganismos (siendo en este caso BZ exógenas naturales).

La purificación del ME aislado a partir del lóbulo óptico de pollo en el presente trabajo, conducirá al establecimiento de su naturaleza química, lo cual permitirá posteriormente conocer su origen y mecanismo de modulación

del complejo receptor GABA/BZ. El hallazgo de un constituyente (s) endógeno que interactúa con los receptores BZD es de gran importancia ya que posibilita la clarificación del rol fisiológico de estos receptores y de las bases moleculares de la acción de las BZ en el Sistema Nervioso Central.

CONCLUSIONES

Uno de los aspectos más importantes del perfil de desarrollo del receptor BZD en el lóbulo óptico de pollo es la presencia de un período transitorio de sobre-expresión receptora, alrededor del nacimiento. En este momento el número máximo de sitios receptores es superior al de los animales adultos.

El desarrollo de los sitios receptores BZD precede al de los sitios receptores GABAérgicos con respecto al momento de aparición de sus respectivos picos de máxima expresión receptora.

Si bien se reveló la existencia de un único sitio de alta afinidad, de tipo central, para las BZ, las TPZ distinguieron dos poblaciones de receptores BZD (BZD₁ y BZD₂). Cada uno de estos subtipos de receptores exhibió un perfil de desarrollo distinto sugiriendo la existencia de mecanismos regulados en forma diferente para la expresión de los mismos.

La experiencia visual temprana juega un rol fundamental en el desarrollo de los receptores BZD en el sistema visual. En efecto, la hipo e hiperestimulación luminosa durante las

dos primeras semanas postnatales produjeron cambios en los niveles del receptor BZD. Estas variaciones fueron máximas durante el período de sobre-expresión del receptor indicando que este pico corresponde a un breve período de alta plasticidad receptora durante el desarrollo del lóbulo óptico.

Además, se demostró la presencia de un factor endógeno durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo que inhibe competitivamente la unión de las BZ a su sitio receptor. El establecimiento de la naturaleza química de este inhibidor endógeno en trabajos posteriores así como el análisis de su mecanismo de modulación del receptor BZD ayudará a esclarecer el rol fisiológico de estos receptores dentro del Sistema Nervioso Central.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha establecido el perfil de desarrollo del receptor BZD y sus características farmacológicas en el lóbulo óptico de pollo. Alrededor del nacimiento (días 1-2 postnatales) se produjo un incremento agudo y transitorio en la unión de [3 H]FNZ superando los valores de unión hallados en animales adultos.

A través del análisis cinético se demostró que los cambios registrados en la unión de [3 H]FNZ durante todo el desarrollo fueron debidos a variaciones en el número máximo de sitios receptores mientras que la afinidad se mantuvo constante.

El pico de máxima expresión de los sitios receptores BZD precede en 5 días al pico observado durante el desarrollo del receptor GABAérgico, sugiriendo un desarrollo precoz de los sitios receptores BZD.

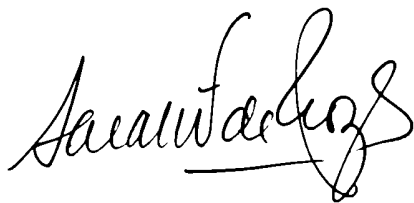
Si bien los estudios de unión de BZ revelaron la existencia de un único sitio receptor de alta afinidad a lo largo del desarrollo, los experimentos de inhibición de la unión de [3 H]FNZ por una TPZ permitieron demostrar la presencia de dos poblaciones de receptores BZD (BZD₁ de alta afinidad y BZD₂ de baja afinidad). Cada uno de estos subtipos

de receptores presentó un patrón de desarrollo diferente. En los primeros estadios estuvieron presentes casi exclusivamente los sitios BZD₂ (98,23 %), coincidiendo con la expresión de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad. En cambio, en el estadio adulto los sitios BZD₁ se encontraron en mayor proporción (62,88 %).

