

Caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en tejidos de rata y humanos

Antoni Camins Espuny

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y QUIMICA TERAPEUTICA

UNIDAD DE FARMACOLOGIA Y FARMACOGNOSIA

**"CARACTERIZACION DEL RECEPTOR BENZODIACEPINICO
PERIFERICO EN TEJIDOS DE RATA Y HUMANOS"**

Tesis que presenta Don Antoni Camins Espuny
dirigida por el Dr. Jorge Camarasa García y la
Dra. Elena Escubedo Rafa, para la obtención del
Grado de Doctor en Farmacia.

Barcelona Junio de 1992.



El Dr. JORGE CAMARASA GARCIA, Catedrático de Farmacología, y la Dra. ELENA ESCUBEDO RAFA, Profesora Titular de Farmacología de la Facultad de farmacia de La Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN: Que la presente Memoria titulada "Caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en tejidos de rata y humanos", presentada por Antoni Camins Espuny, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, Junio de 1992.

Dr. Jorge Camarasa

Dra. Elena Escubedo

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Jorge Camarasa y a la Dra. Elena Escubedo el haber aceptado la dirección de esta Tesis Doctoral. Asimismo, quiero agradecerles la dedicación y el trabajo diario que han realizado para que esta tesis fuera posible. Finalmente, les agradezco la amistad que me han mostrado durante todo este tiempo que he estado trabajando con ellos y todos los conocimientos que me han transmitido en el campo de la Farmacología.

Al Dr. D. Tomás Adzet, Director de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia, por el trato que me ha dispensado en todo momento y por el interés que me ha mostrado.

Al Dr. D. José Iglesias, por haberme facilitado el trabajo dentro del Laboratorio de Farmacología y Farmacognosia.

A los Drs. Laguna, Merlos, Cañigüeral, Rimbau y Dras. Marin y Vila quiero agradecerles el interés que han mostrado por el trabajo que he realizado.

A la Dra. Pallás y Andrés Jimenez por su compañerismo y amistad.

A Cristobal Talaverón, F.X. Sureda y a David Pubill, quiero agradecerles el haber compartido conmigo el trabajo diario sin el cual esta tesis no hubiera podido realizarse.

Asimismo a Rosa M^a Gené, Rosa Sánchez, M^a José Salvia, M. Alegret, M. Viñals, M. Vazquez, R. Ferrando, Amer, Hans, L. Segura, C. Cartañá y C. Nuñez; quiero darles las gracias por su compañerismo.

A M^a Teresa Iglesias por la ayuda desinteresada que me ha prestado en todo momento.

A mis padres que me han apoyado en todo momento para la realización de este trabajo. A Neus por su comprensión, paciencia y no dejar nunca de apoyarme.

PUBLICACIONES

De la presente tesis se han derivado las siguientes publicaciones:

1.- Characterization of [³H] Ro 5-4864 binding sites in rat vas deferens. 1992. J. Neurochem.,58,39-45.

2.- Specific binding sites for [³H] Ro 5-4864 in rat prostate and seminal vesicle. Gen. Pharmacol. Aceptado para su publicación el 6 de diciembre de 1991.

3.- Peripheral-type benzodiazepine receptors in human prostate. Pharmacology. Aceptado para su publicación el 13 de Marzo de 1992.

4.-Characterization and differentiation of peripheral-type benzodiazepine receptors in rat and human prostate. Urology. En prensa.

Comunicaciones presentadas a congresos:

1.-Receptores benzodiazepínicos periféricos en próstata y vesícula seminal de rata.1991. IV Reunión Conjunta de las Sociedades Española y Portuguesa de Farmacología. Lisboa.

2.- Afectación del receptor benzodiazepínico periférico por el carrier ADP/ATP. 1991. IV Reunión conjunta de las Sociedades Española y Portuguesa de Farmacología.

3.- Omega 3 sites in human prostatic adenoma. IV Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas. 1991. Barcelona.

4.- Activity of ADP/ATP carrier modulates omega 3 site affinity in rat prostate and seminal vesicle. 1991. IV Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas. 1991. Barcelona.

INDICE

INDICE

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

I.-PARTE TEORICA

1.-BENZODIACEPINAS.....	6
--------------------------------	----------

1.1.-Interacción de las benzodiazepinas con el receptor benzodiazepínico central.....	6
1.2.-Nueva nomenclatura de los receptores benzodiazepínicos: los receptores omega.....	9
1.3.-Receptores omega 1.....	11
1.4.-Localización cerebral de los receptores omega 1 y omega 2.....	13
1.5.-Mecanismo funcional de los receptores omega 1 y omega 2.....	13
1.6.-Receptores del GABA.....	14
1.7.-GABA y Benzodiazepinas.....	15

2.-EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO.....	16
--	-----------

2.1.-Caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en el Sistema Nervioso central en roedores.....	16
2.2.-Localización y regulación del receptor benzodiazepínico periférico en otros órganos de rata.....	17
2.3.-Distribución subcelular.....	19
2.3.1.-Evolución del receptor benzodiazepínico periférico.....	20
2.4.-Ligando endógeno del receptor benzodiazepínico periférico.....	22
2.4.1.-EL DBI como ligando endógeno.....	23
2.4.2.-Funciones y localización del DBI y sus derivados.....	24
2.4.3.-Analogía entre el DBI y la proteína de unión del acil-CoA (ACBP).....	25
2.4.4.-Ligandos endógenos poco específicos.....	26
2.4.5.-Protoporfirinas como ligandos endógenos.....	26

2.5.-Relación estructura - actividad de las benzodiazepinas respecto al receptor benzodiazepínico periférico.....	28
2.6.-Variación interespecífica del receptor benzodiazepínico periférico.	29
2.7.-Localización del receptor benzodiazepínico periférico en la especie humana. Implicaciones patológicas.....	32
2.8.-Propiedades moleculares del receptor benzodiazepínico periférico.	32
2.9.-Clonaje de la subunidad de unión para las isoquinoleínas PKBS.	34
2.10.-Papel del receptor benzodiazepínico periférico como marcador del daño cerebral.....	37
2.11.-Estudios del receptor benzodiazepínico periférico en tumores humanos: aplicaciones del PK 11195.....	38
2.12.-Participación de las benzodiazepinas en la regulación del sistema inmune.....	40
2.13.-Relación entre el sistema endocrino y el receptor periférico.....	42
2.14.-Estructura del receptor benzodiazepínico periférico.....	47
2.15.-Otras acciones de las benzodiazepinas a nivel periférico.....	49
2.16.-Interacción con otros fármacos.....	51
3.-CANALES DE CALCIO.....	53
3.1.-Subtipos de canales de calcio.....	53
3.2.-Unión de los antagonistas del calcio a distintos lugares del canal L.....	55
3.2.1.-Transportador de nucleósidos.....	56
3.2.2.-Glicoproteína P.....	57
3.2.3.-Receptores a nivel mitocondrial.....	57
3.3.-Características comunes de estos lugares de unión para los antagonistas del calcio.....	59
3.4.-Benzodiazepinas y canal de calcio.....	59
3.4.1.-Benzodiazepinas centrales y canal de calcio.....	59
3.4.2.-Benzodiazepinas periféricas y canal de calcio.....	60

4.-UPTAKE DE ADENOSINA.....	63
4.1.-Inhibición del uptake de adenosina.....	63
5.-EL TRANSPORTADOR ADP/ATP MITOCONDRIAL.....	66
5.1.-Localización metabólica.....	66
5.2.-Inhibidores del carrier ADP/ATP.....	67
5.3.-Cinética del transportador.....	68
5.4.-Caracterización del transportador.....	70
5.5.-Mecanismo de reorientación: transición del estado "c" y "m"	71

II.-PARTE EXPERIMENTAL

6.-MATERIAL Y METODOS.....	74
6.1.-Obtención del conducto deferente, próstata, vesícula seminal y testículos de rata.....	74
6.2.-Obtención de próstatas humanas.....	74
6.3.-Obtención del extracto mitocondrial.....	75
6.4.-Determinación proteica: método de Bradford.....	75
6.5.-Descripción del ensayo.....	76
6.6.-Preparación de tampones.....	76
6.7.-Condiciones generales para determinar la unión de un ligando a un receptor.....	78
6.8.-condiciones del ensayo.....	80
6.9.-Proceso de separación del radioligando unido al receptor del radioligando libre.....	81
6.10.-Técnica del centelleo líquido.....	83
6.11.-Tratamiento de los resultados.....	86
6.12.-Validación del método.....	86
6.12.1.-Ensayos con córtex cerebral y conducto deferente de rata utilizando [³ H]-diazepam.....	86
6.13.-Valoración de factores externos.....	88
6.13.1.-Influencia de la unión del radioligando libre al filtro.....	88
6.13.2.-Influencia de la concentración proteica.....	89
6.13.3.-Estudios realizados con [³ H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata	89
6.13.4.-Influencia de la temperatura.....	93
6.13.5.-Estudios realizados con [³ H]-PK 11195 en próstata de rata.....	94
6.13.6.-Influencia de la concentración proteica.....	94
6.13.7.-Influencia de la temperatura.....	96
6.14.-Descripción de los ensayos de unión.....	98
6.14.1.-Ensayos de saturación.....	99

6.14.2.-Ensayos cinéticos.....	102
6.14.3.-Ensayos de competición.....	106
6.15.-Estudios de uptake de adenosina.....	108
6.16.-Estudio del transporte de adenosina en la fracción mitocondrial de testículo de rata.....	109
6.17.-Tratamiento de los resultados.....	109
7.-RESULTADOS.....	110
7.0.-Estudios de saturación.....	110
7.0.1.-representación de Scatchard.....	113
7.0.2.-representación de Hill.....	114
7.1.-Estudios de saturación en próstata de rata utilizando [³ H]-PK 11195 como radioligando.....	117
7.2.-Estudios de saturación en próstata de rata utilizando [³ H]-Ro 5-4864 como radioligando.....	121
7.3.-Estudios de saturación en vesícula seminal de rata utilizando [³ H]-Ro 5-4864 como radioligando.....	125
7.4.-Estudios de saturación realizados en conducto deferente de rata utilizando [³ H]-Ro 5-4864 como radioligando.....	129
7.5.-Estudios de saturación en adenoma de próstata humana utilizando [³ H]-PK 11195 como radioligando.....	133
7.6.-Estudios de saturación realizados en adenoma de próstata humana utilizando [³ H]-Ro 5-4864.....	137
7.7.-Estudios de saturación realizados en próstata humana utilizando [³ H]-PK 11195 como radioligando.....	141
7.8.-Estudios cinéticos.....	145
7.8.-Estudios cinéticos realizados en próstata de rata utilizando [³ H]-PK 11195.....	148
7.9.-Estudios cinéticos realizados en próstata de rata utilizando [³ H]-Ro 5-4864.....	154
7.10.-Estudios cinéticos realizados en vesícula seminal de rata utilizando [³ H]-Ro 5-4864.....	160
7.11.-Estudios cinéticos realizados en conducto deferente de rata utilizando	

[³ H]-Ro 5-4864.....	166
7.12.-Estudios cinéticos realizados en adenoma de próstata utilizando [³ H]-PK 11195.....	172
7.13.-Estudios cinéticos realizados en adenoma de próstata utilizando [³ H]-Ro 5-4864.....	178
7.14.-Estudios de desplazamiento.....	184
7.14.Estudios de desplazamiento con [³ H]-PK 11195 en próstata de rata	185
7.14.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.....	185
7.14.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina: NBTI y dipiridamol.....	186
7.14.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP/ATP.....	187
7.14.4.-Interacción del lugar de unión del [³ H]-PK 11195 con antagonistas del calcio, antiandrógenos y el ligando endógeno.....	188
7.15.-Estudios de desplazamiento realizados con [³ H]-Ro 5-4864 en próstata de rata.....	190
7.15.1.-Estudios de desplazamiento realizados con benzodiazepinas periféricas y centrales.....	190
7.15.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina, antiandrógenos y ligando endógeno.....	191
7.15.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP/ATP.....	192
7.15.4.-Interacción del lugar de unión del [³ H]-Ro 5-4864 con antagonistas del calcio.....	193
7.16.-Estudios de desplazamiento realizados con [³ H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.....	195
7.16.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas centrales y periféricas.....	195
7.16.2.-Estudios con antiandrógenos y el ligando endógeno.....	196
7.16.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier	

ADP/ATP.....	197
7.17.-Estudios de desplazamiento realizados con [³ H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.....	199
7.17.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas centrales y periféricas.....	199
7.17.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina y antagonistas del calcio.....	200
7.17.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP/ATP.....	201
7.18.-Estudios de desplazamiento realizados con [³ H]-PK 11195 en adenoma de próstata.....	203
7.18.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.....	203
7.18.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina....	204
7.18.3.-Interacción del lugar de unión del [³ H]-PK 11195 con antagonistas del calcio y el ligando endógeno.....	205
7.19.-Estudios de desplazamiento realizados con [³ H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata.....	207
7.19.1.-Estudios de desplazamiento realizados con benzodiazepinas periféricas y centrales.....	207
8.-ESTUDIOS REALIZADOS CON [³H]-ADENOSINA.....	209
8.1.-Estudios de saturación con [³ H]-adenosina.....	209
8.2.-Estudios cinéticos del uptake de la adenosina a nivel mitocondrial.....	212
8.3.-Estudios de inhibición del uptake de la [³ H]-adenosina.....	214

III-DISCUSSION

Discusión.....	220
----------------	-----

IV-CONCLUSIONES

Conclusiones.....	232
-------------------	-----

V-BIBLIOGRAFIA

Bibliografía.....	232
-------------------	-----

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La Farmacología de la década de los 80 intenta explicar las acciones de los nuevos fármacos mediante su interacción con los receptores específicos o bien mediante la modulación altamente selectiva de los diferentes sistemas enzimáticos y/o neurotransmisores del organismo.

Las benzodiazepinas constituyen un grupo de fármacos ampliamente utilizados en clínica desde su descubrimiento en los años 60, y por lo tanto son muy conocidos por sus propiedades terapéuticas y por su mecanismo de acción molecular a nivel del sistema nervioso central. A principio de los años 80 se descubrió unos lugares de unión distintos de los del sistema nervioso central, mediante la utilización de [³H]-diazepam, con lo cual se demostró claramente la existencia de un receptor benzodiazepínico periférico.

En la década de los 90 el estudio del receptor benzodiazepínico central se ha complicado mucho más con las técnicas de clonaje molecular. El receptor benzodiazepínico central está constituido por subunidades. Se han descrito la existencia de seis subunidades alfa distintas, lo cual implicaría la existencia de subtipos de receptores a las benzodiazepinas en diferentes áreas del cerebro (Doble y col.,1992).

A nivel del receptor benzodiazepínico periférico se habla de la existencia de un sólo receptor, pero se postula que el PK 11195 y el Ro 5-4864 ocupan lugares distintos del mismo receptor. Puede ser que en el futuro con nuevas técnicas de farmacología molecular pueda clarificarse este tema.

Existen actualmente varios ligandos específicos para el receptor benzodiazepínico periférico, entre los que destacamos el [³H]-Ro 5-4864, el cual presenta una estructura propiamente benzodiazepínica y el [³H]-PK 11195 que presenta una estructura de tipo isoquinoleínico. Mediante la utilización de ambos radioligandos se ha podido comprobar por métodos autorradiográficos la

diferente distribución que presenta el receptor benzodiazepínico central del periférico a nivel del sistema nervioso central, en cerebro de rata (Anholt y col. 1984; Benavides y col., 1983).

Mientras que a nivel del sistema nervioso central las benzodiazepinas tienen una acción hipnótica, ansiolítica, anticonvulsivante y relajante muscular por su interacción con el complejo del GABA-ionóforo del cloro, a nivel periférico se ha atribuido a este receptor unas acciones relacionadas con el crecimiento y diferenciación celular (Anholt y col. 1986). Pero hay que destacar que estas acciones se realizan a concentraciones de orden micromolar y no ha las concentraciones de orden nanomolar. Recientemente se ha propuesto la mediación de este receptor benzodiazepínico periférico en la esteroidogénesis y más concretamente en el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial (Krueger y col., 1990; Papadopoulos y col., 1991).

Finalmente ha adquirido en los últimos años un gran interés el papel de las benzodiazepinas como marcadores del daño neuronal así como su papel para el diagnóstico de gliomas y de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central de ahí la importancia del estudio de este receptor.

Los OBJETIVOS del presente trabajo han consistido en llevar a cabo un estudio a nivel molecular para la caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en tracto genital de rata. Asimismo, se ha realizado un estudio para demostrar una posible interacción de este receptor con el receptor de la testosterona y con el receptor mitocondrial de las dihidropiridinas de alta capacidad y baja afinidad. También hemos considerado de interés, ver el papel que puede desempeñar el ligando endógeno propuesto para este receptor la protoporfirina IX.

Se planteó la necesidad de realizar estudios con tejido humano y más concretamente en próstata humana, debido al posible interés de este receptor como marcador de neoplasias. Por otra parte en la bibliografía existen muy pocos estudios del receptor benzodiazepínico periférico realizados con tejidos

humanos, por ello creímos que sería importante realizar un estudio comparativo entre tejido humano y de rata.

Nuestro grupo de investigación, ya ha realizado estudios a nivel de órgano aislado (Escubedo y col. 1990), demostrándose una relación entre el receptor benzodiazepínico periférico y el sistema de transporte de la adenosina. Hasta el momento no está descrito en la bibliografía la existencia de un sistema de transporte de la adenosina a nivel mitocondrial, con lo cual sería muy atractivo intentar demostrar una teoría planteada por nuestro grupo de investigación basada, en una actuación de las benzodiazepinas a nivel periférico inhibiendo un sistema de transporte mitocondrial de nucleósidos.

I PARTE TEORICA

1.-BENZODIACEPINAS

1.1-Interacción de las benzodiazepinas con el receptor benzodiazepínico central.

Las benzodiazepinas constituyen un grupo de fármacos que ha llegado a ser el más prescrito de todos los psicótrópos desde la introducción del primer miembro de la serie en la práctica clínica, el clordiazepóxido, a principios de los años 60 . Estos compuestos son utilizados como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivantes y relajantes musculares.

A pesar de que el precursor químico se sintetizó en el año 1933, fue a partir de 1955 cuando tras unas modificaciones químicas adecuadas se sintetizó la primera benzodiazepina el clordiazepóxido. Diversas experiencias en el animal de laboratorio y, más tarde en modelos de agresividad animal, demostraron que estos compuestos presentaban un efecto sedante a dosis inferiores de las que eran capaces de producir somnolencia y ataxia. El clordiazepóxido se introdujo en clínica en el año 1960.

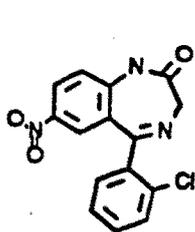
En 1975, los estudios electrofisiológicos demostraron que las benzodiazepinas producían una modulación alostérica en el complejo que potencia las acciones inducidas por el GABA (ácido gamma-aminobutírico), el neurotransmisor inhibitor principal del sistema nervioso central de los mamíferos (Haefelely y col, 1975). Existen unos receptores específicos para las benzodiazepinas relacionados con el receptor gabérgico, formando parte de un complejo macromolecular. Por tanto, las acciones de las benzodiazepinas están íntimamente ligadas a la capacidad de interactuar en un lugar específico localizado en el complejo macromolecular del receptor al GABA. La potenciación por parte de las benzodiazepinas con respecto a la unión del GABA con su dominio, comporta un aumento de la apertura de los canales de Cl^- , facilitando el paso de este ión en la dirección condicionada por el potencial de membrana en reposo y el gradiente

de Cl⁻. Por otro lado, el complejo del GABA presenta dos dominios más, uno correspondiente a las moléculas del tipo picrotoxina y otra para las moléculas del tipo barbiturato (fig 1). Los barbituratos pueden también bloquear directamente los canales de Cl⁻ e interferir los movimientos de Ca²⁺; es por ello que estos fármacos presentan una acción depresora más potente y de ahí también su menor margen terapéutico.

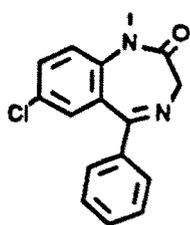
En 1978 se demostró que el GABA y el muscimol (estructuralmente relacionado con el GABA y agonista periférico de los receptores GABA_A), incrementaba la fijación del diazepam tritiado en homogenizados de tejido, libres de GABA endógeno. Este efecto era estereoespecífico e inhibido por la bicuculina, un antagonista del receptor gabérgico. Estos descubrimientos fueron fundamentales para dilucidar el mecanismo de acción central de las benzodiazepinas. El hecho de que años más tarde se comprobara que las benzodiazepinas potenciaban la unión del GABA tritiado a sus receptores, sugirió la idea de la asociación del receptor benzodiazepínico central y el receptor del GABA.

Inicialmente se pensó que el lugar de unión de las benzodiazepinas era específico para las mismas. Sin embargo, existe una serie de compuestos no benzodiazepínicos que son capaces de desplazar potente y completamente las benzodiazepinas de sus lugares de unión en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los primeros de estos compuestos fueron las triazolopiridacinas, de entre las cuales destaca CL 218872. Este compuesto era capaz de desplazar al [³H]-diazepam y al [³H]-flunitrazepam de sus lugares de unión en cerebro de rata, con un coeficiente de Hill distinto al de la unidad.

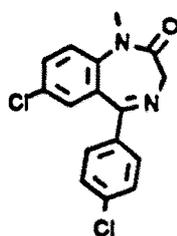
Los trabajos realizados utilizando 1,4-benzodiazepinas sugieren que el receptor benzodiazepínico es heterogéneo, existiendo dos subpoblaciones de receptores denominados BZ₁ y BZ₂. Las benzodiazepinas no son capaces de distinguir entre estos dos subtipos de receptores, mientras que las β carbolinas presentan aproximadamente una afinidad 10 veces mayor por el subtipo BZ₁. En la siguiente página se representa las estructuras químicas de diversas benzodiazepinas y otras sustancias relacionadas con los receptores benzodiazepí-



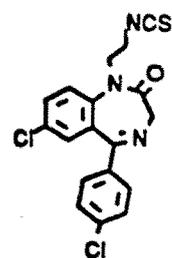
Clonazepam



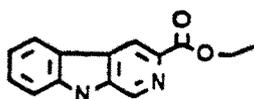
Diazepam



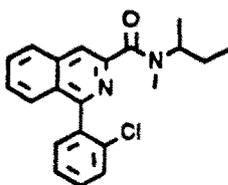
Ro 5-4864



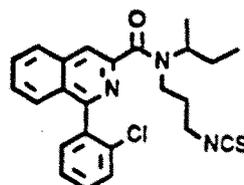
AHN 086



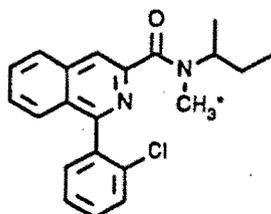
BCCE



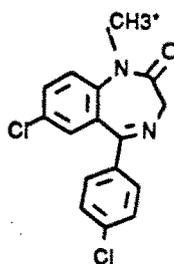
PK 11195



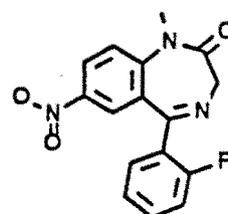
AHN 070



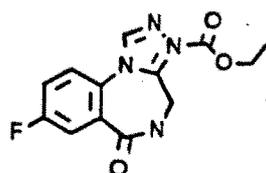
[3H]-PK 11195



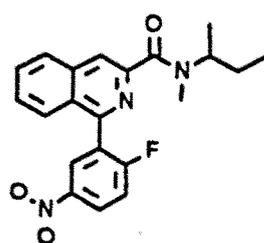
[3H]-Ro 5-4864



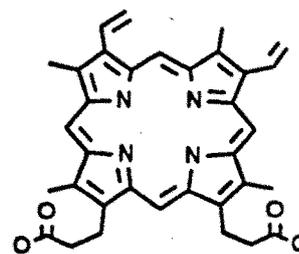
Flunitrazepam



Ro 15-1788



PK 14105



Protoporphirina IX

nicos.

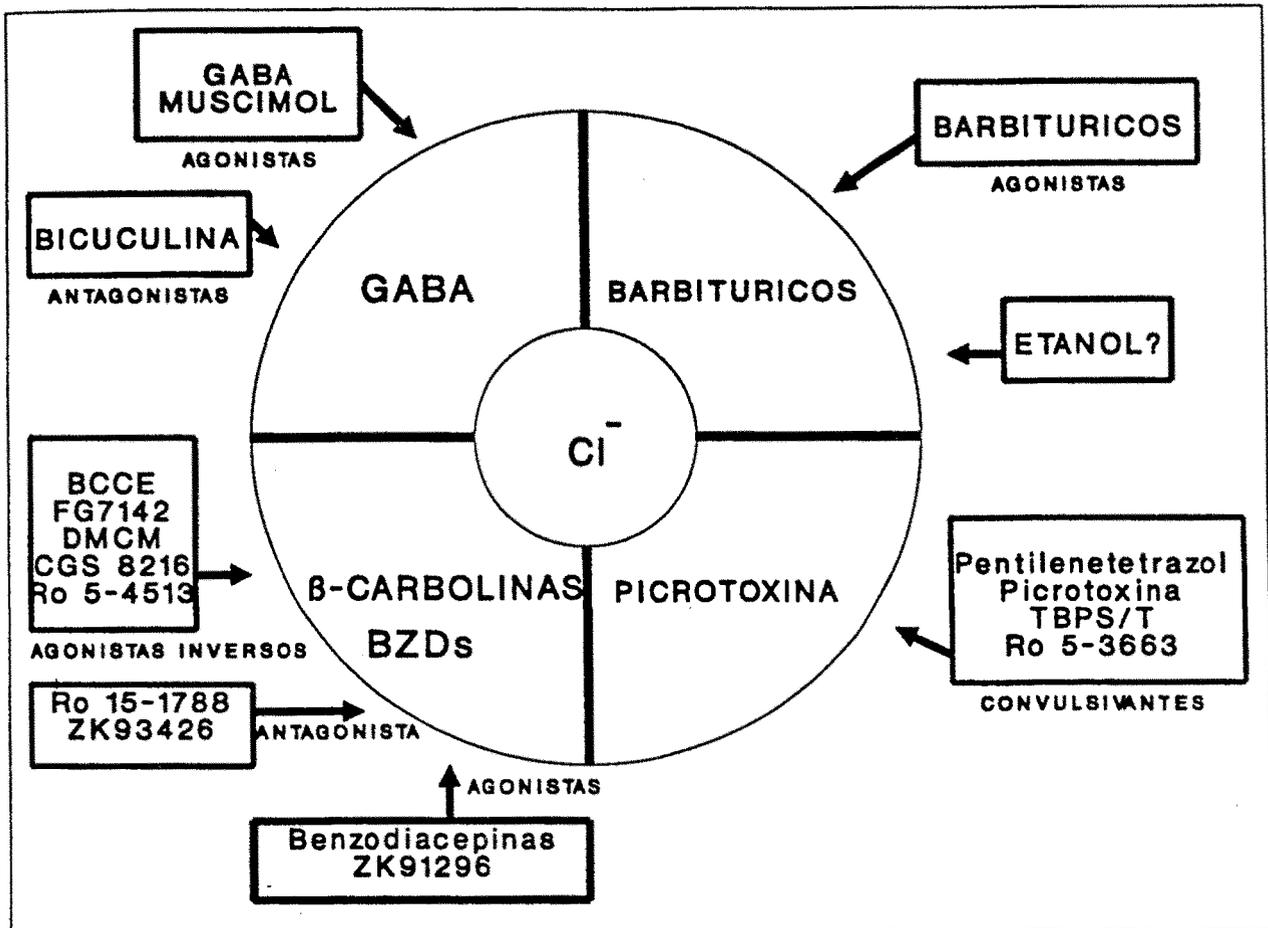


Fig 1.-Complejo molecular GABA/BENZODIACEPINAS/IONOFORO Cl⁻. En la figura se representa los diferentes lugares de unión dentro del complejo y se remarca algunos ejemplos de los ligandos que interactúan con ellos. (Flórez, 1989)

1.2.-Nueva nomenclatura de los receptores benzodiazepínicos: Los receptores omega.

Hasta hace pocos años, la nomenclatura de los receptores benzodiazepínicos estaba basada en su histórica asociación con la estructura benzodiazepínica. Sin embargo, recientemente, se han sintetizado nuevas

moléculas con una estructura completamente diferente a la molécula benzodiazepínica y que presentan una gran afinidad por el receptor benzodiazepínico. Se ha propuesto una clasificación del receptor benzodiazepínico (Langer y Arbilla 1988) en la cual se pone de manifiesto la existencia de tres receptores a las benzodiazepinas y se clasifican con la letra griega omega. Dicha clasificación está basada en la diferente afinidad de ligandos específicos, así como por una distribución diferente dentro del sistema nervioso central. Se establecen tres subtipos de receptores: omega-1, omega-2 y omega-3.

El receptor benzodiazepínico central, el BZ₁, se designa como omega-1 y corresponde al receptor central identificado con agonistas selectivos tales como el zolpidem, el CGS 9896 y el CL 218872. Como puede observarse, incluye compuestos de tres series químicas diferentes. Además, dicho receptor omega-1 presenta afinidad por los agonistas inversos como las β -carbolinas. Entre los antagonistas que bloquean el receptor omega-1 se encuentra CGS 8216, mientras que el flumazemil (Ro 15-1788) es un fármaco no selectivo por dichos receptores.

El receptor benzodiazepínico central BZ₂ se designa como omega-2 y se diferenciaría del anterior por su diferente distribución a nivel central. Por otro lado, no se dispone hasta el momento de ligandos selectivos para este subtipo de receptor. Tanto el diazepam como el flunitrazepam poseen propiedades agonistas a este nivel aunque también se unen a los receptores omega-1. El flumazemil bloquea no selectivamente los dos subtipos de receptores omega-1 y omega-2.

El tercer subtipo de receptor corresponde al receptor benzodiazepínico periférico el cual también se encuentra a nivel del sistema nervioso central y se le ha denominado omega-3. Este receptor, inicialmente localizado en tejidos periféricos como el riñón, plaquetas, glándula pineal ect., también se encuentra localizado en estructuras centrales a nivel de la glía. Como agonista de este receptor periférico se encuentra el Ro 5-4864 que presenta una estructura relacionada con la molécula benzodiazepínica y únicamente se diferencia del diazepam por presentar un átomo de cloro en la posición 4'. Como antagonista

de este receptor se encuentran el PK 11195 que presenta una estructura de tipo isoquinoleínico y el PK 14105.

Tabla 1.-Clasificación de los receptores benzodiazepínicos propuesta por Langer y Arbilla.

NUEVA CLASIFICACION DE LOS RECEPTORS BENZODIACEPINICOS

Nombre antiguo	Propuesto	Agonistas o agonistas inversos	Antagonistas
BZ ₁ Central	ω_1	Zolpidem Cl 218872 β -CCE	CGS 8216
BZ ₂ Central	ω_2	(-)*	(-)*
BZ Periférico	ω_3	Ro 5-4864 AHN 086	PK 11195 PK 14105

* No existen ligandos selectivos hasta el momento para el receptor omega 2.

1.3-Receptores omega-1.

Tal como hemos dicho, su ligando específico es el zolpidem el cual muestra una elevada afinidad por un dominio específico del receptor del GABA el α_1 . Este compuesto es un nuevo hipnótico que posee una estructura química imidazopiridínica muy diferente a la de la molécula benzodiazepínica. El zolpidem es capaz de inducir un efecto sedante y anticonvulsiónante en el animales de experimentación. Este fármaco posee también efectos miorrelajantes al igual que las benzodiazepinas clásicas. Está demostrado, que los efectos anticonvul-

sivantes y miorelajantes de las benzodiazepinas no pueden ser disociados y aparecen a unas dosis más débiles que los efectos sedantes. Las dosis de zolpidem que provocan un efecto sedante son del orden de 10 a 20 veces más bajas que las que producen los efectos anticonvulsivantes o miorelajantes.

El orden de aparición de los efectos neurofarmacológicos del zolpidem y de las benzodiazepinas en roedores es el siguiente:

ZOLPIDEM

Sedación >> Actividad anticonvulsivante > Actividad anticonflictiva >> Miorelajación.

BENZODIAZEPINAS

Actividad anticonvulsivante > actividad anticonflictiva > miorelajación > sedación.

Tabla 2.-Diferencias neurofarmacológicas entre el zolpidem y las benzodiazepinas.

Actividad	Zolpidem	Benzodiazepinas
Actividad miorelajante	Muy inferior a la actividad sedante	Similar a la actividad sedante
Atáxia	Inferior a la actividad sedante	Similar a la actividad sedante
Actividad anticonvulsivante	Inferior a la actividad sedante	Superior a la actividad sedante
Actividad ansiolítica	Atípica	Superior a la actividad sedante

1.4-Localización cerebral de los receptores omega-1 y omega-2.

Como se ha mencionado el zolpidem difiere netamente de las benzodiazepinas, por su perfil farmacológico hipnótico selectivo y por su selectividad sobre los receptores omega-1. Mediante estudios autorradiográficos realizados "in vitro" se ha puesto de manifiesto la distribución selectiva de los receptores omega-1 y omega-2 en el cerebro, puesto que, la distribución de un ligando radiactivo da una idea de la densidad de receptores en un tejido determinado.

Estudios de fotoafinidad han mostrado que los sitios omega-1 y omega-2 corresponden a entidades de peso molecular distinto.

Si se provocan lesiones selectivas en el cerebro de rata, permiten poner de manifiesto que a nivel del locus niger, los sitios omega-1 tienen una localización postsináptica en tanto que los omega-2 están localizados en los axones nigro-estriados.

Así, los receptores omega-1 presentan una distribución a nivel de la corteza sensorial, motora y sensitiva y en el sistema extrapiramidal concretamente en el globus pallidus, tálamo ventral, núcleo subtalámico, locus niger, y cerebelo. Por otro lado, los sitios omega-2 están sobre todo localizados a nivel de las regiones límbicas: corteza límbica, hipocampo (en particular el giro dentado), amígdala y el núcleo accumbens.

A nivel talámico, los sitios omega-1 son abundantes en los núcleos sensitivos y los sitios omega-2 en el núcleo talámico. La médula espinal contiene exclusivamente sitios omega-2. Otras regiones cerebrales (por ejemplo el putamen) contienen a la vez sitios omega-1 y omega-2.

1.5.-Mecanismo funcional de los receptores omega-1 y omega-2.

La localización diferencial, a nivel cerebral, de los sitios omega-1 y omega-2 permite formular hipótesis en cuanto al posible papel que pueden desempeñar estos subtipos de receptores. El hecho de que los receptores omega-1 estén

localizados preferentemente en las zonas corticales somatomotoras y los lugares somatomotores talámicos sugiere que este subtipo de receptor podría estar implicado en los efectos hipnóticos. Por el contrario, la localización en regiones límbicas de los receptores omega-2, así como en la amígdala y el hipocampo, podría sugerir que los efectos ansiolíticos y anticonvulsivos resultarían de la interacción de los fármacos con estos receptores. La presencia exclusiva de los receptores omega-2 en la médula espinal indicaría que estos sitios están probablemente implicados en los efectos mio-relajantes. La existencia de un fármaco como el zolpidem, que reconoce selectivamente los receptores omega-1, permite explicar su perfil hipnótico selectivo así como, su débil incidencia en los efectos mio-relajantes, ansiolíticos y anticonvulsivos.

Por otro lado, los estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la administración crónica de benzodiazepinas provoca una tolerancia a los efectos hipnóticos y sedantes de estas moléculas. Este fenómeno no se observa en el caso del zolpidem que conserva la potencia del efecto sedante después de un tratamiento repetitivo en ratones.

1.6.-Receptores del GABA

El ácido gamma aminobutírico (GABA), es cuantitativamente uno de los transmisores inhibitorios más importantes en el sistema nervioso central. Se ha estimado que alrededor del 30% de todas las sinapsis a nivel central utilizan este ácido como neurotransmisor.

Los receptores del GABA se han subdividido en dos subpoblaciones teniendo en cuenta su especificidad farmacológica. Los receptores GABA_A interactúan con el GABA, muscimol y la isoguvacina como agonistas. La bicuculina (competitivamente) y la picrotoxina (no competitivamente) actúan como antagonistas. Por el contrario, el receptor GABA_B es estimulado selectivamente por el baclofeno e inhibido por el phaclofeno. El receptor GABA_A se

encuentra localizado a nivel del sistema nervioso central y neuronas simpáticas periféricas, mientras que el receptor GABA_B se localiza a nivel presináptico.

Otra diferencia a entre estos dos subtipos de receptores GABA es que los receptores GABA_A están ligados a los canales de cloro, mientras que el receptor GABA_B está relacionado con los canales de calcio o potasio a través de un sistema de segundos mensajeros.

1.7.-GABA y Benzodiazepinas

La estructura de este receptor es de particular interés debido a que contiene lugares específicos de interés farmacológico en los cuales pueden actuar fármacos que modulan alostéricamente la unión del GABA y el canal del cloro. Entre ellos destacamos los ansiolíticos (benzodiazepinas), ansiogénicos (β -carbolinas), anticonvulsivantes (barbituratos) y sustancias convulsivantes (picrotoxina). El receptor GABA_A ha sido purificado (Mamalaki, 1987) a partir de homogenizados de córtex de bovino. En un principio el receptor del GABA_A, por estudios de electroforesis, se propuso que estaba constituido por dos subunidades α_2 (con un peso molecular de 53000) y β_2 (57000). Parecía pues que el receptor GABA_A era un tetrámero, donde la subunidad α puede marcarse intensamente mediante una reacción de fotoafinidad con el ligando fotosensible benzodiazepínico [³H]-flunitrazepam, lo que indica que el punto de unión con las benzodiazepinas reside en la subunidad α y el lugar de unión de los ligandos del GABA está localizado en la subunidad β ya que el [³H]-muscimol se une específicamente a esta subunidad.

Estudios usando técnicas de clonaje molecular ha sido posible demostrar la heterogeneidad del receptor GABA_A, existiendo al menos seis subunidades α (Doble y col. 1991).

Hasta el momento, se dispone de un ligando selectivo para la subunidad α_1 , como es el zolpidem. Para la subunidad α_6 se dispone de un agonista que es

el sarmazanil. Se ha formulado la hipótesis que esta subunidad está implicada en los efectos del etanol.

2.-EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO.

2.1.-Localización del receptor benzodiazepínico periférico en el Sistema Nervioso Central en roedores.

Los estudios autorradiográficos (Gehlert y col. 1985) revelan una localización diferente para el receptor benzodiazepínico periférico respecto al central a nivel del SNC.

Los estudios iniciales en rata (Richards y col. 1982; Benavides y col. 1983), en ratón (Anholt y col. 1984), y en cobaya (Weisman y col. 1985) demuestran una alta densidad de lugares de unión para el Ro 5-4864 y el PK 11195 en fibra nerviosa, en la capa glomerulosa del bulbo olfatorio, neuronas aferentes olfatorias, plexos coroideos y revestimiento ependimal de los ventrículos. También presentan una localización a nivel de las células de la glía. En estudios autorradiográficos en cerebro de gato (Benavides y col. 1984) utilizando el [³H]-PK 11195 se demostró la presencia de receptores benzodiazepínicos periféricos en neuronas, únicamente a nivel de sustancia gris ya que están ausentes a nivel de la sustancia blanca. Asimismo se ha demostrado la existencia de elevadas densidades del receptor benzodiazepínico periférico a nivel del sistema auditivo y visual, en el núcleo que regula la presión sanguínea y en los sistemas motores vestibulo cerebelosos y extrapiramidales, en zonas del hipocampo y del estriado (Shoemaker y col. 1983; Richards y col. 1983). También se localizan en el nervio óptico y en la medula espinal.

Hay una idea generalizada sobre la participación de los receptores benzodiazepínicos periféricos en las acciones ansiogénicas y convulsionantes

producidas por el Ro 5-4864. Estos efectos del Ro 5-4864 son difíciles de interpretar y no se sabe si pueden ser mediados también, por un metabolito.

2.2-Localización y regulación del receptor benzodiazepínico periférico en otros órganos de rata.

La identificación del receptor benzodiazepínico periférico fuera del sistema nervioso central se ha realizado principalmente utilizando [^3H]-Ro 5-4864 y [^3H]-PK 11195 mediante la realización de estudios autorradiográficos y de homogenizados de tejidos. Estudios autorradiográficos realizados en animal entero (Anholt y col. 1985) muestran una elevada densidad de estos receptores en el córtex adrenal, en la piel, corazón, glándulas salivares y en regiones del riñón, principalmente en el asa ascendente de Henle y en el tubulo convulvulado distal, el epitelio pulmonar y el lingual, en el revestimiento de arterias pulmonares y en el timo. También en estudios autorradiográficos realizados en órganos endocrinos (De Souza y col. 1985) se ha encontrado una gran densidad de receptores a nivel de la pituitaria, principalmente en el lóbulo posterior mientras que el lóbulo intermedio y anterior presentan una menor densidad. En la glándula adrenal se encuentran preferentemente localizados en el córtex adrenal donde la mayor densidad de receptores está en la zona glomerular externa. Se detectan receptores pero en menor densidad en la zona fasciculada y en la zona reticulada. En el sistema inmune de rata se han localizado receptores utilizando [^3H]-PK 14105 en diferentes regiones del timo y del bazo (Benavides y col. 1989).

A nivel de los testículos, se encuentra una distribución para el [^3H]-Ro 5-4864 a nivel del tejido intersticial donde se encuentran las células de Leydig, que son las responsables de la producción de testosterona. Densidades más bajas se encuentran a nivel del epitelio de los tubos seminíferos en las células de Sertoli y el esperma.

Tabla 3.-Niveles relativos de receptores benzodiazepínicos periféricos en diferentes tejidos de rata.

Tejido	Densidad relativa de lugares e unión del Ro 5-4864 (%) relativo la glándula adranal; media \pm ESM.
Tejidos periféricos:	
Glándula adrenal	100
Epitelio nasal	83
Glándula salivar	73
Higado	71
Riñón	40
Corazón	40
Testículos	33
Bazo	29
Lengua	17
Pulmón	12
Pituitaria	7
Pancreas	4
Intestino delgado	1
Músculo esquelético	0.8
Cerebro:	
Bulbo olfatorio	21
Tálamo / Hipotálamo	6
Hipocampo	4
Cerebelo	4
Córtex	3

Parece pues, que hay una relación entre densidades altas de receptores benzodiazepínicos periféricos y tejidos con funciones exocrinas. Pero hay tejidos como el corazón que contiene densidades elevadas de receptores con lo cual, parece ser que la relación alta / baja densidad de receptores puede estar relacionada con la fuente de energía metabólica (Anholt y col. 1985). Tejidos con niveles bajos de receptores como el cerebro, músculo esquelético y músculo liso dependen del consumo de glucosa. En cambio, tejidos con niveles elevados de receptores benzodiazepínicos periféricos como el córtex adrenal, la piel y el músculo cardíaco obtienen la mayor parte de su energía metabólica de la fosforilación oxidativa. Una relación entre metabolismo aeróbico y el receptor benzodiazepínico periférico podría explicar las densidades elevadas detectadas en el músculo cardíaco. Tampoco puede descartarse una relación entre la secreción de hormonas de tejidos endocrinos y el receptor benzodiazepínico periférico.

2.3.-Distribución subcelular

Existe una controversia en cuanto a la localización subcelular del receptor benzodiazepínico periférico, ya sea en la membrana externa o interna mitocondrial. Por un lado están los estudios realizados en pulmón de cobaya (Mukherjee y col. 1989) donde se demuestra, tras el estudio de diferentes fracciones obtenidas por centrifugación, que el receptor está estrechamente relacionado con la adenilato kinasa que se encuentra en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial.

Otros estudios realizados (Anholt y col. 1986), muestran una relación entre el receptor periférico y la monoamino oxidasa, indicando que este receptor está localizado a nivel de la mitocondria, ya que se solapan los lugares de unión del [³H]-Ro 5-4864 con la monoaminoxidasa. La separación de la membrana externa e interna con un ligero tratamiento con digitonina hace que descienda la unión del [³H]-PK 11195 a su receptor y se libere junto a la monoamino

oxidasa (Figura 2).

Estos resultados demuestran que el receptor periférico está localizado en la membrana externa mitocondrial ya que la monoaminoxidasa es un excelente marcador de dicha membrana, por el contrario, no existe ninguna relación entre el receptor periférico y la citocromo oxidasa que es un marcador específico de la membrana interna mitocondrial.

2.3.1.-Evolución del receptor benzodiazepínico periférico

Se han comprobado cambios ontogénicos en el receptor benzodiazepínico periférico en tejidos de rata. Así, el corazón y el pulmón de ratas adultas experimentan un incremento en el número de receptores comparado con ratas recién nacidas. Por otro lado, la población de receptores en el cerebro no se modifica. Esta variación podría explicarse por diferencias entre las fuentes de energía metabólica, fosforilación oxidativa por parte del corazón y pulmón y glicogenólisis por parte del cerebro (Fares y col. 1987).

Respecto a la filogenia, el receptor benzodiazepínico periférico es de aparición más tardía que el receptor central, ya que se ha detectado en el cerebro de mamíferos mientras que la densidad de receptores en otras especies es inferior (Bolger y col. 1985).

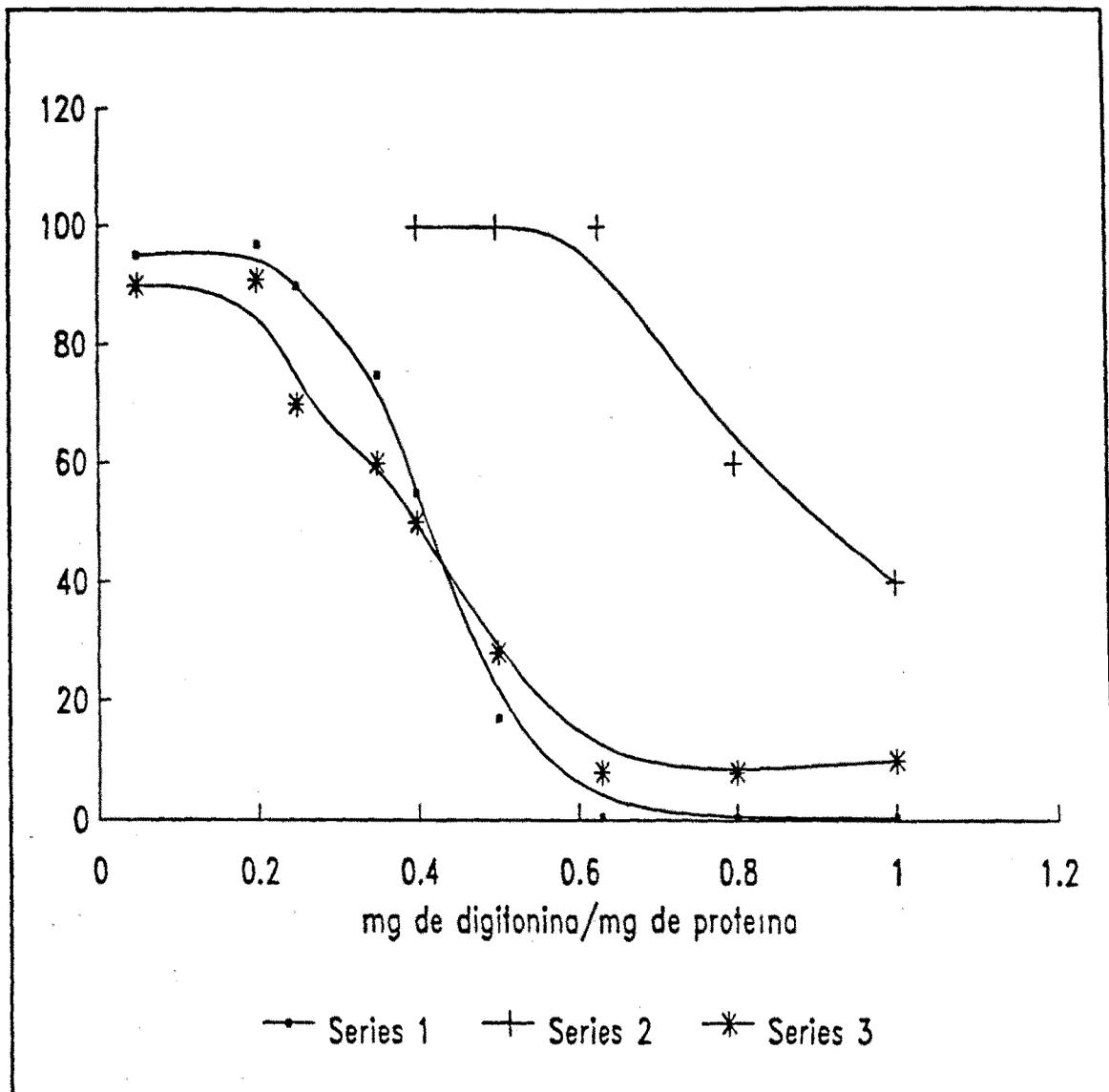


Figura 2.- Como se observa en la gráfica tanto el [^3H]-PK 11195 como la monoaminoxidasa siguen la misma liberación en el pellet mitocondrial tratado con digitonina (Anholt R.R.H y col. 1985).