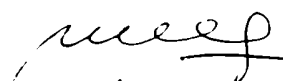
En este trabajo se demostró que las variaciones en la intensidad luminosa durante las dos primeras semanas de vida postnatal afectan el patrón de desarrollo de los sitios receptores BZD. La exposición a luz y oscuridad permanentes produjeron un aumento y una disminución, respectivamente, en la unión de [³H]FNZ con respecto a condiciones normales de iluminación. Estos cambios fueron máximos en el momento de aparición del pico de sobre-expresión del receptor BZD sugiriendo que este pico corresponde a un período de alta plasticidad receptora. Estas variaciones fueron debidas a modificaciones en el número total de sitios receptores, en tanto que la afinidad permaneció inalterada.

Por medio de un procedimiento de exhaustivos lavados con buffer de una fracción de membranas sinápticas, se extrajo un factor (s) endógeno que inhibe la unión de las BZ durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo.

El análisis de Scatchard permitió demostrar que esta sustancia (s) es un inhibidor de tipo competitivo. Por lo tanto se trataría de un compuesto endógeno que interactúa directamente con los sitios receptores BZD o indirectamente a través de un mecanismo de modulación alostérica.



Dra. SARA FISZER de PLAZAS
INVESTIGADOR DEL C.O.N.I.C.E.T.



María Clara Gravielle

REFERENCIAS

- Aldinio, C., Balzano, M., Savoini, G., Leon, A. and Toffano, G. (1981) Ontogeny of ^3H -diazepam binding sites in different rat brain areas. Effect of GABA. *Dev. Neurosci.*, 4: 461-466.

- Altstein, M., Dudai, Y. and Vogel, Z. (1981) Benzodiazepine receptors in chick retina: Development and cellular localization. *Brain Res.*, 206: 198-202.

- Anholt, R. R. H., Pedersen, P. L., De Souza, E. B. and Snyder, S. H. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.*, 261: 576-583.

- Asano, T. and Spector, S. (1979) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous ligands for the brain benzodiazepine-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76: 977-981.

Bacon, E. and Viennot, F. (1990) Heterogeneity of the GABA-benzodiazepine receptor complex. *Med. Sci.*, 6: 770-777.

- Bacon, E., de Barry, J. and Gombos, G. (1991) Differential ontogenesis of type I and II benzodiazepine receptors in mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.*, 58: 283-287.

Bakkum, B. W., Benevento, L. A. and Cohen, R. S. (1991) Effects of light/dark- and dark-rearing on synaptic morphology in the superior colliculus and visual cortex of the postnatal and adult rat. *J. Neurosci. Res.*, 28: 65-80.

- Batuecas, A., Cubero, A., Barat, A. and Ramírez, G. (1987) The GABA_A receptor complex in the developing chick optic tectum: Ontogeny of [³H]muscimol, [³H]flunitrazepam and [³⁵S]TBPS binding sites. *Neurochem. Int.*, 11: 425-431.

- Biggio, G., Guarnieri, P. and Corda, M. G. (1981) Benzodiazepine and GABA receptors in the rat retina: Effect of light and dark adaptation. *Brain Res.*, 216: 210-214.

- Borden, L. A., Gibbs, T. T. and Farb, D. H. (1987) Identification, characterization, and developmental regulation of embryonic benzodiazepine binding sites. *J. Neurosci.*, 7: 1902-1910.

- Braestrup, C., Albrechtsen, R. and Squires, R. F. (1977) High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269: 702-704.

- Braestrup, C. and Squires, R. F. (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity [³H]diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 74: 3805-3809.

- Braestrup, C. and Nielsen, M. (1978) Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain. Res.*, 147: 170-173.

- Braestrup, C., Nielsen, M. and Olsen, C. E. (1980) Urinary and brain β -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 77: 2288-2292.

- Briley, M. S. and Langer, S. Z. (1978) Influence of GABA receptor agonists and antagonists on the binding of ^3H -diazepam to the benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 52: 129-132.

- Candy, J. M. and Martin, I. L. (1979) The postnatal development of the benzodiazepine receptor in the cerebral cortex and cerebellum of the rat. *J. Neurochem.*, 32: 655-658.

- Casalotti, S. O., Stephenson, F. A. and Barnard, E. A. (1986) Separate subunits for agonist and benzodiazepine binding in the τ -aminobutyric acid A receptor oligomer. *J. Biol. Chem.*, 261: 15013-15016.