Serie 1 monoaminoxidasa

Serie 2 citocromooxidasa

Serie 3 [^3H]-PK 11195

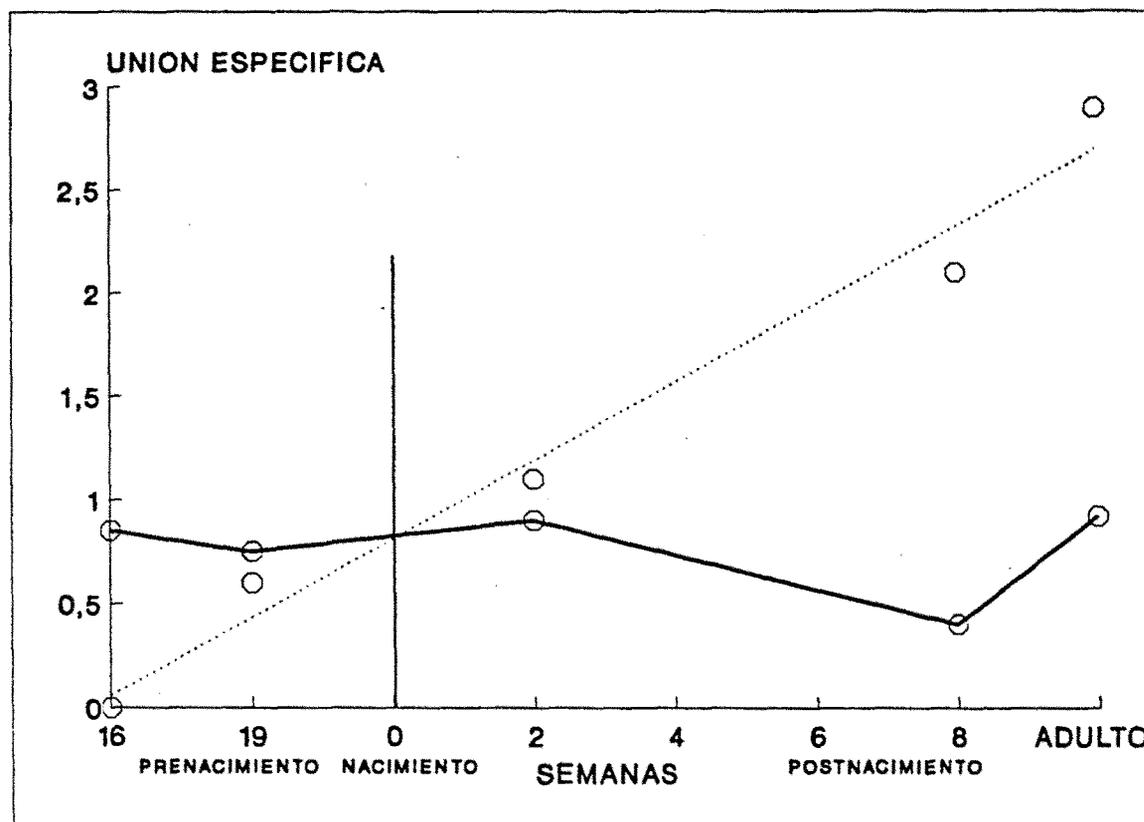


Figura 3.- Tiempo de aparición del receptor benzodiazepínico periférico y central en el desarrollo del cerebro (Anholt,RRH y col, 1984). Las líneas punteadas representan la evolución del receptor benzodiazepínico central. La línea continua representa la evolución del receptor benzodiazepínico periférico.

2.4.-Ligando endógeno del receptor benzodiazepínico periférico.

La identificación del ligando endógeno para el receptor periférico ayudaría a comprender su función dentro del organismo. Hasta el momento se han propuesto dos series de compuestos que podrían actuar como ligandos endógenos; uno lo constituiría un péptido denominado "inhibidor del binding del diazepam" (DBI), que presenta efectos similares para el receptor benzodiazepínico central y periférico. En segundo lugar, se han propuesto los

compuestos tipo porfirina como dichos ligandos endógenos.

2.4.1.-El DBI como ligando endógeno.

Entre los ligandos endógenos de las benzodiazepinas destacamos un peptido de 10 KD que presenta unas características que indican que puede ser un precursor de una familia de moduladores alostéricos del receptor del GABA_A, actuando a nivel del receptor benzodiazepínico. Se ha identificado el DBI en la especie humana y contiene 105 aminoácidos, el de rata contiene 86 igual que el DBI identificado en vaca. A partir del DBI y por digestión enzimática con tripsina se genera un octadecaneuropeptido, llamado ODN, el cual contiene 18 aminoácidos, los de la fracción 33-50 de la secuencia del DBI. También se ha aislado otra fracción denominada triakontatetrapeuropeptido, el cual, posee 34 aminoácidos correspondientes a las posiciones 17-50 del DBI y el icosapentapeuropeptido fragmento 26-50 del DBI. El TTN incluye la secuencia de aminoácidos del ODN más una cadena de 16 aminoácidos.

A nivel neuronal el DBI se encuentra compartimentado en las vesículas sinápticas, siendo procesado a ODN y otros péptidos localizados en dichas vesículas. Luego son liberados al espacio extracelular por exocitosis siguiendo una despolarización neuronal. A nivel de la glía, el DBI no es procesado a ODN, tampoco es secretado extracelularmente, pero puede actuar sobre el receptor mitocondrial de las benzodiazepinas que está implicado según algunos autores en la regulación del transporte aniónico a través de la membrana.

Para establecer las propiedades estructurales y fisico-químicas del DBI referentes a su capacidad de desplazamiento del [³H]-PK 11195 de sus lugares de unión y como estas propiedades difieren de las requeridas para los lugares de unión del complejo GABA_A, Barbaccia comprobó la capacidad de desplazamiento de varios peptidos del DBI sobre el PK 11195 de fracciones mitocondriales de astrocitos y del flumazemil de receptores del GABA en cultivos de neuronas corticales de ratas. El ODN (DBI 33-50) desplaza al [³H]-flumazemil del receptor al GABA_A con una afinidad de 5 nM, pero no desplaza al [³H]-PK 11195 de las

mitocondrias de astrocitos. Por otro lado el TTN (DBI 17-50) desplaza al PK 11195 de sus lugares de unión con una $K_i = 10$ micromolar pero no al flumazemil del receptor del GABA_A. TTN desplaza también al [³H]-Ro 5-4864 (Slobodyansky y col. 1991) de sus lugares de unión en membranas de bulbo olfatorio a concentraciones micromolares, mientras que el binding del [³H]-flumazemil no se ve afectado.

2.4.2.-Funciones y localización del DBI y sus derivados.

Para conocer el papel que puede desempeñar el DBI se han realizado estudios en pacientes con desórdenes neuropsiquiátricos (Barbaccia y col. 1986), midiendo los niveles de DBI en el fluido cerebro espinal y su posterior comparación con individuos normales. Los resultados demuestran que hay un incremento del DBI en pacientes que sufrían depresión respecto a los individuos normales.

En 1987 Masakazu demostró que el tratamiento crónico con diazepam, en rata, aumenta los niveles de DBI, los del ARNm que codifica al DBI y los anticuerpos marcados con ¹²⁵I contra el ODN a nivel del cerebelo y del cortex, pero no se detectaron cambios a nivel del hipocampo y del estriado. Asimismo, el nivel de ODN se incrementó en un orden de cinco veces superior al del DBI. Parece, pues que el DBI podría participar en el control de funciones cerebrales.

Se ha propuesto, que el DBI actúa en la liberación de insulina (Chen y col. 1988), ya que al añadir este péptido en preparaciones aisladas de páncreas se provoca una inhibición en la liberación de insulina. Mediante técnicas de radioinmunoensayo utilizando ¹²⁵DBI (Johansson y col. 1990) se ha puesto de manifiesto una asociación entre el glucagón y el DBI, ya que micrografías de inmunofluorescencia, en páncreas de rata, muestran que el DBI se solapa con el glucagón y no con la somatostatina, sugiriendo una posible función de este péptido en la producción o modulación de hormonas a nivel de los islotes de Langerhans.

Se ha demostrado (Papadopoulos y col. 1991) que tanto el DBI como el TTN activan la síntesis de esteroides mediante una interacción con el receptor benzodiazepínico periférico obteniéndose como resultado un incremento del transporte del colesterol hacia el espacio intramitocondrial y posterior formación de pregnolenona.

Alteraciones de los péptidos endógenos podrían estar implicadas en la patogenia de las encefalopatías hepáticas. En 1991 Butterwort demuestra incremento en el número de receptores benzodiazepínicos periféricos en el cerebro de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas y que fallecieron a causa de un coma hepático.

Los estudios realizados con técnicas inmunohistoquímicas (Tonon y col. 1990) demuestran que el ODN presenta una localización en el cerebro de rata a nivel no neuronal y, por otro lado, concuerda con el echo de que el ODN desplaza al [³H]-diazepam de sus lugares de unión de manera más potente a nivel de la glía que a nivel neuronal (Bender y col. 1986). A nivel de localización, el ODN se encuentra distribuido a nivel de la glía, por lo cual parece que haya una posible relación con el receptor benzodiazepínico periférico. Se ha localizado el ARNm que codifica al DBI en los testículos de rata concretamente a nivel de las células de Leydig (Rhéaume y col. 1990), también se ha localizado ha este mismo nivel el ODN.

2.4.3.-Analogía entre el DBI y la proteína de unión del acil-CoA (ACBP).

El inicio de la síntesis de ácidos grasos de cadena media en la glandula mamaria de cabra (Knudsen y col. 1990) por una ácido graso sintetasa está mediado por una aciltransferasa, resultando como productos acil-CoA ésteres. Estos acil-CoA ésteres son transportados y almacenados intracelularmente a través de una proteína a la que se unen los ácidos grasos (FABP). Una parte de esta FABP contiene un péptido de 10 KD el cual induce la síntesis de ácidos grasos de cadena media. Este péptido se denominó ACBP. Se ha descubierto que el ACBP tiene una secuencia que coincide con la del inhibidor del binding del

diazepam (DBI) sugiriéndose que el DBI puede ser un péptido estructural con acciones hormonales.

2.4.4.-Ligandos endógenos poco específicos.

Se han descrito que diversos extractos de plasma y orina de humanos que pueden inhibir competitivamente y selectivamente la unión del Ro 5-4864 del receptor benzodiazepínico periférico (Beaumont y col. 1983). Otros investigadores han descrito inhibidores de la unión del [³H]-Ro 5-4864 en extractos metanólicos acidificados del antro de estómago. Examinados diferentes tejidos y sus extractos, parece ser que existe una relación inversa entre la concentración de estos inhibidores y la densidad de los lugares de unión para las benzodiazepinas a nivel periférico, sugiriendo que la densidad de estos receptores puede estar regulada por el inhibidor presente en el tejido.

Un isoenzima de la fosfolipasa A₂ ha sido descrito como un modulador endógeno de la unión de los radioligandos al receptor benzodiazepínico periférico, actuando también en el lugar de unión de las dihidropiridinas. Este enzima sería capaz de interactuar directamente con algún componente del receptor benzodiazepínico periférico, o bien generaría ácidos grasos libres que competirían por el receptor (Verma y col. 1990). Otros estudios demuestran que algunos fosfolípidos y ácidos grasos insaturados pueden inhibir la unión del [³H]-Ro 5-4864 al receptor benzodiazepínico periférico a concentraciones micromolares.

2.4.5.-Protoporfirinas como ligandos endógenos

El descubrimiento de que los lisados de eritrocitos (Snyder y col 1987) desplazan al Ro 5-4864 y al PK 11195 de sus lugares de unión, en mitocondrias de riñón, propició el estudio y purificación de extractos metanólicos de diversos tejidos y el aislamiento de las porfirinas.

La identificación de las porfirinas como ligandos endógenos y la asociación del receptor benzodiazepínico periférico con la membrana externa mitocondrial sugiere una posible relación funcional. La etapa inicial y final en la biosíntesis de porfirinas tiene lugar dentro de la mitocondria, luego los precursores de protoporfirina IX y del grupo hemo deben atravesar la membrana mitocondrial. Aunque no han sido identificados transportadores específicos para las porfirinas, estos compuestos atravesarían la membrana externa mitocondrial utilizando la vía del canal aniónico voltaje dependiente.

Proteínas citosólicas que utilizan porfirinas como grupo prostético, como pueden ser la hemoglobina, mioglobina, catalasa y varias peroxidasas, son formadas gracias al transporte de la porfirina fuera de la mitocondria. Los citocromos contienen un grupo hemo y se encuentran localizados en ambas membranas mitocondriales. Estos hechos podrían explicar las altas densidades de receptores que existen en el cortex adrenal y en las células productoras de esteroides de los testiculos y en los ovarios, ya que, los citocromos intervienen en la biosíntesis de esteroides adrenales y gonadales.

COMPUESTO	Ki
Protoporfirina IX	14.5 ± 10.7
Mesoporfirina IX	23.1 ± 8.2
Deuteroporfirina IX	31.3 ± 2
Hemo	40.6 ± 13.7
Hematoporfirina IX	500 ± 151
Coproporfirina III	1511 ± 636
Biliverdina	4111 ± 1343

Snyder y col., 1987.

La estructura de las porfirinas y metaloporfirinas es fundamental para

inhibir la unión de las benzodiazepinas a nivel periférico. Así, las porfirinas con ácidos dicarboxílicos presentan una afinidad nanomolar para el receptor periférico. Los ácidos tetracarboxílicos presentan una afinidad muy débil mientras que los ácidos octacarboxílicos son inactivos. Los precursores de la biosíntesis de porfirinas y productos de degradación son también inactivos.

2.5.-Relación estructura - actividad de las benzodiazepinas respecto al receptor benzodiazepínico periférico.

El receptor benzodiazepínico periférico y central pueden diferenciarse por la diferente selectividad de ligandos selectivos. Por un lado se encuentra el Ro 5-4864 que se une preferentemente al receptor benzodiazepínico periférico, y por otro lado tenemos al clonazepam que es un agonista central y que se une a los dos subtipos de receptores centrales.

Por lo que respecta a la estructura química, un grupo metilo situado en el nitrógeno en posición 1 es básico para la unión del fármaco al receptor benzodiazepínico periférico. Por ejemplo, el Ro 5-2180 es muy parecido al diazepam pero carece del grupo 1-metilo, esta variación hace que la afinidad para el receptor periférico disminuya siendo 10 micromolar mientras que el diazepam es de 79 nM.

La necesidad de la presencia de un grupo metilo en el nitrógeno en posición 1 se cree que es debida a la capacidad de ceder electrones del anillo A de la molécula benzodiazepínica, aumentando así la nucleofilia del anillo B adyacente, de manera que facilita la interacción con grupos electrófilos. El átomo de halógeno situado en la posición 4', aumenta la afinidad por los lugares de unión periféricos. Dentro de los compuestos que presentan halógenos en posición 4' los que tienen como sustituyente el cloro muestran una afinidad 10 veces mayor que los que tienen el flúor. Otra posición que determina la afinidad del fármaco es la posición 7 en la cual los mejores sustituyentes son los

halógenos mucho más que el grupo nitro.

2.6.-Variación interespecífica del receptor benzodiazepínico periférico.

Mientras que en rata, el [³H]-Ro 5-4864 y el [³H]-PK 11195 presentan una afinidad similar, se ha visto que en otros animales la afinidad por el Ro 5-4864 es mucho menor.

El Ro 5-4864 muestra una gran afinidad para el receptor periférico en tejidos de roedores (rata, ratones y cobayas) mostrando baja afinidad en otros organismos. En estudios realizados en cortex de cerebro de diferentes especies, se ha observado una variación en la afinidad de estos fármacos. Así la potencia del Ro 5-4864 en desplazar al [³H]-PK 11195 de sus lugares de unión fue la siguiente: rata = cobaya > gato = perro > conejo (Awad y col.1987).

También se ha comprobado una variación referente al numero de receptores que se hace más patente en gato y en ternera, ya que, se encuentran más lugares de unión para el [³H]-PK 11195 que para el [³H]-Ro 5-4864 en la proporción 10 a 1.

El PK 11195 en cerebro de trucha presenta una elevada afinidad para el receptor benzodiazepínico periférico mientras que el Ro 5-4864 presenta una afinidad del orden micromolar. Así mismo, la protoporfirina IX presenta una afinidad mayor que el Ro 5-4864 en los estudios de competición (Eshleman y col. 1989).

En estudios autorradiográficos utilizando [³H]-Ro 5-4864 (Cymerman y col. 1986) se ha detectado una selectividad y distribución distinta del receptor periférico en el cerebro.

Tabla 4.-Afinidad que presentan los distintos radioligandos para el receptor benzodiazepínico periférico en diferentes órganos y tejidos.

Tejido	[³ H]-Radioligando	Afinidad K _D (nM)
Rata		
Cerebro	Ro 5-4864	1.0
Cerebro	PK 11195	0.8
Glándula pineal	Ro 5-4864	2.4
Corazón	Flunitrazepam	11.1
Corazón	PK 11195	3.7
Corazón	Diazepam	33.3
Riñón	Ro 5-4864	0.6
Riñón	Flunitrazepam	7.1
Riñón	Diazepam	9.3
Riñón	PK 11195	2.4
Hígado	Ro 5-4864	2.0
Testiculos	PK 11195	2.0
Plaquetas	PK 11195	1.7
Humanos		
Plaquetas	Ro 5-4864	10.8
Plaquetas	Diazepam	10.5
Plaquetas	PK 11195	6.4
Granulocitos	Diazepam	3.0
Placenta	PK 11195	2.1
Iris	PK 11195	1.4

* Referencia Saano y col. 1989.

BZD	Posición del radical						Afinidad	
	1	7	4'	2'	6'	3	SNC	Periférico
Ro 5-4864	CH ₃	Cl	Cl	H	H	H	5 µM	6 nM
Clonazepam	H	NO ₂	H	Cl	H	H	3 nM	>10 µM
Ro 5-2180	H	Cl	H	H	H	H	2 nM	> 10 µM
Ro 5-3463	CH ₃	H	H	H	H	H	600 nM	704 nM
Ro 5-5151	CH ₃	H	Cl	H	H	H	>10 µM	54 nM
Diazepam	CH ₃	H	H	H	H	H	6 nM	79 nM

Tabla 5.- Diferencias de afinidad para sus lugares de unión en el Sistema Nervioso Central y tejidos periféricos entre diferentesdiferentes benzodiazepinas debido al cambio de radicales.

Se ha propuesto que estas posibles variaciones en las diferentes especies podrían deberse a dos causas:

- Variaciones en la estructura del receptor benzodiazepínico periférico debido a cambios mutacionales.

- Variaciones a nivel del entorno fosfolípídico.

Al solubilizarse el receptor benzodiazepínico periférico, las diferencias de afinidad entre los dos ligandos se mantenían, con lo cual se llega a la conclusión de que la variación en la afinidad de los diferentes ligandos se debe a la diferente estructura molecular de la proteína en las diversas especies y no a una posible diferencia a nivel del entorno de la membrana.

2.7.-Localización del receptor benzodiazepínico periférico en la especie humana. Implicaciones patológicas.

Mediante estudios autorradiográficos (Pazos y col. 1986) utilizando [³H]-Ro 5-4864 en cerebro humano se ha visto que áreas como el plexo coroides, bulbo olfatorio, córtex cerebral y núcleo caudado presentan un número de lugares de unión inferior al cerebro de rata.

La localización del receptor benzodiazepínico periférico a nivel de la glía, ha sugerido la posibilidad de su utilización como indicadores del daño neuronal. Así, en la enfermedad de Alzheimer, desorden neurodegenerativo caracterizado por una disminución de las neuronas colinérgicas a nivel de diferentes áreas del cerebro, se ha comprobado un incremento en la población de los lugares de unión para el [³H]-PK 11195 (Diorio y col. 1990) a nivel del córtex frontal y temporal.

En la Corea de Huntington también se ha encontrado un incremento de los lugares de unión para el [³H]-5-4864.

2.8.-Propiedades moleculares del receptor benzodiazepínico periférico.

El aislamiento y caracterización molecular del receptor benzodiazepínico periférico permitiría clarificar su papel dentro del organismo. Para el aislamiento del receptor periférico se han usado ligandos que se unen covalentemente al mismo (Mukhin y col. 1990) mediante la realización de un fotomarcaje con luz ultravioleta. Se han utilizado tres ligandos para la purificación y aislamiento del receptor periférico, el [³H]-flunitrazepam, [³H]-PK 14105 y [³H]-AH 086.

El Flunitrazepam tiene una afinidad 50 veces mayor por el receptor central que por el periférico. Por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico se obtienen dos bandas de 35 y 30 KD. Utilizando [³H]-AH

086, un derivado isotiocianato del 4'-clorodiazepam que actúa acilando el receptor se obtiene una proteína de 30 KD que se ha caracterizado en la glándula pineal de rata y bovino (Maccabe y col. 1989).

Un candidato propuesto para esta proteína de 30 KD (Snyder y col. 1987) sería el canal aniónico voltaje-dependiente (VDAC) que participa en el transporte de metabolitos entre la mitocondria y el citoplasma. Utilizando [¹⁴C]-DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida), que se une selectivamente al VDAC, se ha visto que la intensidad de la banda obtenida es la tercera parte de la que corresponde a la banda de 30 KD, que aún queda por identificar (Trifiletti y col. 1986).

Mediante la utilización del [³H]-PK 14105 se ha aislado en riñón de rata (Skowronski y col. 1988) una proteína con un peso de 18500 daltons. Doble y col en 1987 aíslan en membrana cardíaca de rata un polipéptido de 17-18 KD, también aislado en cortex adrenal de bovino (Parola y col. 1990) y de igual peso molecular. A este péptido se le denominó (Antkiewicz y col. 1988) como el lugar de unión para el PK (PKBS), ya que se considera que constituye el dominio del receptor periférico donde se unirían los derivados isoquinoleínicos. De este modo, el receptor periférico sería un dímero del PKBS.

Estos resultados ponen de manifiesto que el receptor periférico sería un complejo formado por varias moléculas, de modo que las benzodiazepinas y las isoquinoleínas se unirían a lugares distintos del mismo.

En el caso del [³H]-PK 14105, la única proteína que presenta un peso molecular de 15-18 KD es la fosfolipasa A₂. Experiencias realizadas con ácido araquidónico, producto de la fosfolipasa A₂, se ha podido observar como este ácido inhibe la unión de la benzodiazepina Ro 5-4864 pero no la isoquinoleína PK 11195 (Skowroski y col. 1987).

Otra proteína de la membrana externa mitocondrial de 15 KD es la glutatión-S-transferasa. La protoporfirina IX se une a este enzima a concentra-

ciones nanomolares (Ohlendieck y col. 1986).

En estudios sobre la relación entre la membrana interna y la membrana externa se sugiere que existe un punto de fusión entre las dos membranas en el que están localizados tanto el VDAC como la glutathion-S-transferasa. El hecho de que la fosfolipasa A₂ tenga la cualidad de agregar moléculas de VDAC podría constituir un nexo de unión entre estas dos moléculas. Parece ser pues, estas proteínas estarían asociadas formando un complejo molecular que podría ser el receptor benzodiazepínico. Una de sus funciones sería la de realizar transacciones de moléculas entre el citoplasma y los compartimientos mitocondriales (Mannella y col. 1984; Schwaiger y col. 1987; Fiek y col. 1982).

Se ha relacionado el VDAC que está en la membrana externa mitocondrial y el carrier de nucleótidos que está en la membrana interna mitocondrial, ya que la fusión de estos dos sitios proporcionan un camino para el intercambio del ADP citoplasmático con el ATP mitocondrial.

2.9-Clonaje de la subunidad de unión para las isoquinoleínas (PKBS)

Se ha clonado toda la cadena del ADNc para el PKBS (Sprengel y col. 1989) y se ha expresado este ADNc en células humanas de riñón. Se obtiene por este procedimiento un péptido cuyo peso molecular es de 18.943 Da. El PKBS contiene cinco regiones hidrofóbicas transmembranales. La secuenciación proteica coincide con la realizada en células de ovario de hamster (Riond y col. 1989) donde la proteína de 17 KD aislada en mitocondria es rica en Leucina, Valina, Alanina, Glicina y Prolina. De su secuencia aminoácídica se deduce que no es típicamente mitocondrial. Estos resultados concuerdan con otros estudios (Doble y col. 1985; Olson y col. 1988) que sugieren que el receptor benzodiazepínico periférico no tiene una localización exclusiva a nivel de compartimientos mitocondriales. Se ha comprobado que en estas células 293 el PK 11195 presenta una elevada afinidad para el PKBS mientras que el [³H]-Ro 5-4864 presenta una afinidad menor. La teoría que proponen estos autores es que el

lugar de unión de las isoquinoleínas (PKBS) es responsable de la manifestación del receptor benzodiazepínico periférico. También sugieren que el receptor benzodiazepínico periférico es un complejo molecular donde la proteína de 30-35 KD estaría en íntima asociación con el receptor. Tampoco se excluye que pueda existir un sitio de unión para las benzodiazepinas distinto al receptor periférico sobre la proteína de 30-35 KD.

Se ha clonado el receptor benzodiazepínico en células humanas U 937 (Riond y col. 1991) y se ha comprobado que la secuencia de bases es muy parecida a las de rata y, diferenciándose principalmente en que la especie humana posee dos cisteínas una en posición 19 y otra en posición 153 mientras que la rata carece de dicho aminoácido. La cisteína en posición 19 parece ser que está implicada en la unión del [^3H]-PK 14105 a dicho receptor, ya que, se encuentra muy cerca de un residuo NH_2 - que por fotoafinidad se ha podido comprobar es donde se une dicho ligando. Mediante los estudios de clonaje se ha propuesto que pueden haber diferentes receptores benzodiazepínicos periféricos (Riond y col. 1991).

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos del receptor benzodiazepínico periférico en la especie humana (Riond y col.1991).

Aminoácido	número de residuos
Alanina	18
Arginina	10
Asparagina	3
Acido aspártico	2
Cisteina	0
Glutamina	4
Acido glutámico	5
Glicina	19
Histidina	2
Isoleucina	4
Leucina	22
Lisina	2
Metionina	7
Fenilalanina	6
Prolina	12
Serina	11
Treonina	10
Triptófano	12
Tirosina	10
Valina	10

2.10-Papel del receptor periférico benzodiazepínico como marcador del daño cerebral.

En los últimos años ha adquirido un gran interés el papel que podría desempeñar el receptor benzodiazepínico periférico como un elemento indicador del daño neuronal se ha comprobado que la administración de ácido kaínico, a nivel del cuerpo estriado, un modelo para reproducir la Corea de Huntington, (enfermedad que cursa con una degeneración selectiva de los cuerpos de células neuronales en el núcleo caudado y el putamen) y provoca un incremento en el número de receptores benzodiazepínicos periféricos (Schoemaker y col. 1982). Este ácido causa también una neurodegeneración cuando se aplica por vía sistémica con lo cual puede ser un modelo potencial para el estudio de una enfermedad tal como la de Alzheimer, que se caracteriza por un amplio daño neuronal a nivel de las áreas corticales y subcorticales e hipocampo. Hay ciertas enfermedades como son la esclerosis múltiple, enfermedad isquémica cerebrovascular y glioma maligno que por estudios autorradiográficos (Benavides y col. 1988) se ha visto que cursan con un incremento de los receptores omega-3.

Una posible aplicación del receptor benzodiazepínico periférico como elemento de diagnóstico neuropatológico sería en el estudio de biopsias de cerebros humanos. Hoy en día existen unos ligandos como son el [¹¹C]-PK 11195 que en estudios de tomografía de emisión de positrones o bien la emisión de rayos gamma con [¹²⁵I]-PK 11195 permitiría el estudio "in vivo" de lesiones epilépticas en humanos.

A nivel de roedores el estudio de la isquemia cerebral se ha realizado mediante la oclusión de la arteria cerebral media por termocoagulación eléctrica, cursando dicha oclusión con un incremento de receptores periféricos asociado con células de la glia y macrófagos. Los estudios autorradiográficos han revelado la presencia de una elevada cantidad en la glía de una proteína fibrilar ácida (GFAP), la presencia de astrocitos y el incremento de receptores omega-3 en macrófagos con lo cual la densidad de receptores omega-3 puede ser útil como marcador de la activación celular (Benavides y col. 1990). Estudios posteriores

(Myers y col. 1991) han confirmado la unión del [^3H]-PK 11195 a los macrófagos en procesos de isquemia cerebral. Parece ser estos procesos podrían estar mediados por citoquinas tales como la interleuquina 1 y el factor α de necrosis tumoral (TNF- α) (Bourdiol y col. 1991), que serían liberadas por los monocitos y serían las responsables del incremento de los receptores periféricos.

2.11.-Estudios del receptor periférico en tumores humanos: aplicaciones del PK 11195.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios en la especie humana por la dificultad de obtención de tejidos. La utilización de [^{11}C]-PK 11195 como emisor de positrones de vida corta que marca específicamente los receptores en el corazón de perro y de humanos habría en 1986 una nueva vía para el estudio de receptores benzodiazepínicos periféricos "in vivo" (Charbonneau y col. 1986)

Recientemente ha adquirido una gran importancia la participación de las benzodiazepinas en procesos de regulación del crecimiento neoplásico. Starosta-Rubenstein y col. fueron los primeros en sugerir el papel potencial que podrían desempeñar las benzodiazepinas periféricas como marcadores tumorales. De este modo, al realizar administraciones "in vivo" de [^3H]-PK 11195 y [^3H]-flunitrazepam en ratas con gliomas intracraneales, pudieron observar por métodos autorradiográficos como se unían específicamente los ligandos a las zonas tumorales. Aunque la tomografía axial computerizada y la resonancia magnética nuclear proporcionan una detección precisa de tumores cerebrales, para la discriminación por ejemplo, entre un edema y tejido neoplásico estos métodos son poco concluyentes.

En los tumores gliales cerebrales humanos se ha descrito un incremento de la unión específica del [^3H]-PK 11195 (Black y col. 1990) proponiéndose su utilización selectiva para la visualización de tumores por tomografía de emisión de positrones. Asimismo se propone su utilización como marcadores tumorales

(Black y col. 1989). El incremento de la unión de las benzodacepinas a los tumores gliales se correlaciona con un incremento de la malignidad del tumor. En un estudio reciente (Pappata y col. 1991) se ha empleado [^{11}C]-PK 11195 inyectándolo a un paciente con glioblastoma. Las imágenes obtenidas por tomografía de emisión de positrones revelan la acumulación del ligando en las zonas tumorales.

Estudios realizados en diferentes tumores cerebrales para medir el nivel de DBI por radioinmunoensayo (Farrese y col. 1989) han puesto de manifiesto la presencia de DBI en glioblastomas y astrocitomas, estando ausente en meningiomas, craneofaringiomas y neurinomas. Además el contenido de DBI resultó ser menor en los tejidos tumorales comparado con el tejido normal, con lo cual, no está claro el papel que puede desempeñar el ligando endógeno dichos en tejidos. El ligando endógeno protoporfirina IX no desplaza a bajas concentraciones la unión del [^3H]-PK 11195 en tejido de glioblastoma (Broaddus, 1990). Parece ser pues, que el papel que puedan desempeñar los ligandos endógenos no está hasta el momento muy claro.

Un dato que demuestra la complejidad del tema es que en el glioblastoma humano (Broaddus y col 1990) demuestran la presencia de dos lugares de unión para los derivados isoquinoleínicos uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad. En cambio, el córtex humano presenta un sólo lugar de unión con una afinidad moderada. Asimismo, el córtex renal presenta dos lugares de unión para el [^3H]-PK 11195.

En cambio, los derivados benzodiacépinicos [^3H]-Ro 5-4864 y [^3H]-flunitrazepam muestran una baja afinidad en estudios realizados en cultivos de células humanas de glioblastoma U251 y D54 (Olson, 1988). Los estudios de competición del Ro 5-4864 frente a los derivados isoquinoleínicos trititados indican una baja afinidad para esta benzodiacépinas en la especie humana, con lo cual el papel de marcador tumoral, en la especie humana, quedaría restringido al PK 11195. Por otra parte se ha descrito un incremento en los lugares de unión para el [^3H]-PK 11195 en muestras de pacientes con adenocarcinoma de colon con respecto a muestras control (Katz y col. 1990) y en pa-

cientes con cáncer de ovario. Los tumores benignos de ovario presentaban valores que no difieren significativamente de los valores normales. De este modo estos autores sugieren que este incremento en la densidad de receptores periféricos puede ser usado como un marcador biológico de la malignidad en procesos tumorales.

En plaquetas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado un incremento significativo en los lugares de unión para el [³H]-PK 11195 respecto a controles sanos (Bidder y col. 1990). Asimismo, se ha detectado un aumento de receptores en el córtex frontal y temporal de pacientes que padecían dicha enfermedad (Diorio y col. 1991) indicando el potencial uso del receptor omega-3 como marcador de la gliosis asociada, por otro lado, a una muerte de células neuronales.

Otros tejidos humanos en los cuales se ha demostrado la presencia de receptores periféricos lo constituyen la placenta (Fares y col. 1986) y los eritrocitos (Olson y col. 1988).

2.12.-Participación de las benzodiazepinas en la modulación del sistema inmune.

Los ligandos que se unen al receptor benzodiazepínico periférico desempeñan un papel inmunomodulador, ya que ha sido demostrado que el Ro 5-4864 y el diazepam estimulan la quimiotaxis de los monocitos humanos mientras que el PK 11195 actúa inhibiendo este efecto (Ruff y col. 1985). Los monocitos y sus derivados los macrófagos, son una población heterogénea de células que juegan un papel clave en la función del sistema inmune, principalmente en la reparación de tejidos, inflamación y la defensa antineoplásica. Diversos, estudios autorradiográficos han permitido confirmar una distribución de los receptores omega-3 en el sistema inmune de rata, bazo y timo, utilizando [³H]-PK 14105. Además, se observa una asociación con los linfocitos T y macrófagos.

El 11195 actúa "in vivo" en la respuesta humoral estimulando la

formación de anticuerpos frente a globulos rojos de oveja, inyectados previamente en ratón. Así, la inyección de PK 11195 intracerebral a una dosis de 0.1 ng/kg tubo un efecto sobre la formación de placas celulares. En cambio, la administración intraperitoneal del PK 11195 fue inactiva, sugiriéndose que la respuesta inmune puede estar mediada por receptores del sistema nervioso central (Lenfant y col. 1988). El sistema nervioso central puede afectar al sistema inmune no sólo a través del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, sino también por inervación periférica de órganos que participan en la producción de linfocitos y por la liberación de neurotransmisores. En un estudio realizado con pacientes ansiosos, se ha visto que estos presentan una disminución la densidad receptores omega-3 en los linfocitos (Ferrarese y col 1990). Por otro lado, pacientes con estado de ansiedad y sometidos a un tratamiento crónico con diazepam no mostraron esta disminución en la densidad de receptores. Estos autores sugieren que modificaciones en los niveles del DBI en los pacientes con ansiedad pueden participar en la regulación de receptores periféricos modulado por el sistema nervioso central.

La inducción de artritis en ratas ha permitido comprobar un incremento de receptores en el bazo y timo de ratas artríticas respecto a ratas control. Un mecanismo por el cual se postula este incremento de receptores es la secreción de interleukina 1 por parte de los macrófagos activados, que induciría la expresión de estos lugares de unión en las células T (Scatton y col. 1990).

El tratamiento de ratas Long Evans embarazadas con dosis bajas de diazepam (1.25 mg/kg) en los días 14-20 de la gestación provoca en la descendencia una supresión de la respuesta inmune (Schlumpf y col. 1990). Asimismo dicho tratamiento provoca en la descendencia un cambio en la afinidad del [³H]-PK 11195 por los linfocitos, siendo mayor respecto en las ratas no tratadas, sugiriendo un papel directo de las benzodiazepinas sobre los linfocitos. Posteriormente, se ha comprobado que las benzodiazepinas a nivel periférico inhiben la proliferación de los linfocitos a concentraciones micromolares.

Se ha observado una reducción en el número de receptores en las

plaquetas de pacientes esquizofrénicos tratados con neurolépticos, respecto a pacientes esquizofrénicos sin recibir ningún tratamiento y pacientes sanos (Gavish y col. 1986).

2.13.-Relación entre el sistema endocrino y el receptor periférico.

El sistema endocrino parece ser que actúa modulando de alguna el receptor benzodiazepínico periférico. Se ha demostrado que tras la realización de una hipofisectomía, se provoca una disminución de dichos receptores en glándula adrenal y en testículos de rata. La castración de las ratas no tiene ningún efecto sobre el número de receptores benzodiazepínicos periféricos en la glándula adrenal del mismo modo que la adrenalectomía no modifica el número de receptores en los testículos. Estos estudios mostraron una relación entre el receptor benzodiazepínico periférico y la glándula pituitaria. (Anholt y col. 1985).

Este efecto sobre la disminución del número de receptores benzodiazepínicos periféricos tras la hipofisectomía ha sido corroborado por Fares y col. En cambio, en el riñón esta disminución no se produce. La administración de ACTH en las ratas hipofisectomizadas provoca un incremento en el número de receptores comparado con las ratas hipofisectomizadas que no han recibido el tratamiento o con ratas que no sufrieron hipofisectomía.

La adrenalectomía causa una reducción significativa en la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en el riñón (Basile y col.1985). Estos hechos vienen a demostrar que el receptor benzodiazepínico periférico está sometido a un proceso de regulación hormonal. Además, se ha comprobado que, tras someter las ratas a un tratamiento crónico con estradiol, se produce una "up-regulation" en riñón y una "downregulation" en testículos (Gavish y col. 1986). Ni el número de receptores benzodiazepínicos centrales ni el de receptores periféricos en el corazón se vio alterado. El tratamiento crónico con progesterona (10 días) en ratas macho incrementa la densidad tanto en córtex cerebral como

en riñón, sin afectar la población de receptores en hipocampo, testículos o corazón. El incremento en el número de receptores en riñón puede estar asociado al efecto natriurético de esta hormona y al incremento adaptativo en la secreción de aldosterona (Gavish y col. 1987). El efecto de "up-regulation" en el córtex podría ser debido a las acciones neuronales y de comportamiento que posee la progesterona ya que dicha hormona tiene efectos antidiskinéticos y anticonvulsivantes. Además, posee propiedades antiepilépticas que parece ser no están relacionadas con su acción hormonal. Se ha puesto de manifiesto que existe una cooperatividad entre el lugar de unión de los metabolitos de la progesterona, concretamente el 3α -pregnan- 3α -ol-20-ona y el pregnadiol, a nivel del córtex de rata y el receptor del GABA (Belelli y col. 1990). Esta interacción podría explicarse a través de una modulación por parte del receptor benzodiazepínico periférico sobre la biosíntesis de hormonas esteroideas (Amsterdam y col. 1991).

El hipertiroidismo causado por la administración crónica en ratas de tiroxina (T_4), provoca un incremento de receptores benzodiazepínicos periféricos tanto a nivel central como periférico sin producir cambios en la afinidad de los ligandos. Esta modulación, por parte de la hormona T_4 sobre los receptores benzodiazepínicos puede atribuirse a una acción directa de la hormona tiroidea sobre estos receptores o puede reflejar un mecanismo de adaptación compensatorio a la tirotoxicosis asociado con hipermetabolismo, ansiedad y estrés (Gavish y col. 1986). Estudios de competición realizados en cerebro de rata muestran que la unión del [3 H]-Ro 5-4864 y [3 H]-clonazepam se ve afectada por concentraciones micromolares de T_4 (Deckert y col. 1986).

En ratas que han sufrido una adrenalectomía se observa una disminución significativa en el número de receptores benzodiazepínicos periféricos en el riñón. Cuando se administra aldosterona se revierte el efecto, pero la aldosterona fue incapaz de provocar un incremento en los animales control. Esto indicaba que los cambios en la población de receptores eran debidos a la adaptación de la nefrona renal a la pérdida de hormonas mineralocorticoides (Basile y col. 1987).

Las hormonas sexuales femeninas, parece ser, que afectan también la

población de receptores en algunos órganos como son el ovario, útero, oviducto y la pituitaria. La administración de gonadotrofina coriónica y dietilestilbestrol en ratas inmaduras hipofisectomizadas, provoca un restablecimiento del número de receptores benzodiazepínicos periféricos que previamente habían disminuído, sugiriéndose que dicha disminución de receptores es debido a una deficiencia de estrógenos y de gonodotropina coriónica (Bar-Ami y col. 1989). La actividad de la gonodotrofina coriónica incluye a la de las hormonas FH y LH. Este efecto de incrementar el número de receptores benzodiazepínicos periféricos puede ser debido a la estimulación de la síntesis de estrógenos a nivel de los ovarios por parte de la gonodotrofina coriónica (Fares y col. 1986).

En la placenta humana expuesta a dosis bajas de Ro 5-4864 se produce un incremento en la segregación de progesterona y estradiol. Dosis altas de esta benzodiazepina provocan una disminución en la secreción, y dosis altas de diazepam o PK 11195 provocan un incremento en la secreción de hormonas, demostrándose de este modo, el efecto sobre la segregación de esteroides por parte de la placenta de ligandos del receptor periférico (Barnea, 1989). Estos ligandos intervienen también en la síntesis de determinadas hormonas esteroídicas ya que se detecta un incremento en la síntesis de andrógenos en testículos descapsulados de ratas adultas, pero a concentraciones micromolares (Ritta y col. 1987).

Otros estudios ponen de manifiesto una relación entre los receptores benzodiazepínicos periféricos y el sistema adrenérgico. La simpatectomía química provocada tras la administración de 6-hidroxidopamina induce un incremento en la población de receptores benzodiazepínicos periféricos en hipotálamo, estriado y ventrículo cardiaco, disminuyéndolos en la glándula pineal y sin modificarlos en otros órganos como el riñón, pulmones, cortex cerebral, cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio (Basile y col. 1988).

Esta demostrado que la regulación por parte de la ACTH a nivel adrenal de la corticoidegenesis, requiere la síntesis de una proteína denominada "proteína activadora de la esteroidogénesis". Se ha purificado y aislado una

proteína de la corteza adrenal que es capaz de facilitar el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial (Yanagibashi y col. 1988). Análisis estructurales de esta proteína revelan una similitud con el DBI, con lo cual estos autores proponen que la ACTH causa una rápida inducción en la síntesis de DBI y esto da lugar a una estimulación de la esteroidogénesis a nivel mitocondrial. El papel del DBI sería el de mediador intracelular de la ACTH por su interacción con el receptor benzodiazepínico periférico situado en la membrana externa mitocondrial.

En los últimos años ha adquirido una gran interés el papel fisiológico que puede tener el receptor benzodiazepínico periférico sobre el transporte del colesterol.

De este modo, se ha observado que el diazepam y el Ro 5-4864 provocan una estimulación de la traslocación del colesterol hacia la membrana interna mitocondrial (Yanagibashi y col. 1989).

La biosíntesis de hormonas esteroideas comienza con el transporte de colesterol de sus depósitos extramitocondriales hacia el primer enzima de la ruta biosintética, el citocromo P-450_{sc} (que cataliza el paso de colesterol a pregnenolona), situado en la membrana interna mitocondrial. Este es el paso limitante de la esteroideogénesis y el principal lugar de regulación por estímulos fisiológicos. Asimismo, la presencia elevada de receptores benzodiazepínicos periféricos en células donde la esteroideogénesis es importante y su localización mitocondrial, avalan la hipótesis acerca del papel del receptor benzodiazepínico periférico. Diversos trabajos han citado los efectos que provocan las benzodiazepinas periféricas en estas rutas biosintéticas. En células adrenales de ratón el PK 11195, como más potente, y el resto de ligandos del receptor periférico estimulan, la esteroidogénesis (Mukhin y col. 1989). En células de Leydig y adrenales de ratón, el flunitrazepam inhibe la acción sobre la esteroideogénesis de la ACTH y de la gonadotropina coriónica. De esta manera, se demuestra que la acción antagonista del flunitrazepam está mediada por el receptor benzodiazepínico periférico que media la síntesis de esteroides activada por

hormonas (Papadopoulos y col. 1991).

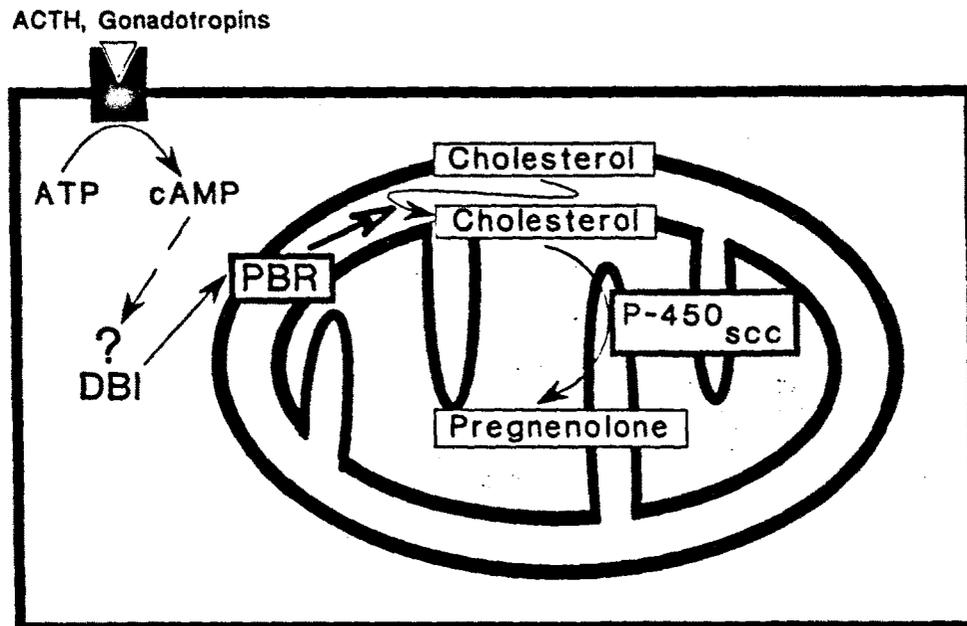


Figura 4.-Representación esquemática del mecanismo celular y del papel del receptor periférico benzodiazepínico en la biosíntesis de esteroides. Las hormonas inicialmente interactúan con la superficie celular, estimulando la producción de AMP_c. Este segundo mensajero es responsable de la producción de un factor citosólico, todavía no caracterizado pero se cree que posiblemente sea el DBI, requerido necesariamente para activar el transporte intramitocondrial de colesterol.