- Chan, C. Y., Gibbs, T. T., Borden, L. A. and Farb, D. H. (1983) Multiple embryonic benzodiazepine binding sites: Evidence for functionality. *Life Sci.*, 33: 2081-2089.

- Changeux, J. -P. and Danchin, A. (1976) Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature*, **264**: 705-712.
- Chisholm, J., Kellogg, C. and Lippa, A. (1983) Development of benzodiazepine binding subtypes in three regions of rat brain. *Brain Res.*, **267**: 388-391.
- Chiu, T. H. and Rosenberg, H. C. (1979) GABA receptor-mediated modulation of ^3H -diazepam binding in rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, **56**: 337-345.
- Colello, G. D., Hockenbery, D. M., Bosmann, H. B., Fuchs, S. and Folkers, K. (1978) Competitive inhibition of benzodiazepine binding by fractions from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **75**: 6319-6323.
- Cuenod, M. and Streit, P. (1980) Amino acids transmitters and local circuitry in optic tectum. En *The Neurosciences*, eds. Schmidt, F. O. and Warden, F. G., The MIT Press, Cambridge, MA, pp. 989-1004.

- Daval, J. -L., Werck, M. -C., Nehlig, A. and Pereira de Vasconcelos, A. (1991) Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to GABA receptors in the rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **9**: 307-320.
- Davis, L. G. and Cohen, R. K. (1980) Identification of an endogenous peptide-ligand for the benzodiazepine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 141-148.
- De Blas, A. L. and Sangameswaran, L. (1986) Demonstration and purification of an endogenous benzodiazepine from the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Life Sci.*, **39**: 1927-1936.
- De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. and Salganicoff, L. (1962) Cholinergic and non-cholinergic nerve-endings in rat brain. *J. Neurochem.*, **9**: 23-35.

- Dubnick, B., Lippa, A. S., Klepner, C. A., Coupet, J., Greenblatt, E. N. and Beer, B. (1983) The separation of ^3H -benzodiazepine binding sites in brain and of benzodiazepine pharmacological properties. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**: 311-318.
- Eichinger, A. and Sieghart, W. (1986) Postnatal development of proteins associated with different benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.*, **46**: 173-180.
- Endo, Sh. and Olsen, R. W. (1991) Subunit and subtype-specific antibodies to the GABA-A/benzodiazepine receptor complex. En *Neuroreceptor mechanisms in brain*, eds. Kito, S. et al., Plenum Press, New York, pp. 375-380.
- Feltz, A., Demeneix, B., Feltz, P., Taleb, O., Trouslard, J., Bossu, J. -L. and Dupont, J. -L. (1987) Intracellular effectors and modulators of GABA-A and GABA-B receptors: A commentary. *Biochimie.*, **69**: 395-406.

- Ferrarese, C., Vaccarino, F., Alho, H., Mellstrom, B., Costa, E. and Guidotti, A. (1987) Subcellular location and neuronal release of diazepam binding inhibitor. *J. Neurochem.*, 48: 1093-1102.

- Ferrero, P., Santi, M. R., Conti-Tronconi, B., Costa, E. and Guidotti, A. (1986) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83: 827-831.

- Fiszler de Plazas, S., Alfie, J. and González, N. N. (1986) Light and dark adaptation influences GABA receptor sites in the chick retina. *Neurochem. Res.*, 11: 973-981.

- Fiszler de Plazas, S. and Mitridate de Novara, A. (1990) Effect of diazepam on the low affinity GABA binding sites at different developmental stages of the chick optic lobe. *Neurochem. Int.*, 17: 381-387.

- Fiszer de Plazas, S., Mitridate de Novara, A., Gravielle, M. C., Martínez, A. y Flores, V. (1990) Estudio comparativo de la influencia de moduladores endógenos sobre la interacción GABA-receptor durante la ontogenia. XIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, Montevideo, Uruguay.
- Fiszer de Plazas, S., Conterjnic, D. and Flores, V. (1991) Effect of a simple visual pattern on the early postnatal development of GABA receptor sites in the chick optic lobe. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9: 195-201.
 - Flores, V., Ríos, H. and Fiszer de Plazas, S. (1986) Development of GABA binding sites in chick embryo optic lobe: Effect of Triton X-100. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4: 27-34.
 - Fong, J., Okada, K., Lew, J. Y. and Goldstein, M. (1983) Effect of GABA and benzodiazepine antagonists on [³H]flunitrazepam binding to cerebral cortical membrane. *Brain Res.*, 266: 152-154.

Fuchs, K., Möhler, H. and Sieghart, W. (1988) Various proteins from rat brain, specifically and irreversibly labeled by [³H]flunitrazepam, are distinct α -subunits of the GABA-benzodiazepine receptor complex. *Neurosci. Lett.*, **90**: 314-319.

Fuchs, K. and Sieghart, W. (1989) Evidence for the existence of several different α - and β -subunits of the GABA/benzodiazepine receptor complex from rat brain. *Neurosci. Lett.*, **97**: 329-333.

Gardner, C. R., Klein, J. and Grove, J. (1981) Endogenous GABA determines the characteristics of [³H]GABA binding. *Eur. J. Pharmacol.*, **75**; 83-92.

- Gee, K. W., Chang, W.-Ch., Brinton, R. E. and Mc Ewen, B. S. (1987) GABA-dependent modulation of the Cl⁻ ionophore by steroids in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **136**: 419-423.

- Giorgi, O., Corda, M. G., Gritti, I., Mariotti, M., Ongini, E. and Biggio, G. (1989) Binding sites for [³H]2-oxo-quazepam in the brain of the cat: Evidence for heterogeneity of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacol.*, 28: 715-718.

González, N., Alfie, J. and Fiszler de Plazas, S. (1990) Glutamic acid decarboxylase in different areas of the developing chick Central Nervous System. *Neurochem. Res.*, 15: 917-921.

- Graham, L. T., Jr. (1972) Intraretinal distribution of GABA content and GAD activity. *Brain Res.*, 36: 476-479.
- Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkell, D., Bennet, C. D. and Costa, E. (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 80: 3531-3535.

Haefely, W. E. (1988) Endogenous ligands of the benzodiazepine receptor. *Pharmacopsychiat.*, 21: 43-46.

Hebebrand, J., Friedl, W., Unverzagt, B. and Propping, P. (1986) Benzodiazepine receptor subunits in avian brain. *J. Neurochem.*, **47**: 790-793.

Hebebrand, J., Friedl, W., Breidenbach, B. and Propping, P. (1987a) Phylogenetic comparison of the photoaffinity-labeled benzodiazepine receptor subunits. *J. Neurochem.*, **48**: 1103-1108.

Hebebrand, J., Friedl, W., Kessler, K., Hewing, M. and Propping, P. (1987b) Further characterization of the avian benzodiazepine receptor subunits including phylo- and ontogenetic aspects. *J. Neurochem.*, **49**: 1888-1893.

Hickel, T. L. (1981) The developing visual system. *Trends Neurosci.*, **4**: 41-44.

Hill, A. W. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, **40**: iv-vii.

- Hofstee, B. H. J. (1952) On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. *Science*, 116: 329-331.
- Hunt, P. (1982) Benzodiazepine receptors: Evidence for heterogeneity. *Drug Dev. Res.*, 51: 13-16.
- Kamp, C. W. and Morgan, W. W. (1982) Benzodiazepines suppress the light response of retinal dopaminergic neurons in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 77: 343-346.
- Karobath, M. and Sperk, G. (1979) Stimulation of benzodiazepine receptor binding by τ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76: 1004-1006.
- Kato, N. (1990) Effects of visual deprivation on the postnatal development of the geniculocortical projection in kittens. *Neurosci.*, 37: 101-114.
- Klein, W. L., Sullivan, J., Skorupa, A. and Aguilar, J. S. (1989) Plasticity of neuronal receptor. *FASEB J.*, 3: 2132-2140.