Respecto al ligando endógeno DBI y el péptido derivado de él como es el TTN, estimulan en células de Leydig y células adrenocorticales la formación de pregnenolona, al contrario, el ODN presenta una menor afinidad en la síntesis de pregnenolona (Papadopoulos y col. 1991).

Se han propuesto tres teorías sobre el papel que puede desempeñar el receptor benzodiazepínico periférico en la traslocación del colesterol de la membrana externa a la membrana interna (Krueger y col. 1990):

- El receptor benzodiazepínico periférico puede comprender todo o parte del aparato traslocador mitocondrial.

- El receptor benzodiazepínico periférico puede funcionar como un proceso secundario que es requerido para que tenga lugar el proceso de traslocación.

- El receptor benzodiazepínico periférico en asociación con el traslocador puede participar en el transporte de colesterol.

El problema radica en saber si el receptor benzodiazepínico periférico participa no sólo en este proceso, sino de un modo más general en el transporte de otros componentes hacia la membrana interna mitocondrial, no teniendo un papel exclusivo sobre el transporte del colesterol. De este modo, podría explicarse el transporte de la protoporfirina IX hacia la membrana interna mitocondrial y su conversión en el grupo hemo.

2.14.-Estructura del receptor benzodiazepínico periférico.

Se han propuesto diversas hipótesis acerca de que el receptor omega 3 es un complejo molecular que tendría dos lugares de unión, uno para el PK 11195 y otro para el Ro 5-4864. Esta hipótesis se basa en estudios utilizando agentes como son el dietilpirocarbonato (Benavides y col. 1984), fosfolipasa A₂ (Havoundjian y col. 1986) y ácido araquidónico (Skowronski y col. 1987).

La fosfolipasa A₂ actúa de manera distinta sobre la unión de los dos ligandos del receptor benzodiazepínico periférico. Así, la fosfolipasa A₂ provoca

una disminución en la afinidad del [³H]-Ro 5-4864 para su lugar de unión y un incremento en los lugares de unión del [³H]-PK 11195 sin afectar su afinidad. Una hipótesis propuesta es que la fosfolipasa A₂ puede afectar al contorno lipídico del receptor periférico.

El dietilpirocarbonato actúa bloqueando un residuo de histidina. De este modo, la incubación del [³H]-PK 11195 conjuntamente con dietilpirocarbonato provoca una disminución en los lugares para este ligando sin afectar su afinidad. Por otro lado la unión del [³H]-Ro 5-4864 no se ve afectada por la presencia en el medio de incubación de dietilpirocarbonato. Esta modificación en la unión de estos ligandos parece indicar que los residuos de histidina son fundamentales para la unión del PK 11195. Este efecto del dietilpirocarbonato sobre el PK 11195 es revertido por una incubación con Ro 5-4864 y se atribuye este efecto a que el Ro 5-4864 provoca un cambio conformacional en el receptor donde los residuos de histidina están enmascarados.

El ácido araquidónico disminuye la afinidad para el Ro 5-4864 y además bloquea el efecto de dicho ligando sobre la protección que ejerce frente al dietilpirocarbonato.

Parece ser que los aminoácidos que contienen grupos sulfuro juegan un papel clave en la unión de ambos ligandos, ya que se ha comprobado que agentes que bloquean específicamente estos enlaces o provocan una reducción de grupos SH afectan la unión de los dos ligandos.

La hipótesis propuesta por Skorowski y col. es que el receptor periférico tiene una naturaleza compleja con diferentes lugares de unión o bien diferentes conformaciones para el PK 11195 y el Ro 5-4864. Tampoco se descarta que dentro del mismo receptor los lugares de unión para estos dos ligandos estén solapados.

Mediante estudios termodinámicos se ha propuesto que el Ro 5-4864 es un agonista del receptor benzodiazepínico periférico y el PK 11195 un an-

tagonista. La unión del PK 11195 va asociada a un pequeño cambio en la entalpía y un incremento sustancial de la entropía mientras que la unión del Ro 5-4864 está inducida por la entalpía. Se ha propuesto el siguiente modelo en dos etapas para la unión del Ro 5-4864 (Le Fur y col. 1983):



donde L es el ligando, R es el receptor y R' es el cambio producido en el receptor por la unión del agonista. En este modelo el antagonista podría participar solamente en la fase 1. El agonista podría participar en ambas fases provocando un cambio estructural en el receptor (R'). De este modo la unión del agonista está inducida por la entalpía con una disminución marcada de la entropía mientras que la unión del antagonista PK 11195 está inducida por la entropía. Sin embargo, en estos estudios no se descarta que el PK 11195 marque una subclase o una conformación específica del receptor benzodiazepínico periférico.

El tratamiento con detergentes provoca cambios en la unión del Ro 5-4864 o el PK 11195. De este modo el Tritón X-100 causa una disminución sobre la unión del Ro 5-4864 pero no afecta la del PK 11195. Otros detergentes como CHAPS, Tween 20, ácido desoxicólico, digitonina también afectan la unión del Ro 5-4864, provocando una menor variación en la unión del PK 11195 (Awad y col. 1988). Esta distinta sensibilidad al tratamiento con los detergentes por parte de los dos ligandos sugiere que pueden provocarse cambios en el receptor que afecten más específicamente al lugar de unión del Ro 5-4864.

2.15.-Otras acciones de las benzodiazepinas a nivel periférico.

Las benzodiazepinas a nivel periférico inhiben la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico. Parece ser que el mecanismo de esta acción está ligado a una inhibición de la síntesis de tromboxanos y de ácido 12-hidroxi-

heptadecatrienoico. La ciclooxigenasa utiliza un grupo protoporfirínico como cofactor con lo cual podría ser que las benzodiazepinas se unieran a este grupo provocando una disminución en la actividad de la ciclooxigenasa y, por lo tanto, inhibir la agregación plaquetaria (Fonlupt y col. 1990). Estos efectos sobre la agregación plaquetaria ha permitido proponer la hipótesis sobre la posible utilidad de las benzodiazepinas para la prevención o retardo de la tromboaterosclerosis (Cuparencu y col. 1989). Se ha descrito un efecto sobre la respiración en células neuronales y, más concretamente la inhibición del consumo de O_2 en el tercer estado de la respiración que está relacionado con el flujo electrónico y la síntesis de ATP (Larcher y col. 1989).

A nivel del sistema cardiovascular el Ro 5-4864 provoca un incremento del flujo coronario y este efecto no es antagonizado por el PK 11195. El mecanismo de acción de este efecto vasodilatador podría estar relacionado con la existencia de canales de calcio a los cuales podrían las benzodiazepinas (Grupp y col. 1987). Los efectos *in vitro* sobre la relajación del útero en rata se relacionan también con un efecto dependiente del influjo de calcio que podría ser inhibido por las benzodiazepinas (Kazanietz y col 1990). La inhibición del crecimiento celular es una función atribuída a las benzodiazepinas periféricas. En cultivos de células de timoma (Wang y col. 1984), glioma y neuroblastoma de ratón las benzodiazepinas tienen un efecto antiproliferativo. La inhibición del crecimiento celular se lleva a cabo a concentraciones de rango micromolar, con lo cual este efecto no está mediado por el receptor benzodiazepínico periférico, sino que se relaciona con la capacidad de inhibición del uptake de timidina (Gorman y col, 1989). Otros autores han sugerido que tanto el PK 11195 como el Ro 5-4864 tienen un efecto bifásico (Ikezaki y col. 1990). A concentraciones nanomolares actúan sobre la proliferación celular estimulando la incorporación de timidina al DNA. Sin embargo, a concentraciones micromolares inhiben la síntesis de DNA. En células de ratón de melanoma se han caracterizado dos lugares de unión para el [3H]-diazepam sugiriéndose que el lugar de baja afinidad es el responsable de la melanogénesis (Matthew y col. 1981).

2.16.-Interacción con otros fármacos.

Se ha demostrado una interacción entre los barbituratos y el receptor benzodiazepínico periférico, de este modo la administración de fenobarbital en ratón, provoca un incremento significativo en la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en el corazón, riñón y cerebelo respecto a muestras control (Weizman y col. 1989). Asimismo, la administración de pentobarbital en rata revierte los efectos provocados por el stress sobre la disminución en la densidad de receptores en el riñón (Drugan y col. 1990).

El tratamiento crónico con diazepam provoca un incremento en la densidad de receptores para el [³H]-PK 11195 en corazón y córtex de rata. Este efecto puede deberse a la acción sedante de este ansiolítico que provoca una reducción del tono simpático (Marthy y col. 1986) o bien podría explicarse por el efecto del diazepam sobre el carrier mitocondrial Na⁺/Ca⁺ en corazón y cerebro

La administración "in vivo" del Ro 5-4864 en ratones facilita las convulsiones provocadas por métodos audiogénicos. El PK 11195 antagoniza este efecto con lo cual se pone de manifiesto que el Ro 5-4864 puede ser un agonista del receptor periférico y el PK 11195 un antagonista (Benavides y col. 1984).

Se ha demostrado una relación entre los insecticidas piretroides y las benzodiazepinas periféricas. El pretratamiento de ratas con PK 11195 disminuye la actividad proconvulsionante de dichos insecticidas (Devaud y col. 1986). Además la unión del [³H]-Ro 5-4864 en cortex de rata se ve afectada por la presencia de estos insecticidas en el medio de incubación (Devaud y col. 1988).

La población de receptores benzodiazepínicos está modulado por el stress. Mediante un generador de shocks se provoca en ratas una disminución en la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en tejidos como el corazón y el riñón (Drugan y col. 1990). La supresión de la dieta en ratas provoca, asimismo, una disminución de receptores benzodiazepínicos periféricos. Esta

relación puede deberse al stress, que provocaría cambios metabólicos o bien a un efecto sobre la disminución de ACTH causado por una hipercolesteremia causada por una disminución de la alimentación (Weizman y col. 1990).

Pacientes tratados con carbamazepina experimentan una "up-regulation" en la densidad de receptores en las plaquetas respecto a los controles. Este cambio puede explicarse debido a posibles alteraciones a nivel hormonal que puede provocar el tratamiento con carbamazepina que afectarían al receptor benzodiazepínico periférico (Weizman y col. 1987).

Anestésicos como la lidocaína y la tetracaína desplazan a concentraciones micromolares el [³H]-Ro 5-4864 de sus lugares de unión en el bulbo olfatorio de rata. Esta interacción podría ser responsable de los efectos antiarrítmicos o anticonvulsiantes de esos fármacos. Asimismo, la carbamazepina desplaza, a concentraciones del orden micromolar, al Ro 5-4864 relacionándose del mismo modo por su acción anticonvulsionante (Clark y col. 1990).

A nivel del corazón se ha demostrado que el diazepam tiene una acción vasodilatadora. La unión del [³H]-diazepam a nivel del corazón es desplazada por el dipiridamol, fármaco que es utilizado en clínica por su acción vasodilatadora a nivel coronario (Davies y col. 1981).

El tratamiento crónico de ratones con etanol provoca un incremento en el número de lugares de unión para el [³H]-Ro 5-4864 y para el [³H]-PK 11195 en el cerebro, pero este incremento no se produce ni a nivel del corazón ni de riñón. De este modo podría ser que las benzodiazepinas periféricas participaran de alguna manera en el desarrollo de dependencia al alcohol (Syapin y col. 1988).

3.-CANALES DE CALCIO.

3.1.-Subtipos de canales de calcio.

Hasta el presente, se reconoce la existencia de tres clases de canales de calcio: L, T y N. (Bean y col. 1989).

Canales T: Son activados a potenciales negativos de membrana, y se inactivan rápidamente. Estos canales se encuentran en el músculo cardíaco, músculo liso, fibroblastos, osteoblastos y neuronas. Son bloqueados débilmente por las dihidropiridinas y por la ω -conotoxina.

Canales L: A estos canales se unen selectivamente las dihidropiridinas, verapamilo y diltiazem y sus análogos. Se ha propuesto una estructura para este canal, según la cual, estaría formado por una subunidad α_1 , que contiene el lugar de unión de los antagonistas del calcio.

Esta subunidad α_1 es dependiente de fosforilación por parte del AMP cíclico y parece ser que es el centro de este complejo canal. Asimismo, la subunidad α_1 estaría formada por cuatro segmentos transmembranales homólogos.

La subunidad β también es sustrato del AMP cíclico y parece ser que está asociada estrechamente a la subunidad α_1 . La subunidad β está implicada, probablemente en el transporte de nucleósidos.

La subunidad ω de 30 KD interactúa independientemente con la subunidad α_1 . Contiene por lo menos un segmento transmembranal consistente en un 30% de carbohidratos.

El dímero formado por las subunidades $\alpha_2\delta$ interactúa con la subunidad α_1 , y parece ser que el canal de calcio estaría formado por la zona de interacción

de las subunidades α_1 y α_2 . La subunidad α_2 y la gamma están unidas entre sí por puentes disulfuro.

Tabla 8: Estructura del lugar de unión de las dihidropiridinas.

Subunidad	Peso molecular (KD)	Propiedades composición
α_1	150-170	Lugar de unión DHP Fenilalquilaminas Fosforilación AMPc Hidrofóbico
α_2	150-190	Puente disulfuro
β	54	Fosforilación AMPc Transporte de nucleósidos No contiene dominios hidrofóbi
ω	30	30% carbohidratos

Canales N: Aún no han sido totalmente definidos. Se han caracterizado en neuronas donde parece ser que la adenosina puede tener efectos inhibitorios sobre este canal. Son sensibles a la ω -conotoxina y no a las dihidropiridinas.

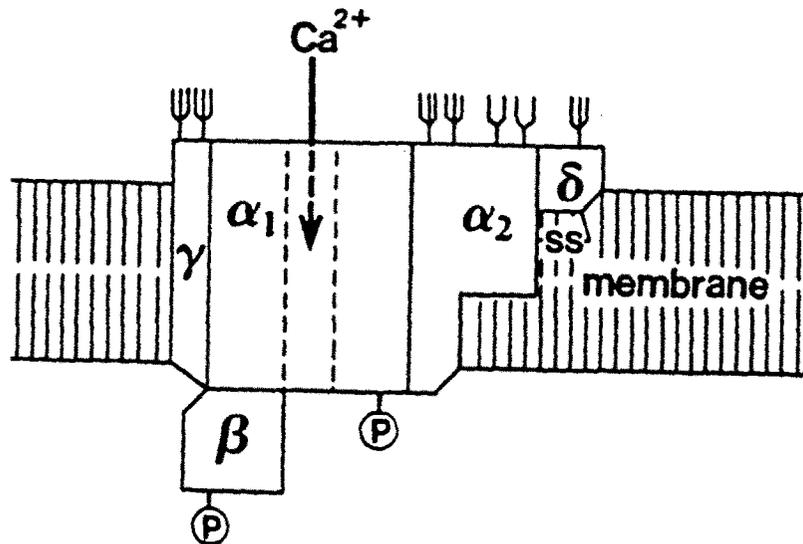


Figura 5.-Representación estructural de los canales L de calcio voltaje-dependientes (Takahashi y col., 1987).

3.2.-Unión de los antagonistas del calcio a distintos lugares del canal L.

Los antagonistas del calcio se dividen en tres grupos:

- Las 1,4-dihidropiridinas: nitrendipino, felodipino, isradipino, nicardipino, nifedipino, nimodipino y nisoldipino.
- Las fenilalquilaminas: verapamilo, devapamilo, gallopamilo, LU49888.

- Las benzotiazepinas: diltiazem.

Todos estos fármacos se unen con una elevada afinidad a la subunidad α_1 de los canales L de calcio voltaje-dependientes. Pero estos fármacos interactúan además con otras estructuras celulares (diferentes a los canales L), ofreciendo de esta manera una variedad de nuevas perspectivas terapéuticas. Estos lugares de unión han sido caracterizados por estudios de binding y son: el transportador de nucleósidos, la glicoproteína P, un lugar de baja afinidad y de alta capacidad para las dihidropiridinas.

Las dihidropiridinas, además, muestran una capacidad de unirse al receptor benzodiazepínico periférico, que regula el control de la respiración a nivel mitocondrial. Otras interacciones de baja afinidad se presentan también entre antagonistas del calcio y receptores α , 5-HT, receptores opioides y colinérgicos.

3.2.1.-Transportador de nucleósidos

Al carrier de nucleósidos se unen fenilalquilaminas y dihidropiridinas y dicho carrier actúa como un verdadero receptor farmacológico para ambas clases de antagonistas del calcio. (+)-Nimodipino es la dihidropiridina que presenta una mayor afinidad por este sistema, en cambio, (+)-nimodipino se une a los canales L con una afinidad del orden de cinco veces menor que el (-)-nimodipino. A nivel del músculo cardíaco bovino (Ruth y col. 1985), se ha detectado un lugar de baja afinidad para el nimodipino que es inhibido por hexobendina y nitro-benciltioinosina a concentraciones nanomolares con lo cual se sugiere que este lugar de baja afinidad está relacionado con el transportador de la adenosina.

Se ha encontrado una relación entre la potencia de las dihidropiridinas y fenilalquilaminas y la inhibición del uptake de adenosina en eritrocitos humanos (Striessning y col. 1985). Se sugiere (Zerning y col. 1990) que el transporte de nucleósidos puede ser modulado por antagonistas del calcio como

son las dihidropiridinas y fenilalquilaminas, pero aún no existen evidencias que esta regulación pueda realizarse "in vivo".

3.2.2.-Glicoproteína P

Se encuentra localizada a nivel de la membrana plasmática. Consiste en dos grupos de seis dominios transmembranales y dos grandes dominios citoplasmáticos. Las regiones citoplasmáticas se cree que están moduladas de alguna manera por el ATP.

3.2.3.-Receptores a nivel mitocondrial

Se ha caracterizado un lugar de unión del calcio de alta capacidad (B_{max} de 1 nmol por mg de proteína) y baja afinidad para las dihidropiridinas y fenilalquilaminas en mitocondrias de corazón, riñón e hígado de rata (Zernig y col. 1988). Las constantes de disociación (K_D) fueron muy altas, por ejemplo 593 nM para [3H]-nitrendipino, comparado con valores dentro del rango nanomolar que se alcanzan cuando estos fármacos actúan a nivel de los canales L de calcio. Por otra parte, a este receptor mitocondrial parece ser que la unión de las dihidropiridinas está regulada de una manera alostérica negativa por nucleótidos y especialmente por el ATP (Zernig y col.1988).

La unión a estos lugares a nivel mitocondrial, es óptima a a 37°C centígrados. Por lo que refiere al perfil farmacológico, este lugar de unión de baja afinidad se ha visto que otras 1,4-dihidropiridinas son inhibidores efectivos con valores CI_{50} del mismo orden (Zernig y col. 1988). Referente a la estructura de las 1,4-dihidropiridinas, la esterificación de los dos grupos 3-carboxi y 5-carboxi es esencial para la unión ha este lugar de baja afinidad. Los compuestos que presentan un sustituyente nitro en posición 5, como el BAY K8644, no desplazan la [3H]-nitrendipina a concentraciones que llegan a sus límites de solubilidad.

La cadena del anillo dihidropiridínico en posición 5, donde se encuentran los ésteres sustituidos es el indicador más importante de la afinidad de las

dihidropiridinas para este lugar de unión de baja afinidad así el orden de afinidad es: Nitrendipina > Nifedipina > Nimodipina. Los sustituyentes isopropilo muestran una mayor afinidad que los sustituyentes isobutilo.

Las fenilalquilaminas son unos inhibidores mucho menos potentes comparados con las 1,4-dihidropiridinas. Referente a la estructura de las fenilalquilaminas los anillos bencénicos son esenciales para la unión y el número de sustituyentes metoxi a uno o a los dos anillos no afecta la afinidad.

Las benzodiazepinas como D- y L-cis diltiazem no inhiben la unión de la [³H]-Nitrendipina a concentraciones de 100 μ M.

Se han propuesto siete candidatos distintos para este lugar de baja afinidad para las dihidropiridinas:

- El transportador de nucleósidos.
- El intercambiador de Na^+/Ca^+ .
- La ATPasa Na^+/K^+ .
- ATPasa- Ca^+ a nivel del sarcolema.
- La calmodulina dependiente de AMP cíclico.
- El receptor benzodiazepínico periférico.
- La glicoproteína P.

De estos candidatos sólo el receptor benzodiazepínico periférico y el intercambiador de Na^+/Ca^+ tienen una localización mitocondrial. Por otro lado, la unión de la [³H]-nitrendipino no es afectada por el Ro 5-4864 pero si que, la unión del [³H]-Ro 5-4864 se ve afectada por Nitrendipina y Nifedipina a concentraciones del orden micromolar (Cantor y col.1984).

Estos sitios están alostéricamente inhibidos por nucleótidos (Zernig y col. 1988).

3.3.-Características comunes de estos lugares de unión para los antagonistas del calcio.

Estos lugares de unión para los antagonistas del calcio, los cuales son distintos a los canales L, presentan una serie de características comunes que los diferencian de los lugares clásicos de unión:

- Una baja afinidad y una alta capacidad: Los lugares de unión de los antagonistas del calcio distintos a los canales L tienen lugar con unos valores de K_D de orden micromolar e incluso milimolar.

- Estabilidad al calor: La estabilidad al calor de los lugares mitocondriales en comparación con los canales L de calcio, sugiere que son unas estructuras rígidas, probablemente debido a la presencia de puentes disulfuro.

- Estereoselectividad : El lugar de unión de baja afinidad a nivel mitocondrial no muestra estereoselectividad ni tampoco la glicoproteína P. En cambio, el transportador de nucleósidos y la calmodulina dependiente de AMPc muestran una estereoselectividad para los derivados del nimodipino.

- Influencia de nucleótidos y nucleosidos: El lugar de unión para las dihidropiridinas a nivel mitocondrial es inhibido alostéricamente por nucleótidos, siendo el ATP el que presenta una mayor afinidad, aunque dentro de un rango micromolar (Zerning y col. 1988).

3.4.-Benzodiacepinas y canal de calcio.

3.4.1.-Benzodiacepinas centrales y canal de calcio.

Se ha sugerido que el diazepam debido a sus acciones a nivel micromolar sobre el aparato cardiovascular, incluyendo sus efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos, vasodilatadores y antiarrítmicos, realizaría estos efectos a

través de un canal de calcio.

Estas acciones no se limitarían sólo a nivel del sistema cardiovascular ya que algunos estudios muestran que las benzodiazepinas a concentraciones micromolares inhiben el uptake del Ca^{2+} en sinaptosomas (Ferrendelli y col 1982). Por su parte, el midazolam tiene un comportamiento a concentraciones micromolares como antagonista del calcio inhibiendo la respuesta contráctil al añadir calcio al medio en el musculo liso de traquea (Raeburn y col. 1988).

3.4.2.-Benzodiazepinas periféricas y canal de calcio.

Parece que existe una relación entre el receptor benzodiazepínico periférico y las dihidropiridinas ya que estudios realizados por Cantor 1984 y col. en corazón, riñón y cerebro de rata muestran que el [^3H]-Ro 5-4864 es desplazado competitivamente de sus lugares de unión por nitrendipino y nifedipino a concentraciones micromolares. En cambio, la unión del [^3H]-clonazepam y [^3H]-flunitrazepam no se ven afectados por estas dihidropiridinas. Con lo cual se propone la existencia de una interacción entre el receptor ω_3 y las dihidropiridinas.

Estudios realizados en corazón de cobaya (Mestre y col. 1984) muestran que tanto el Ro 5-4864 como el PK 11195 disminuyen la fuerza contráctil del corazón. Estas acciones se realizan a través de los canales de calcio voltaje-dependientes, ya que, el PK 11195 inhibió los efectos del BAY K8644 que activa dichos canales (compuesto análogo a la nitrendipina que actúa incrementando la conductividad de los canales de calcio voltage-dependientes) y no inhibió los efectos de la histamina y el isoproterenol que activan indirectamente los canales de calcio voltaje-dependientes (Mestre y col. 1986).

Por otro lado, hay una relación entre los antagonistas del calcio y las benzodiazepinas a nivel periférico, ya que, los efectos de los antagonistas del calcio verapamilo y nitrendipino sobre el corazón de cobaya pudieron ser inhibidos por el PK 11195. Mestre y col. proponen una clasificación de los agen-

tes que actúan a nivel del canal de calcio voltaje-dependiente:

- Por un lado el BAY K8644, el cual incrementa el flujo de calcio.
- Agonistas inversos como son los bloqueantes del canal de calcio (verapamilo, nitrendipino y diltiazem), así como Ro 5-4864, el cual actúa disminuyendo el flujo de calcio.
- El PK 11195, el cual no tiene ningún efecto sobre la conductancia del canal por sí mismo, pero bloquea los efectos de los agonistas y agonistas inversos es considerado por estos autores como un antagonista verdadero de este receptor.

Sin embargo, esta clasificación implicaría la interacción de los ligandos en un sitio común y la situación real es más complicada. Posiblemente puedan haber interacciones alostéricas, ya que no presentan el mismo lugar de unión.

El canal de calcio voltaje-dependiente formaría parte de un complejo macromolecular, donde existirían tres conformaciones diferentes en equilibrio termodinámico: el estado de reposo, un estado activado y un estado inactivado.

Agentes como el BAY K8644 estabilizarían el estado activado y agentes como los antagonistas del calcio estabilizarían el estado inactivado. Otros bloqueadores del canal del calcio como el verapamilo, podrían actuar disminuyendo la velocidad de recuperación del estado de reposo.

El mecanismo de acción de las benzodiazepinas periféricas como Ro 5-4864 sería más tardío, ya que su efecto no es dependiente de la apertura del canal. Por último el PK 11195, actuaría sobre el estado de reposo.

Se ha podido aislar por métodos cromatográficos el lugar de unión de las dihidropiridinas y el de unión de las benzodiazepinas periféricas demostrándose de este modo, que estos lugares de unión constituyen moléculas diferentes. Así se identifica una proteína con un peso de 650 KD para el lugar de unión para

las dihidropiridinas y otra de 23 KD para las benzodiazepinas (Doble y col. 1985). Aunque los dos sitios de unión son distintos pueden representar distintas subunidades de un complejo macromolecular responsable de la apertura de los canales de calcio.

4.-UPTAKE DE ADENOSINA

A nivel del sistema nervioso central ha adquirido un gran interés el papel que puede desempeñar la adenosina como neuromodulador de funciones tales como, la participación en la calidad del sueño, disminución de las convulsiones y prevenir el daño secundario del SNC debido a hipoxia o bien a una isquemia cerebral. Se ha de diferenciar entre el termino "uptake" de adenosina, que incluye el transporte de adenosina y su metabolismo dentro de la célula y el termino "transporte de adenosina" que se define como el transferencia de sustrato a través de la membrana celular en cada una de las direcciones.

4.1.-Inhibición del uptake de adenosina.

- Inhibición por vasodilatadores coronarios:

Dipiridamol, papaverina, y hexobendina han sido utilizados para el estudio de la inhibición del transporte de adenosina y del uptake de adenosina en diversos tejidos.

Bender demostró en 1980 que el dipiridamol inhibe el uptake de la adenosina en sinaptosomas a tiempos de incubacion largos (15 min) de manera no competitiva, mientras que a tiempos cortos de incubación (30 s) el dipiridamol inhibe el uptake de adenosina de manera competitiva en sinaptosomas del cerebro de rata. No se conoce la causa de tales diferencias, pero puede ser debido a la existencia de más de un sitio de acción para el dipiridamol.

Plagamann y Richey en 1974, concluyen que el dipiridamol provoca una disminución de la velocidad máxima del transporte de nucleósidos afectando el movimiento del carrrier. El dipiridimol actúa en un lugar específico del carrrier, porque puede inhibir competitivamente la unión de [³H]-nitrobenclitioinosina al mismo.

La papaverina es un inhibidor del uptake de la adenosina en preparaciones de sinaptosomas durante periodos de tiempo cortos (30 s). Por su parte, la hexobendina es un inhibidor competitivo en sinaptosomas en periodos de tiempo cortos (30 s). Sin embargo, a tiempos de incubación largo (15 min) se comporta como un inhibidor no competitivo.

- Inhibición por ansiolíticos

Los compuestos más importantes de este grupo que actúan inhibiendo el uptake de la adenosina, son las benzodiazepinas. Esta acción de las benzodiazepinas como inhibidores del uptake de la adenosina puede ser un factor importante que contribuya a las acciones centrales de estos fármacos.

Wu y col. en 1981, demuestran una interacción entre los lugares de unión de las benzodiazepinas y los inhibidores del uptake de la adenosina, mostrando, dipiridamol, hexobendina, papaverina y nitrobenziltioguanosina una inhibición competitiva de la unión de [^3H]-diazepam.

La unión del [^3H]-diazepam a nivel central, se ve afectada por las purinas. Entre estos compuestos el que presenta la mayor afinidad es 1-Metilisoguanosina (Davies y col. 1980).

En eritrocitos de rata se ha descrito, una interacción entre el sistema transportador de nucleósidos y las benzodiazepinas, tanto periféricas como centrales. El Ro 5-4864 es la benzodiazepina con más afinidad por el transportador aunque su afinidad es del orden micromolar. Asimismo, el Ro 5-4864 desplaza la unión de [^3H]-nitrobenziltioinosina en eritrocitos humanos a concentraciones micromolares. Las benzodiazepinas que actúan a nivel central también inhiben la unión de dicho radioligando, siendo el flunitrazepam el que presenta la mayor capacidad de desplazamiento (Hammond y col. 1981). De este modo se puede concluir que existe un mecanismo de transporte de nucleósidos por el cual las benzodiazepinas tienen baja afinidad, mientras que fármacos como el dipiridamol tienen una alta afinidad (Hammond y col. 1983).

-Inhibición por fármacos antidepresivos.

Los antidepresivos tricíclicos y los no tricíclicos inhiben ambos el uptake de la adenosina en sinaptosomas de cerebro de rata. Entre los antidepresivos tricíclicos más potentes se encuentra la nortriptilina con una CI_{20} del orden de $0.8 \mu\text{M}$. La clomipramina tiene un valor de CI_{20} de $26 \mu\text{M}$. Los antidepresivos no tricíclicos son inhibidores muy débiles del uptake como es el caso de la vilosacina con un valor de 0.1 mM .

-Inhibición por esteroides:

Se ha relacionado la acción anestésica que tienen algunos esteroides con la capacidad que presentan de inhibir el uptake de la adenosina. El acetato de dexametasona, la progesterona, $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ y el $17\text{-}\alpha\text{-etinilestradiol}$ inhiben el uptake de la adenosina a un rango de valores de CI_{20} entre $4.8 \mu\text{M}$ y $6 \mu\text{M}$, siendo esta inhibición de tipo competitivo. La causa por la cual estos fármacos actúan sobre el uptake de la adenosina es desconocida, posiblemente sea debido a un mecanismo inespecífico o al hecho de que la inhibición de la adenosina kinasa por parte de los esteroides reduciría la velocidad de uptake de la adenosina.

5.- EL TRANSPORTADOR ATP/ADP MITOCONDRIAL

5.1.-Localización metabólica.

La mitocondria abastece al citosol de ATP, el cual es consumido por las células eucariotas en los procesos dependientes de energía. La síntesis mitocondrial de ATP se realiza en la matriz mitocondrial la cual está separada del citosol por la membrana interna. Debido a que esta membrana es impermeable a metabolitos hidrofílicos, la transferencia de ATP al citosol y el retorno como ADP al espacio mitocondrial interno (matriz) requiere un sistema especial de transporte. Un transportador específico para ADP/ATP ha sido caracterizado (Klingenberg y col. 1966) en mitocondria y cumple los requisitos de suministro de ATP al citosol siendo pues, el único camino de salida de energía producido en la membrana interna mitocondrial.

Otros nucleótidos tales como AMP, GTP, GDP están conectados al sistema ADP/ATP por reacciones de transferencia de grupos fosfato en ambos compartimientos. Sin embargo, estos nucleótidos no pueden comunicarse directamente a través de la membrana interna mitocondrial debido a que no existe un sistema de transporte para ellos ya que el carrier ADP/ATP es altamente específico y no reconoce estos nucleótidos.

Una de las diferencias básicas entre la membrana mitocondrial externa y la interna es su diferencia respecto a la permeabilidad. La membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas que pueden llegar hasta un peso molecular de 4000 hecho de que la membrana externa sea muy permeable implica que las concentraciones de ATP, ADP y AMP que se encuentran entre el espacio de las dos membranas sean proporcionales a las concentraciones citoplasmáticas de dichos nucleótidos, mientras que en el espacio matricial, la concentración de nucleótidos de adenina son totalmente independientes sus concentraciones exógenas. Se ha

demostrado que la reserva de nucleótidos de adenina a nivel de la matriz mitocondrial es un paso intermedio obligado para la formación de ATP que será transportado hacia el exterior (Klingenberg y col. 1970).

5.2.-Inhibidores del carrier ADP/ATP

La naturaleza ha distinguido al carrier ADP/ATP desarrollando inhibidores específicos y efectivos, los cuales debido a su papel clave en el transporte del ADP/ATP los hace muy útiles en el estudio del compartimento intracelular. Hay esencialmente dos grupos de inhibidores: glucósidos originarios de plantas con un grupo atractilogenina como es el atractilósido y bongkrekato y sus isómeros, obtenidos a partir de bacterias. El atractilósido descubierto a partir de su efecto tóxico, fue clasificado como un inhibidor de la fosforilación oxidativa (Bruni y col. 1962). Los dos grupos de inhibidores se distinguen por su muy alta especificidad por el transportador.

Entre los derivados de la atractilogenina, el carboxiatractilósido es el inhibidor más potente con una constante de afinidad de $10^{-9}M$, presentando una unión de tipo prácticamente irreversible. El atractilósido presenta una menor afinidad por el carrier siendo su constante de afinidad de $10^{-7}M$ y su unión es parcialmente competitiva frente al ADP y ATP. Los derivados del ácido glucurónico encontrados en *Coffea arabica* son mucho menos efectivos $K_D=10^{-4}$ a 10^{-3} y presentan una inhibición de tipo competitivo. El Bongkkrekato es también un inhibidor competitivo del carrier ADP/ATP.

Los derivados del acil-CoA actúan también inhibiendo el transportador ADP/ATP. Parece ser que esta actuación es mediante un mecanismo inespecífico. También el CoA por si mismo y el análogo NADPH son inhibidores débiles del transportador. Cabe destacar que los inhibidores del carrier tienen en común la

presencia en su estructura de tres a cuatro cargas negativas. Este requerimiento es el mismo para los sustratos ADP^{3-} y ATP^{4-} y probablemente por esta razón AMP^{2-} no es un sustrato del carrier.

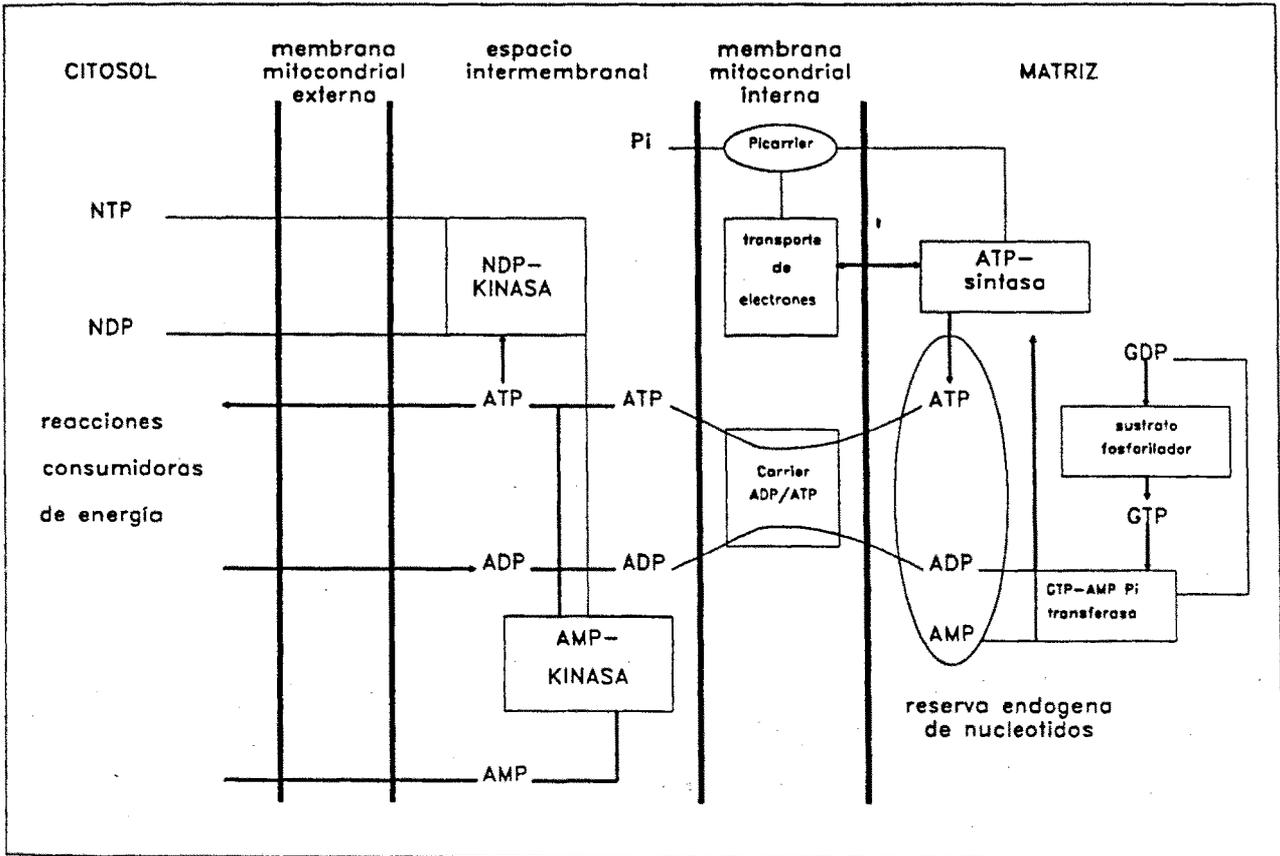


Figura 6.-Esquema de los movimientos de los nucleótidos de adenina (ATP-ADP) a nivel mitocondrial. (Klingenberg, M. 1985).

5.3.-Cinética del transportador.

La caracterización de la cinética del transportador ha sido difícil debido a su elevada actividad y a la baja reserva de nucleótidos que hay en el interior de la mi-

tocondria. Estos dos factores hacen que la vida de equilibrio del transportador sea extraordinariamente rápida.

El intercambio de nucleótidos que lleva a cabo el transportador entre el espacio extra e intramitocondrial corresponde a una relación 1:1. Como puede observarse en la gráfica las curvas que se obtienen son iguales pero inversas (Klingenberg y col. 1967). Cabría esperar que la cinética de intercambio fuera de primer orden si el pool endógeno de nucleótidos reaccionara en conjunto de forma homogénea. Sin embargo, si las velocidades de salida para el AMP, ADP y ATP fueran diferentes, la cinética no sería homogénea. Así, se ha comprobado que el AMP es inactivo también en este proceso de salida. Además, la cinética mostrada por el ADP y ATP endógenos son rápidas con lo cual se obtiene una cinética aproximadamente de primer orden.

La alta especificidad del carrier ADP/ATP queda demostrada por la exclusión del AMP del transporte. También se ha observado que otros nucleótidos con bases diferentes son virtualmente inactivos. Los nucleótidos derivados de la adenina y que presentan una desoxiribosa, así como análogos en el grupo fosfato como son el AMP-PNP y AMP-PCP presentan una cierta especificidad aunque es notablemente inferior a la del ADP-ATP.

La exclusión del AMP del transporte indicaría la existencia de una adenilato kinasa perimitocondrial (Plaffy col. 1965). La existencia en la matriz mitocondrial de una GTP-AMP-Pi transferasa que está acoplada a un sistema de fosforilación de sustratos es importante en la conversión del AMP a ADP a nivel intramitocondrial.

El carrier ADP/ATP es dependiente de la temperatura. La velocidad de traslocación se incrementa más de 40 veces al incrementar la temperatura de 0-30°C. Ello indica la necesidad de una energía de activación elevada que puede

explicarse desde el punto de vista de la existencia de una interacción proteico-lipídica en el proceso de traslocación ADP-ATP.

5.4.-Caracterización del transportador

Está admitido que el carrier es una proteína, debido a que sólo un péptido de peso molecular elevado puede tener la especificidad que tiene el centro activo para moléculas tan grandes como son el ADP y el ATP. Tanto el ADP como el ATP presentan lugares de unión a nivel mitocondrial distintos a los del carrier ADP/ATP. Luego, sólo la porción ADP o de ATP que se une a la membrana mitocondrial y que puede ser desplazada por el atractilósido se considera que es la unida al carrier. Los estudios de afinidad con radioligandos han revelado la existencia de dos lugares de unión para el atractilósido, un 20-30% de alta afinidad y el resto con baja afinidad. Estos resultados fueron interpretados como el reflejo de la orientación del carrier, ya sea hacia dentro o hacia fuera de la membrana interna mitocondrial. Otra posible interpretación, estaría basada en la existencia de dos familias de sitios cada uno con alta y baja afinidad para el ADP, debido posiblemente a diferencias del resultado de la alteración de la estructura de la membrana.

El bongkrekato, sorprendentemente, no desplaza al ADP de sus lugares de unión, incluso incrementa la unión del ADP al carrier. Bajo estas circunstancias, se ha definido la porción del carrier como la diferencia entre la unión del ADP más bongkrekato menos la porción no desplazada por el atractilósido. Esta diferencia muestra claramente que el bongkrekato incrementa aparentemente la afinidad del ADP por los sitios del carrier. Bajo la influencia del bongkrekato, el ADP parece ser que se une casi irreversiblemente, por que no puede ser desplazado por un exceso de ADP ni por el atractilósido. Esto explicaría el efecto inhibitor del

bongkrekato sobre el transporte de ADP, ya que parece ser que previene la disociación del ADP de la membrana.

La unión de [³⁵S]-ATR y [³⁵S]-CAT presenta notables diferencias. Así la afinidad del CAT es mucho mayor que la del ATR. La vida media de disociación del ATR es de 4 minutos mientras que el CAT presenta una vida media de disociación superior a los 400 min. La constante de disociación para el CAT es 100 veces más pequeña que para el ATR.

5.5.-Mecanismo de reorientación: transición del estado "c" y "m".

El transportador puede reorientarse en dos posiciones, una por la cara interna y otra por la cara externa de la membrana mitocondrial y cada una de estas orientaciones comportará una conformación propia (Erdet y col. 1972; Klingenberg y col. 1973). El transportador presenta tanto para los sustratos, ADP y ATP como para los inhibidores un sólo lugar de unión. Dentro del proceso de translocación, este sitio puede estar abierto por la cara externa o bien por la cara interna de la membrana mitocondrial. La transición entre los dos sitios sólo es posible cuando el lugar del carrier está ocupado por ADP o ATP.

Mientras que los sustratos pueden unirse al transportador por los dos lados, los inhibidores solamente lo pueden hacer en un estado. Así CAT y ATR se unen al transportador por la cara externa, mientras que el bongkrekato se une a la cara interna.

Si no añadimos al medio ADP, la unión del CAT y del ATR está favorecida debido a que el transportador extrae moléculas de ADP y, ATP de las reservas endógenas de nucleótidos de adenina y de este modo, la orientación mayoritaria será hacia la cara externa de la mitocondria. En presencia de ADP o ATP la unión

del bongkrekatato está favorecida debido a que reorienta de otra manera los lugares vacíos de la cara interna mitocondrial. De este modo se ha denominado a la orientación hacia la cara externa del carrier como "c" (citosol) y a la interna como "m" matriz.

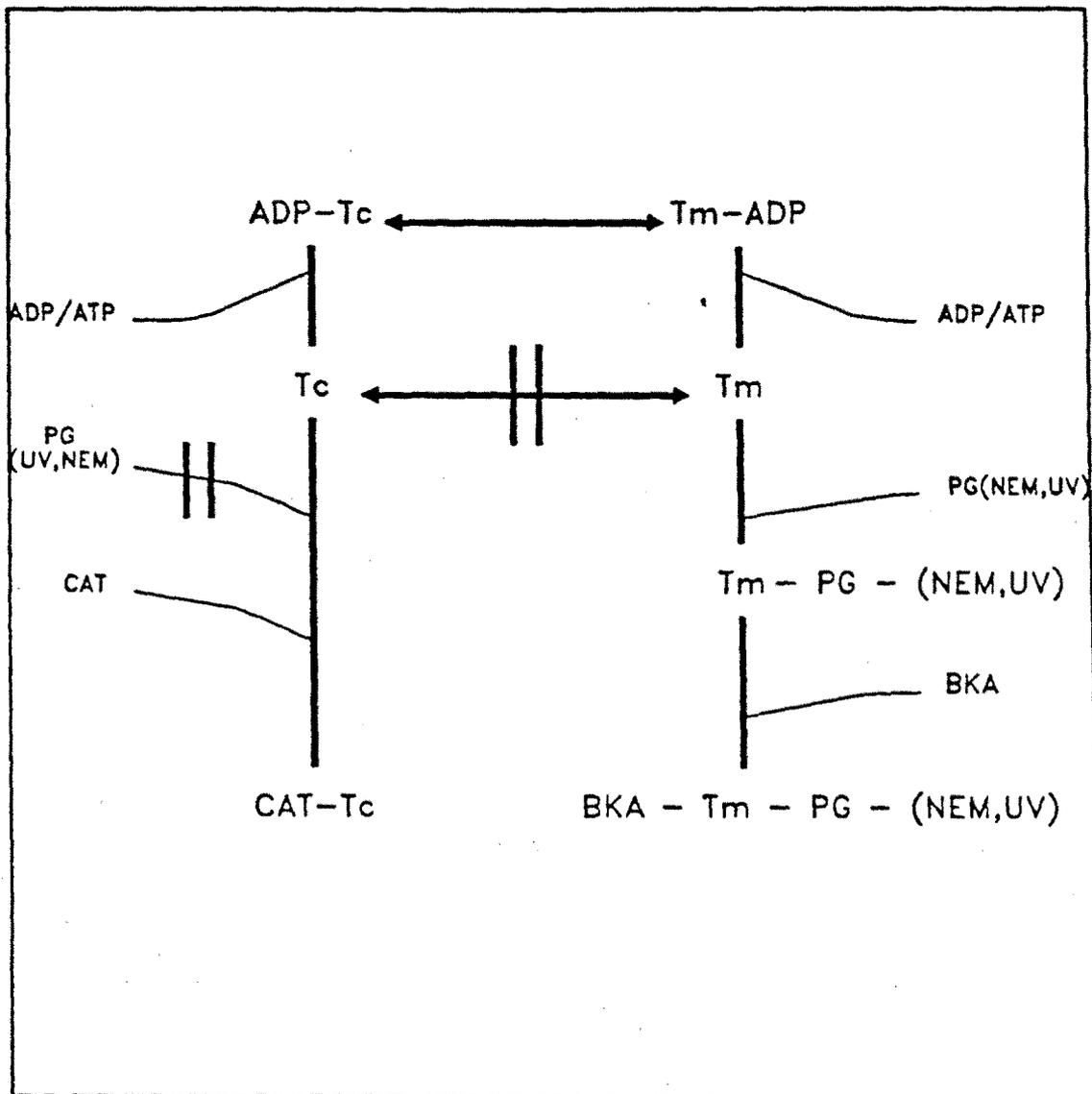


Figura 7.-Representación de la transición entre el estado "c" y "m" del transportador y la interacción con los diferentes ligandos del transportador ADP/ATP mitocondrial (Klingenberg M., 1985).