- Langer, S. Z. and Arbilla, S. (1988) Limitations of the benzodiazepine receptor nomenclature: A proposal for a pharmacological classification as omega receptor subtypes. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2: 159-170.
- La Vail, J. H. and Cowan, W. M. (1971) The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res.*, 28: 391-419.
- Lippa, A. S., Beer, B., Sano, M. C., Vogel, R. A. and Meyerson, L. R. (1981) Differential ontogeny of type 1 and type 2 benzodiazepine receptors. *Life Sci.*, 28: 2343-2347.
- Lippa, A. S., Meyerson, L. R. and Beer, B. (1982) Molecular substrates of anxiety: Clues from the heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Life Sci.*, 31: 1409-1417.
- Lo, M. M. S., Strittmatter, S. M. and Snyder, S. H. (1982) Physical separation and characterization of two types of benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 79: 680-684.

- Lo, M. M. S., Niehoff, D. L., Kuhar, M. J. and Snyder, S. H. (1983) Differential localization of Type I and Type II benzodiazepine binding sites in substantia nigra. *Nature*, **306**: 57-60.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, P. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lund, R. D. and Lund, J. S. (1972) Development of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat. *Brain Res.*, **42**: 1-20.
- Luzzani, F., Colombo, G. and Glässer, A. (1984) Central benzodiazepine receptors in the spinal cord and other regions of the CNS of the cat. *Neuropharmacol.*, **23**: 1137-1140.
- Mackerer, C. R., Kochman, R. L., Bierschenk, B. A. and Bremner, S. S. (1978) The binding of [³H]diazepam to rat brain homogenates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **206**: 405-413.

- Madtes, P. Jr. and Redburn, D. A. (1983) GABA as a trophic factor during development. *Life Sci.*, **33**: 979-984.

- Mallorga, P., Hamburg, M., Tallman, J. F. and Gallager, D. W. (1980) Ontogenetic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacol.*, **19**: 405-408.

- Marquardt, H., Todaro, G. J. and Shoyab, M. (1986) Complete amino acid sequences of bovine and human endozepines. *J. Biol. Chem.*, **261**: 9727-9731.

- Martin, I. L. and Candy, J. M. (1978) Facilitation of benzodiazepine binding by sodium chloride and GABA. *Neuropharmacol.*, **17**: 993-998.

- Massotti, M., Alleva, F. R., Balazs, T. and Guidotti, A. (1980) GABA and benzodiazepine receptors in the offspring of dams receiving diazepam: Ontogenetic studies. *Neuropharmacol.*, **19**: 951-956.

Mc Cabe, R. T., Olsen, R. W., Yezuita, J. P. and Wamsley, J. K. (1988) Osmotic shock: A method to eliminate endogenous γ -aminobutyric acid and account for the influence on benzodiazepine binding affinity in autoradiographic studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**: 342-349

Mc Graw, C. F. and Mc Laughlin, B. J. (1980) Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of the chick optic tectum. *J. Neurocytol.*, **9**: 79-93.

- Mehta, A. K. and Ticku, M. K. (1988) Developmental aspects of benzodiazepine receptors and GABA-gated chloride channels in primary cultures of spinal cord neurons. *Brain Res.*, **454**: 156-163.

- Meier, E., Drejer, J. and Schousboe, A. (1984) GABA induces functionally active low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, **43**: 1737-1744.

- Miller, L. G., Greenblatt, D. J., Barnhill, J. G., Summer, W. R. and Shader, R. I. (1988) GABA shift in vivo: Enhancement of benzodiazepine binding in vivo by modulation of endogenous GABA. *Eur. J. Pharmacol.*, **148**: 123-130.
- Mitchell, R. and Wilson, L. E. (1983) Effects of GABA receptor agonists on [³H]flunitrazepam binding to rat cerebellar and hippocampal membranes. *Neuropharmacol.*, **22**: 935-938.
- Möhler, H. and Okada, T. (1977) Properties of ³H-diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Life Sci.*, **20**: 2101-2110.
- Möhler, H., Polc, P., Cumin, R., Pieri, L. and Kettler, R. (1979) Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepine-like actions. *Nature*, **278**: 563-565.
- Möhler, H. and Richards, J. G. (1981) Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction in vitro. *Nature*, **294**: 763-765.

- Möhler, H., Richards, J. G. and Wu, J. Y. (1981) Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in immunocytochemically identified γ -aminobutyrenergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **78**: 1935-1938.
- Movshon, J. A. and Van Sluyters, R. C. (1981) Visual neural development. *Ann. Rev. Psychol.*, **32**: 477-522.
- Mower, G. D., Christen, W. G. and Caplan, C. J. (1983) Very brief visual experience eliminates plasticity in the cat visual cortex. *Science*, **221**: 178-180.
- Napias, C., Bergman, M. O., Van Ness, P. C., Greenlee, D. V. and Olsen, R. W. (1980) GABA binding in mammalian brain: Inhibition by endogenous GABA. *Life Sci.*, **27**: 1001-1011.
- Niehoff, D. L., Mashal, R. D., Horst, W. D., O'Brien, R. A., Palacios, J. M. and Kuhar, M. J. (1982) Binding of a radiolabeled triazolopiridazine to a subtype of benzodiazepine receptor in the rat cerebellum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **221**: 670-675.

- Nielsen, M., Braestrup, C. and Squires, R. F. (1978) Evidence for a late evolutionary appearance of brain specific benzodiazepine receptors: An investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species. *Brain Res.*, **141**: 342-346.

Olsen, R. W. and Leeb-Lundberg, F. (1981) Convulsant and anticonvulsant drug binding sites related to GABA-regulated chloride ion channels, En *GABA and Benzodiazepine Receptors*, eds. Costa, E. et al., Raven Press, New York, pp. 93-102.

Olsen, R. W. and Snowman, A. M. (1985) Avermectin Blia modulation of γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor binding in mammalian brain, *J. Neurochem.*, **44**: 1074-1082.

- Olsen, R. W., Bureau, M., Khrestchatisky, M., Mac Lennan, A. J., Chiang, M. -Y., Tobin, A. J., Xu, W., Jackson, M., Sternini, C. and Brecha, N. (1990) Isolation of pharmacologically distinct GABA-benzodiazepine receptors by protein chemistry and molecular cloning. En *GABA and benzodiazepine receptor subtypes*, eds. Biggio, G. and Costa, E., Raven Press, New York, pp. 35-49.
- Palacios, J. M., Niehoff, D. L. and Kuhar, M. J. (1979) Ontogeny of GABA and benzodiazepine receptors: Effects of Triton X-100, bromide and muscimol. *Brain Res.*, **179**: 390-395.
- Pasantes-Morales, H., Klethi, J., Ledig, M. and Mandel, P. (1973) Influence of light and dark on the free amino acid pattern of the developing chick retina. *Brain Res.*, **57**: 59-65.
- Peña, C., Medina, J. H., Novas, M. L., Paladini, A. C. and De Robertis, E. (1986) Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl β -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **83**: 4952-4956.

Pritchett, D. B., Lüddens, H. and Seeburg, P. H. (1989a) Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science*, **245**: 1389-1392.

- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R. and Seeburg, P. H. (1989b) Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, **338**: 582-585.

- Regan, J. W., Roeske, W. R. and Yamamura, H. I. (1980) The benzodiazepine receptor: Its development and its modulation by γ -aminobutyric acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **212**: 137-143.

Regan, J. W., Roeske, W. R., Malick, J. B., Yamamura, S. H. and Yamamura, H. I. (1981) γ -aminobutyric acid enhancement of CL 218872 affinity and evidence of benzodiazepine receptor heterogeneity. *Mol. Pharmacol.*, **20**: 477-483.

- Reichelt, R., Hofmann, D., Födisch, H. -J., Möhler, H., Knapp, M. and Hebebrand, J. (1991) Ontogeny of benzodiazepine receptor in human brain: Fluorographic, immunochemical, and reversible binding studies. *J. Neurochem.*, **57**: 1128-1135.
- Ríos, H., Flores, V. and Fiszer de Plazas, S. (1987) Effects of light- and dark-rearing on the postnatal development of GABA receptor sites in the chick optic lobe. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **5**: 319-325.
- Robbins, J. and Ikeda, H. (1989) Benzodiazepines and the mammalian retina. III. Postnatal development. *Brain Res.*, **479**: 334-338.
- Rodbard, D., Munson, P. J. and Thakur, A. K. (1980) Quantitative characterization of hormone receptor. *Cancer*, **46**: 2907-2918.
- Rose, S. P. R. and Stewart, M. G. (1978) Transient increase in muscarinic acetylcholine receptor and acetylcholinesterase in visual cortex on first exposure of dark-reared rats to light. *Nature*, **271**: 169-170.