II.-PARTE EXPERIMENTAL

6.-MATERIAL Y METODOS

6.1- Obtención del conducto deferente, próstata, vesícula seminal y testículos de rata.

Los animales de laboratorio utilizados han sido ratas Sprague-Dawley macho adultas, de 250-275 gramos de peso (C.E.R.J., Le Genest Francia). Los animales fueron estabulados en condiciones estándar de temperatura ($22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (8 A.M. a 8 P.M.) con libre acceso al pienso (Letica IPM-R20) y al agua de bebida. Las ratas se sometieron a 24 horas de ayuno antes de realizar cada ensayo.

Los animales se sacrificaron mediante traumatismo craneal y posterior desanguiación por arterotomía carotídea. Seguidamente se coloca el animal sacrificado sobre una mesa quirúrgica donde se practica una laparatomía media, que pone al descubierto el paquete intestinal. Se extraen posteriormente los tejidos para el estudio depositándolos en placas de Petri que contienen tampón Tris-sacarosa a pH 7,4. Se limpian posteriormente los tejidos separando el tejido conectivo y los vasos sanguíneos. En el caso de la vesícula seminal se vacía el contenido de semen. A continuación, se trocean los órganos para facilitar su homogenización en el Polytron manteniéndoles a una temperatura de $0-4^{\circ}\text{C}$.

6.2.-Obtención de próstatas humanas

Las muestras han sido obtenidas a partir de intervenciones quirúrgicas practicadas en pacientes afectados de adenoma de próstata mediante resección transuretral. Los fragmentos fueron congelados en nitrógeno líquido (-190°C) y seccionados en un criostato a -22°C). El diagnóstico fué establecido por el método

de Rosai (1989).

6.3-Obtención del extracto mitocondrial

Al órgano troceado y pesado, se le añade tampón Tris-sacarosa pH 7,4 en proporción 1:10 (p/v). La homogenización se lleva a cabo en un Politron durante 20 s. a velocidad máxima. El homogenizado se distribuye en tubos de centrifuga que se someten a un proceso de centrifugación de 3000 rpm durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido mediante este proceso, se centrifuga a 8000 rpm durante 10 min más. El pellet obtenido se resuspende en el mismo volumen de tampón Tris-Sacarosa y se vuelve a centrifugar durante 10 min a 8000 rpm. El pellet así obtenido es la preparación cruda mitocondrial. Dicho pellet se mantuvo siempre entre 0-4°C para evitar su degradación antes de realizar el ensayo de determinación de la concentración proteica.

6.4.-Determinación proteica: método de Bradford.

El método de cuantificación proteica introducido por Bradford en 1975 tiene la ventaja de ser rápido y muy sensible, ya que permite la detección de cantidades de proteína en el orden de microgramos. Este método se fundamenta en la utilización de un colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 que se une a la proteína al cabo de dos minutos.

El complejo formado por el colorante y la proteína provoca un cambio del máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm.

La lectura de las muestras se realiza a una longitud de onda de 595 nm. A diferencia de otros métodos como el de Lowry, no se producen interferencias

debidas a iones como el potasio y el magnesio, EDTA y glúcidos. Se observa pues, la ventaja sobre la interferencia de compuestos salvo una serie de detergentes como el Triton X 100 y detergentes comerciales que interfieren en la determinación mediante la alteración del color del medio falseando los resultados.

6.5.-Descripción del ensayo

Para realizar la determinación proteica es necesario elaborar una recta patrón con seroalbumina bovina al 0.025% p/v. Cada dilución proteica, en un volumen final de 50 μ l contiene 2, 4, 6, 8, 10 μ g de proteína por ml y 1 ml de solución colorante. Asimismo se prepara un blanco que contiene 0.1 ml de solución Tris-ClH pH 7,4 y 2 ml de solución colorante.

A partir del pellet redisuelto en 0.5 ml de tampón, se hace una primera dilución 1:10 con tampón Tris-ClH pH 7.4 y de cada disolución se hacen tres más, 1:5. Al cabo de 15 min. de añadir el colorante Bradford, se realiza la medida de la absorbancia en un espectofotómetro Shimadzu UV-1203 a 595 nm. Los valores de la concentración proteica del pellet se obtienen interpolando las diferentes absorbancias en la recta de regresión obtenida a partir de las diferentes diluciones de seroalbumina bovina. Tras la determinación proteica, los tubos que contienen las suspensiones proteicas se almacenan a -30°C hasta su utilización en los ensayos de unión.

6.6.-Preparación de tampones

Para la realización de los ensayos de unión es necesario trabajar en un pH entre 7 y 8 ya que es el rango fisiológico. El agente tamponante más utilizado en este tipo de ensayos es el tampón Tris-ClH (hidrocloruro de Tris(hidroximetil)-

aminometano a la concentración de 1 M. A partir de esta disolución se preparan dos tipos de tampones:

Tampón Tris-HCl 50 mM:

Se utiliza para la incubación del fármaco marcado con la proteína y en las diluciones de los fármacos desplazantes. Su composición es:

- Tris-HCl 1M	_____	50 ml
- NaOH 1N	_____	c.s.p. pH 7.4
- H ₂ O destilada	_____	c.s.p 1l.

Tampón Tris-HCl (sacarosa 250 mM):

Se utiliza en la obtención de la preparación mitocondrial, para mantener las condiciones más idóneas para el órgano, una vez se haya extraído del animal de experimentación y para la centrifugación del órgano una vez troceado. La composición es la siguiente:

-Tris-HCl 1 M	_____	0.5 ml
-Sacarosa	_____	8.55 g
-NaOH	_____	c.s.p pH 7.4
-H ₂ O	_____	c.s.p 100 ml.

Solución de polietilenimina al 1% v/v:

Es necesario efectuar un tratamiento previo de los filtros con una solución de polietilenimina para disminuir la unión inespecífica como se explicará posteriormente.

-Polietilenimina 50%	_____	1 ml
- H ₂ O destilada	_____	q.s.p. 100 ml.

6.7.-Condiciones generales para determinar la unión de un ligando a un receptor.

Para caracterizar un receptor es necesario, aparte de utilizar un ligando específico para dicho receptor, mantener unas condiciones específicas de temperatura, pH, concentración proteica tiempo de incubación, para de este modo obtener la máxima unión específica. La unión específica es aquella que se establece entre el ligando y el receptor, y es imposible de determinar directamente ya que también existe una unión inespecífica debido a la liposolubilidad del ligando que se une por ejemplo a otros lugares distintos del receptor en el tejido, la atracción de cargas entre el ligando y lugares distintos del receptor e incluso al ligando que se adsorbe en el filtro. La característica fundamental de la unión inespecífica es que incrementa linealmente en función del incremento de la concentración de fármaco marcado, ya que no llega a saturarse. La unión específica se obtiene por diferencia entre la unión total sustrayéndole la unión inespecífica:

UNION ESPECIFICA = UNION TOTAL - UNION INESPECIFICA

La unión inespecífica se obtiene incubando el ligando con la proteína y además con un exceso de un ligando frío que puede ser el mismo que utilizamos radiactivo o uno distinto que presente una afinidad nanomolar para el receptor. La concentración del fármaco frío suele ser de 100 veces mayor que la K_D del ligando marcado. Al haber una concentración saturante de ligando frío y, al ser el proceso de unión de un ligando a su receptor un proceso dinámico competirán el ligando marcado y el frío por la misma población de receptores y se saturarán todos los receptores por el ligando frío. De este modo el ligando marcado sólo se unirá de forma significativa a los lugares inespecíficos.

Para caracterizar completamente un receptor es necesario realizar cuatro tipos de ensayos: ensayos de saturación, ensayos cinéticos de asociación, ensayos cinéticos de disociación y estudios de competición. Los ensayos de saturación nos permiten determinar la densidad de receptores en un tejido (B_{max}) y la afinidad del radioligando por el receptor que se expresa mediante la K_D . Los estudios cinéticos de asociación nos permiten determinar el tiempo necesario para que el radioligando se una al receptor y llegue al equilibrio termodinámico y determinamos también la constante de asociación k_1 . Los estudios cinéticos de disociación nos proporcionan el valor de la constante de disociación k_{-1} . Mediante el cociente de la constante de disociación y la constante de asociación se obtiene la K_D que tiene que ser del mismo orden que la hallada por los estudios de saturación. Por último, los estudios de competición nos permiten estudiar la especificidad farmacológica por fármacos del mismo grupo o estudiar otros ligandos que se unan al receptor de estudio. Este estudio permite la obtención de la K_I que es una medida de la afinidad del ligando frío por el receptor o bien la CI_{50} que es la concentración de ligando frío que desplaza la 50% del radioligando unido específicamente al receptor.

6.8.-Condiciones del ensayo

- Tiempo de incubación:

Para los estudios de saturación y de competición el tiempo de incubación ha de ser el suficiente para llegar al equilibrio entre el radioligando y el receptor. Cabe destacar que el tiempo en que se tarda en conseguir el estado de equilibrio es dependiente de la concentración del radioligando, con lo cual se suelen usar bajas concentraciones de radioligando para hallar dicho tiempo necesario de incubación.



Para ello será necesario realizar un estudio de unión a diferentes tiempos y hallar el tiempo al cual se alcanza la saturación.

-Temperatura

La unión del radioligando a su receptor varía en función de la temperatura. Por ello, es necesario realizar ensayos para comprobar la temperatura más adecuada para que la unión específica sea la máxima. Mientras que algunos radioligandos necesitan temperaturas fisiológicas, otros presentan una mayor unión específica a temperaturas entre los 0-4°C. La causa por la cual se explica este hecho, podría ser una menor degradación del radioligando, una disminución de la unión inespecífica y el hecho de que algunos radioligandos tienen una mayor afinidad a bajas temperaturas.

-Regulación del pH

Generalmente el pH debería estar dentro del rango fisiológico, entre 7 y 8.

El tampón más utilizado es el Tris(hidroximetilaminometano (Tris), pero no es necesariamente el mejor. Antes de realizar un estudio sobre un receptor es necesario determinar cual es el tampón más adecuado para el ensayo.

-Presencia de iones y GTP

Cationes monovalentes como el sodio y divalentes como el magnesio se añaden algunas veces al tampón de incubación ya que pueden aumentar o disminuir la unión específica del radioligando. Del mismo modo, el GTP se añaden al tampón de incubación a concentraciones del orden $100 \mu\text{M}$. El GTP disminuye la afinidad de agonistas para el receptor que se está estudiando y puede convertir un proceso de competición bifásico en una curva monoexponencial.

6.9.-Proceso de separación del radioligando unido al receptor del radioligando libre.

Una vez el fármaco ha llegado al equilibrio y por lo tanto presenta la máxima unión al receptor, ha de separarse de alguna manera del fármaco libre. Este proceso es, tal vez, el más delicado debido a que tiene que ser muy rápido para evitar que se altere el equilibrio del radioligando unido al receptor y, de esta manera, poder obtener resultados homogéneos. La separación puede realizarse por tres técnicas:

- Separación por diálisis.
- Separación por centrifugación.
- Separación por filtración.

Todos estos métodos son válidos, pero cada uno tiene sus ventajas e

inconvenientes, de manera que la elección de cada método dependerá de las características del ensayo que se quiera realizar.

- Separación por diálisis:

La técnica es teóricamente la más idónea debido a que el equilibrio no se altera. El procedimiento consiste en dos celdas de diálisis separadas en dos cámaras de volumen conocido por una membrana de diálisis que el radioligando puede atravesar libremente pero no lo puede hacer la proteína. En una cámara se coloca la muestra a estudiar y en la otra la disolución del radioligando. El radioligando tiene tendencia a igualar las concentraciones en los dos lados de la membrana. Al llegar al equilibrio tendremos en un lado el radioligando unido al receptor más el fármaco libre y en el otro lado tendremos el radioligando libre. Debido a que la concentración de radioligando libre es la misma en ambos lados de la membrana de diálisis por diferencia se obtiene la cantidad de fármaco unido al receptor. Una ventaja de este método sería su utilización cuando el radioligando presenta una baja afinidad para el receptor. La gran desventaja sería su inoperatividad, debido a que no se pueden procesar una gran cantidad de muestras.

-Separación por centrifugación:

En este método una vez se ha llegado al equilibrio entre el radioligando y el receptor se procede a la centrifugación de la muestra. El pellet obtenido contiene el radioligando unido al receptor y en el sobrenadante quedará el radioligando libre. Uno de los problemas de este método es que el radioligando libre puede quedar retenido en el pellet y esto originará un error. Para disminuir este error se utilizan medios de alta densidad, como gradientes de sacarosa. Esta técnica se utiliza cuando la unión inespecífica es demasiado alta en los filtros, o bien cuando

la velocidad de disociación del complejo receptor radioligando es elevada.

-Separación por filtración:

Es la técnica más utilizada en los ensayos de unión de una radioligando a su receptor. Una etapa crucial en esta técnica es la separación del radioligando unido del radioligando libre.

Es importante prevenir la disociación del radioligando unido al receptor, ya que éste es el parametro que medimos. Para ello, lo que se intenta es que la separación sea lo más rápida posible utilizando la filtración al vacío a través de filtros de fibra de vidrio. El radioligando unido al receptor quedará retenido en el filtro mientras que el radioligando libre atravesará el filtro. Otro problema de esta técnica es reducir la unión del radioligando libre al filtro, para ello en este trabajo se ha tratado previamente los filtros con solución de polietilenimina 0.5% que disminuye la unión del radioligando libre debido a cargas eléctricas. También puede utilizarse albumina o gelatina. Una vez se ha retenido en el filtro el complejo radioligando-receptor se lava el filtro con solución de tampón para arrastrar de esta manera el fármaco libre. Es muy importante que el proceso de filtración sea rápido, ya que de esta manera se evitan los problemas de disociación del complejo.

Las ventajas de esta técnica son la rapidez y la posibilidad de procesar volúmenes muy grandes de muestras. El inconveniente es la reducción de la unión inespecífica a los filtros y la dificultad de utilizar esta técnica cuando el radioligando presenta una baja afinidad por el receptor.

6.10.-Técnica del centelleo líquido

Una vez tenemos el complejo radioligando-receptor retenidos en el filtro los depositamos en viales de plástico. Los radioligandos utilizados en el presente

trabajo están marcados con tritio el cual emite radiaciones β . Una manera de medir estas radiaciones es añadir al vial de plástico un volumen de líquido de centelleo (10ml.). En el vial tiene lugar la formación de fotones que se producen al interaccionar la radiación β con los disolventes orgánicos que contiene el líquido de centelleo. En un primer paso se produce la transformación de la radioactividad en radiación electromagnética. En un segundo proceso se detecta y cuantifica instrumentalmente la cantidad de fotones producidos.

-Proceso de centelleo:

Esta etapa tiene lugar dentro del vial que contiene el material radioactivo y el líquido de centelleo. La composición de este líquido se basa en el disolvente y el líquido de centelleo. Los disolventes contienen grupos aromáticos que captan la energía produciéndose ionizaciones y excitaciones de moléculas. Esta energía es transferida a las moléculas del líquido de centelleo las cuales resultan a su vez excitadas retornando a su estado inicial emitiendo una energía en forma de fotones.

La finalidad de este proceso es producir una ampliación de la cantidad de fotones que se emiten y una disminución de su energía, para que se ajuste a las características del aparato contador y a las más óptimas para cada radioisótopo.

-Proceso de detección y cuantificación:

En este proceso se transforman los fotones emitidos en el proceso anterior en impulsos eléctricos que son detectados en el aparato contador. Como la cantidad de fotones producida es directamente proporcional a la actividad existente en el vial para un radioisótopo dado, a mayor intensidad de los impulsos registrados, mayor será la cantidad del fármaco unido al receptor en la muestra. Los fotones que se originan son captados por un fotomultiplicador, que no es más que una célula fotoeléctrica, que bajo la acción de la luz desprende electrones. El proceso final es la

ampliación de la señal para el posterior tratamiento electrónico.

Un concepto muy importante es la eficiencia de contaje (E) que es la relación entre las cuentas hallados por el contador de centelleo líquido, que normalmente se expresan en cuentas por minuto (cpm) y la actividad real de la muestra que viene dado en desintegraciones por minuto (dpm), de este modo tenemos la relación:

$$E = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

En una situación ideal las cuentas por minuto detectadas por el contador tendrían que ser iguales a las desintegraciones producidas con lo cual la eficiencia sería igual a la unidad. Normalmente al afectar el contaje existen pérdidas y la eficiencia es inferior a la unidad. Para obtener el valor real de las desintegraciones hay que conocer la eficiencia de contaje del aparato. Al conjunto de fenómenos que impiden llegar al valor ideal de eficiencia se les denomina "quenching". Los tipos de quenching más frecuentes son:

Quenching por el color:

Si al poner la muestra radioactiva con el líquido de centelleo se producen coloraciones, este color absorbe fotones, que impiden que las radiaciones puedan salir del vial y por lo tanto se produce una pérdida de la eficiencia de contaje.

Quenching químico:

Este quenching lo provocan sustancias como el alcohol, bases fuertes, agua oxigenada, oxígeno y otras sustancias. Estos compuestos provocan una interferencia

en el proceso de transferencia energética de la radiación al disolvente y a las sustancias de centelleo. Se forman de este modo menos moléculas excitadas lo cual se traduce en un rendimiento mucho menor del que se tendría que obtener.

Es importante de este modo, realizar una curva de calibración de la eficiencia de conteo con el líquido de centelleo que se utilice y patrones de tritio con una actividad conocida. Con esta curva de calibración podremos saber la eficiencia en cada vial y hallar las desintegraciones que se han producido. De este modo sabremos la cantidad de radioligando unido.

6.11.-Tratamiento de los resultados

Los resultados obtenidos en dpm se introducen en un programa de ordenador que calcula las constantes y representa las diferentes gráficas. El paquete de programas utilizado ha sido el KINETIC, EBDA y LIGAND (McPherson, Munson y Rodbard, 1980).

6.12.-Validación del método.

6.12.1-Ensayos con córtex cerebral y conduto deferente de rata utilizando [³H]-Diazepam.

Para validar el método empleado para la caracterización de receptores se procedió a un estudio comparativo entre la unión específica del diazepam en dos tejidos que tengan una población de receptores muy diferentes. De este modo se comparó a una concentración determinada de radioligando el córtex cerebral de rata que presenta una elevada densidad de receptores benzodiazepínicos centrales

y por otro lado el conducto deferente de rata donde la población de receptores benzodiazepínicos centrales es inexistente.

La metodología para realizar el ensayo ha sido la siguiente: la obtención del córtex cerebral se ha realizado sacrificando a los animales por decapitación extrayéndose el cerebro de la cavidad craneana. El córtex se separa del resto del cerebro y se homogeniza en el Politron añadiendo un volumen de tampón Tris-sacarosa correspondiente a diez veces el peso del órgano. La concentración proteica se determina por el método de Bradford, diluyéndose los pellets hasta una concentración proteica de 800 mg/ml. El radioligando utilizado ha sido [³H]-Diazepam a una concentración de 3nM. Para obtener la unión inespecífica se ha utilizado diazepam frío a la concentración de 10 µM. El tiempo de incubación ha sido de 15 min.

- **Tabla 6.1.-** Resultados del ensayo comparativo entre cortex cerebral y conducto deferente de rata.

	UNION TOTAL (fentomols/mg)	UNION ESPECIFICA (fentomols./mg)	% UNION ESPECIFICA
Cortex	2267.3 ± 23.2	2110.2 ± 31.65	93
Conducto deferente	44.3 ± 1.5	-----	-----

Cada resultado es la (experiencia) de tres experiencias realizadas por separado ± E.S.M.

Como puede observarse, en este ensayo existen diferencias marcadas entre los dos tejidos. En el caso del córtex se detecta una gran cantidad de unión específica a concentraciones muy bajas debido a la existencia de una elevada población de receptores benzodiazepínicos centrales por los cuales el [³H]-Diazepam presenta una elevada afinidad. En el caso del conducto deferente, no se observa una unión específica a concentraciones tan bajas de radioligando debido a que no existen receptores benzodiazepínicos centrales y además el diazepam presenta una baja afinidad por el receptor benzodiazepínico periférico.

6.13.-Valoración de factores externos

6.13.1.-Influencia de la unión del radioligando libre al filtro

En el presente trabajo el método elegido para separar el radioligando unido al receptor del radioligando libre ha sido la filtración con ayuda del vacío. Los filtros utilizados han sido Whatman GF/B de un diámetro de 2.4 o 2.5 cm. El problema radica en que los filtros tienen unas cargas negativas y el radioligando libre podrá unirse al filtro cometiendo pues un error en la lectura. Para disminuir esta unión inespecífica provocada por el radioligando libre, se hace un pretratamiento del filtro con un polímero catiónico como es la polietilenimina. La función de este polímero es neutralizar las cargas negativas disminuyendo pues la unión del radioligando libre al filtro (Bruns y col. 1982).

Para evaluar en nuestro caso la cantidad de radioligando retenido en el filtro se realizaron ensayos consistentes en incubar el radioligando [³H]-Ro 5-4864 (actividad específica 81.3 Ci /mmol) con tampón de incubación y al cabo de un tiempo determinado se realizó la filtración a través de los filtros y posteriormente se lavaron los filtros dos veces con 4 ml de tampón de incubación. Los filtros estaban tratados con solución de polietilenimina al 0.5% . En los ensayos realizados

la cantidad de radioligando retenido en el filtro se mantuvo siempre en un valor medio del 2%.

6.13.2.-Influencia de la concentración proteica

6.13.3.-Estudios realizados con [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

Al empezar un estudio sobre la caracterización de un receptor se parte siempre de la hipótesis de la naturaleza proteica del mismo. Para demostrar este hecho es necesario realizar un estudio previo sobre la influencia de la concentración proteica en la unión del radioligando. Para realizar el ensayo se han elegido cinco concentraciones proteicas 250 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg y 25 µg con una cantidad de [³H]-Ro 5-4864 fija de 2 nM.

- **Tabla 6.2.-** Resultados obtenidos del estudio de la influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [³H]-Ro 5-4864.

µg de proteína	Unión específica (DPM)
25	630.5 ± 45.89
50	1379.9 ± 259.11
100	4295.6 ± 206.74
200	8079.0 ± 319.5
250	9239.1 ± 986.6

Cada resultado es la media de tres experimentos ± E.S.M.

La ecuación de la recta resultante del estudio fue:

$$Y = 39.64 x - 231.42$$

$$r = 0.933 (P < 0.01)$$

La conclusión a que llegamos es la existencia de una relación lineal dentro del margen estudiado, entre la cantidad de proteína en el medio de incubación y el incremento de la unión específica para el [³H]-Ro 5-4864. Esto demuestra que el receptor periférico benzodiazepínico tiene una naturaleza proteica.

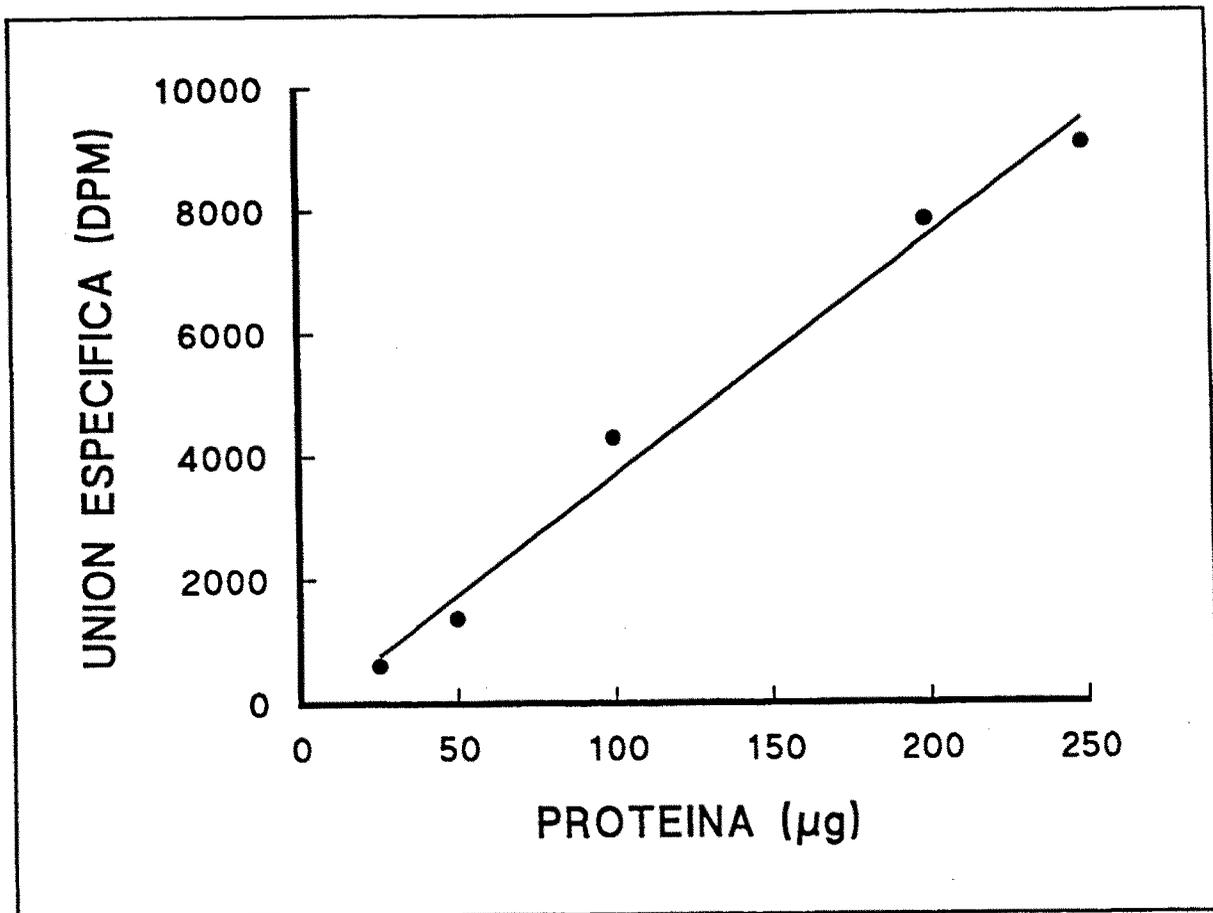


Figura 6.1.- Representación gráfica de la influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

6.13.4.-Influencia de la temperatura

La temperatura es un factor a tener en cuenta pues puede afectar la unión del radioligando a su receptor. Para aumentar la sensibilidad del método se tiene que trabajar a unas condiciones de temperatura óptimas.

Estudios previos realizados con [³H]-Diazepam, en mastocitos de rata se demuestra que la unión de dicho radioligando varía en función de la temperatura (Tanaguchi y col. 1980). Los resultados obtenidos indicaban que la temperatura óptima para obtener la máxima unión específica al receptor benzodiazepínico periférico estaría entre 0°C-4°C. Asimismo, a medida que se aumentaba la temperatura disminuía linealmente la unión del fármaco.

El ensayo ha consistido pues, en realizar un estudio en un rango de temperaturas creciente para ver como se afecta la unión del [³H]-Ro 5-4864 al receptor benzodiazepínico periférico. Las temperaturas escogidas han sido: 0°C, 10°C, 25°C y 37°C. El tiempo de incubación ha sido de 2h.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos en el estudio indican que la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 al receptor benzodiazepínico periférico varía en función de la temperatura. De este modo, se demuestra la existencia de una relación lineal entre los dos parámetros. Se confirma que entre 0°C-4°C se obtiene la máxima unión específica y que al aumentar la temperatura se produce una disminución de la unión específica.

-Tabla 6.3.- Resultados obtenidos de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 a diferentes temperaturas en conducto deferente de rata.

Temperaturas (°C)	Unión específica (DPM)
0	19221.8 ± 1914.0
10	15031.0 ± 3106.7
25	10868.5 ± 1247.3
37	5455.0 ± 295.7

Cada resultado es la media de tres experimentos ± E.S.M.

La ecuación de la recta de regresión resultante es la siguiente:

$$Y = 19566.0 - 374.8 x$$

$$r = 0.994 (P < 0.01)$$

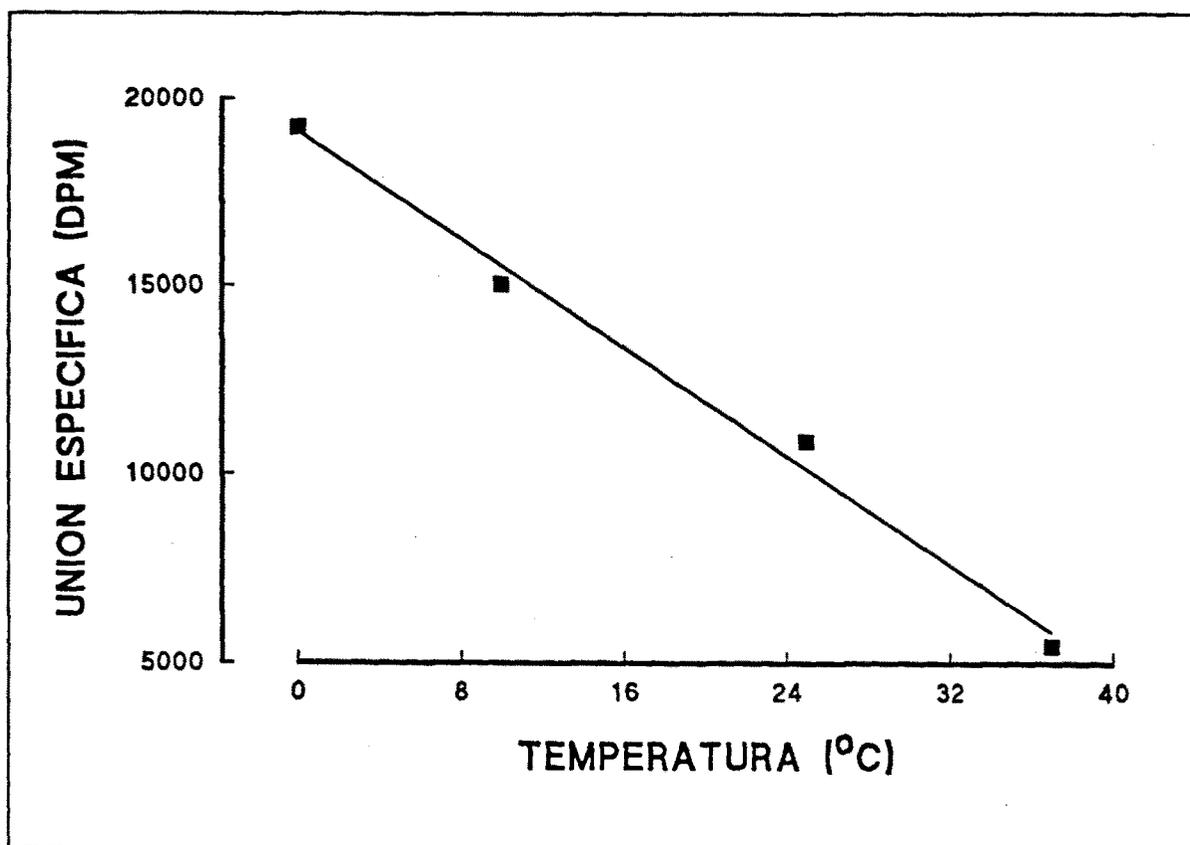


Figura 6.2.- Representación gráfica del efecto de la temperatura sobre la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

6.13.5.-Estudios realizados con [³H]-PK 11195 en prostata de rata.

6.13.6.-Influencia de la concentración proteica

Al igual que en el [³H]-Ro 5-4864 se ha realizado un estudio sobre la influencia de la concentración proteica en la unión de dicho radioligando a su receptor, tal como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 6.4.- Influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata.

µg de proteína	unión específica (DPM)
25	1795 ± 145
50	3096 ± 500
100	7126 ± 798
200	11344 ± 637
250	14455 ± 293

Cada resultado es la media de tres experimentos realizados por triplicado ± E.S.M.

La ecuación de la recta de regresión resultante es:

$$Y = 55.14 x + 670.45$$

$$r = 0.994 (P < 0.01)$$

Con lo cual se demuestra también la relación existente entre el incremento de la concentración proteica y la unión específica del [³H]-PK 11195.

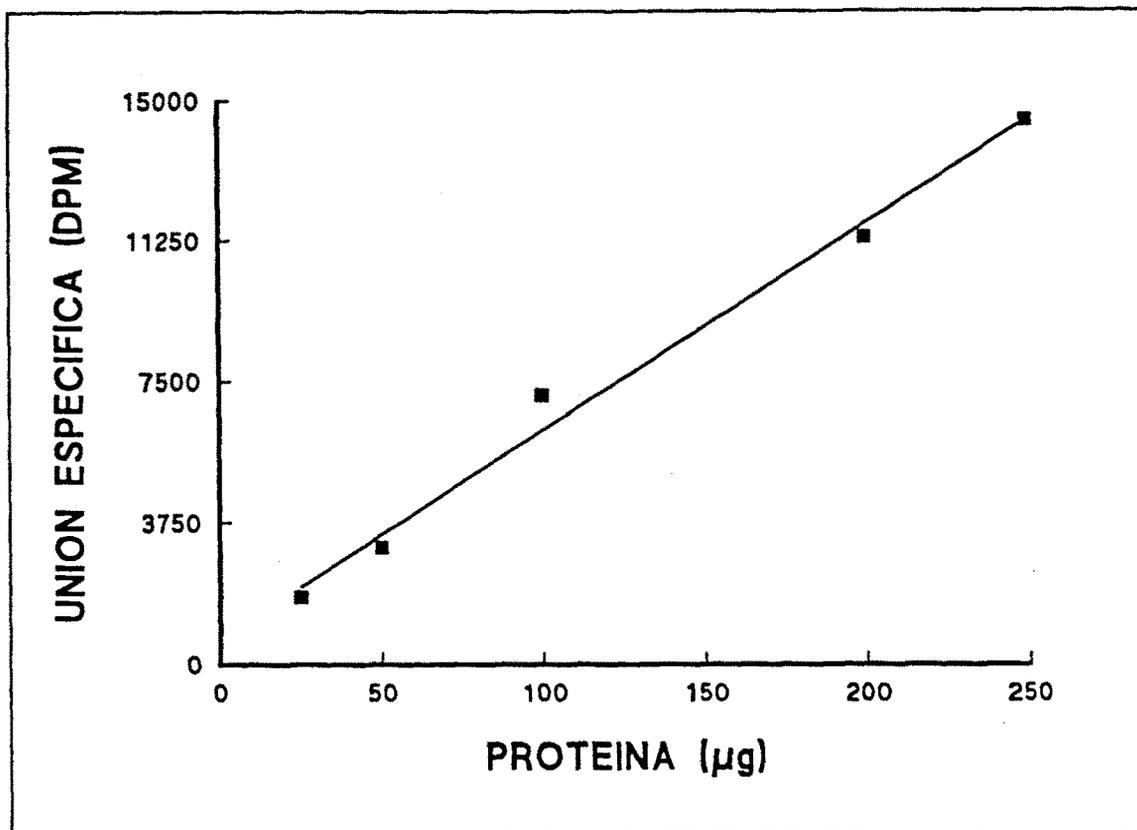


Figura 6.3.- Representación gráfica de la influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata.

6.13.7.-Influencia de la temperatura.

Se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la unión del [³H]-PK 11195. Para ello se han elegido cuatro temperaturas que como se representa en la siguiente tabla:

Tabla 6.5.- Influencia de la temperatura sobre la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata.

Temperaturas (°C)	Unión específica (DPM)
0	7561 ± 199
10	8922 ± 599
25	9590 ± 89
37	7246 ± 807

Los resultados son la media de tres experimentos ± E.S.M realizados por separado.

Como puede apreciarse, en el caso del [³H]-PK 11195 la unión específica no se ve influenciada de una manera tan patente como en el caso del [³H]-Ro 5-4864.

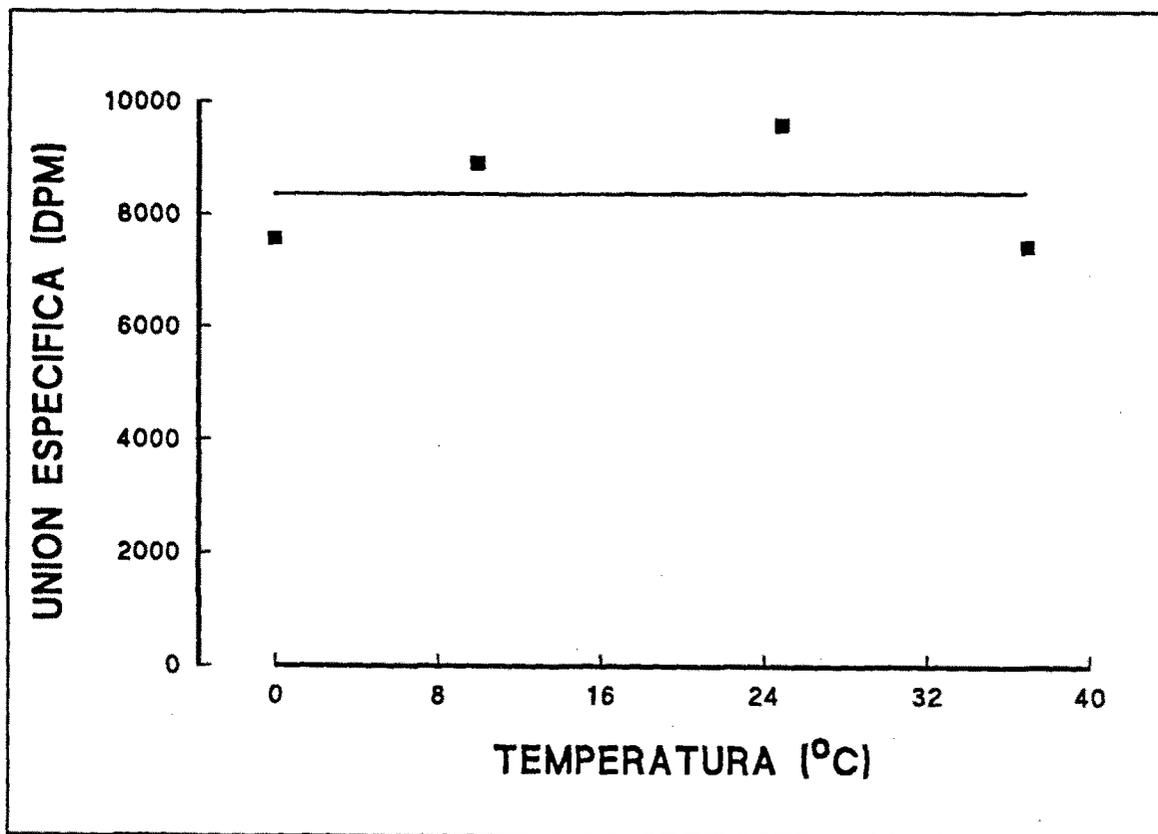


Figura 6.4.- Representación gráfica del efecto de la temperatura sobre la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata.

6.14.-Descripción de los ensayos de unión.

Incubación:

La incubación es el proceso por el que el radioligando interactúa con el receptor. Esta incubación tiene lugar entre 0-4°C de temperatura, debido a que como ya se ha indicado anteriormente a esta temperatura se obtiene la máxima unión específica. El tiempo de incubación viene dado por los estudios cinéticos de asociación, y ha sido en todos los ensayos de dos horas. Las concentraciones proteicas han sido siempre las mismas para un ensayo determinado, es decir entre 100-200 µg de proteína en los 250 µl de volumen de incubación.

La reacción se inicia al poner en contacto 125 μ l de la suspensión proteica que contiene el extracto crudo mitocondrial a la concentración de 0.8 - 1.6 mg/ml con 125 μ l de la dilución del radioligando. Una consideración importante es el manejo del radioligando, ya que se ha comprobado que el almacenamiento de diluciones del radioligando en la nevera aunque sea en períodos cortos de tiempo degrada la disolución del mismo, posiblemente sea debido al fácil intercambio del tritio con los hidrógenos del agua. Por otro lado, se recomienda el hacer diluciones del radioligando en tubos de vidrio, porque hemos comprobado que las diluciones en tubos de plástico afectan al radioligando. Vemos pues, que lo más recomendable es extraer la cantidad necesaria del radioligando a partir de la solución (normalmente etanólica) que recibimos y trabajar lo más rápidamente posible.

El tubo que contiene el medio de incubación se mantiene en el hielo hasta que han transcurrido dos horas, momento en el que paramos la reacción añadiendo 4 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y posterior filtración, en un aparato conectado en una bomba de vacío, a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B. Previamente los filtros se han tratado con solución de polietilenimina al 0.5%. El filtrado se lava dos veces con 4 ml de tampón. Una vez el filtro está seco se coloca en un vial y se añade 10 ml de cocktail de centelleo y la radioactividad presente en la muestra se lee al cabo de 24h.

Los radioligandos utilizados en el presente trabajo se han almacenado a -30°C en la misma disolución etanólica que nos proporcionó el proveedor.

6.14.1-Ensayos de saturación

En estos estudios se mantiene constante la concentración proteica y el tiempo de incubación y lo que varía es la concentración de radioligando. La cantidad del complejo radioligando-receptor se calcula en función del radioligando

libre. A partir de este ensayo se obtienen dos constantes muy importantes para la caracterización de un receptor como son la K_D , que mide la afinidad de un radioligando por su receptor y la B_{max} que nos indica la densidad de receptores en un tejido. Cuanto más pequeño sea el valor de la K_D mayor será la afinidad del radioligando por su receptor.

La ecuación matemática que relaciona la concentración del complejo radioligando receptor y la del radioligando libre es la siguiente:

$$B = \frac{B_{max} F}{(K_D + F)}$$

donde B es la cantidad de radioligando unido, B_{max} representa la cantidad máxima de radioligando unido al receptor, es decir, el número máximo de receptores y F es la cantidad de radioligando libre. Esta ecuación describe aproximadamente una hipérbola rectangular, como se puede observar en la **Figura 6.5**. Cuando la concentración de radioligando libre es igual a la K_D , la cantidad de radioligando que se ha unido al receptor es la mitad de la B_{max} . La K_D es pues, la concentración de radioligando que ocupa la mitad del número máximo de receptores.

El procedimiento consiste en preparar diluciones del radioligando a concentraciones crecientes para de esta manera poder llegar a la ocupación de todos los receptores en el tejido de estudio. Como se ha indicado anteriormente, la concentración proteica permanecerá constante y de cada concentración de radioligando se harán controles.

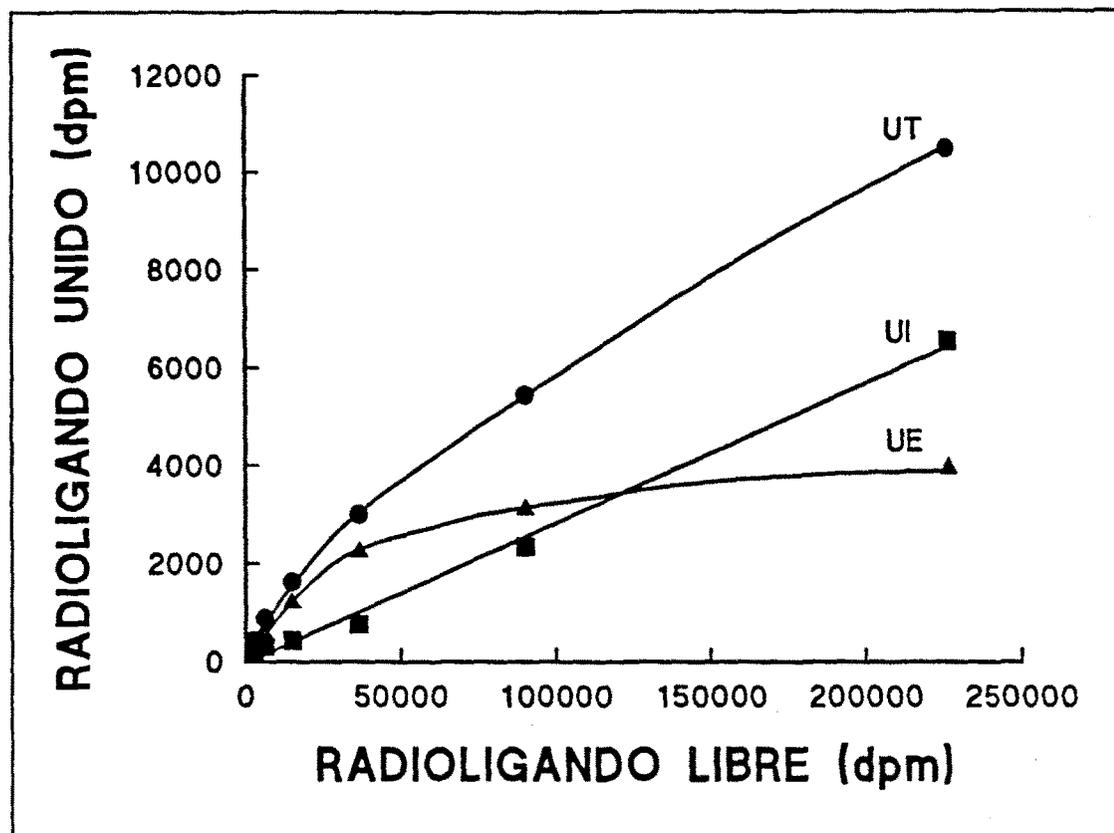


Figura 6.5.- Evolución de la unión de un radioligando a diferentes concentraciones. UT: unión total. UI: unión inespecífica. UE: unión específica.

Cuando la K_D sea demasiado elevada, ello implicará que la cantidad de radioligando a utilizar para saturar los receptores deberá ser también muy elevada. Para ello lo que se hace en las diferentes diluciones, es mantener constante la cantidad de radioligando alcanzando las concentraciones necesarias para la saturación añadiendo cantidades crecientes del reactivo frío. De esta manera haremos un banco de diluciones con el compuesto frío tal como se esquematiza en la Figura 6.6.

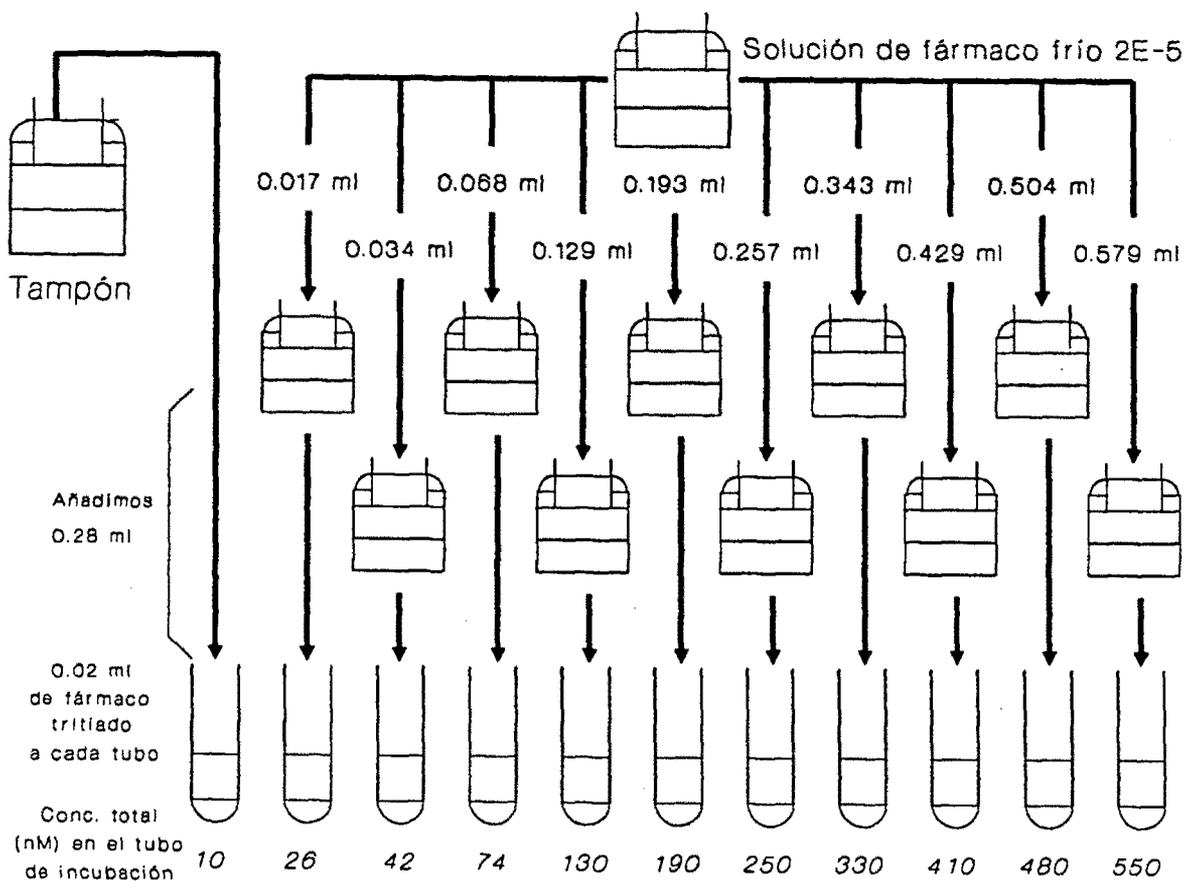


Figura 6.6.- Ejemplo de un ensayo de saturación utilizando fármaco frío en el medio de incubación.

6.14.2-Ensayos cinéticos

En este tipo de ensayo, se pretende estudiar el tiempo en que se tarda en saturar a una concentración de radioligando determinada, el número máximo de receptores. De esta manera obtendremos el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio entre el radioligando y el receptor. Asimismo, mediante este estudio

se obtiene la constante de asociación (k_{+1}) y la constante de disociación (k_{-1}).
Teniendo en cuenta que:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

los estudios cinéticos nos permiten la obtención de la K_D que tiene que ser del mismo orden que la obtenida por los estudios de saturación.

La metodología de este ensayo consiste en la preparación de los tubos de ensayo, manteniendo constante la concentración de radioligando y de proteína, y variando el tiempo de incubación de manera que se llegue al equilibrio. En nuestro caso, se ha escogido un margen de tiempos desde el minuto hasta las dos horas (1', 3', 5', 7', 10', 15', 30', 60', 90' y 120'). En cada tiempo se realiza la correspondiente unión total y unión inespecífica con una concentración de radioligando frío de $10^{-5}M$.

Una vez se ha realizado el ensayo de asociación, se ha de llevar a cabo los cálculos que nos permitan obtener la recta de regresión, la pendiente de la cual nos dará el valor de la k_{obs} . De manera alternativa, se puede calcular el logaritmo neperiano de la cantidad de radioligando unido en el equilibrio (B_e) dividido por la diferencia entre B_e y la cantidad de radioligando unido en el tiempo t (B) y la representación gráfica respecto al tiempo según la ecuación:

$$\ln B_e / B_e - B = (k_{+1} F + k_{-1}) t + k_{obs} t$$

permite obtener una recta cuya pendiente es la k_{obs} , tal como se indica en la Figura 6.7.

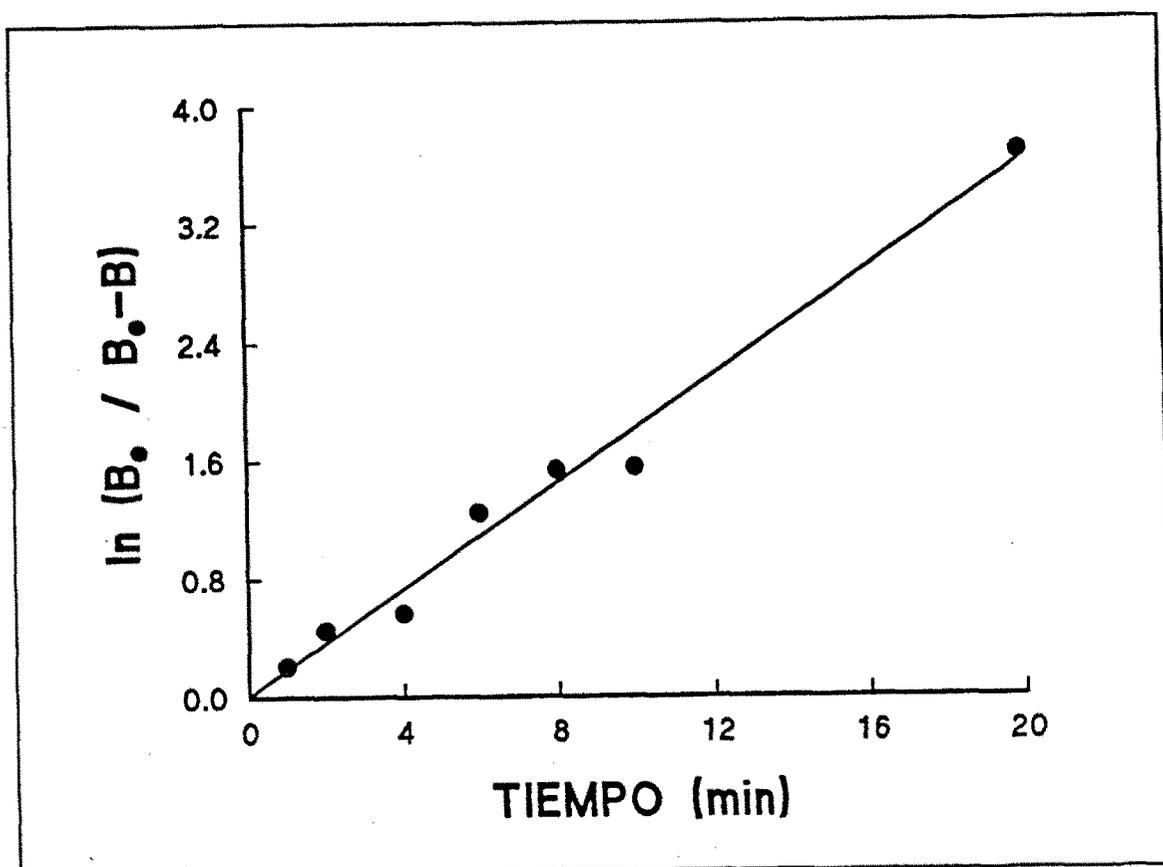


Figura 6.7.- Representación del $\ln (B_e / B_e - B)$ respecto al tiempo de incubación. El valor de la pendiente de la recta es la K_{obs} .

Otro tipo de estudio cinético es el de disociación, donde el objetivo es determinar la k_1 . De este modo se incuban los tubos de ensayo con el radioligando y la proteína el tiempo suficiente para obtener el equilibrio. Una vez conseguido, se añade una concentración de reactivo frío a cada tubo para la disociación del

complejo radioligando-receptor. Se determina la unión a diferentes tiempos después de haber añadido una concentración de reactivo frío $10^{-5}M$. La representación de la unión específica en función del tiempo nos permite obtener la curva de disociación. Por un programa de regresión no lineal puede obtenerse la k_1 . Otra manera de obtener este valor es mediante la representación del logaritmo neperiano del cociente entre la unión específica en un tiempo determinado (B) y la resultante a un tiempo cero (B_0) respecto al tiempo. La pendiente de la recta de regresión nos permite obtener la k_1 . La Figura 6.8. representa esta gráfica.

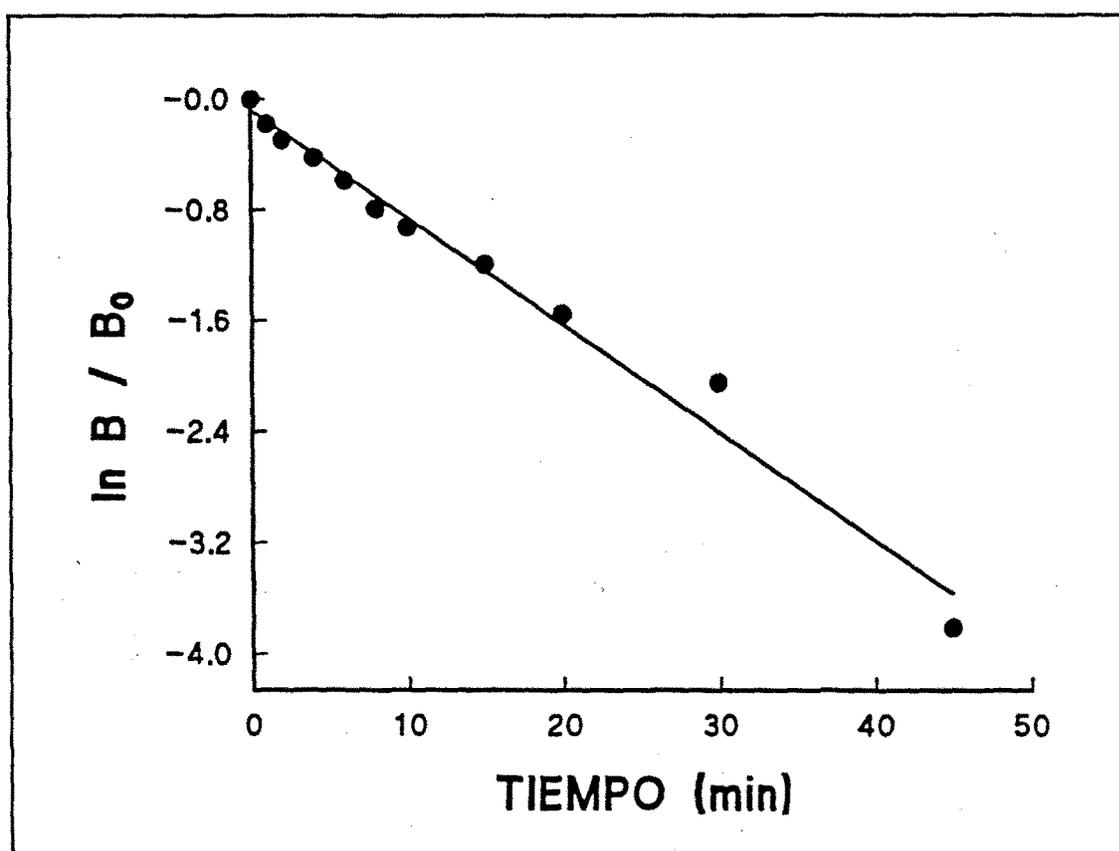


Figura 6.8.- Representación del $\ln (B / B_0)$ respecto al tiempo de disociación.

A partir del valor de k_{-1} se obtiene el valor de la vida media de disociación:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{-1}}$$

6.14.3-Ensayos de competición

En este ensayo medimos la afinidad que tiene un determinado compuesto, no radioactivo, para el receptor que estamos estudiando en función de la capacidad de competir con el radioligando por el mismo receptor. En este caso la concentración proteica y la concentración de radioligando se mantienen constantes y lo que varía es la concentración de competidor. El tiempo de incubación en nuestros ensayos ha sido de dos horas y pasado este tiempo se procede a la filtración de las muestras. A medida que se incrementa la concentración de competidor, lógicamente cabe esperar que la concentración de radioligando unido al receptor sea menor.

Los estudios de competición se realizan para demostrar una especificidad farmacológica, es decir, el fármaco (radioligando) que estamos estudiando tiene que ser desplazado de su receptor, o mejor dicho, tiene que competir por el mismo receptor con todos los fármacos del mismo grupo farmacológico.

Si representamos la unión específica frente al logaritmo de la concentración del competidor obtendremos una curva sigmoidea, tal como se representa en la **Figura 6.9.**, en el caso de la existencia de un sólo lugar de unión. La ecuación que relaciona la concentración de radioligando unido con la concentración de fármaco desplazante es la siguiente:

$$B = \frac{B_{\max} F}{F + K_D (1 + I / K_i)}$$

la K_i es la afinidad del competidor por el receptor. La concentración a la cual la unión del radioligando es la mitad de la máxima se la denomina CI_{50} , o concentración inhibitoria 50.

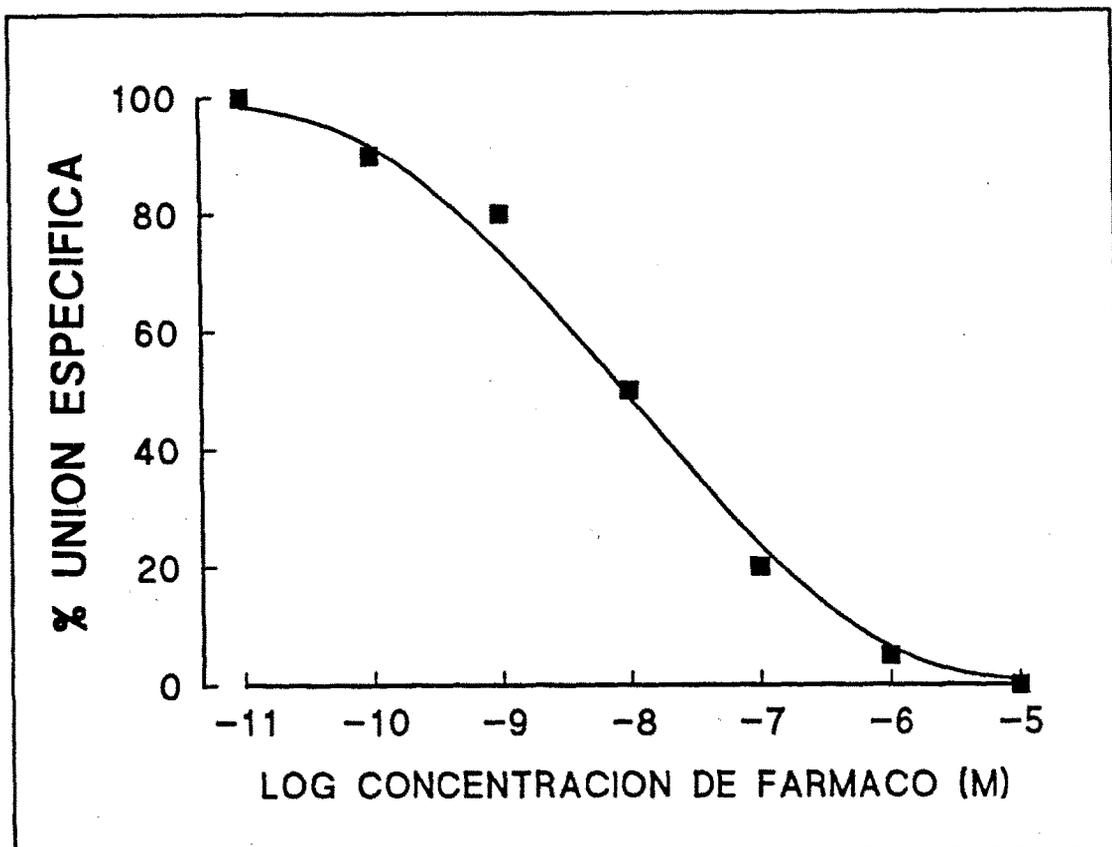


Figura 6.9.-Representación de la disminución de la unión específica respecto a la concentración de fármaco desplazante.

6.15.-Estudios de uptake de adenosina.

La obtención del tejido para la realización de este ensayo ya se ha indicado en la sección 6.1. Los tampones necesarios han sido:

Tampón Hepes-sacarosa (pH 7.5):

Se utiliza para la homogenización del tejido y la obtención del pellet mitocondrial. Su composición es la siguiente:

HEPES-Na	_____	10 mM
Sacarosa	_____	0.3 M

Tampón Hepes (pH 7.4):

Se utiliza para la incubación de la [³H]-Adenosina. Su composición es la siguiente:

NaCl	_____	140 mM
Sacarosa	_____	68 mM
Mg Cl ₂	_____	2 mM
Ca Cl ₂	_____	1.3 mM
K ₂ HPO ₄	_____	1.5 mM
HEPES-Na	_____	10 mM

6.16-Estudio del transporte de adenosina en la fracción mitocondrial de testículo de rata.

La determinación de la K_m y la V_{max} se ha realizado incubando una suspensión proteica de la fracción mitocondrial de testículo de rata (concentración 0.4 mg/ml) conjuntamente con concentraciones crecientes de [3H]-adenosina.

En este caso y debido a los valores de K_m en el rango micromolar que presenta la adenosina por su transportador, se ha seguido el procedimiento indicado en el apartado 6.14., manteniendo una concentración constante de [3H]-adenosina y añadiendo adenosina fría hasta llegar a la concentración deseada.

El tiempo de incubación de la [3H]-adenosina, que se ha determinado por estudios previos, ha sido de cinco minutos y la temperatura de realización del ensayo se ha mantenido constante a 37°C.

Los estudios de inhibición del transportador, para la determinación de la CI_{50} , se han realizado preincubando la suspensión proteica con cantidades crecientes del fármaco frío durante 45 minutos. Pasado este período de tiempo, se añade la [3H]-adenosina y se inicia el proceso de uptake. Al cabo de los 5 minutos se añade tampón Hepes (pH= 7.4) y se procede a la filtración de la muestra a través de filtros Whatman GF/B. Los filtros se depositaron en viales de centelleo y la reactividad retenida en el filtro se valoró al cabo de 24 horas en un contador de centelleo.

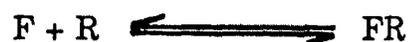
6.17.-Tratamiento de los resultados.

Los resultados obtenidos, expresados en DPM se intruducen en el programa de ordenador ENZFITTER para la determinación de las distintas constantes.

7.-RESULTADOS

7.0.-Estudios de saturación.

La interacción fármaco-receptor se puede describir mediante una serie de ecuaciones basadas en los principios de A.J. Clark en los cuales se postula que los fármacos se unen a los receptores dependiendo de la concentración de fármaco y de receptor, mientras que los complejos fármaco-receptor dejen de interaccionar proporcionalmente al número de complejos formados. Esta afirmación implica que la interacción fármaco-receptor obedece la ley de acción de masas. De esta forma tenemos:



donde F es el fármaco, hormona o neurotransmisor, R el receptor, k_1 la constante de asociación y k_2 la de disociación.

La velocidad de asociación y de disociación iniciales serán respectivamente:

$$V_a = k_1 [F] [R]$$

$$V_d = k_2 [FR]$$

El equilibrio se consigue cuando ambas velocidades se igualan:

$$k_1 [F] [R] = k_2 [FR]$$

de este modo:

$$\frac{[FR]}{[F] [R]} = \frac{k_1}{k_2} = K_A, \text{ molar}^{-1}$$

Pero lo más corriente es expresar la afinidad de un fármaco mediante la K_D (constante de disociación en el equilibrio) y no mediante la K_A (constante de asociación en el equilibrio). La K_D es la inversa de la K_A . De este modo:

$$K_D = k_2 / k_1$$

En los ensayos de saturación, como se ha comentado anteriormente en el apartado de material y métodos, se determina la K_D y el número máximo de receptores, la B_{max} . Estos valores se obtienen realizando los ensayos de saturación a diferentes concentraciones de radioligando. La representación gráfica (eje de abscisas concentración de radioligando y en ordenadas radioligando unido al receptor) determina una hipérbola rectangular, descrita por la ecuación:

$$Y = \frac{ax}{b + x}$$

Si $Y = [*FR]$, $x = [*F]$, $b = K_D$ y $a = R_{TOT}$, luego:

$$[*FR] = \frac{[*F] [R_{TOT}]}{K_D + [*F]}$$

Se puede determinar la K_D como la concentración de radioligando que ocupa la mitad de los receptores, lo que se demuestra según:

$$[*FR] = \frac{[R_{TOT}]}{2}$$

Igualando las ecuaciones:

$$[R_{TOT}] = \frac{2[*F] [R_{TOT}]}{k_D + [*F]}$$

Dividiendo por $[R_{TOT}]$:

$$k_D + [*F] = 2 [*F]$$

con lo cual:

$$K_D = [*F]$$

Otra demostración importante es que la planicie que se describe en la gráfica representa la ocupación máxima de receptores específicos para *F. Esto se demuestra según:

$$[*F] = \frac{[*F] [R_{TOT}]}{k_D + [*F]}$$

$$[*FR] (K_D + [*F]) = [*F] [R_{TOT}]$$

$$[*FR] K_D + [*FR] [*F] = [*F] [R_{TOT}]$$

$$[*F] ([R_{TOT}] - [*FR]) = [*FR] K_D$$

$$[*F] = \frac{[*FR] K_D}{[R_{TOT}] - [*FR]}$$

Como que $[*FR]$ tiende a $[R_{TOT}]$, $[*F]$ tiende al infinito ya que el cociente, cuando el denominador es cero, equivale al infinito.

Esta gráfica, en la que se representa la concentración de fármaco marcado respecto a su unión, nos permite determinar uno de los requisitos que deben cumplirse en todo ensayo de caracterización de receptores: la saturabilidad. A altas concentraciones de radioligando, se ocupan prácticamente todos los receptores, ya que estos a una determinada concentración proteica de tejido están en un número limitado.

7.0.1.-Representación de Scatchard.

A partir de los ensayos de saturación se obtiene la representación de Scatchard (también denominada de Rosenthal) que nos permite determinar el número máximo de lugares de unión. De este modo, se representa en abcisas la concentración de fármaco unido (B o [*FR] frente al fármaco unido dividido por el fármaco libre (B/F o [*FR]/[*F]).

Si tenemos en cuenta la ecuación descrita anteriormente:

$$[*FR] = \frac{[*F] [R_{TOT}]}{K_D + [*F]}$$

es lo mismo que :

$$B = \frac{(F) (B_{max})}{K_D + F}$$

luego:

$$(B) (K_D) + (B) (F) = (F) (B_{max})$$

dividiendo por F:

$$(B / F) (K_D) + B = B_{\max}$$

finalmente:

$$B/F = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{B}{K_D}$$

que es una expresión lineal del tipo $y = mx + b$ ya que:

$$B/F = -(1 / K_D) B + B_{\max} / K_D$$

De este modo, si un ligando interacciona con una población de receptores de un sólo tipo, se obtiene una recta cuya interacción con el eje de abscisas determina el valor de B_{\max} . La pendiente de la recta determina la $-K_A$. Si la población de receptores no es homogénea, y las K_D para cada subclase de receptores no son iguales, se obtiene una curva que se puede descomponer en dos rectas cuyas pendientes serán la $-K_A$ para cada población.

7.0.2.-Representación de Hill.

La representación de Hill es una transformación que se obtiene a partir de los ensayos de saturación y que nos permite determinar si la interacción fármaco-receptor es bimolecular o no y si cumple la ley de acción de masas.

La ecuación de Hill es la siguiente:

$$\frac{B}{B_{\max}} = \frac{[F]^n}{K_D' + [F]^n}$$

cuando $n = 1$, la interacción obedece a la ley de acción de masas para reacciones bimoleculares. En esta ecuación, n es el número de lugares de unión por moléculas de receptor. Para su representación gráfica, esta expresión matemática se puede transformar de forma logarítmica:

$$(B) (K_D') + B [F]^n = B_{\max} [F]^n$$

$$(B) (K_D') = B_{\max} - B [F]^n$$

$$\frac{B}{(B_{\max} - B)} K_D' = [F]^n$$

$$\frac{B}{(B_{\max} - B)} K_D' = [F]^n$$

$$\frac{B}{(B_{\max} - B)} = \frac{[F]^n}{K_D'}$$

aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación obtenemos:

$$\log \frac{B}{(B_{\max} - B)} = n \log [F] - \log K_D'$$

La pendiente de la representación de Hill, n , se la denomina coeficiente de Hill (también se representa como n_H). Si el valor del coeficiente es igual a 1, la K_D' es igual a la K_D . En este caso, la población de receptores ocupados por el radioligando será de un sólo tipo, siendo la interacción entre el fármaco y el receptor de tipo bimolecular y cumpliendo la ley de masas. En el caso de que hubiera más de una población de receptores ocupados, el coeficiente de Hill

también sería igual a la unidad si las afinidades del fármaco por los diferentes subtipos fueran iguales y los distintos lugares de unión no interactuasen entre sí.

En el caso de que este coeficiente fuera mayor de 1, existiría una cooperatividad positiva en la interacción fármaco-receptor. Si el coeficiente de Hill es menor de 1, hay diversas interpretaciones: puede existir una cooperatividad negativa, o puede ser que haya diferentes poblaciones de receptores que no interactúan entre sí, o bien múltiples estados interconvertibles en los cuales la afinidad varía.

A continuación se representa las gráficas que se han obtenido a partir de los estudios de saturación en los diferentes tejidos estudiados utilizando como radioligandos el [³H]-Ro 5-4864 y el [³H]-PK 11195. También se representan los valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_D), la densidad de receptores (B_{max}) y el coeficiente de Hill (n_H) en cada caso.

7.1.- Estudios de saturación en próstata de rata utilizando [^3H]-PK 11195 como radioligando.

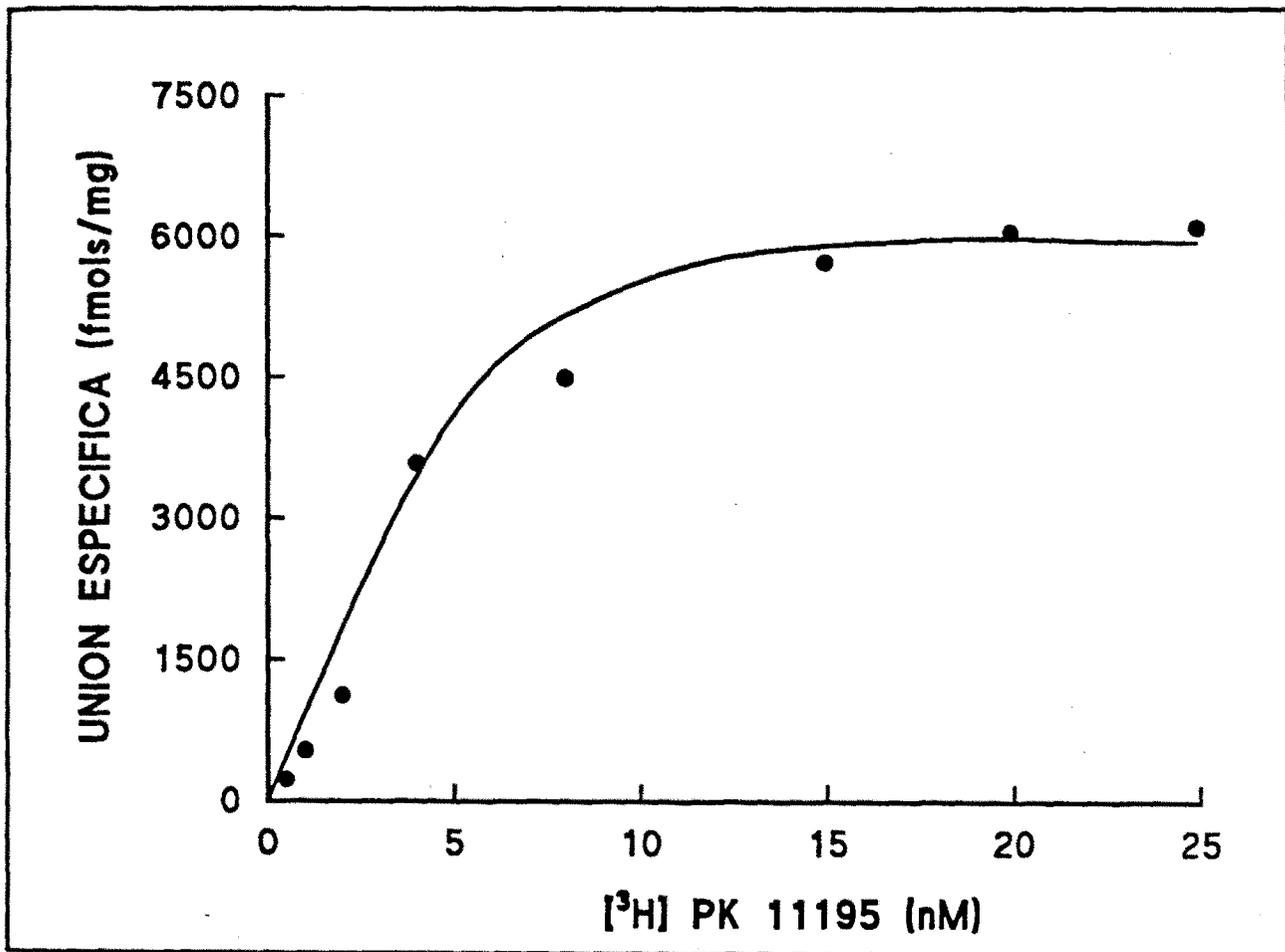


Figura 7.1.1.- Representación de la unión específica del [^3H]-PK 11195 en próstata de rata.

Tabla 7.1.- Unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata.

Concentración [³ H]-PK 11195	Unión específica (fmols/mg)
0.5 x 10 ⁻⁹	228 ± 49
1 x 10 ⁻⁹	521 ± 69
2 x 10 ⁻⁹	1072 ± 252
5 x 10 ⁻⁹	3107 ± 122
10 x 10 ⁻⁹	4800 ± 157
15 x 10 ⁻⁹	5709 ± 498
20 x 10 ⁻⁹	6342 ± 385
25 x 10 ⁻⁹	6374 ± 752

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

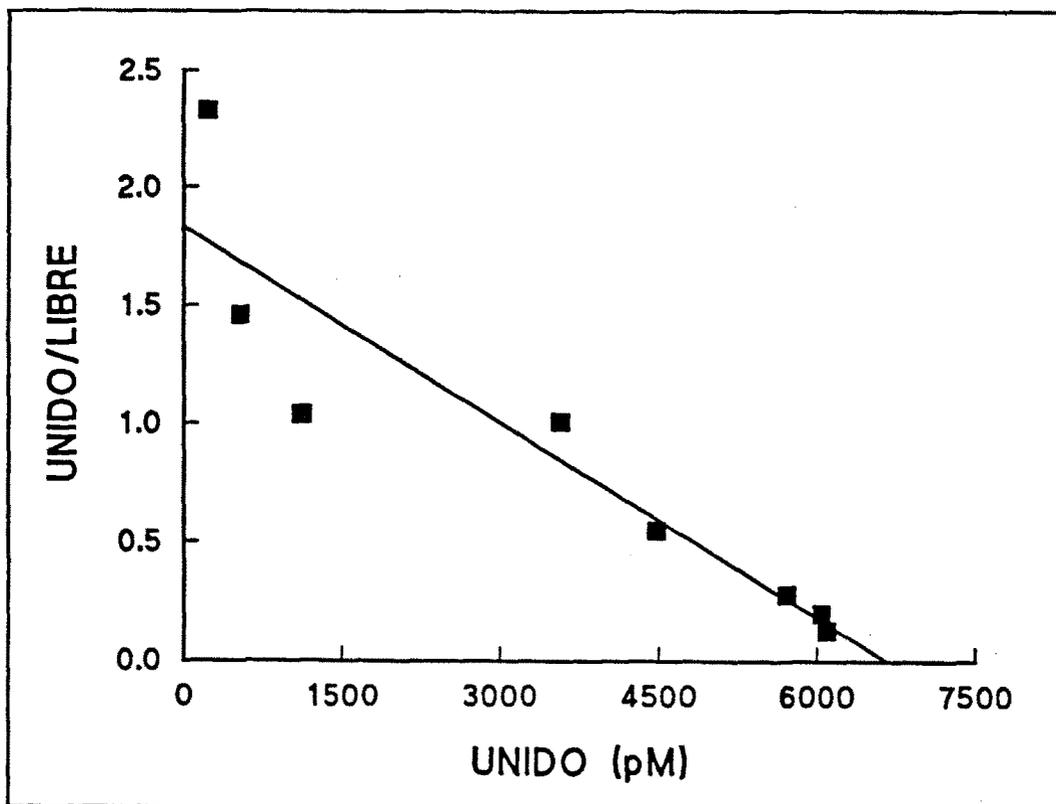
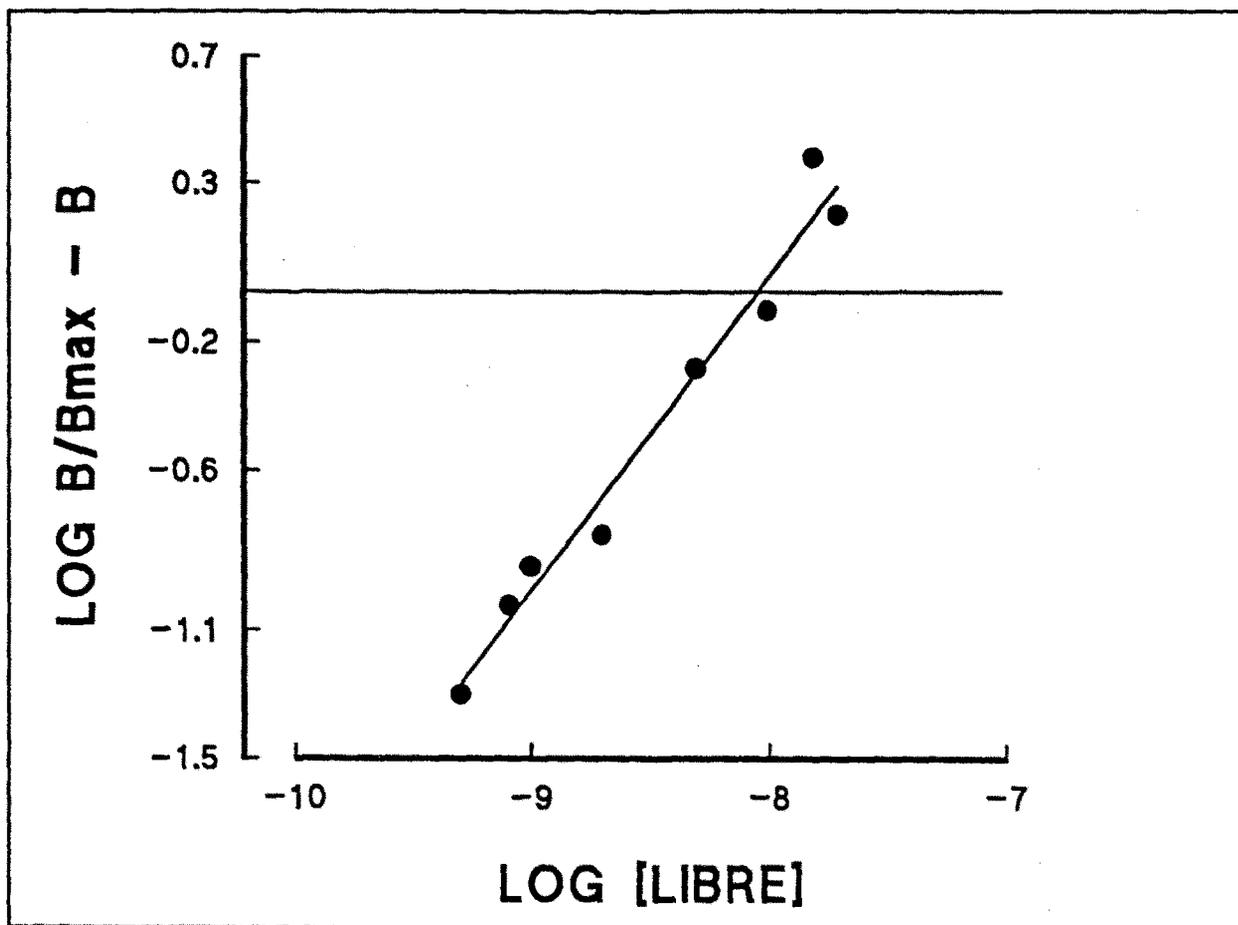


Figura 7.1.2.- Representación de Scatchard en próstata de rata utilizando [^3H]-PK 11195 como radioligando.

Tabla 7.2.- Resultados de las experiencias de saturación realizadas en próstata de rata con [^3H]-PK 11195. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
1.51 ± 0.03	6050 ± 583	1.07 ± 0.03



7.3.- Representación de Hill en próstata de rata utilizando [^3H]-PK 11195 como radioligando.

7.2.- Estudios de saturación en próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

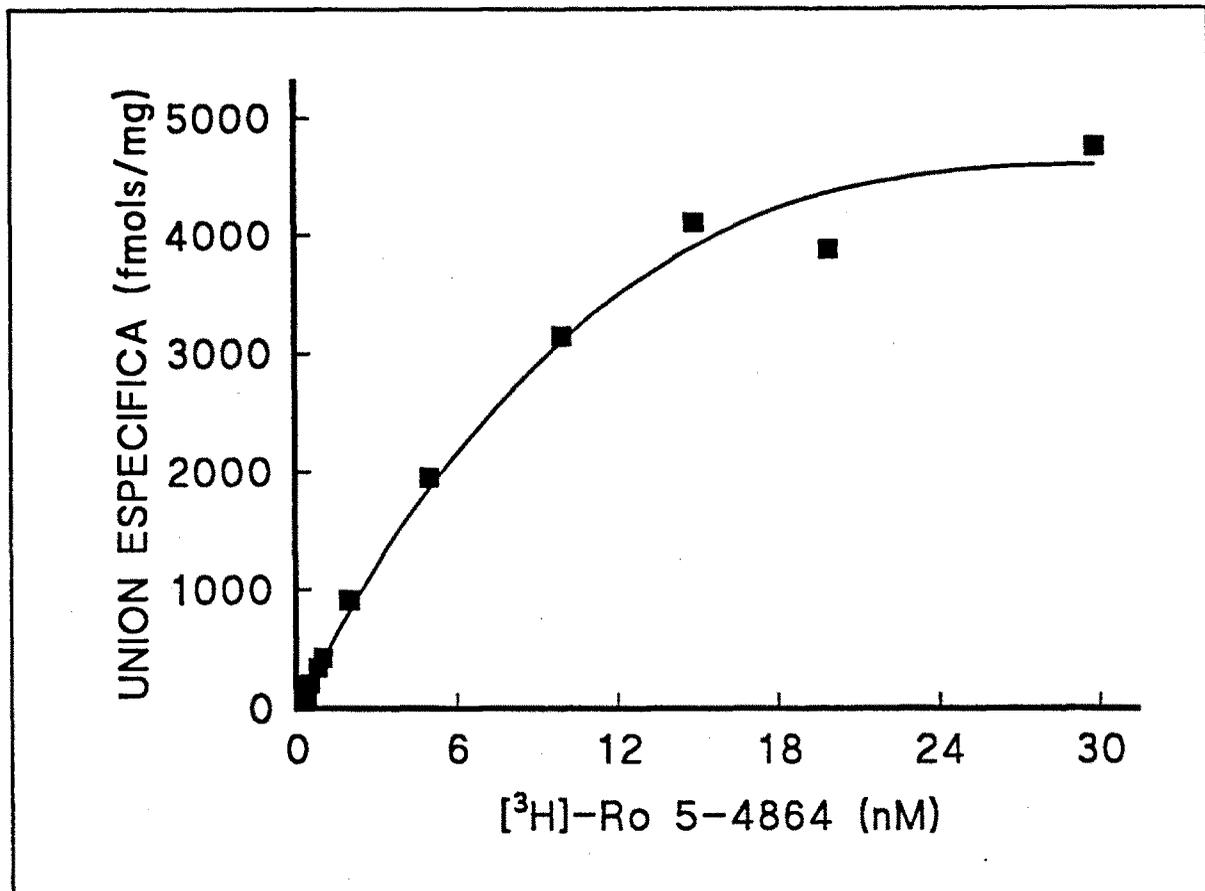


Figura 7.2.1- Representación de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en próstata de rata.

Tabla 7.3.-Unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en próstata de rata.

Concentración de [³ H]-Ro 5-4864	Unión Específica (fmols/mg)
0.5 x 10 ⁻⁹	150 ± 5
0.8 x 10 ⁻⁹	281 ± 24
1 x 10 ⁻⁹	360 ± 36
2 x 10 ⁻⁹	665 ± 45
4 x 10 ⁻⁹	1028 ± 210
8 x 10 ⁻⁹	2234 ± 364
10 x 10 ⁻⁹	3542 ± 761
15 x 10 ⁻⁹	4370 ± 709
20 x 10 ⁻⁹	4621 ± 867
30 x 10 ⁻⁹	4537 ± 675

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

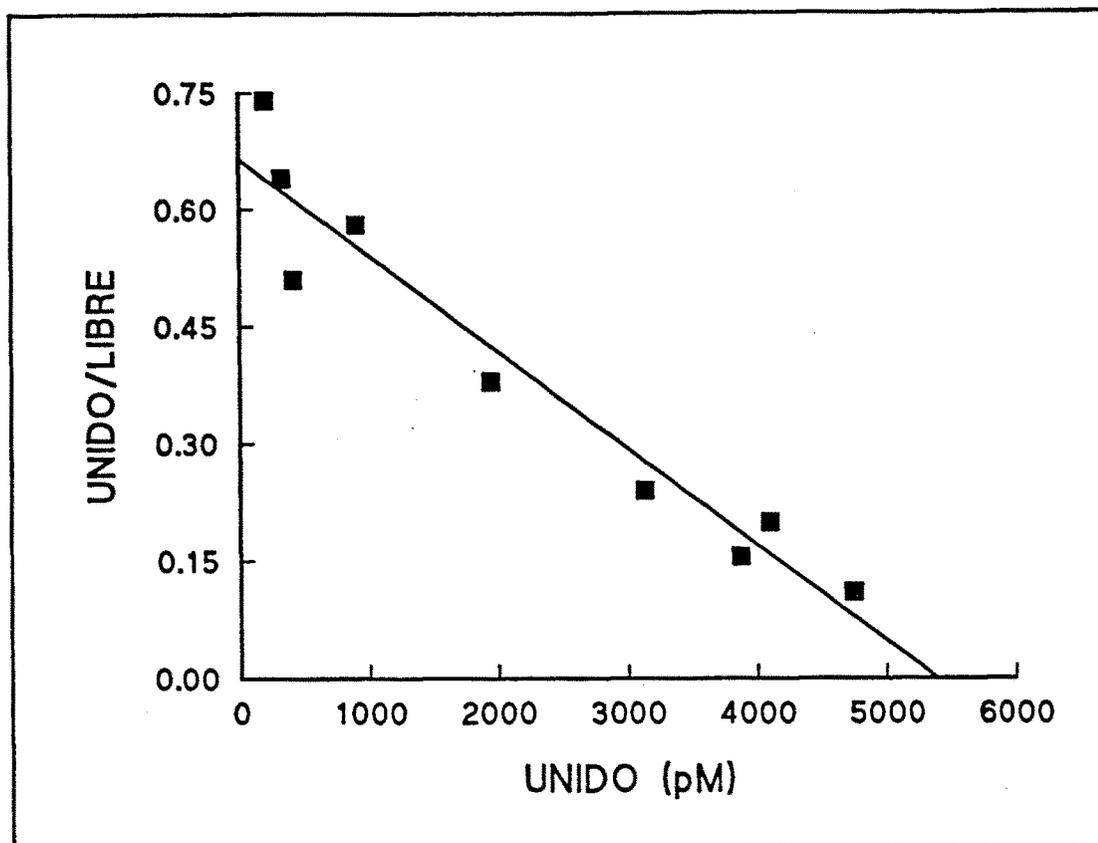


Figura 7.2.2.- Representación de Scatchard en próstata de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.4-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en próstata de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias realizadas por separado \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
4.36 ± 1.02	4164 ± 873	1.00 ± 0.02

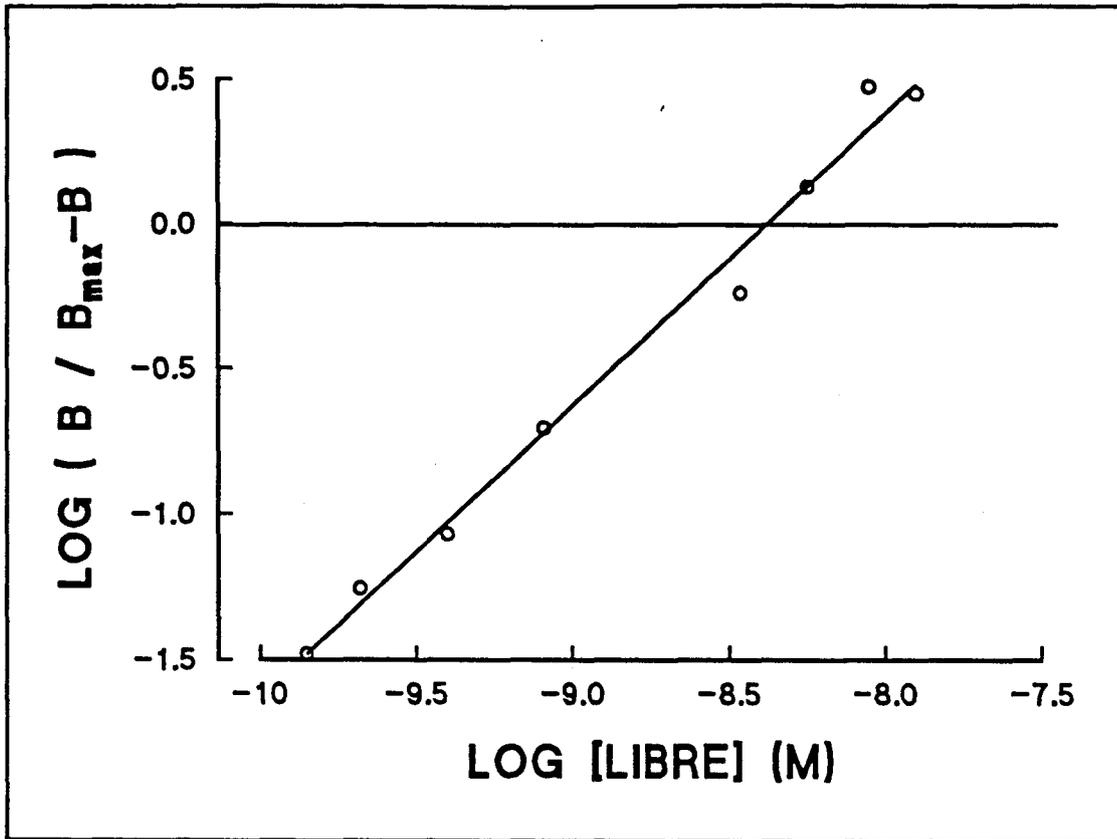


Figura 7.2.3.- Representación de Hill en próstata de rata utilizando [^3H]-5-4864 como radioligando.