- Rothe, T., Schliebs, R. and Bigl, V. (1985) Benzodiazepine receptors in the visual structures of monocularly deprived rats. Effect of light and dark adaptation. *Brain Res.*, 329: 143-150.
- Sábato, U. C., Aguilar, J. S. and De Robertis, E. (1981) Benzodiazepine receptors in rat brain: Action of Triton X-100 and localization in relation to the synaptic region. *J. Receptor Res.*, 2: 119-133.
- Santi, M. R., Cox, D. H. and Guidotti, A. (1988) Heterogeneity of τ -aminobutyric acid/benzodiazepine/ β -carboline receptor complex in rat spinal cord. *J. Neurochem.*, 50: 1080-1086.
- Sato, T. N. and Neale, J. H. (1987) The type I and type II τ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor: 1. Purification and two-dimensional electrophoretic analysis of the receptor from cortex and cerebellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 568-574.

- Sato, T. N. and Neale, J. H. (1989a) Type I and type II γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptors: Purification and analysis of novel receptor complex from neonatal cortex. *J. Neurochem.*, 52: 1114-1122.
- Sato, T. N. and Neale, J. H. (1989b) Immunological identification of multiple α -like subunits of the γ -aminobutyric acid receptor complex purified from neonatal rat cortex. *J. Neurochem.*, 53: 1089-1095.
- Scatchard, B. (1949) The attraction of proteins for small molecular ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51: 660-672.
- Schliebs, R., Kullman E. and Bigl, V. (1986a) Development of glutamate binding sites in the visual structures of the rat brain. Effect of visual pattern deprivation. *Biomed. Biochim. Acta*, 45: 495-506.
- Schliebs, R., Rothe, T. and Bigl, V. (1986b) Dark-rearing affects the development of benzodiazepine receptors in the central visual structures of rat brain. *Dev. Brain Res.*, 24: 179-185.

- Schliebs, R., Rothe, T. and Bigl, V. (1987) Rat retinal benzodiazepine receptor are controlled by visual cortical mechanisms. *Neurochem. Int.*, 10: 179-184.

- Schliebs, R. and Rothe, T. (1988) Development of GABA_A receptors in the central visual structures of rat brain. Effect of visual pattern deprivation. *Gen. Physiol. Biophys.*, 7: 281-292.

- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodríguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H. and Barnard, E. A. (1987) Sequence and functional expression of the GABA_A-receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 328: 221-227.

- Schofield, P. R. (1989) The GABA_A receptor: molecular biology reveals a complex picture. *Trends Physiol. Sci.*, 10: 476-478.

- Sher, P. K. (1983) Development and differentiation of the benzodiazepine receptor in cultures of fetal mouse spinal cord. *Dev. Brain Res.*, 7: 343-348.

- Shivers, B. D., Killisch, I., Sprengel, R., Sontheimer, H., Köhler, M., Schofield, P. R. and Seeburg, P. H. (1989) Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations. *Neuron*, **3**: 327-337.

 - Sieghart, W., Drexler, G., Supavilai, P. and Karobath, M. (1982) Properties of benzodiazepine receptors in rat retina. *Exp. Eye Res.*, **34**: 961-967.

 - Sieghart, W. and Schuster, A. (1984) Affinity of various ligands for benzodiazepine receptors in rat cerebellum and hippocampus. *Biochem. Pharmacol.*, **33**: 4033-4038.
- Sigel, E., Stephenson, F. A., Mamalaki, C. and Barnard, E. A. (1983) A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, **258**: 6965-6971.

- Skolnick, P., Marangos, P. J., Goodwin, F. K., Edwards, M. and Paul, S. (1978) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of [³H]diazepam binding in the Central Nervous System. *Life Sci.*, 23: 1473-1480.
- Speth, R. C., Wastek, G. J., Johnson, P. C. and Yamamura, H. I. (1978) Benzodiazepine binding in human brain: Characterization using [³H]flunitrazepam. *Life Sci.*, 22: 859-866.
- Squires, R. F. (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol.*, 22: 1443-1450.
- Stapleton, S. R., Prestwich, S. A. and Horton, R. W. (1982) Regional heterogeneity of benzodiazepine binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 84: 221-224.
- Stephenson, F. A. (1987) Benzodiazepine in the brain. *Trends Neurosci.*, 10: 185-186.