7.3.- Estudios de saturación en vesícula seminal de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

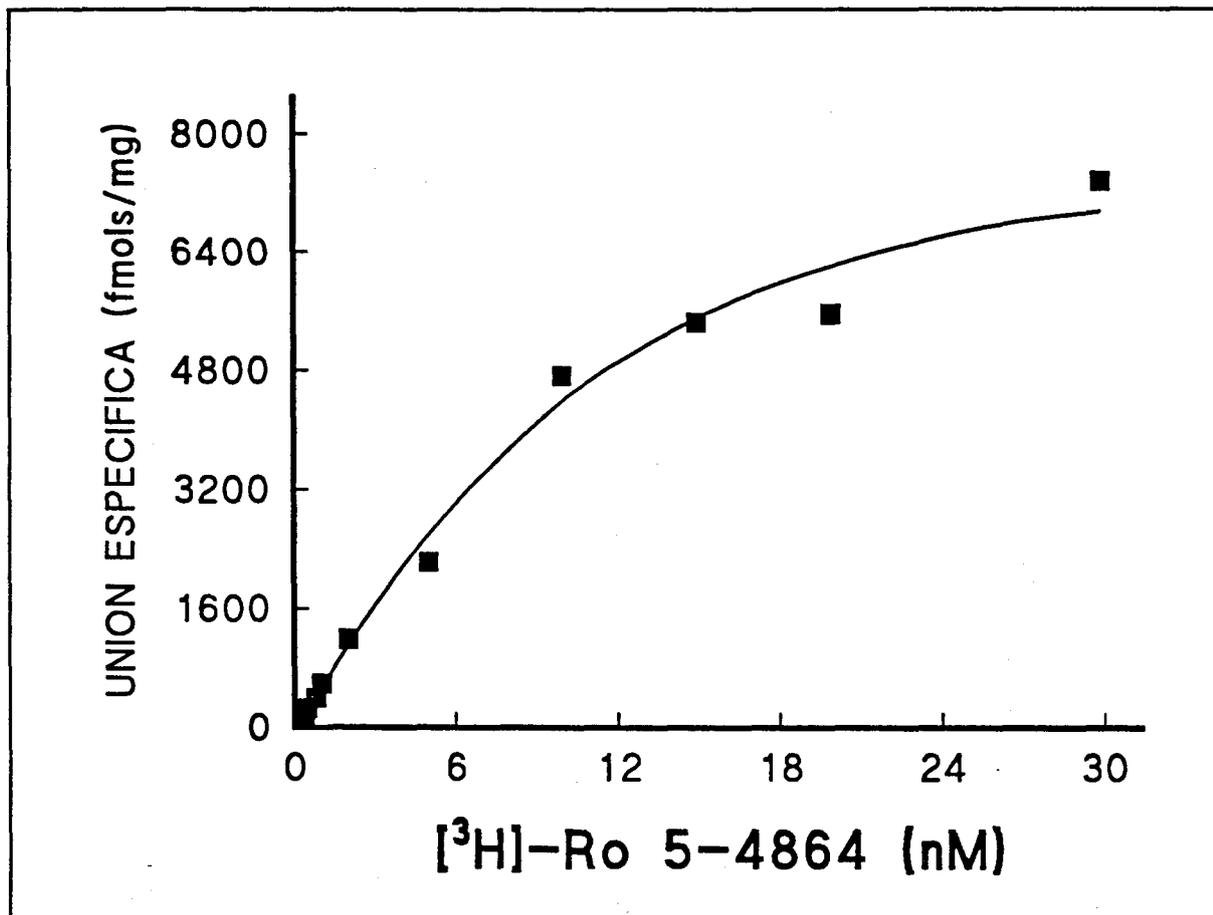


Figura 7.3.1-Representación de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.

Tabla 7.5.-Unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.

Concentración de [³ H]-Ro 5-4864	Unión Específica (fmols/mg)
0.5 x 10 ⁻⁹	149 ± 7
0.8 x 10 ⁻⁹	247 ± 23
1 x 10 ⁻⁹	350 ± 64
2 x 10 ⁻⁹	510 ± 44
4 x 10 ⁻⁹	1144 ± 165
8 x 10 ⁻⁹	2249 ± 567
10 x 10 ⁻⁹	4288 ± 512
15 x 10 ⁻⁹	5135 ± 581
20 x 10 ⁻⁹	5500 ± 610
30 x 10 ⁻⁹	6300 ± 278

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

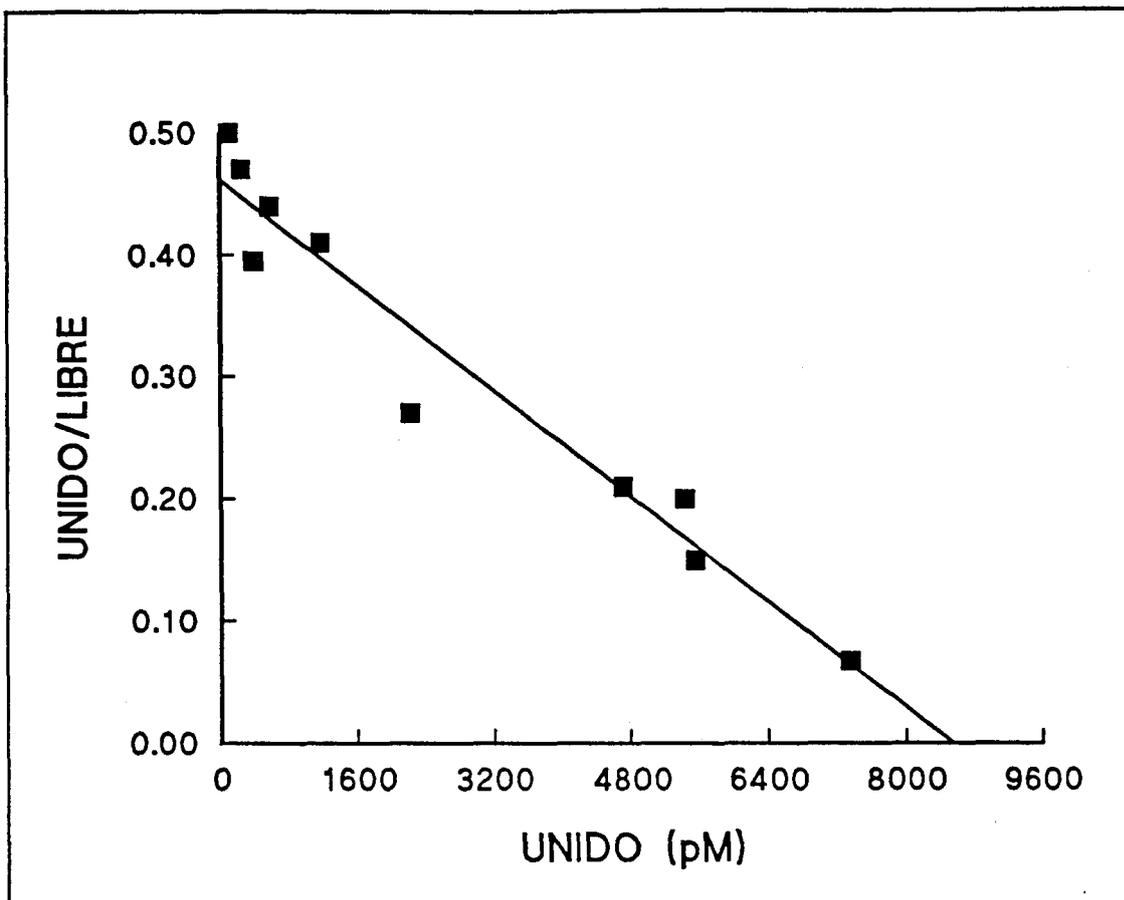


Figura 7.3.2.- Representación de Scatchard en vesícula seminal de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.6.-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en vesícula seminal de rata con [^3H]-Ro 5-4864. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

K_D	B_{max}	n_H
8.45 ± 1.34	5978 ± 1022	0.96 ± 0.03

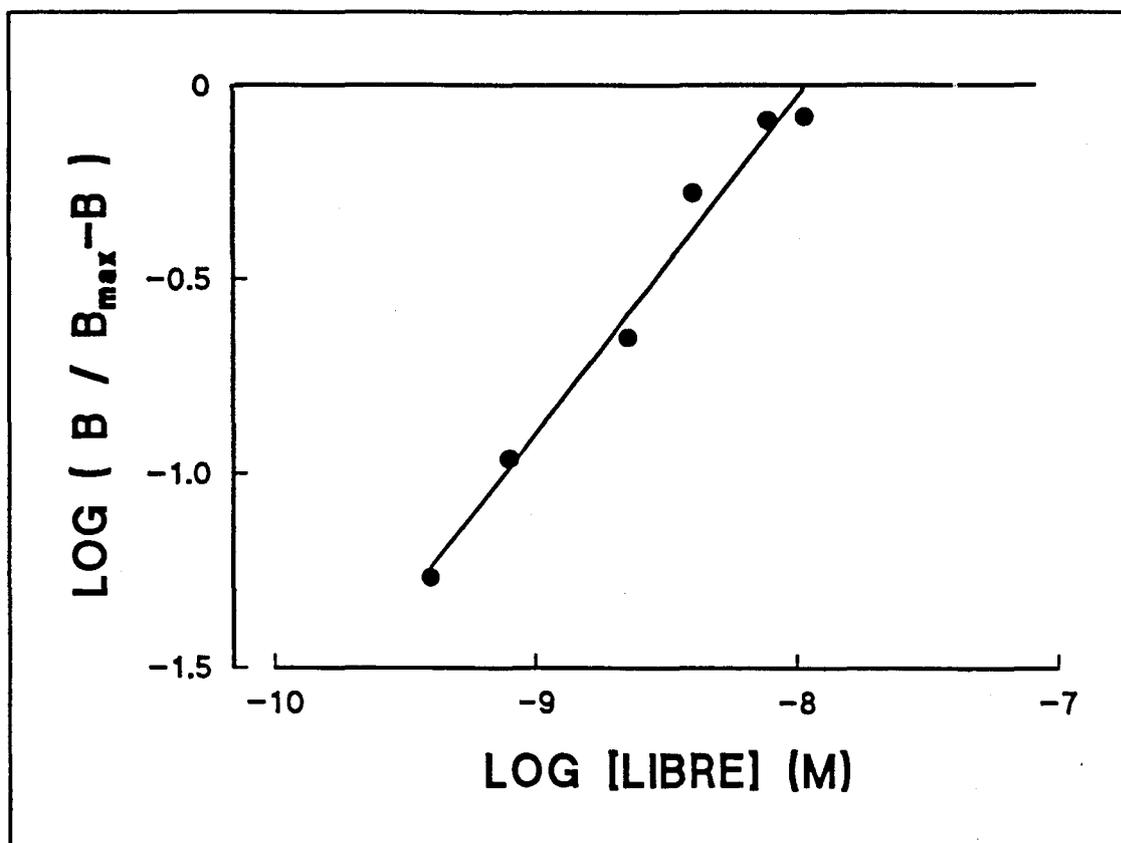


Figura 7.3.3.- Representación de Hill en vesícula seminal de rata utilizando $[^3\text{H}]\text{-5-4864}$ como radioligando.

7.4.-Estudios de saturación realizados en conducto deferente de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

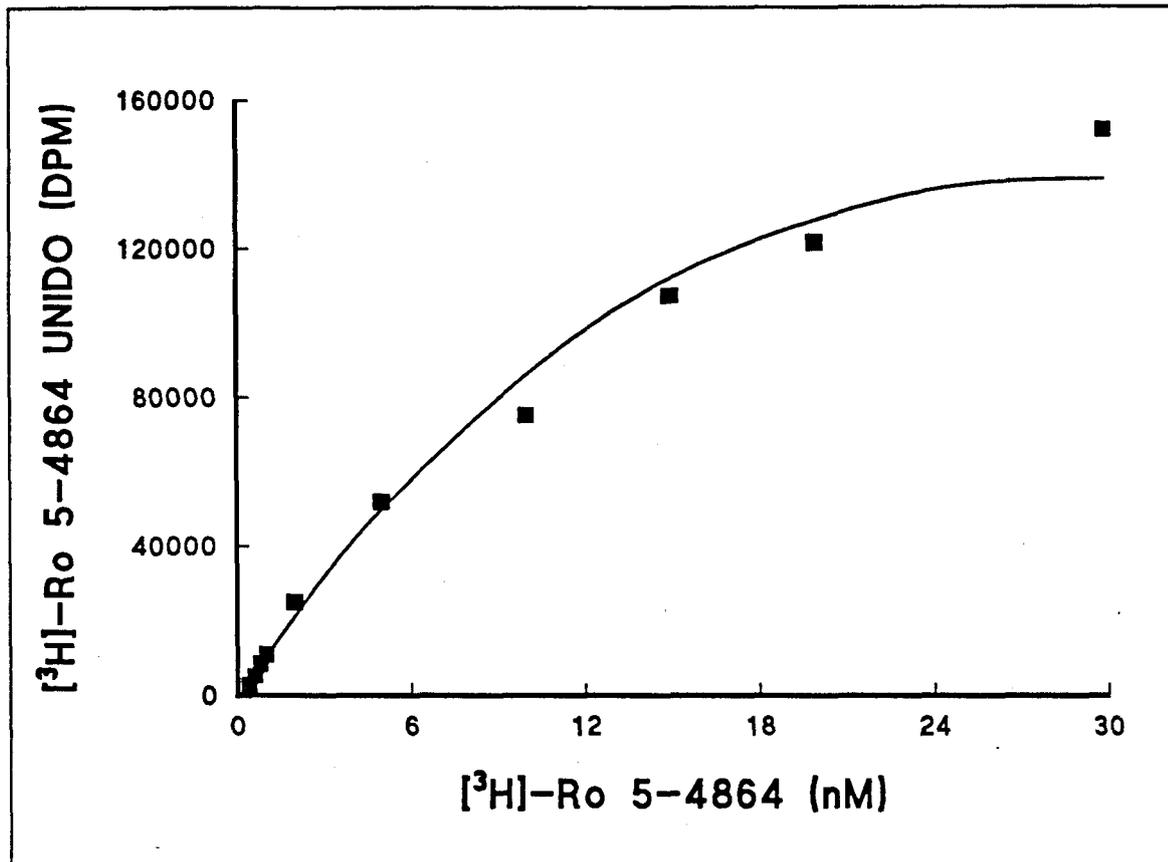


Figura 7.4.1-Representación de la unión específica del [^3H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

Tabla 7.7.-Unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

Concentración de [³ H]-Ro 5-4864	Unión Específica (DPM)
0.4 x 10 ⁻⁹	2910 ± 157
0.6 x 10 ⁻⁹	5252 ± 321
0.8 x 10 ⁻⁹	8375 ± 897
1 x 10 ⁻⁹	10913 ± 1536
2 x 10 ⁻⁹	21998 ± 3122
5 x 10 ⁻⁹	52042 ± 6136
10 x 10 ⁻⁹	75297 ± 8321
15 x 10 ⁻⁹	107450 ± 12312
20 x 10 ⁻⁹	121780 ± 15381
30 x 10 ⁻⁹	151972 ± 17587

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

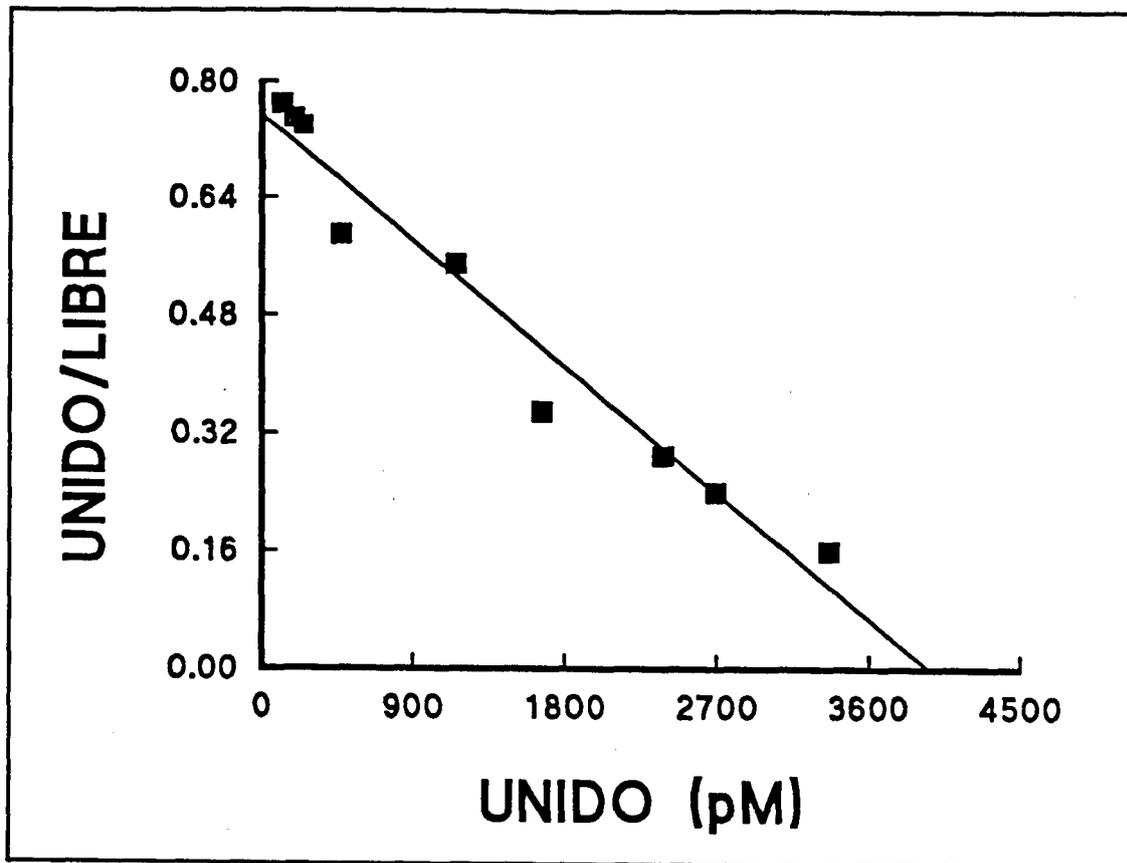


Figura 7.4.2.- Representación de Scatchard en conducto deferente de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.8-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en conducto deferente de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias realizadas por separado \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
5.22 ± 0.56	4926 ± 565	0.99 ± 0.01

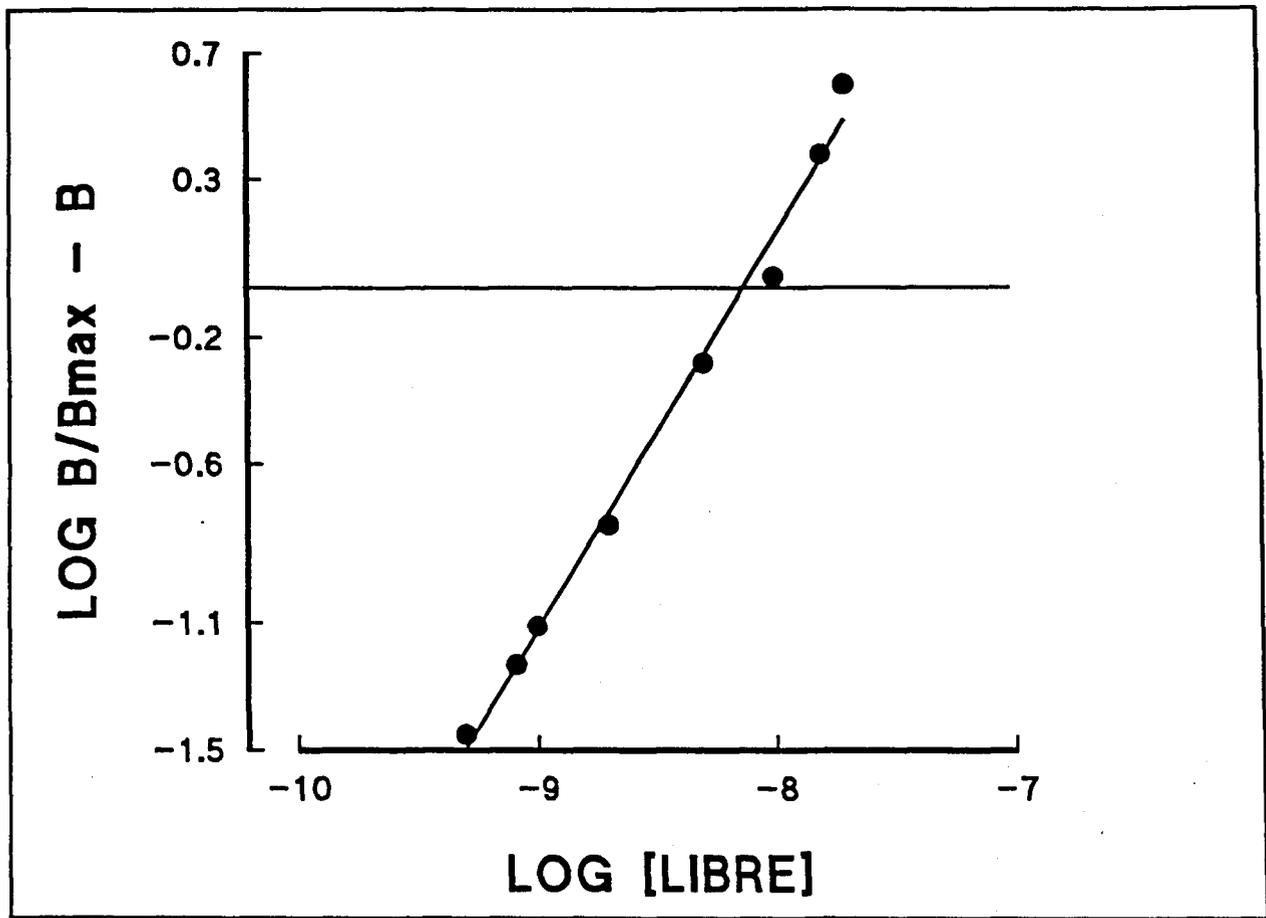


Figura 7.4.3.- Representación de Hill en conducto deferente de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

7.5.-Estudios de saturación en adenoma de próstata humana utilizando [³H]-PK 11195 como radioligando.

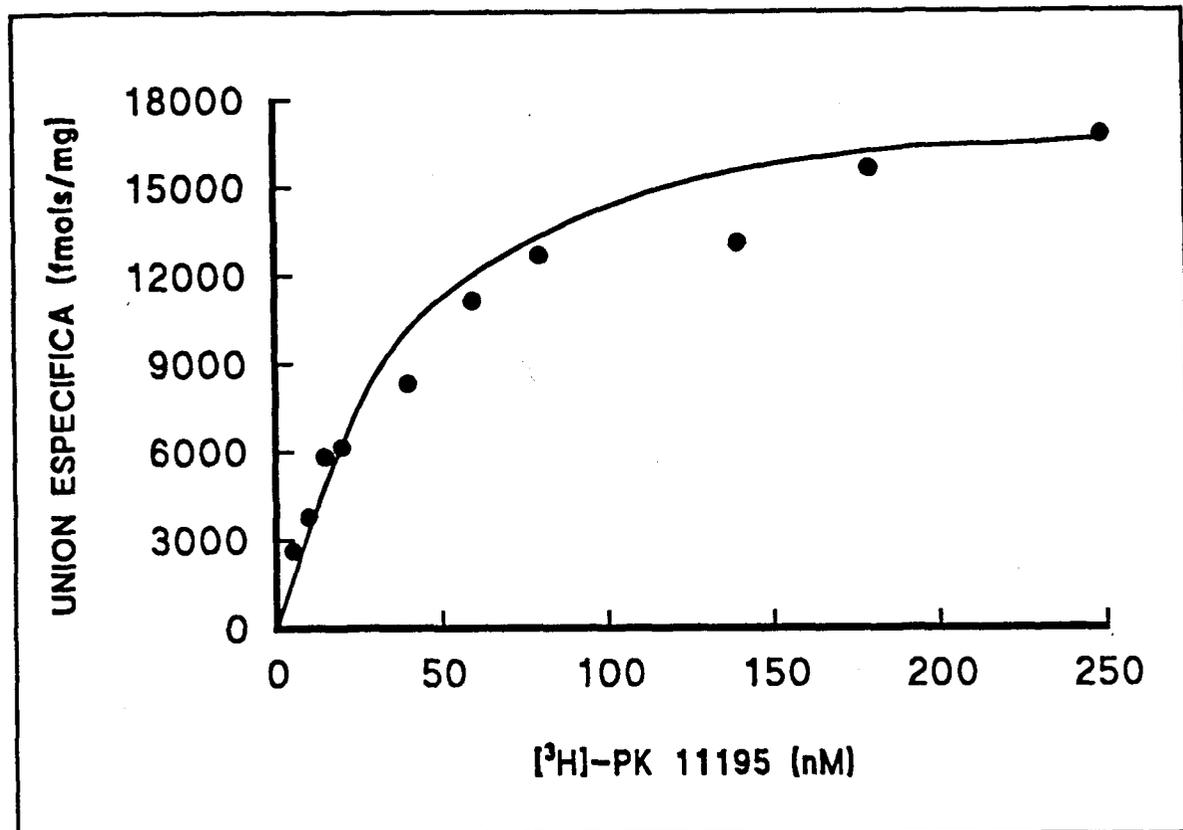


Figura 7.5.1-Representación de la unión específica del [³H]-PK 11195 en adenoma de próstata.

Tabla 7.9.-Unión específica del [³H]-PK 11195 en adenoma de próstata.

Concentración de [³ H]-PK 11195 (nM)	Unión Específica (fmols/mg)
5	2642 ± 59
10	3776 ± 288
15	5836 ± 578
20	6156 ± 656
40	8322 ± 876
60	11150 ± 1181
80	12690 ± 889
140	13110 ± 1108
180	15632 ± 1786
250	16764 ± 1576

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

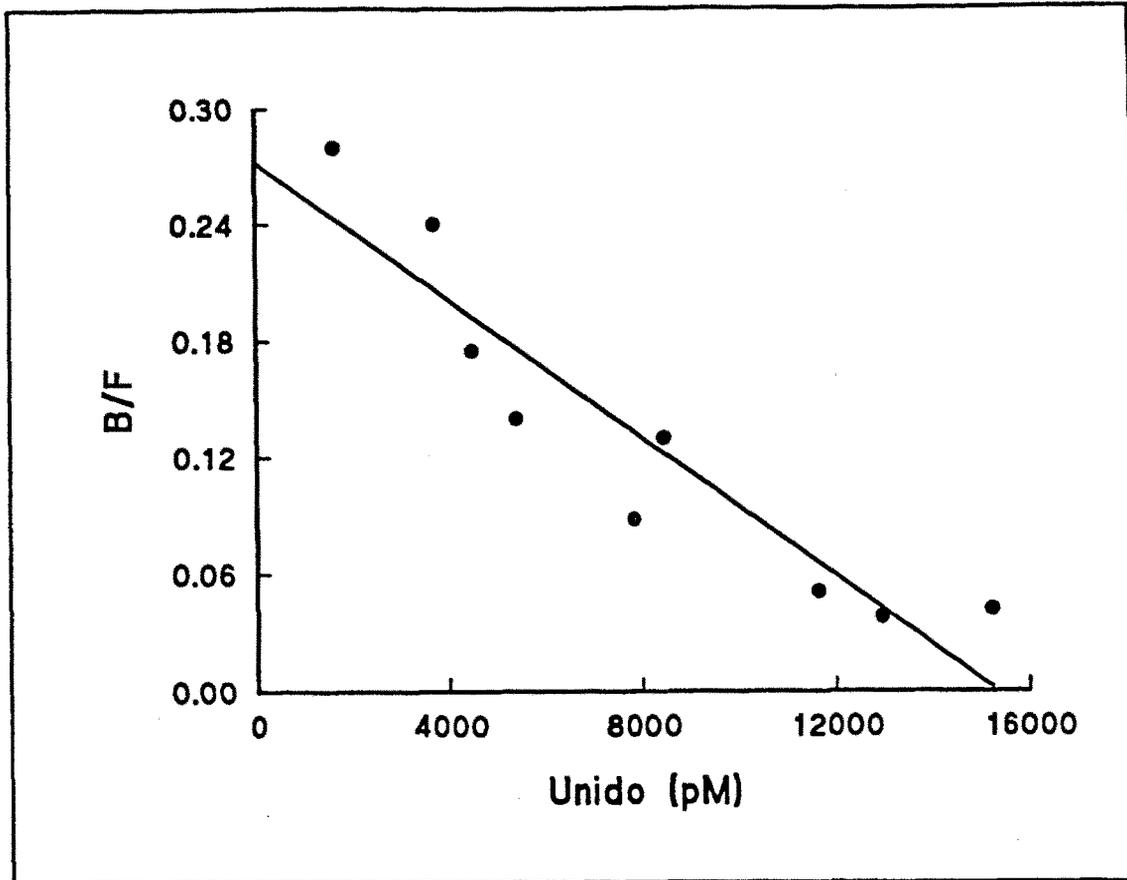


Figura 7.4.2.- Representación de Scatchard en adenoma de próstata utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando.

Tabla 7.10.-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en adenoma de próstata utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias realizadas por separado \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
12.00 ± 2.42	13.924 ± 2.454	0.95 ± 0.06

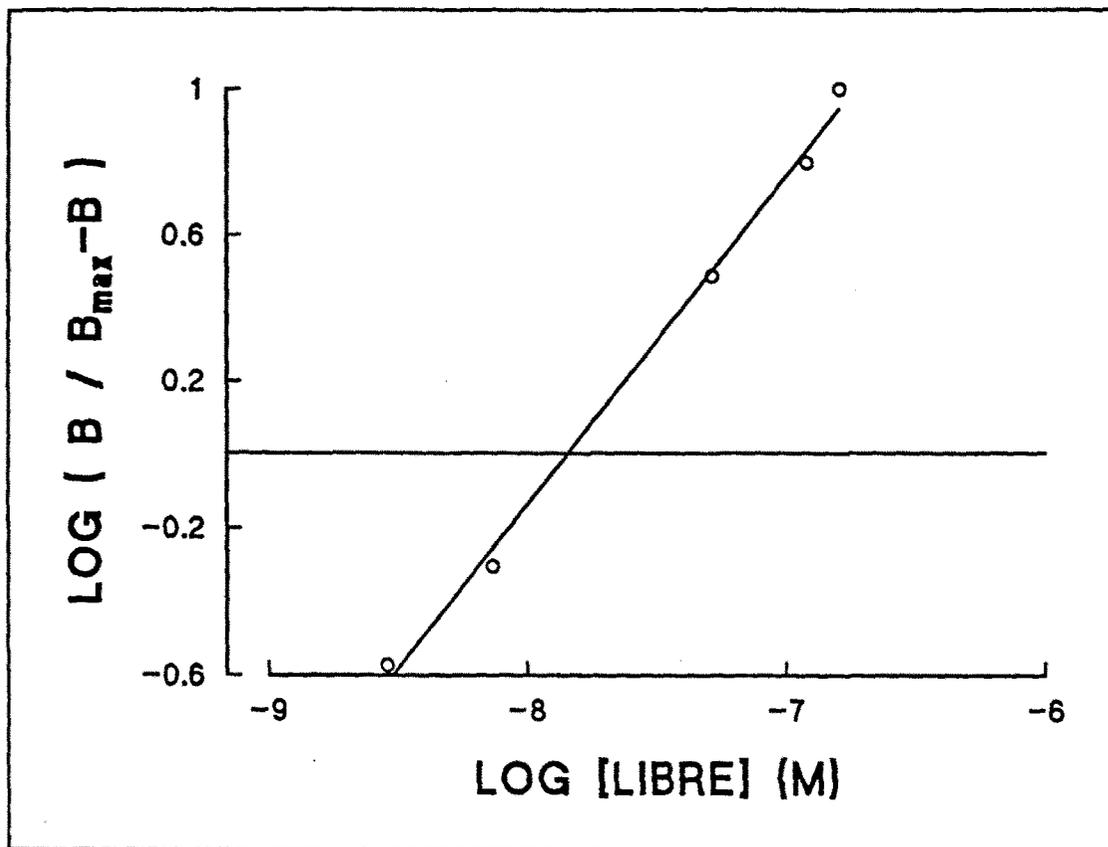


Figura 7.5.3.- Representación de Hill en adenoma de próstata utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando.

7.6.-Estudios de saturación en adenoma de próstata humana utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

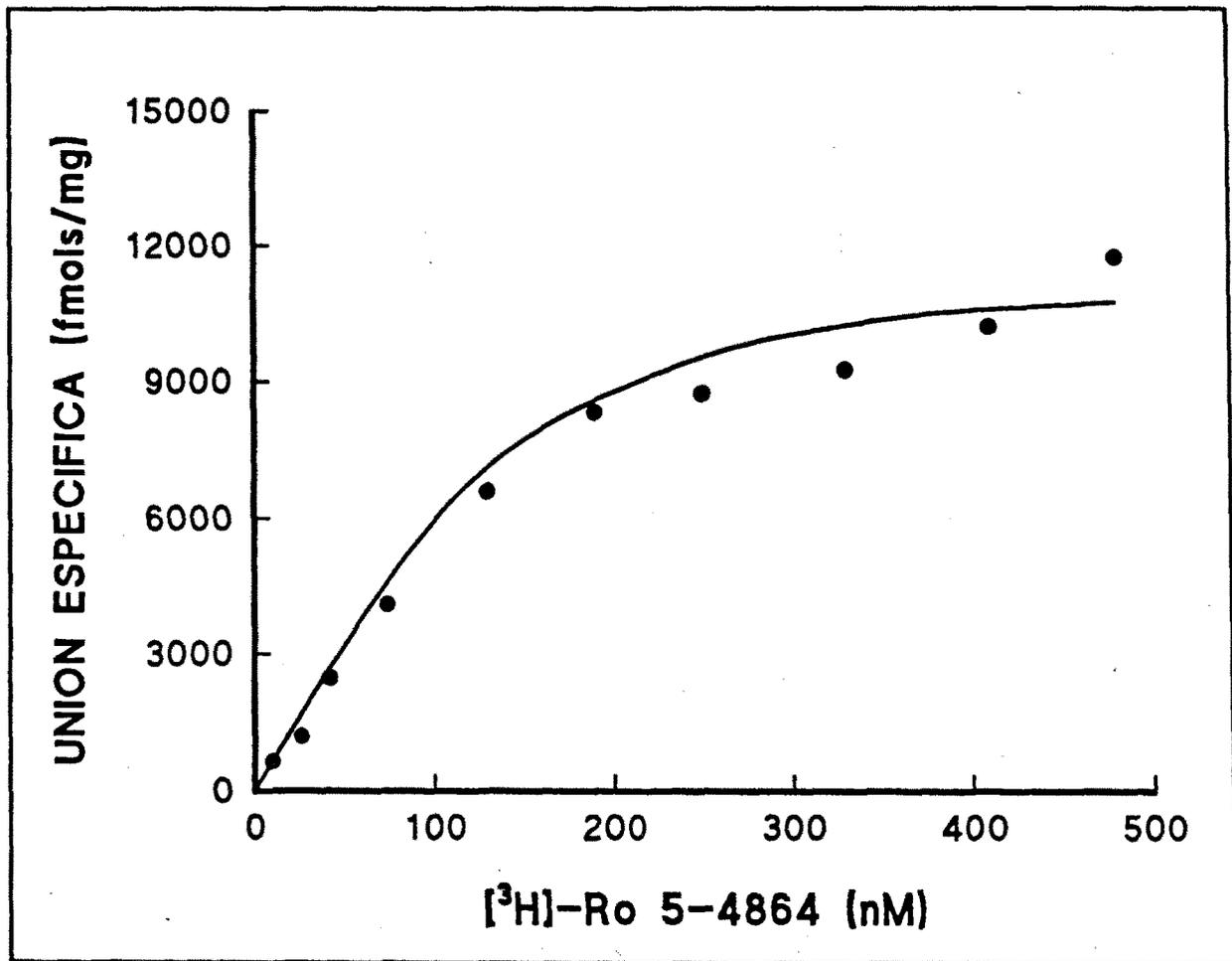


Figura 7.6.1-Representación de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata.

Tabla 7.11-Unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata.

Concentración de [³ H]-Ro 5-4864 (nM) (fmols/mg)	Unión Específica
10	642 ± 35
26	1202 ± 128
42	2478 ± 257
74	4100 ± 653
130	6602 ± 722
190	8338 ± 613
250	8742 ± 832
300	9258 ± 1212
410	10208 ± 1538
480	11728 ± 17587

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

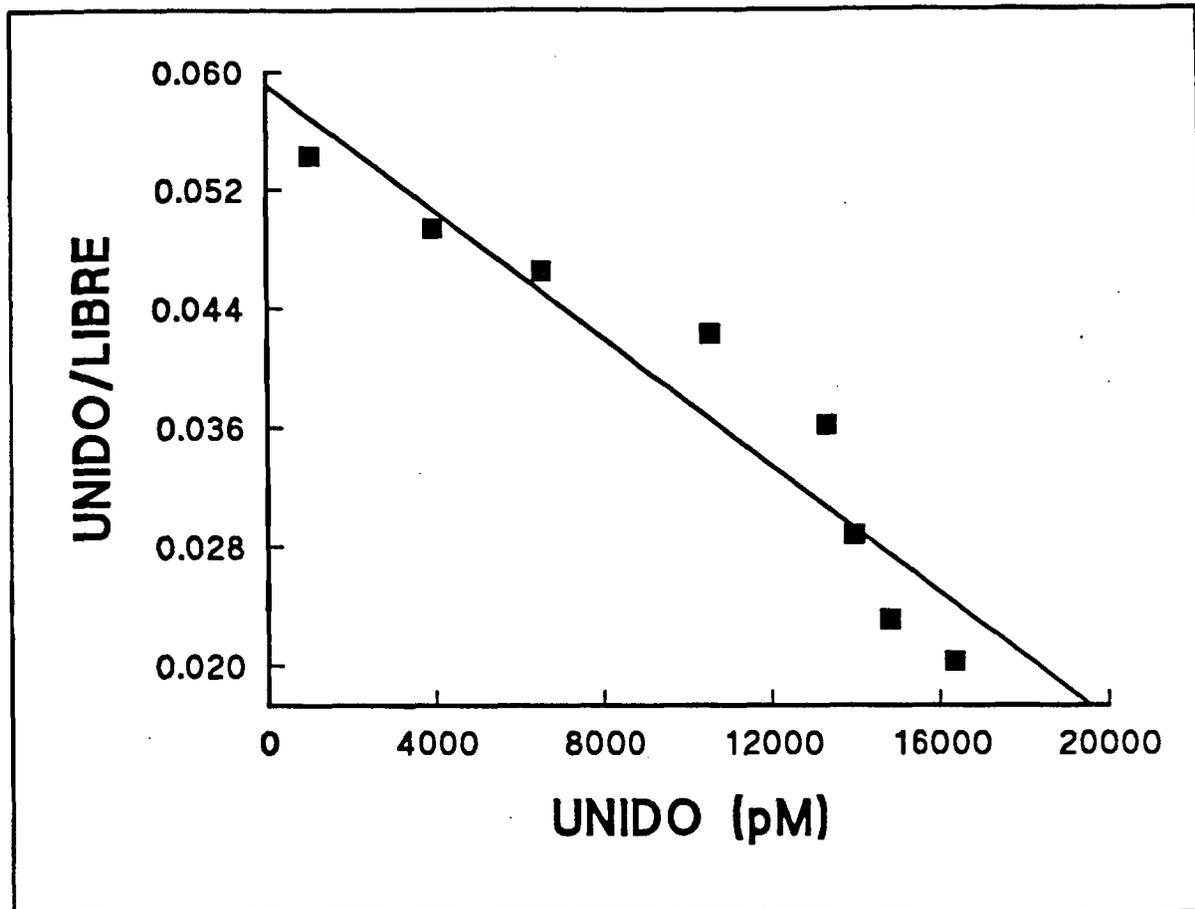


Figura 7.6.2.- Representación de Scatchard en adenoma de próstata utilizando [^3H]-5-4864 como radioligando.

Tabla 7.12.-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en adenoma de próstata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias realizadas por separado \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
188.38 ± 16.46	13.630 ± 1.878	0.93 ± 0.03

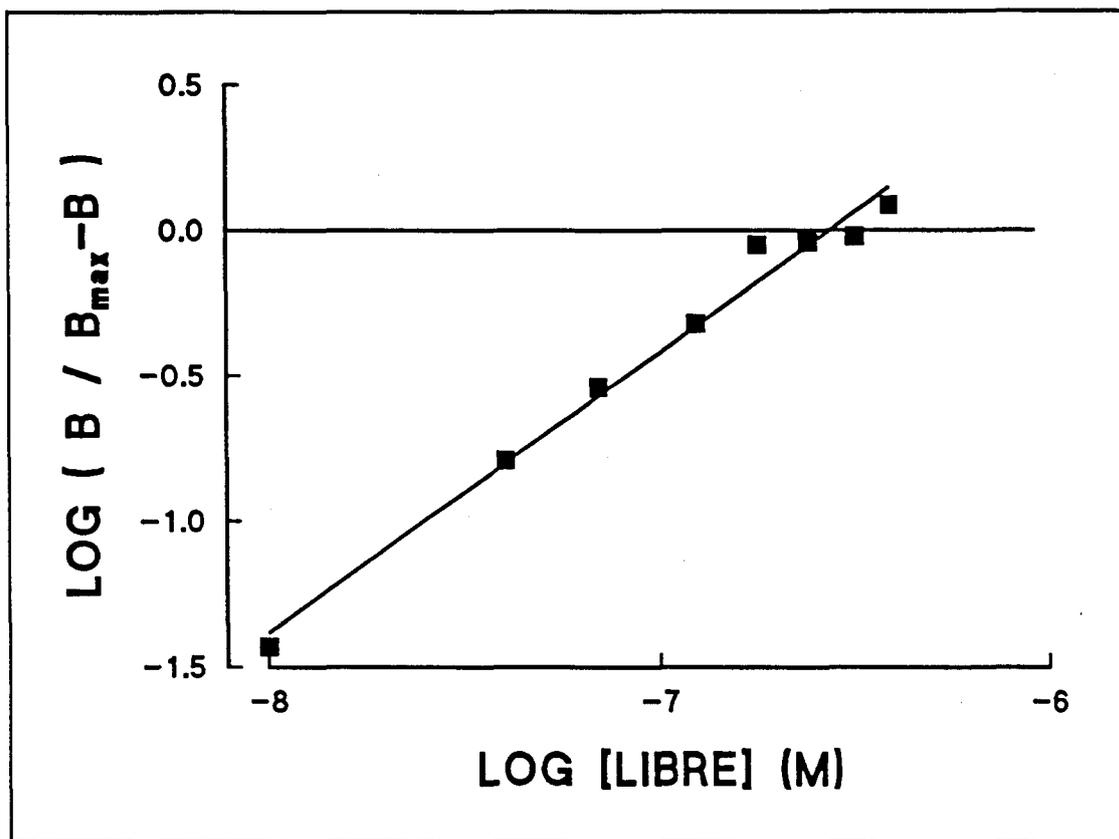


Figura 7.6.3.- Representación de Hill en adenoma de próstata utilizando $[^3\text{H}]$ -Ro 5-4864 como radioligando.

7.7.-Estudios de saturación en realizados en próstata humana utilizando [³H]-PK 11195 como radioligando.

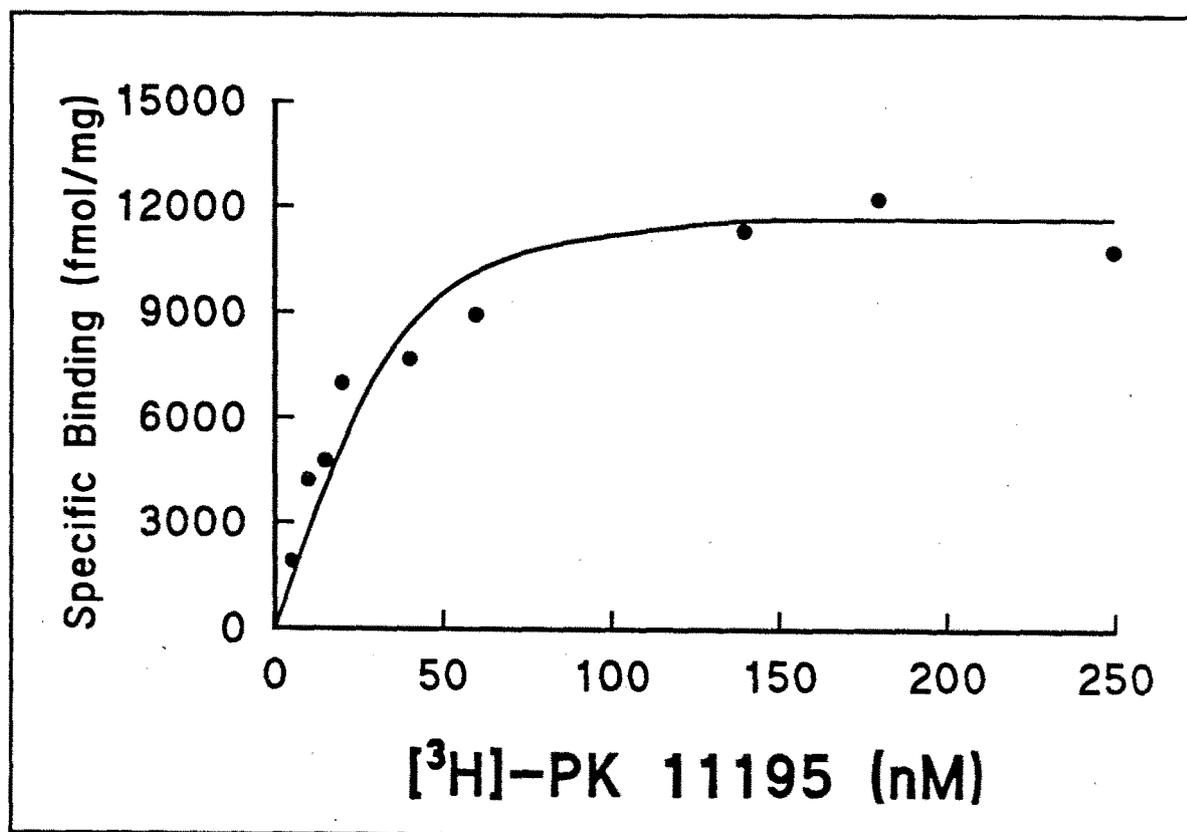


Figura 7.7.1-Representación de la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata humana.

Tabla 7.13-Unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata humana.

Concentración de [³ H]-PK 11195 (nM)	Unión Específica (fmols/mg)
5	1904 ± 69
10	4230 ± 270
15	4775 ± 578
20	7005 ± 547
40	7698 ± 686
60	8947 ± 881
140	11334 ± 908
180	12245 ± 1186
250	10760 ± 1261

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

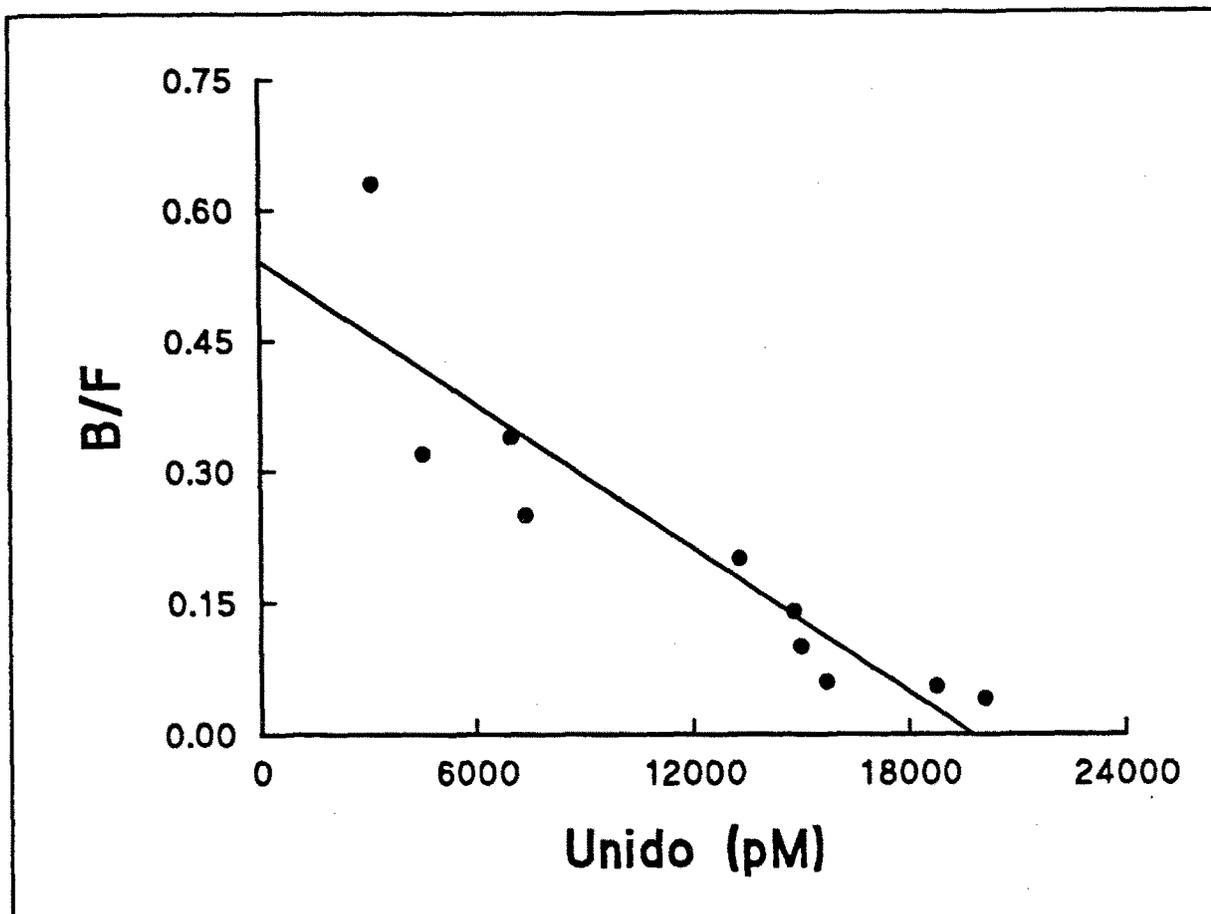


Figura 7.7.2.-Representación de Scatchard en próstata humana utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando.

Tabla 7.14.-Resultados de las experiencias de saturación realizadas en próstata humana utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias realizadas por separado \pm E.E.M.

K_D	B_{\max}	n_H
14.6 ± 5.6	12.155 ± 1.3	0.98 ± 0.01

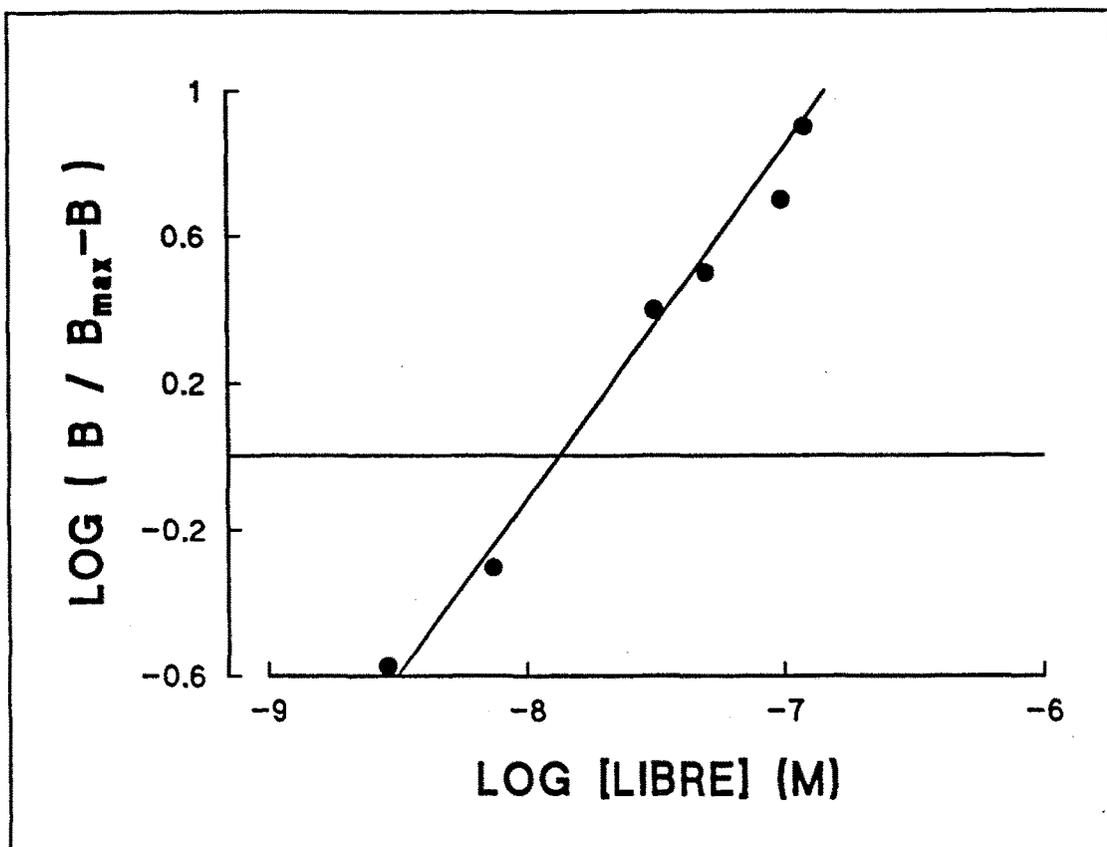


Figura 7.7.3.- Representación de Hill próstata humana utilizando [^3H]-PK 11195 como radioligando.

7.8.-Estudios cinéticos

En la interacción de tipo bimolecular que se ha descrito anteriormente, la k_1 representa la constante de asociación mientras que la k_2 representa la constante de disociación. Las formulas que permiten la obtención de estas constantes se describen a continuación.

La formación del complejo [*FR] respecto al tiempo se puede expresar como:

$$(1) \quad \frac{d[*FR]}{dt} = k_1 [*F] [R] - k_2 [FR]$$

En el equilibrio, la cantidad del complejo que se forma es la misma que se disocia. Por lo tanto, $d[*FR] / dt = 0$.

Se considera que en las condiciones de incubación, [*F] es mucho mayor que [R]. De esta forma, [*F] no varía mientras que [R] si lo hace a medida que se forma más [FR]. Luego, se puede considerar que la reacción que se lleva a cabo es de pseudo primer orden. Se denomina k_1' a la constante de pseudo primer orden ($k_1' = k_1 [*F]$).

También se cumple que $[R] = [R_{TOT}] - [FR]$ y que la formación de *FR como ya se ha comentado, es cero.

En el equilibrio tendremos de este modo:

$$k_1' ([R_{TOT}] - [FR]) = k_2 [FR]_{eq}$$

$$K_2 = \frac{k_1' [R_{TOT}]}{[FR]_{eq}} - K_1'$$

Sustituyendo estas expresiones en la ecuación (1):

$$\frac{d[\text{FR}]}{dt} = k_1' ([R_{\text{TOT}}] - [\text{FR}]) - \left\{ k_1' \frac{[R_{\text{TOT}}]}{[\text{FR}]_{\text{eq}}} - k_1' \right\} [\text{FR}]$$

$$\frac{d[\text{FR}]}{dt} = k_1' [R_{\text{TOT}}] \frac{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}])}{[\text{DR}]_{\text{eq}}}$$

$$\frac{d[\text{FR}]}{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}])} = \frac{k_1' [R_{\text{TOT}}]}{[\text{FR}]_{\text{eq}}} dt$$

Integrando esta ecuación entre t_1 y t_2 :

$$\ln \frac{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}]_{t_1})}{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}]_{t_2})} = \frac{k_1' [R_{\text{TOT}}]}{[\text{FR}]_{\text{eq}}} (t_2 - t_1)$$

Para un valor de $t=0$:

$$\ln \frac{[\text{FR}]_{\text{eq}}}{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}]_t)} = \frac{k_1' [R_{\text{TOT}}]}{[\text{FR}]_{\text{eq}}} t$$

Como se ha indicado anteriormente:

$$k_2 + K_1 = \frac{K_1' [R_{\text{TOT}}]}{[\text{FR}]_{\text{eq}}}$$

como $k_1' = k_1 [F]$

entonces:

$$\ln \frac{[\text{FR}]_{\text{eq}}}{([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}])} = (k_2 + k_1 [\text{F}]) t$$

La constante observada (k_{obs}) se define como $(k_1 [\text{D}] + k_2) = (k_1' + k_2)$. Cuando $\ln [\text{FR}]_{\text{eq}} / ([\text{FR}]_{\text{eq}} - [\text{FR}])$ se representa respecto al tiempo, se obtiene una recta en la cual la pendiente es la K_{obs} . Sus unidades son min^{-1} . De esta manera, si conocemos la k_2 :

$$k_1 = (K_{\text{obs}} - k_2) / [*F]$$

Para determinar la k_2 es necesario que las condiciones del ensayo sean las adecuadas para que la asociación entre el radioligando y el receptor sean despreciables. Luego:

$$\frac{d[*\text{FR}]}{dt} = -k_2 [*\text{FR}]$$

$[\text{*FR}]$ es sustituible por $[\text{*F}]$. Por posteriores transformaciones se obtiene:

$$\ln \frac{[*\text{FR}]}{[*\text{FR}]_0} = -k_2 t$$

donde $[\text{*FR}]$ es la unión del radioligando a cualquier tiempo y $[\text{*FR}]_0$ es la unión al tiempo cero. La representación del $\ln [\text{*FR}] / [\text{*FR}]_0$ respecto al tiempo muestra una pendiente igual a $-k_2$. Las unidades también son min^{-1} .

En las siguientes páginas se muestran las gráficas de asociación y disociación junto con las representaciones que permiten determinar las k_{obs} y k_1 (k_2) en los trabajos realizados.

7.8.-Estudios cinéticos realizados en próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195.

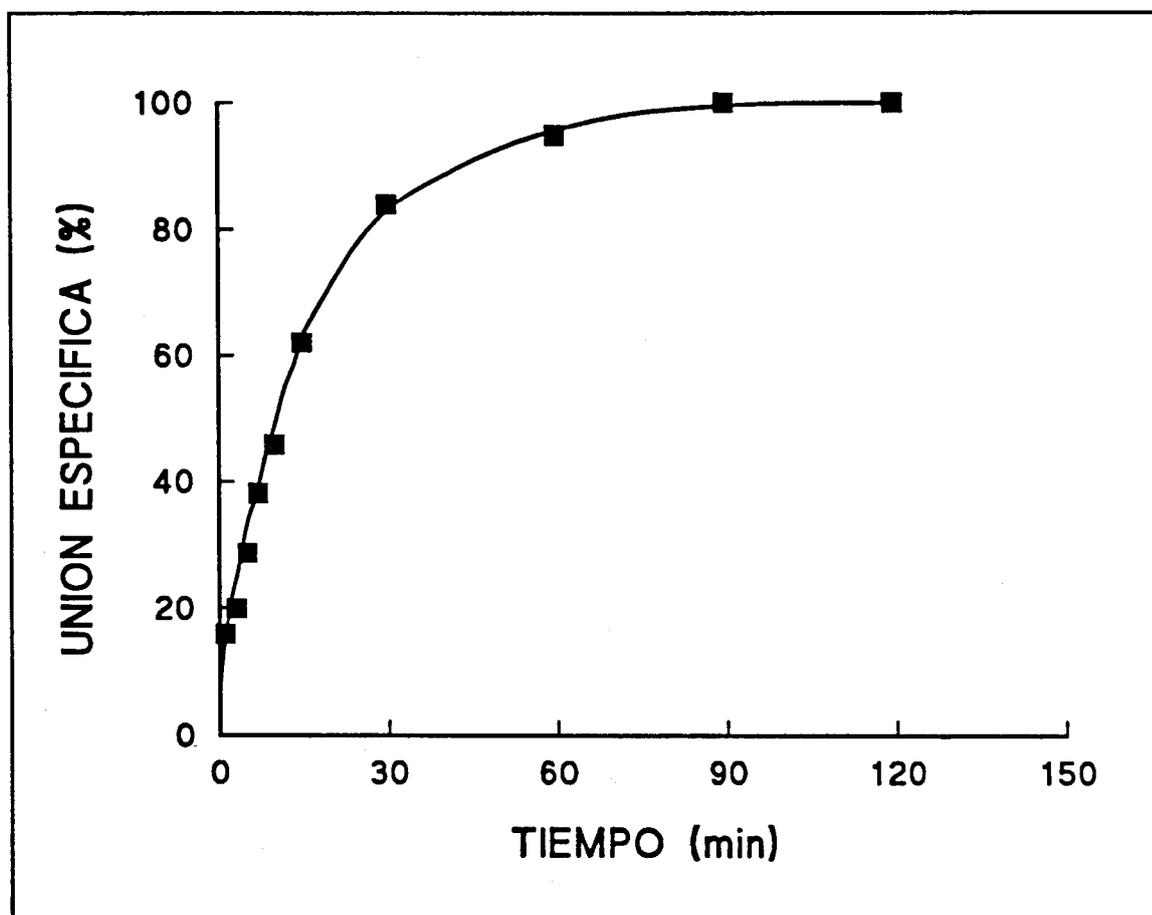


Figura 7.8.1.-Cinética de asociación en próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195.

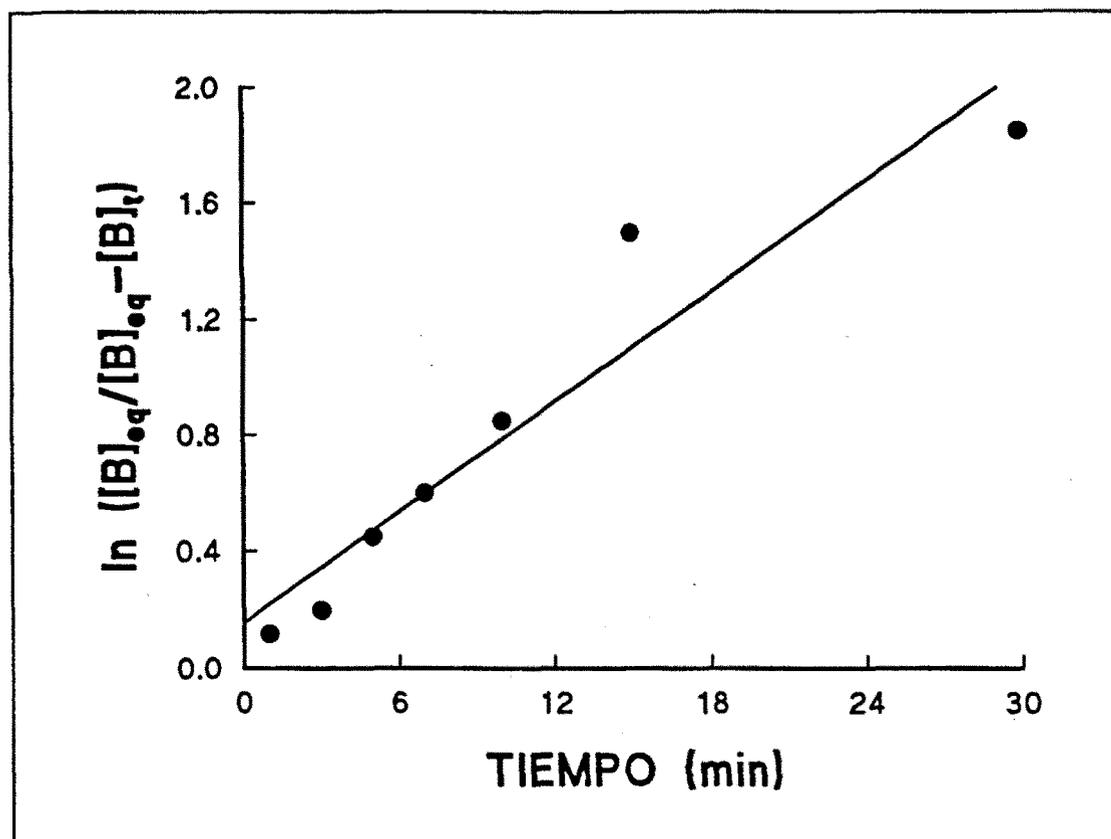


Figura 7.8.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del $[^3\text{H}]$ -PK 11195 en próstata de rata.

Tabla 7.15.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en próstata de rata utilizando $[^3\text{H}]$ -PK 11195 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

k_{obs} (min^{-1})	k_{-1} (min^{-1})	k_{+1} ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	K_D (nM)
0.059 ± 0.014	0.0051 ± 0.0008	$5.44 \pm 1.4 \cdot 10^7$	0.11 ± 0.005

Tabla 7.16.-Estudios cinéticos de asociación realizados en próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
1	16 ± 3
3	20 ± 2
5	28 ± 7
7	38 ± 3
10	45 ± 4
15	62 ± 5
30	83 ± 6
60	94 ± 4
90	100 ± 5
120	100 ± 2

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

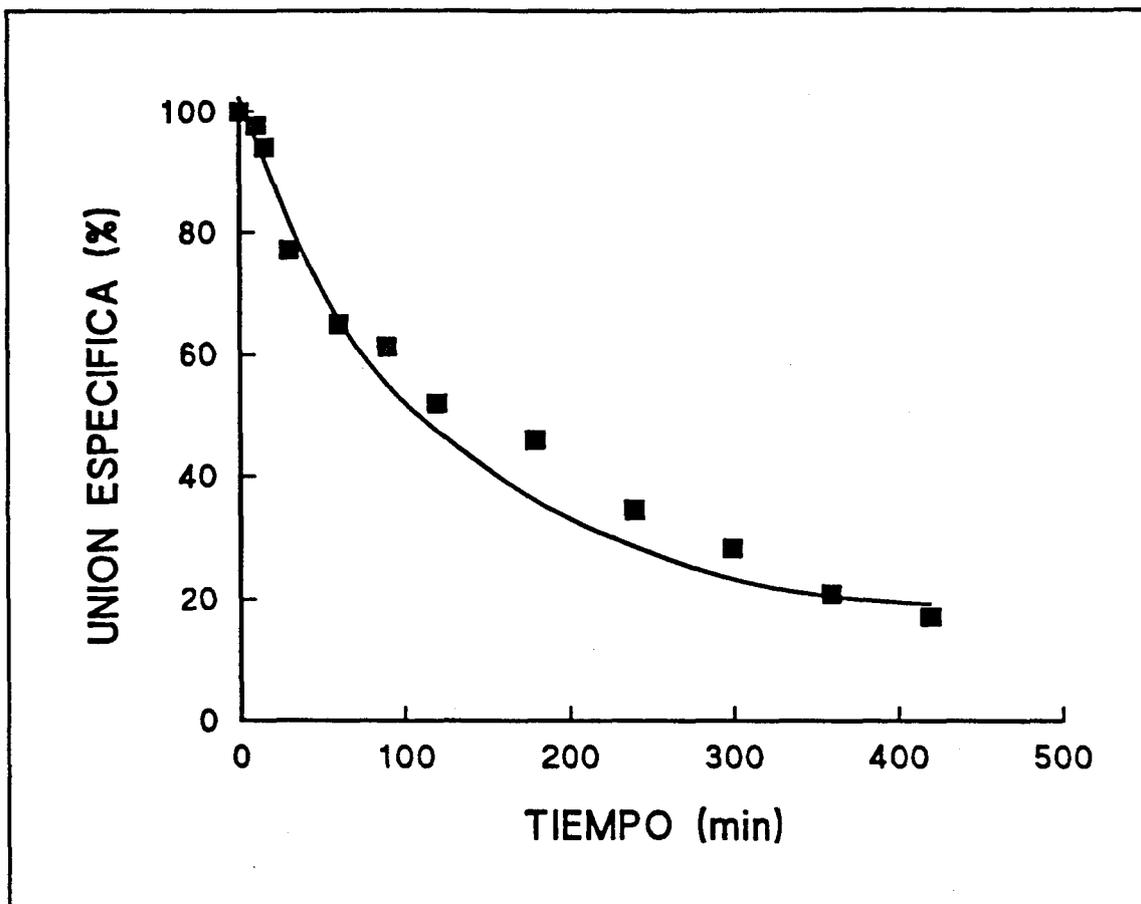


Figura 7.8.3.-Cinética de disociación en próstata de rata utilizando [3H]-PK 11195 como radioligando.

Tabla 7.17.-Estudios cinéticos de disociación realizados en próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
5	97 ± 2
10	94 ± 7
15	77 ± 4
30	65 ± 2
60	61 ± 3
90	52 ± 3
120	46 ± 6
180	34 ± 3
240	28 ± 2
270	20 ± 4
300	17 ± 1
360	10 ± 3

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

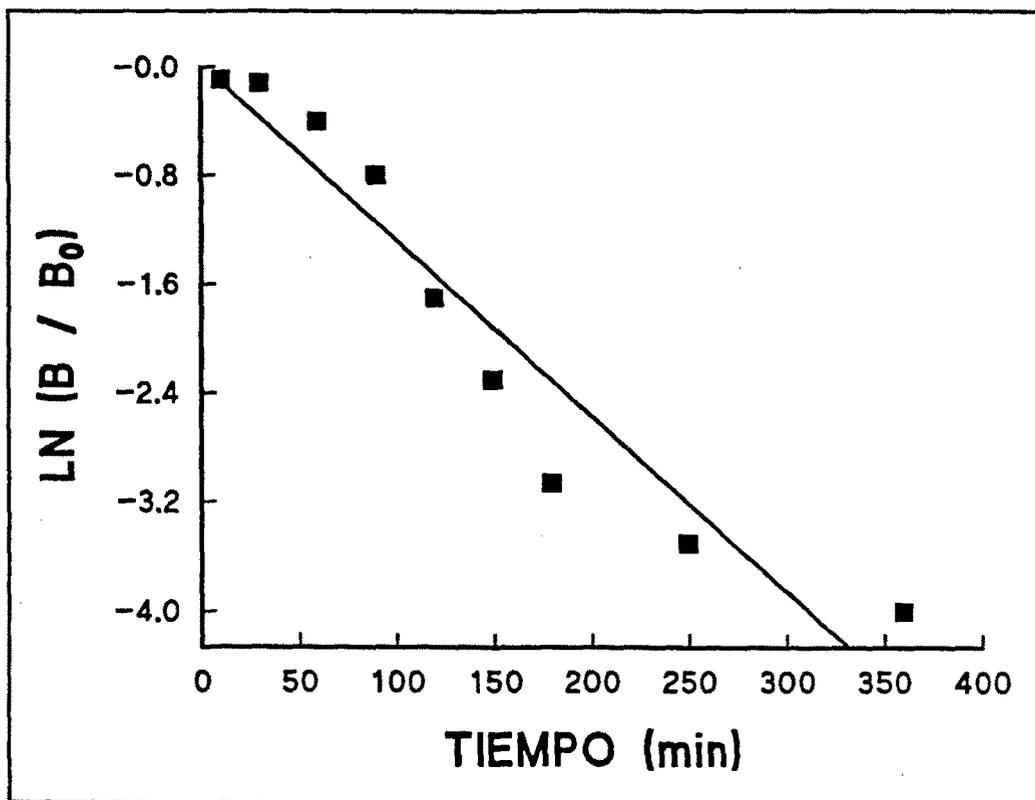


Figura 7.8.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195 como radioligando

7.9.-Estudios cinéticos realizados en próstata de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864.

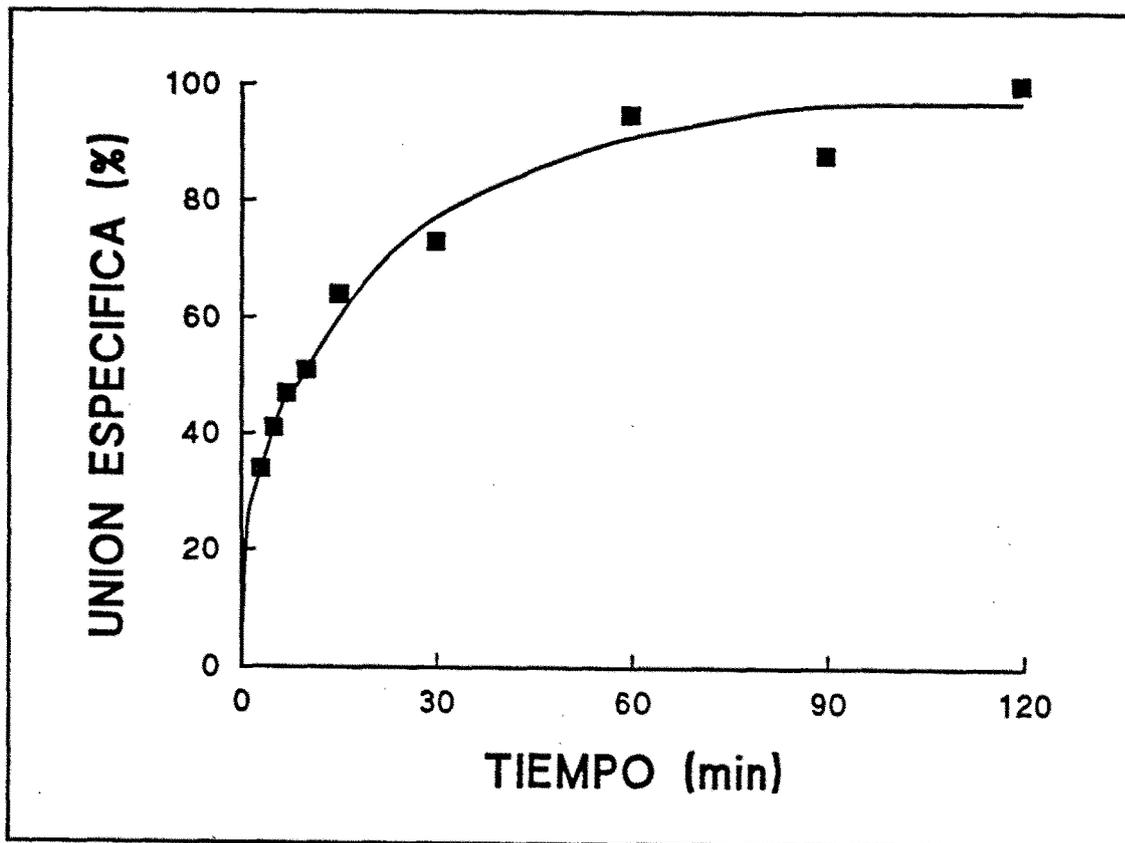


Figura 7.9.1.-Cinética de asociación en próstata de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864.

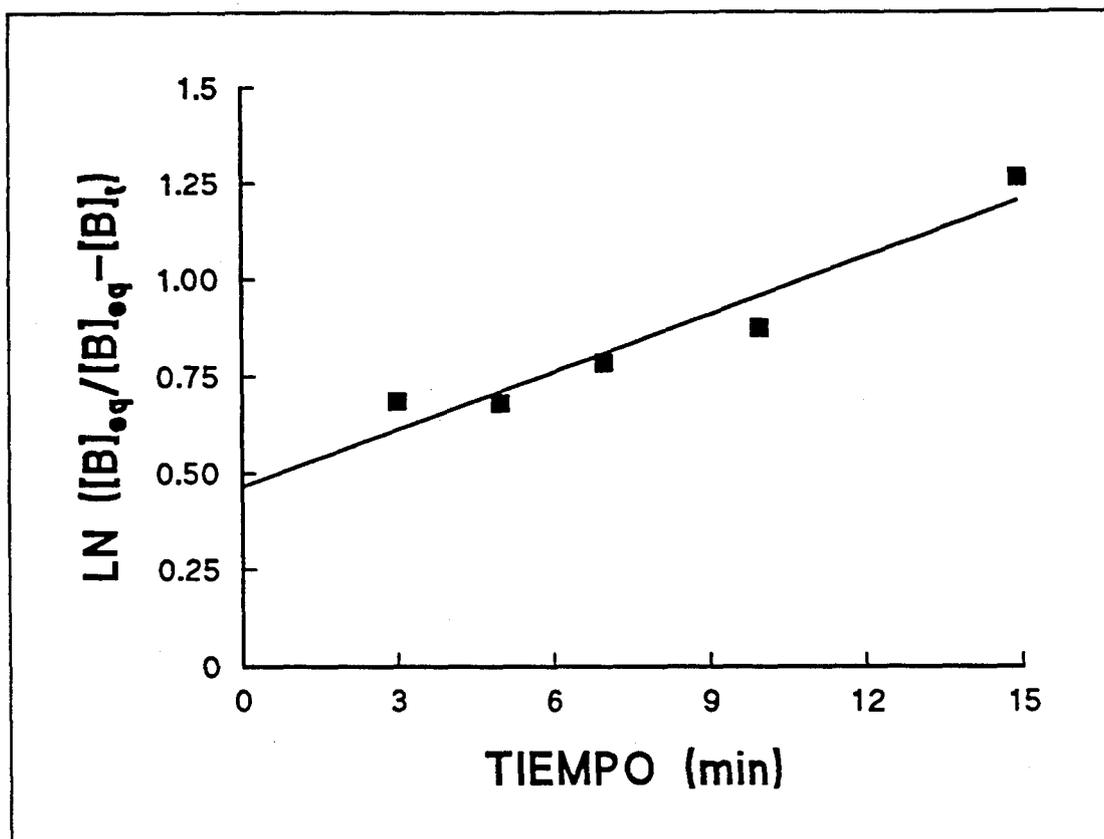


Figura 7.9.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del $[^3\text{H}]\text{-Ro 5-4864}$ en próstata de rata.

Tabla 7.18.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en próstata de rata utilizando $[^3\text{H}]\text{-Ro 5-4864}$ como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

k_{obs} (min^{-1})	k_1 (min^{-1})	k_{+1} ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	K_D (nM)
0.052 ± 0.016	0.025 ± 0.001	$1.30 \pm 0.78 \cdot 10^7$	3.34 ± 1.24

Tabla 7.19.-Estudios cinéticos de asociación realizados en próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
3	25 ± 1
5	31 ± 3
7	39 ± 1
10	42 ± 3
15	71 ± 5
30	76 ± 4
60	100 ± 8
90	98 ± 6
120	99 ± 4

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

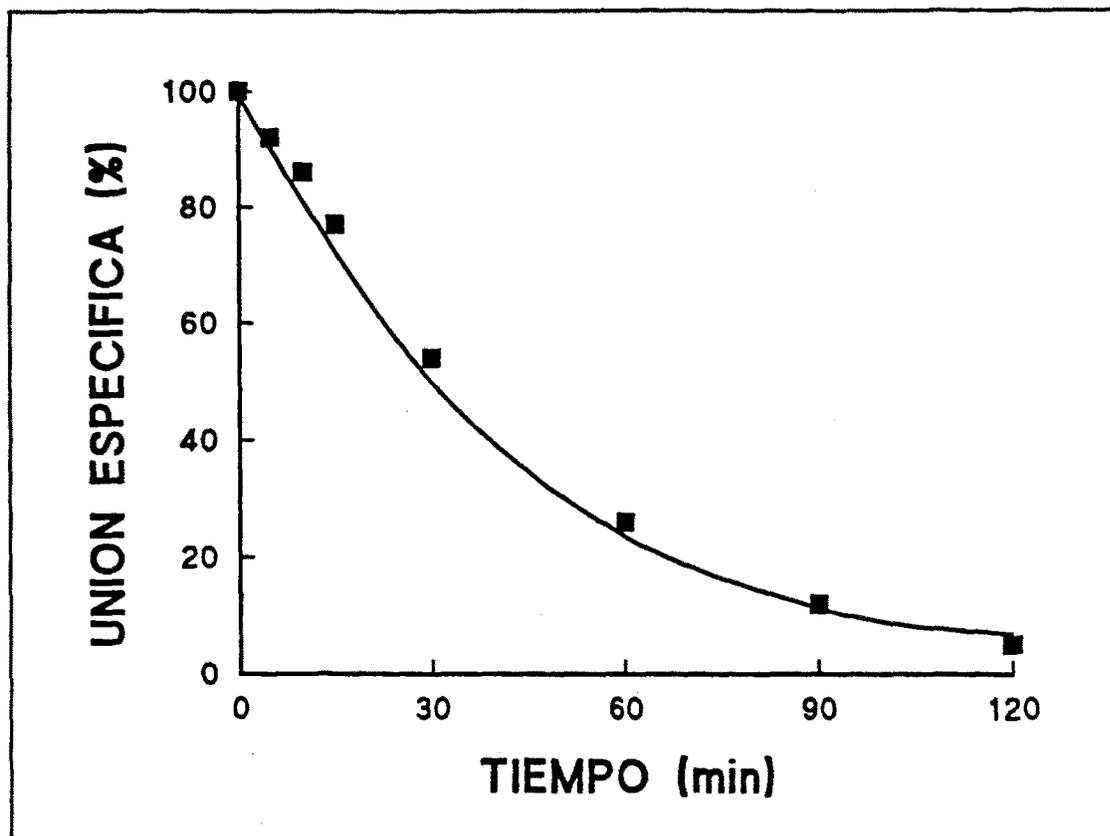


Figura 7.9.3.-Cinética de disociación en próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.20.- Estudios cinéticos de disociación realizados en próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
5	89 ± 3
10	80 ± 2
15	70 ± 3
30	49 ± 3
60	24 ± 1
90	12 ± 2
120	5 ± 1

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

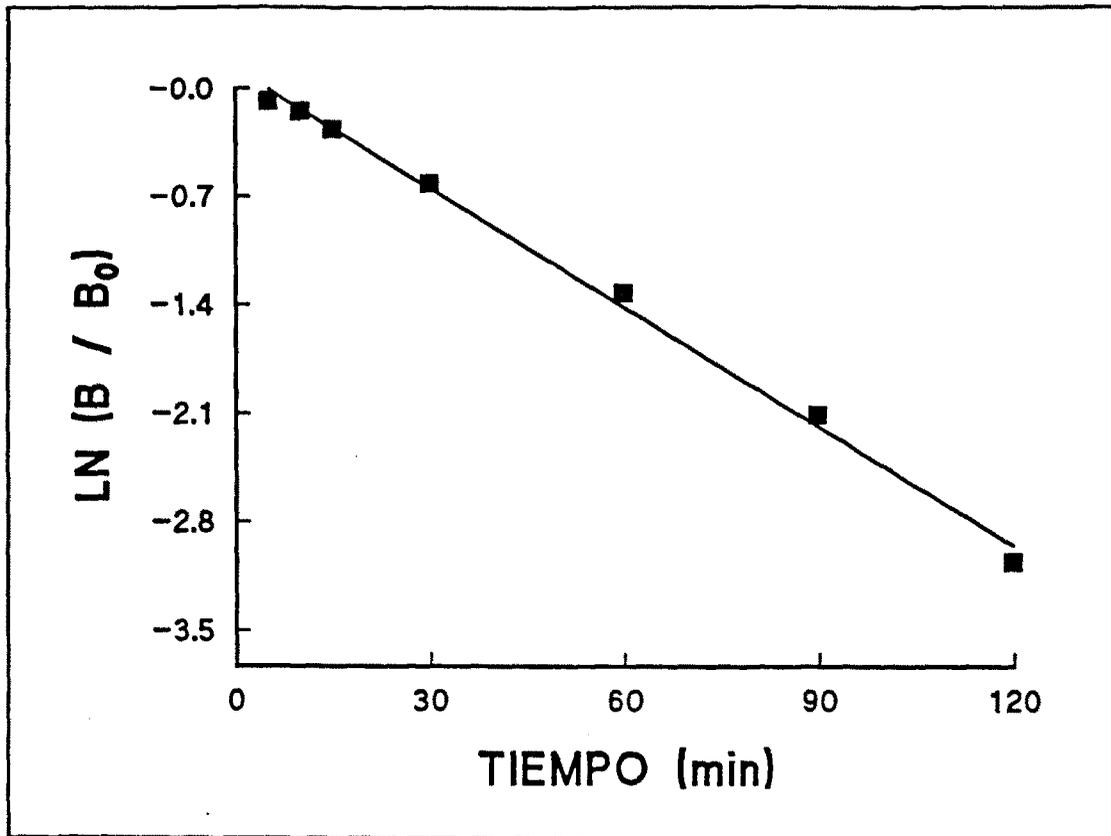


Figura 7.9.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando

7.10.-Estudios cinéticos realizados en vesícula seminal de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864.

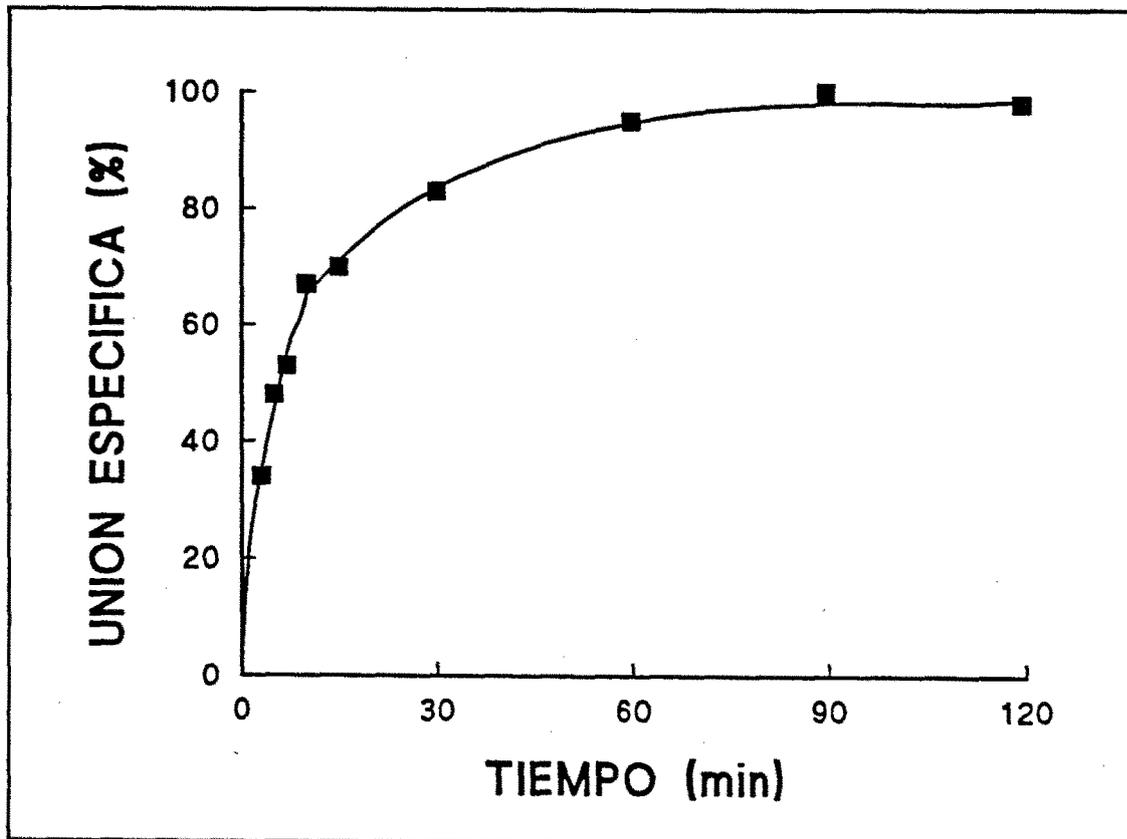


Figura 7.10.1.-Cinética de asociación en vesícula seminal de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864.

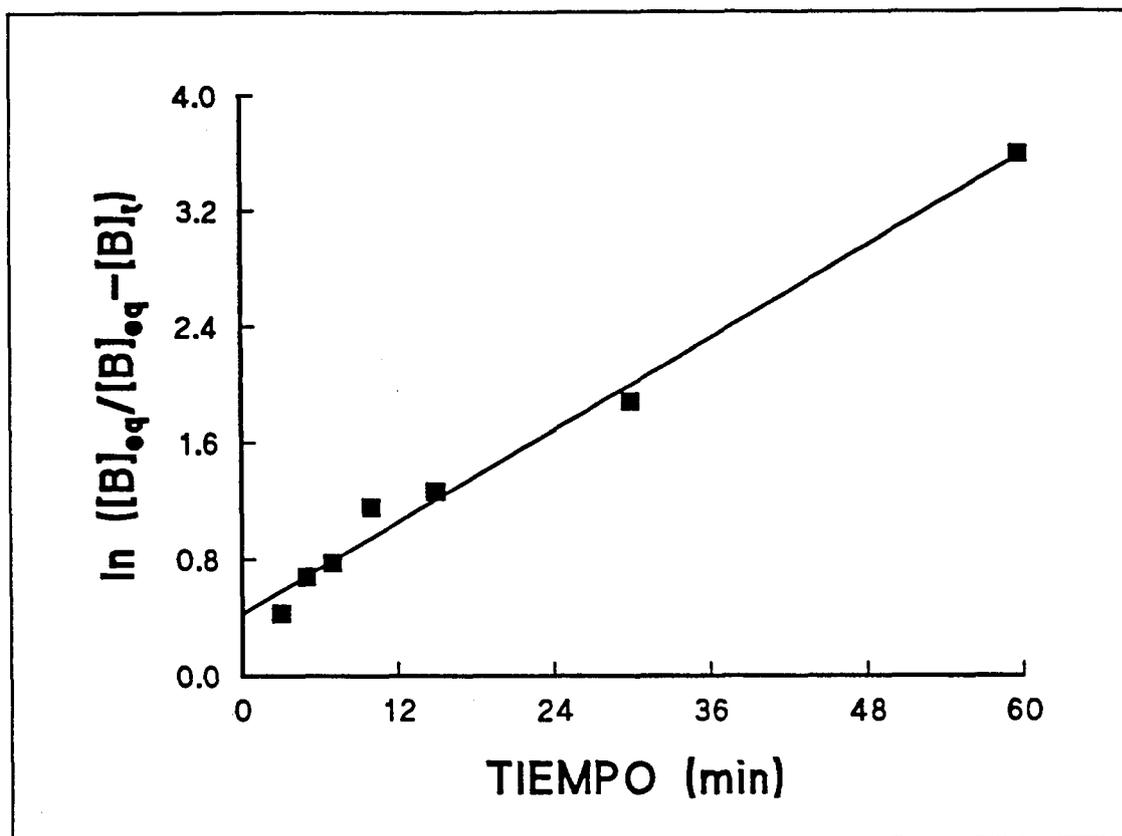


Figura 7.10.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del [³H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.