- Supavilai, P. and Karobath, M. (1981) In vitro modulation by avermectin B_{1a} of the GABA/benzodiazepine receptor complex of rat cerebellum. *J. Neurochem.*, **36**: 798-803.

- Sweetnam, P. M. and Tallman, J. F. (1986) Regional difference in brain benzodiazepine receptor carbohydrates. *Mol. Pharmacol.*, **29**: 299-306.

- Tallman, J. F., Thomas, J. W. and Gallager, D. W. (1978) GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature*, **274**: 383-385.

- Tehrani, M. H. J. and Barnes, E. M. Jr. (1986) Ontogeny of the GABA receptor complex in chick brain: Studies in vivo and in vitro. *Dev. Brain Res.*, **25**: 91-98.

- Tehrani, M. H. J. and Barnes, E. M. Jr. (1988) GABA down-regulates the GABA-benzodiazepine receptor complex in developing cerebral neurons. *Neurosci. Lett.*, **87**: 288-292.

Tehrani, M. H. J. and Barnes, E. M. Jr. (1991) Agonist-dependent internalization of γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptors in chick cortical neurons. *J. Neurochem.*, **57**: 1307-1312.

- Ticku, M. K., Van Ness, P. C., Haycock, J. W., Levy, W. B. and Olsen, R. W. (1978) Dihydropicrotoxinin binding sites in rat brain: Comparison to GABA receptors. *Brain Res.*, **150**: 642-647.

Ticku, M. K. and Davis, W. C. (1982) Molecular interactions of etazolate with benzodiazepine and picrotoxinin binding sites. *J. Neurochem.*, **38**: 1180-1182.

Toffano, G. A., Guidotti, A. and Costa, E. (1978) Purification of an endogenous protein inhibitor for the high affinity binding of γ -aminobutyric acid to synaptic membranes of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **75**: 4024-4028.

- Trifiletti, R. R., Snowman, A. M. and Snyder, S. H. (1985) Barbiturate recognition site on the GABA/benzodiazepine receptor complex is distinct from the picrotoxinin/TBPS recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, **106**: 441-447.

- Trifiletti, R. R. and Snyder, S. H. (1985) Localization of type I benzodiazepine receptors to postsynaptic densities in bovine brain. *J. Neurosci.*, **5**: 1049-1057.

- Vaccarino, F., Tronconi, B. M. C., Panula, P., Guidotti, A. and Costa, E. (1985) GABA-modulin: A synaptosomal basic protein that differs from small myelin basic protein of rat brain. *J. Neurochem.*, **44**: 278-290.

- Villiger, J. W. (1985) Characterization of peripheral-type benzodiazepine recognition sites in the rat spinal cord. *Neuropharmacol.*, **24**: 95-98.

- Vitorica, J., Park, D., Chin, G. and de Blas, A. L. (1990) Characterization with antibodies of the γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex during development of the rat brain. *J. Neurochem.*, **54**: 187-194.

- Volicer, L. and Biagioni, T. M. (1982) Presence of two benzodiazepine binding sites in the rat hippocampus. *J. Neurochem.*, **38**: 591-593.

- Wiesel, T. N. (1982) Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature*, **299**: 583-591.

- Woolf, J. H. and Nixon, J. C. (1981) Endogenous effector of the benzodiazepine binding site: Purification and characterization. *Biochem.*, **20**: 4263-4269.

- Zarbin, M. A., Wamsley, J. K., Palacios, J. M. and Kuhar, M. J. (1986) Autoradiographic localization of high affinity GABA, benzodiazepine, dopamine, adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in rat, monkey and human retina. *Brain Res.*, **374**: 75-92.

- Zezula, J., Cortés, R., Probst, A. and Palacios, J. M. (1988) Benzodiazepine receptor sites in the human brain: Autoradiographic mapping. *Neurosci.*, **25**: 771-795.