Tabla 7.21.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en vesícula seminal de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

k_{obs} (min ⁻¹)	k_{-1} (min ⁻¹)	k_{+1} (min ⁻¹ M ⁻¹)	K_D (nM)
0.032 ± 0.008	0.021 ± 0.003	5.50 ± 2.80 10 ⁷	6.48 ± 2.85

Tabla 7.22.- Estudios cinéticos de asociación realizados en vesícula seminal de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
3	40 ± 2
5	55 ± 4
7	56 ± 1
10	75 ± 7
15	76 ± 3
30	89 ± 5
60	97 ± 10
90	100 ± 8
120	99 ± 4

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

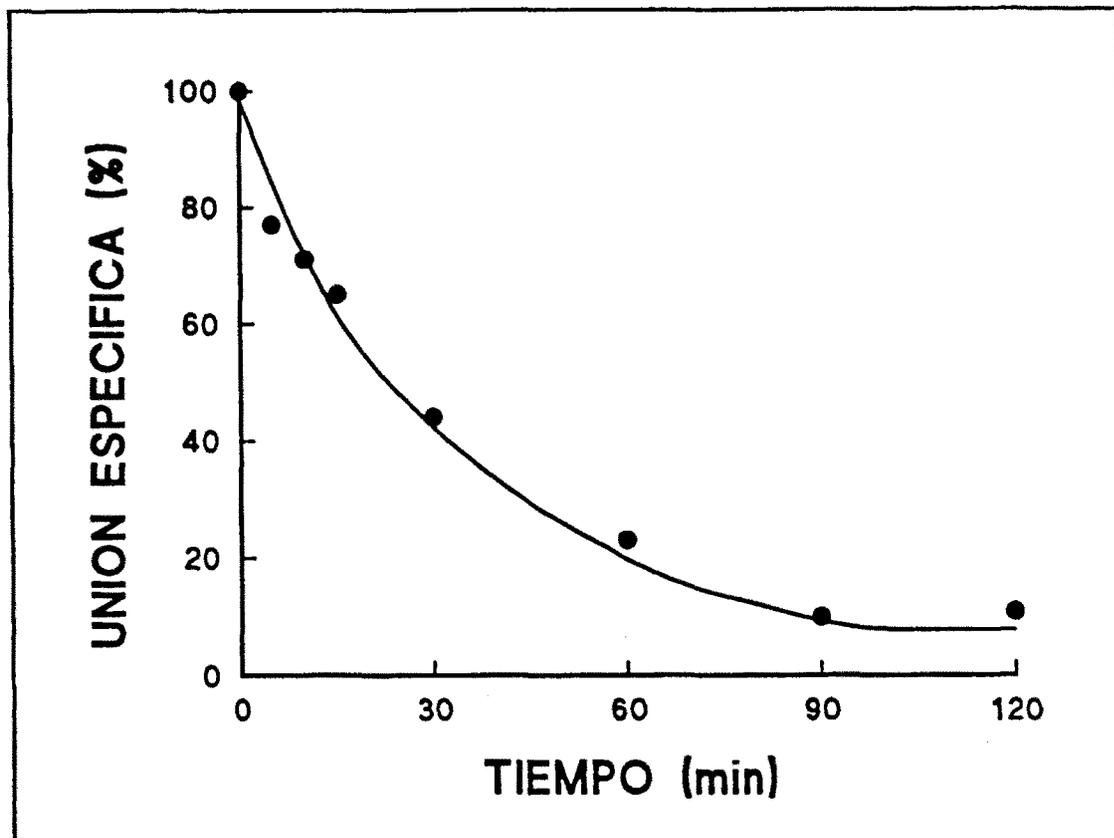


Figura 7.10.3.-Cinética de disociación en vesícula seminal de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.23.-Estudios cinéticos de disociación realizados en vesícula seminal de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
5	77 ± 5
10	76 ± 2
15	64 ± 4
30	42 ± 3
60	28 ± 2
90	12 ± 1
120	5 ± 1

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

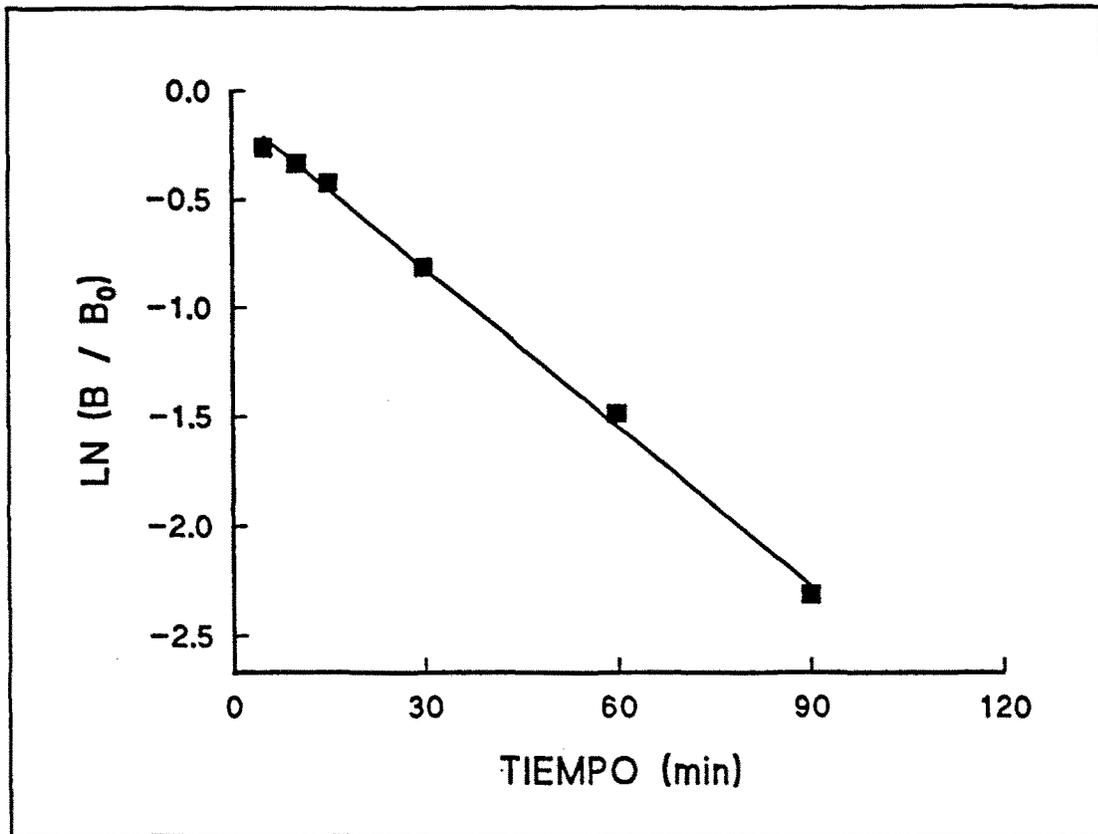


Figura 7.10.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación vesícula seminal de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

7.11.-Estudios cinéticos realizados en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

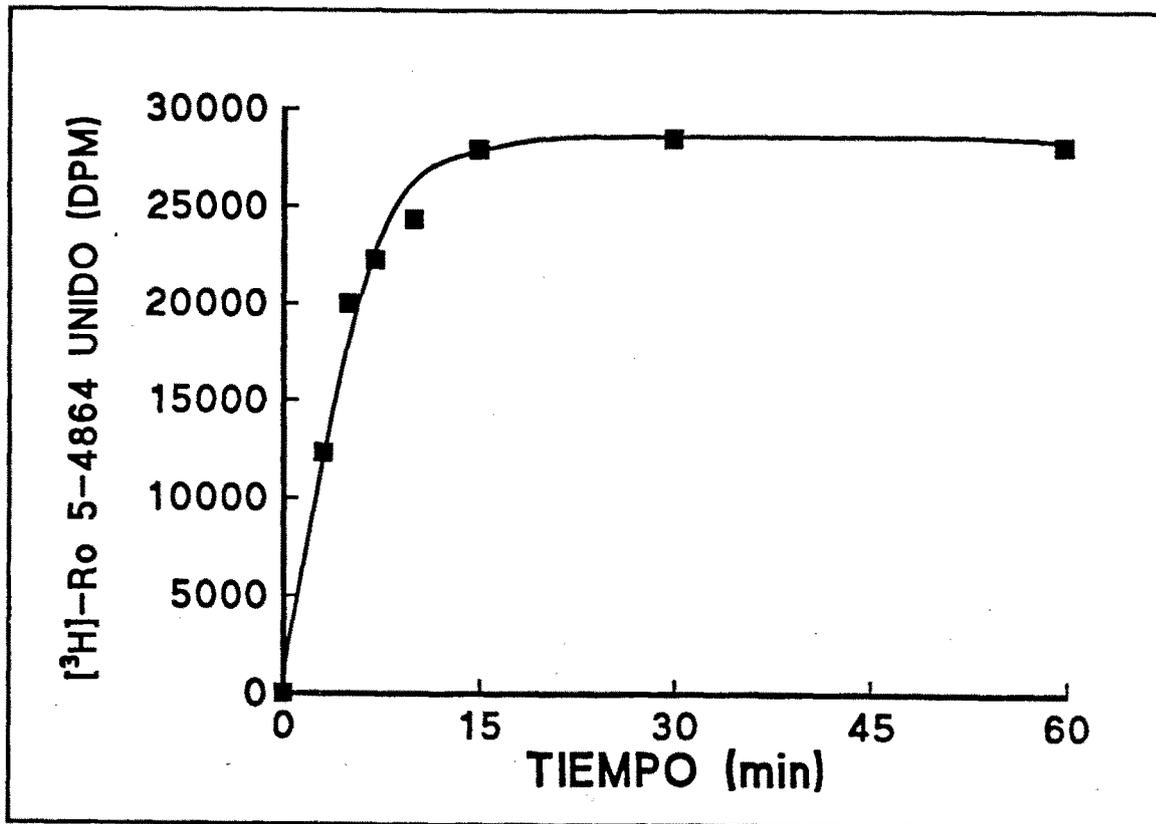


Figura 7.11.1.-Cinética de asociación en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

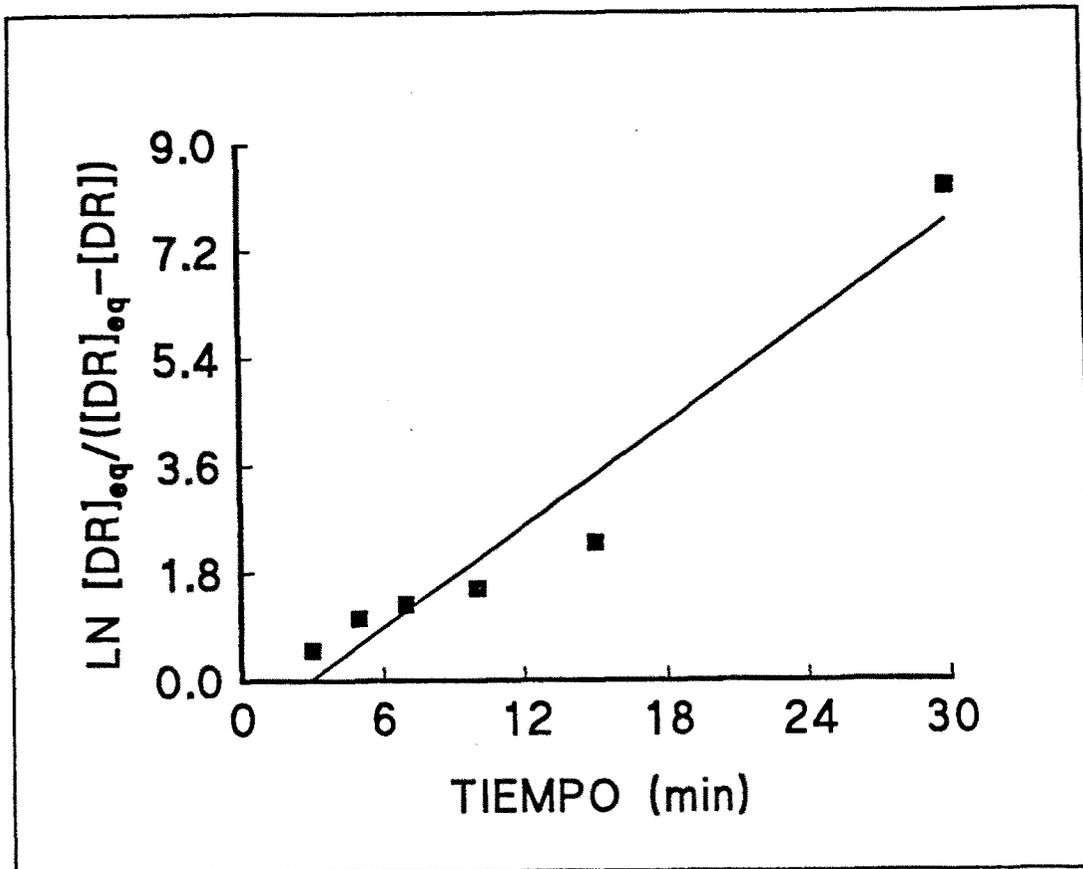


Figura 7.11.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del [³H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.

Tabla 7.24.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

k_{obs} (min ⁻¹)	k_1 (min ⁻¹)	k_{+1} (min ⁻¹ M ⁻¹)	K_D (nM)
0.203 \pm 0.002	0.021 \pm 0.003	8.70 \pm 0.70 10 ⁷	0.37 \pm 0.02

Tabla 7.25.-Estudios cinéticos de asociación realizados en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (DPM)
3	12330 ± 1530
5	20015 ± 1718
7	22254 ± 1631
10	24353 ± 1815
15	27911 ± 1917
30	30992 ± 2181
60	28114 ± 1757
90	28220 ± 1651
120	29026 ± 1312

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

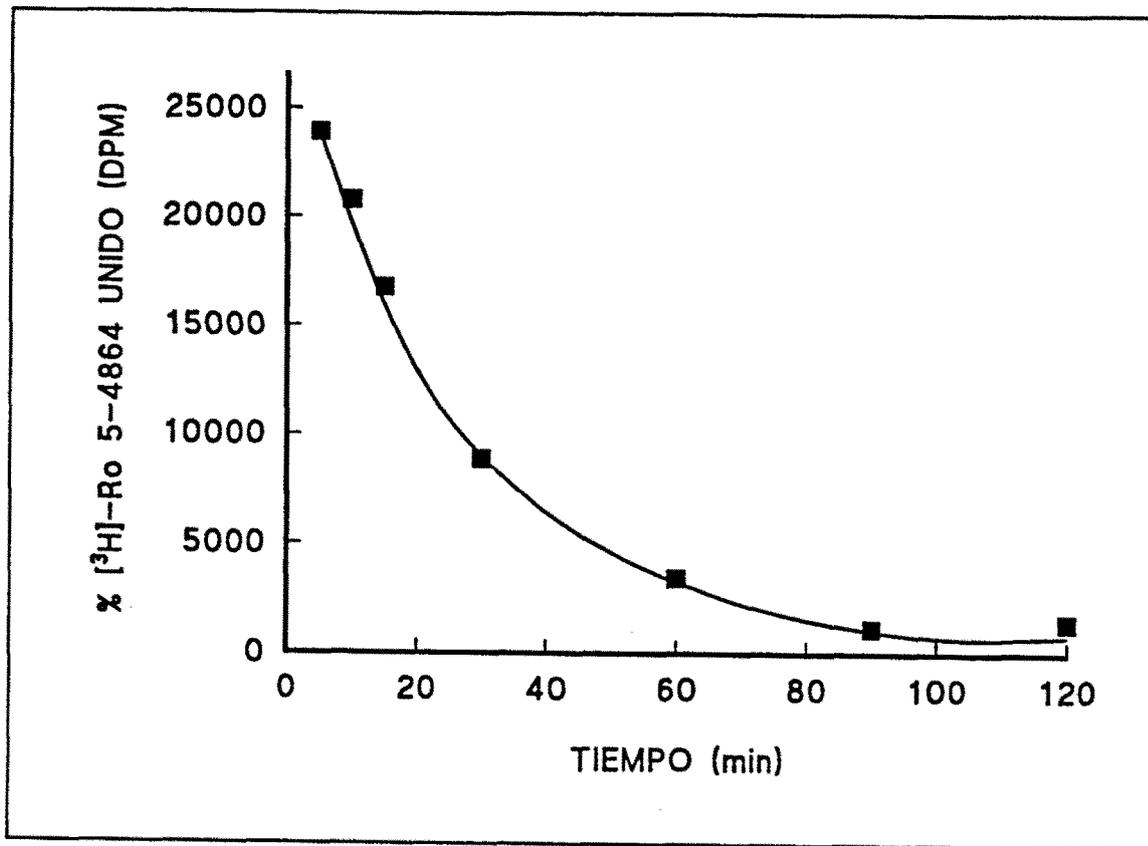


Figura 7.11.3.-Cinética de disociación en conducto deferente de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.26.-Estudios cinéticos de disociación realizados en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (DPM)
5	23918 ± 896
10	20796 ± 715
15	16796 ± 517
30	8869 ± 376
60	3447 ± 175
90	1169 ± 150
120	1447 ± 182

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

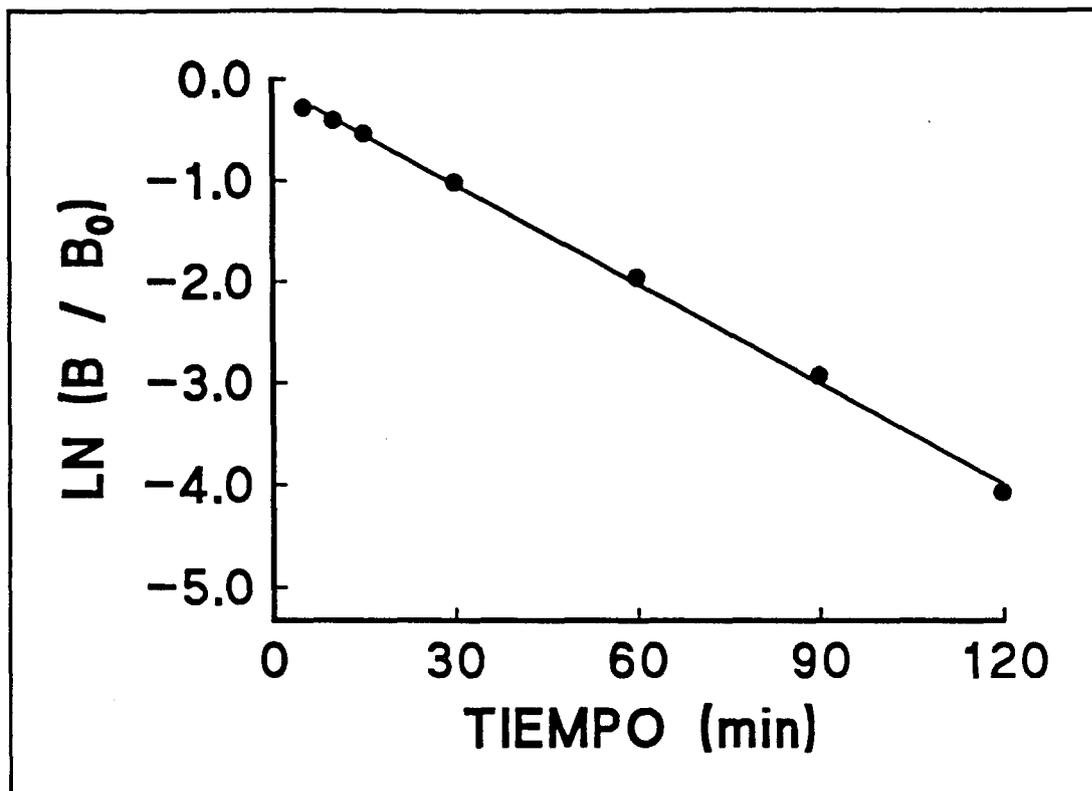


Figura 7.11.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

7.12.-Estudios cinéticos realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195.

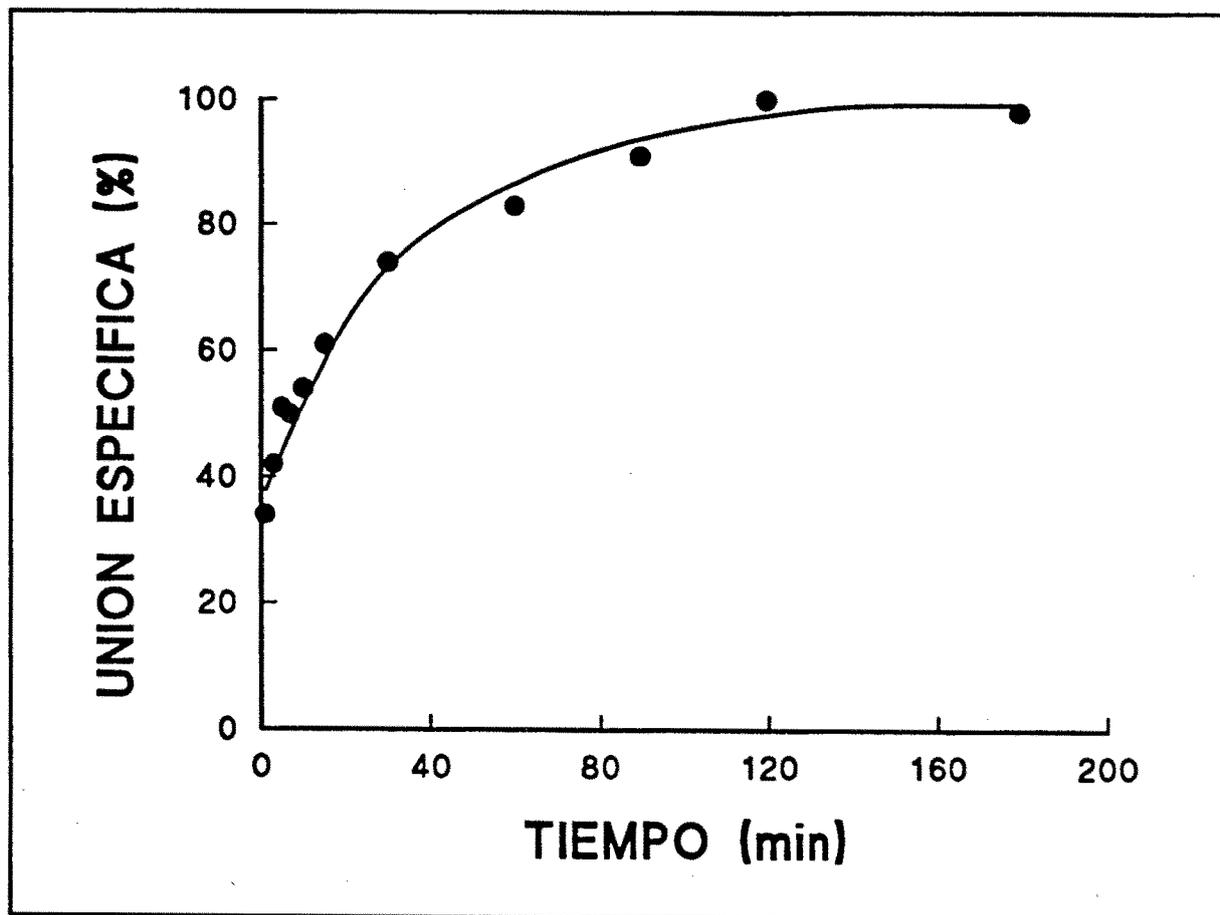


Figura 7.12.1.-Cinética de asociación en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195.

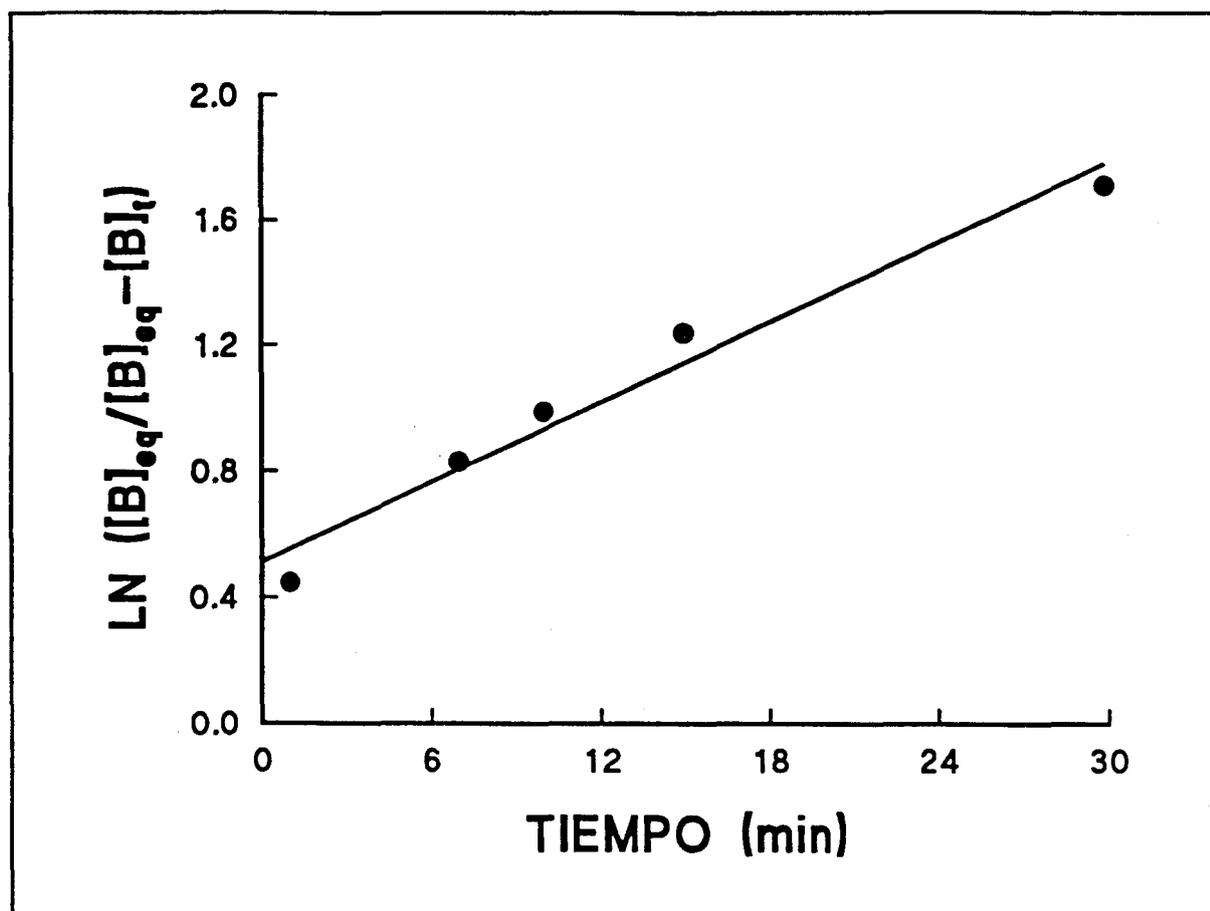


Figura 7.12.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del [³H]-PK 11195 en adenoma de próstata.

Tabla 7.27.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

k_{obs} (min ⁻¹)	k_{-1} (min ⁻¹)	k_{+1} (min ⁻¹ M ⁻¹)	K_D (nM)
0.028 ± 0.003	0.064 ± 0.002	10.61 ± 1.56 10 ⁶	0.62 ± 0.072

Tabla 7.28.-Estudios cinéticos de asociación realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
1	34 ± 4
3	42 ± 6
5	51 ± 3
7	50 ± 2
10	54 ± 3
15	61 ± 4
30	74 ± 6
60	83 ± 3
90	91 ± 5
120	100 ± 4

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

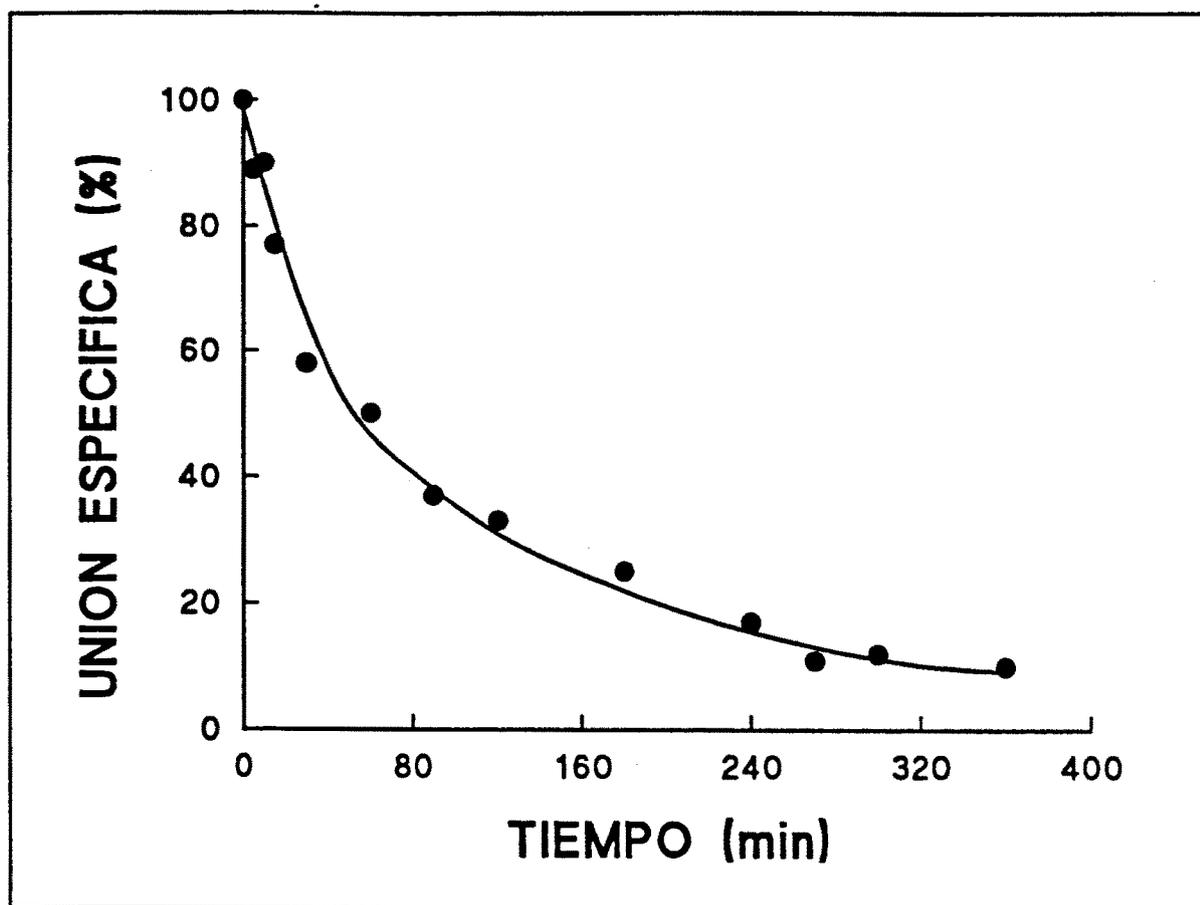


Figura 7.12.3.-Cinética de disociación en adenoma de próstata utilizando [3 H]-PK 11195 como radioligando.

Tabla 7.29.-Estudios cinéticos de disociación realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
5	89 ± 5
10	90 ± 3
15	77 ± 5
30	58 ± 2
60	50 ± 4
90	37 ± 3
120	33 ± 4
180	25 ± 6
240	17 ± 2
270	11 ± 4
300	12 ± 1
360	10 ± 3

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

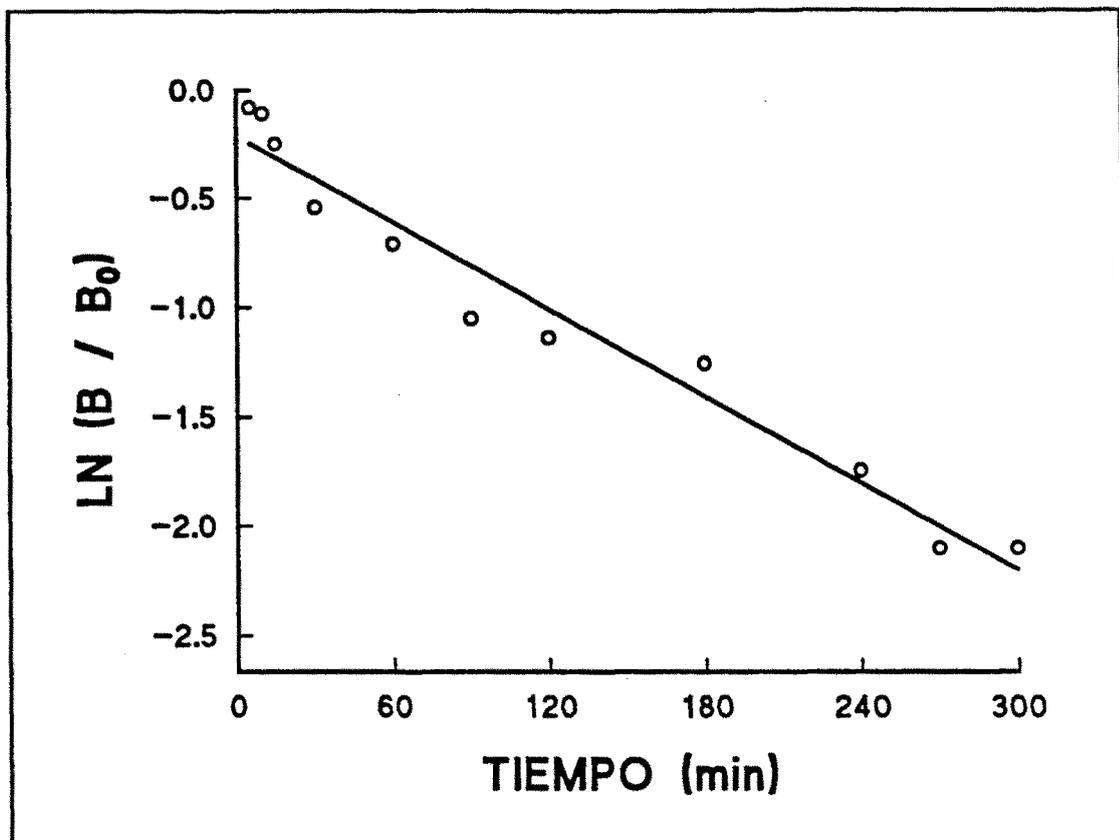


Figura 7.12.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación en adenoma de próstata utilizando [^3H]-PK 11195 como radioligando.

7.13.-Estudios cinéticos realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

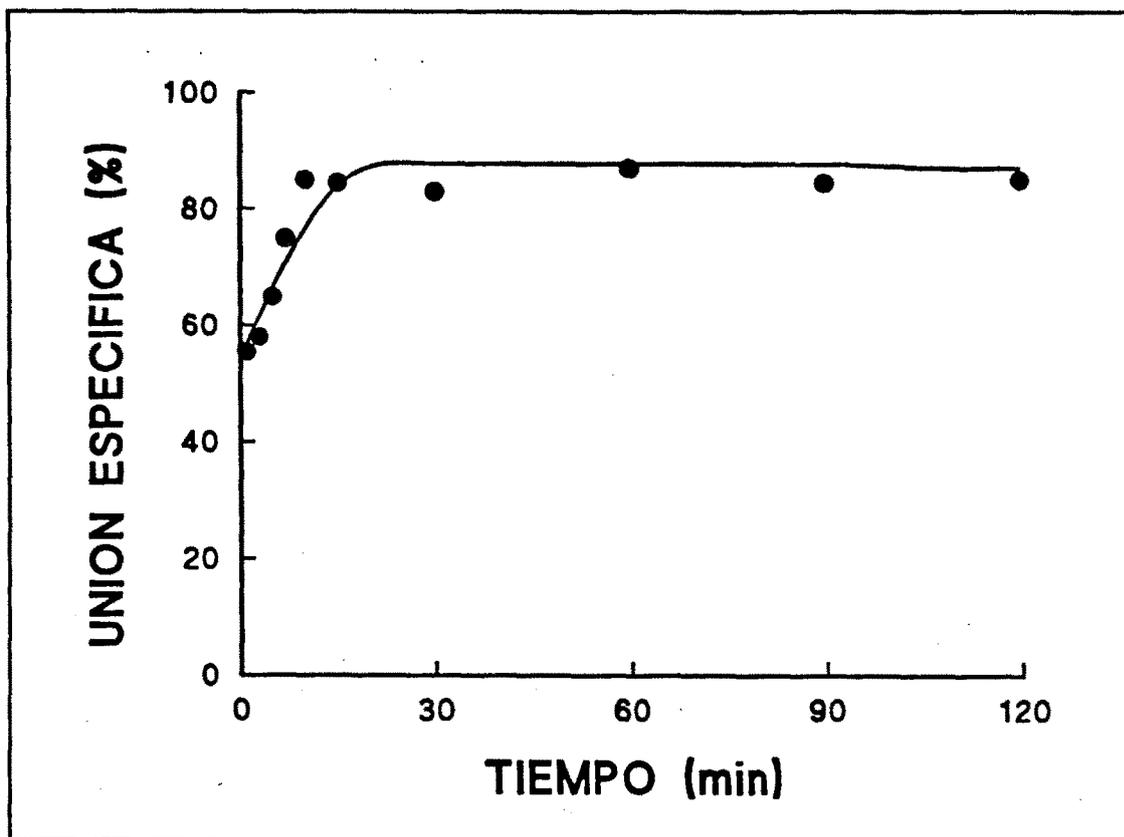


Figura 7.13.1.-Cinética de asociación en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

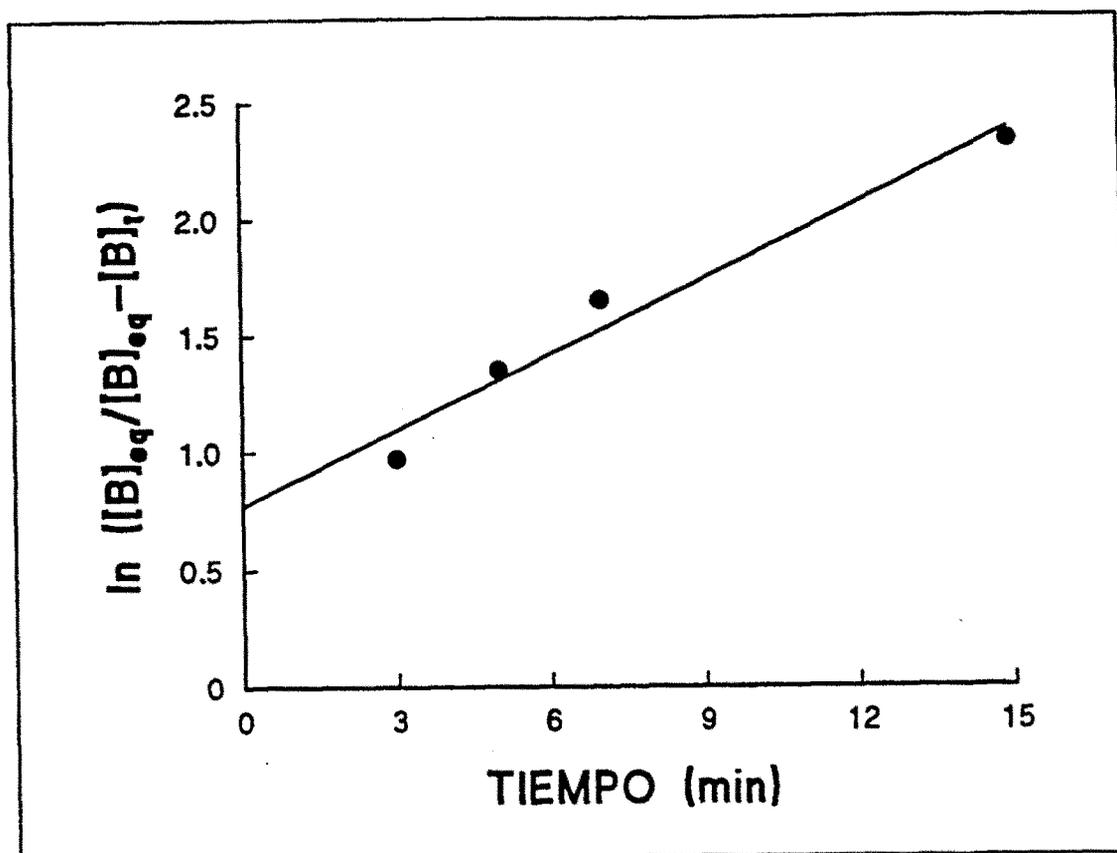


Figura 7.13.2.-Representación logarítmica de la cinética de asociación del [³H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata.

Tabla 7.30.-Resultados de los ensayos cinéticos de asociación en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando. Los resultados son la media de tres experiencias \pm E.E.M.

k_{obs} (min ⁻¹)	k_{-1} (min ⁻¹)	k_{+1} (min ⁻¹ M ⁻¹)
0.86 \pm 0.17	0.025 \pm 0.002	10.57 \pm 2.20 ⁷

Tabla 7.31.-Estudios cinéticos de asociación realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
1	55 ± 6
3	58 ± 7
5	65 ± 4
7	75 ± 8
10	85 ± 4
15	95 ± 9
30	100 ± 7
60	98 ± 6
90	100 ± 5
120	97 ± 4

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado ± EEM

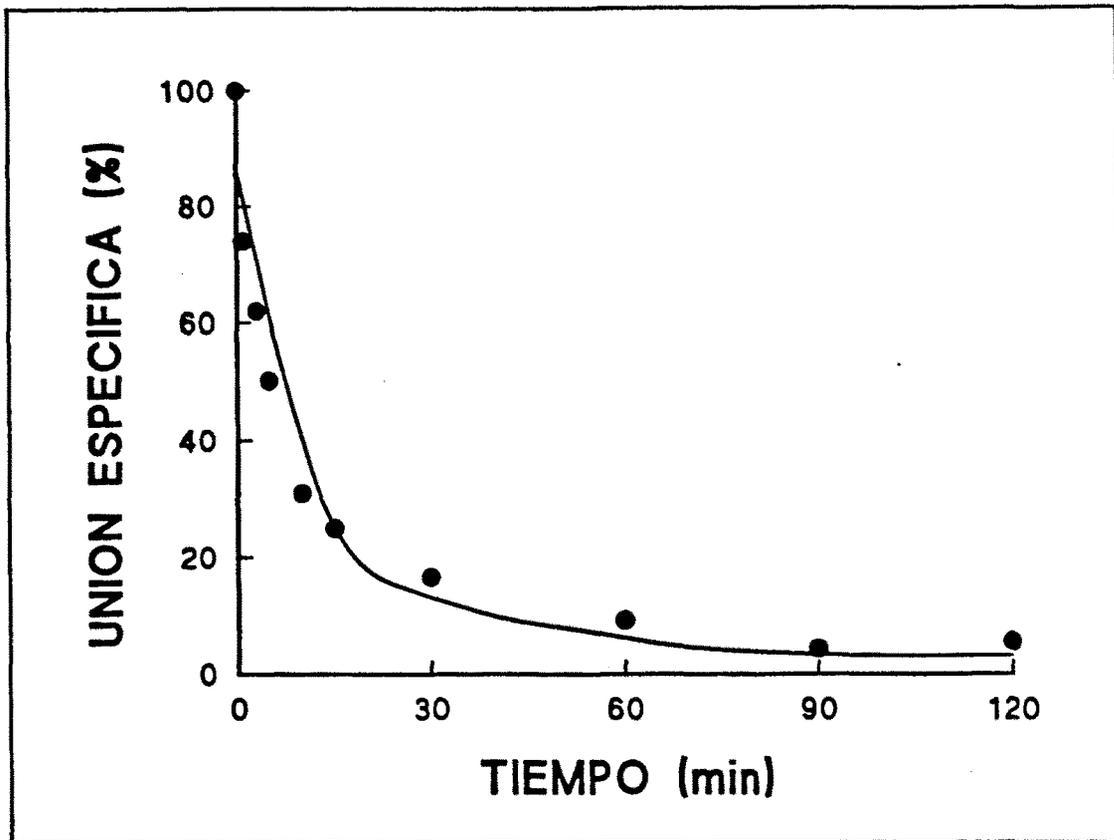


Figura 7.13.3.-Cinética de disociación en adenoma de próstata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 como radioligando.

Tabla 7.31.-Estudios cinéticos de disociación realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864.

Tiempo (min)	Unión Específica (%)
1	74
3	62
5	50
10	31
15	25
30	16
60	9
90	4
120	5

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por separado \pm EEM

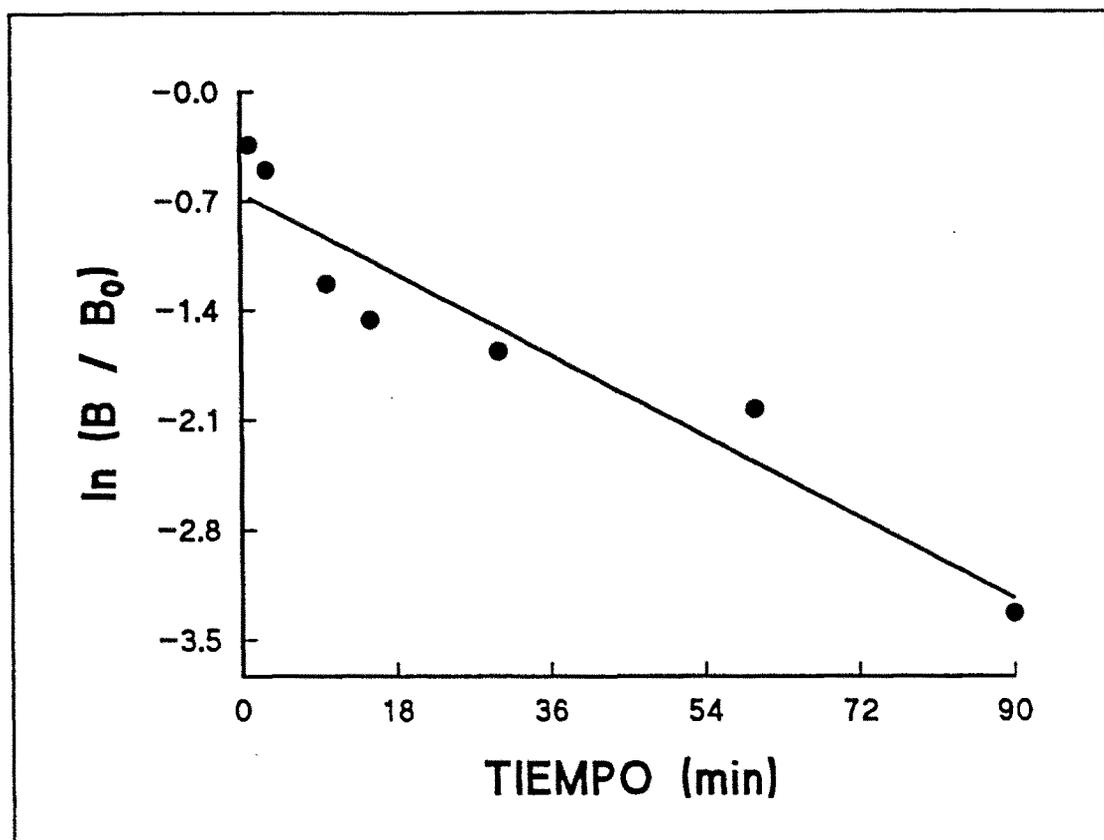


Figura 7.13.4.-Representación logarítmica de la cinética de disociación en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864 como radioligando.

7.14.-Estudios de desplazamiento

En este estudio determinamos cual es la capacidad de las diferentes sustancias de competir con el radioligando por el receptor que estamos estudiando. El parametro que determinamos en este estudio es la CI_{50} que corresponde a la concentración de fármaco competidor que disminuye la mitad de la unión del radioligando al receptor. En la sección de material y métodos ya se ha explicado que se obtiene una gráfica que permite observar la disminución de la unión específica en función de la concentración de fármaco competidor. La CI_{50} se calcula a partir de programas de regresión no lineal. También suele utilizarse en los estudios de competición el valor de la K_i que representa la afinidad de la sustancia competidora (o desplazante para el receptor de estudio). El valor de la K_i se calcula a partir de la ecuación de Cheng y Prusoff:

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\left(1 + \frac{[*F]}{K_D}\right)}$$

Las curvas de desplazamiento también son analizadas por la representación de Hill. Este coeficiente se obtiene representando $[\% B_{max} / (100\% - \%B_{max})]$ frente a la concentración de fármaco desplazante. La B_{max} representa la unión del radioligando al receptor en ausencia de desplazante y el radioligando unido al receptor en presencia de desplazante se representa como $\%B_{max}$. El coeficiente de Hill calculado a partir de la pendiente de esta representación si es igual a 1, implica un desplazamiento competitivo. Valores del coeficiente estadísticamente significativos distintos de la unidad indican una cooperatividad negativa o bien la presencia de más de un lugar de unión.

En las siguientes páginas se representan las curvas de desplazamiento con los valores de CI_{50} conjuntamente con los valores del coeficiente de Hill.

7.14.-Estudios de desplazamiento realizados con [^3H]-PK 11195 en próstata de rata.

7.14.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

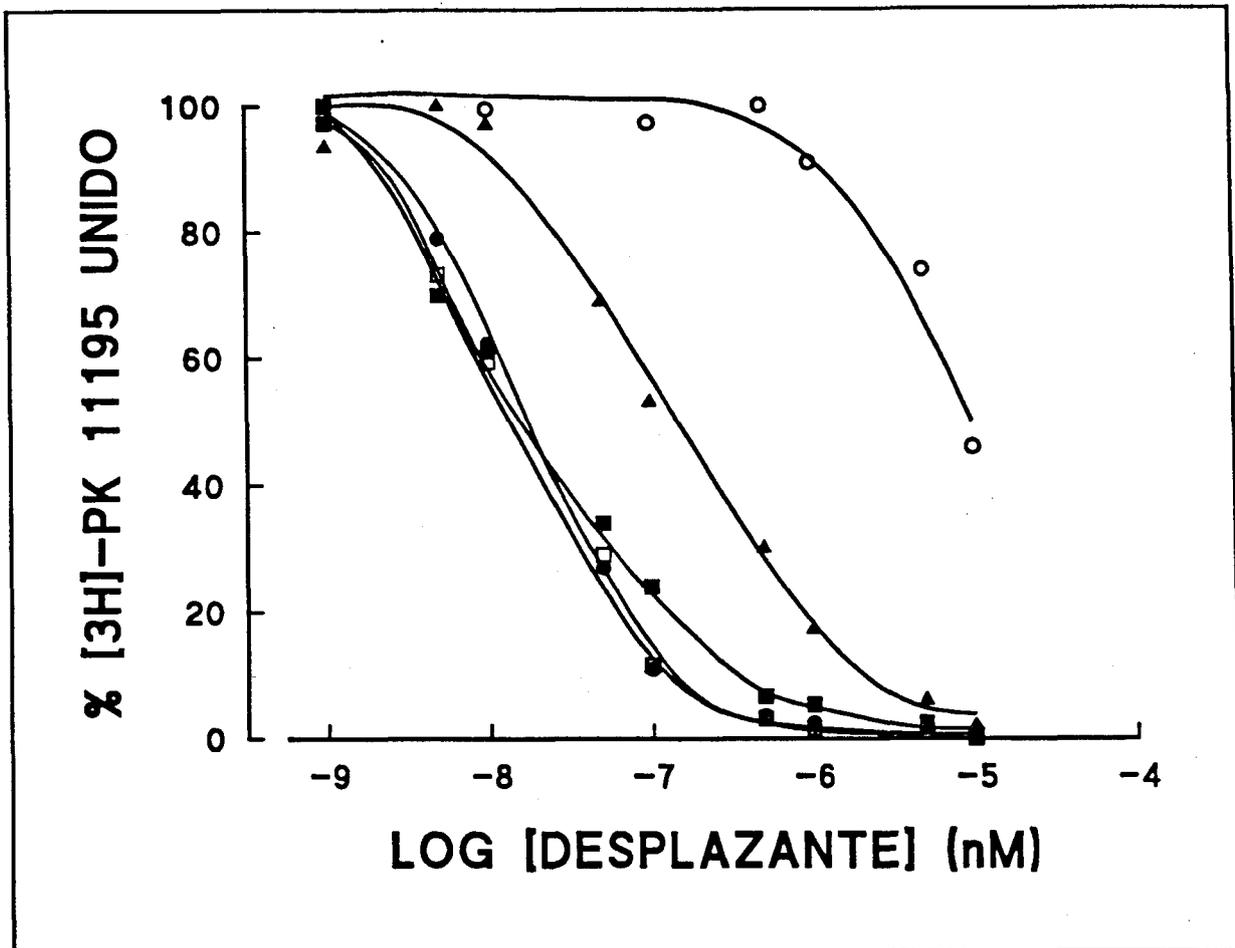


Figura 7.14.1-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [^3H]-PK 11195. Círculos negros: PK 11195. Cuadrados blancos: PK 14105. Cuadrados negros: Ro 5-4864. Triángulos: diazepam. Círculos blancos: clonazepam.

7.14.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina: NBTI y dipiridamol.

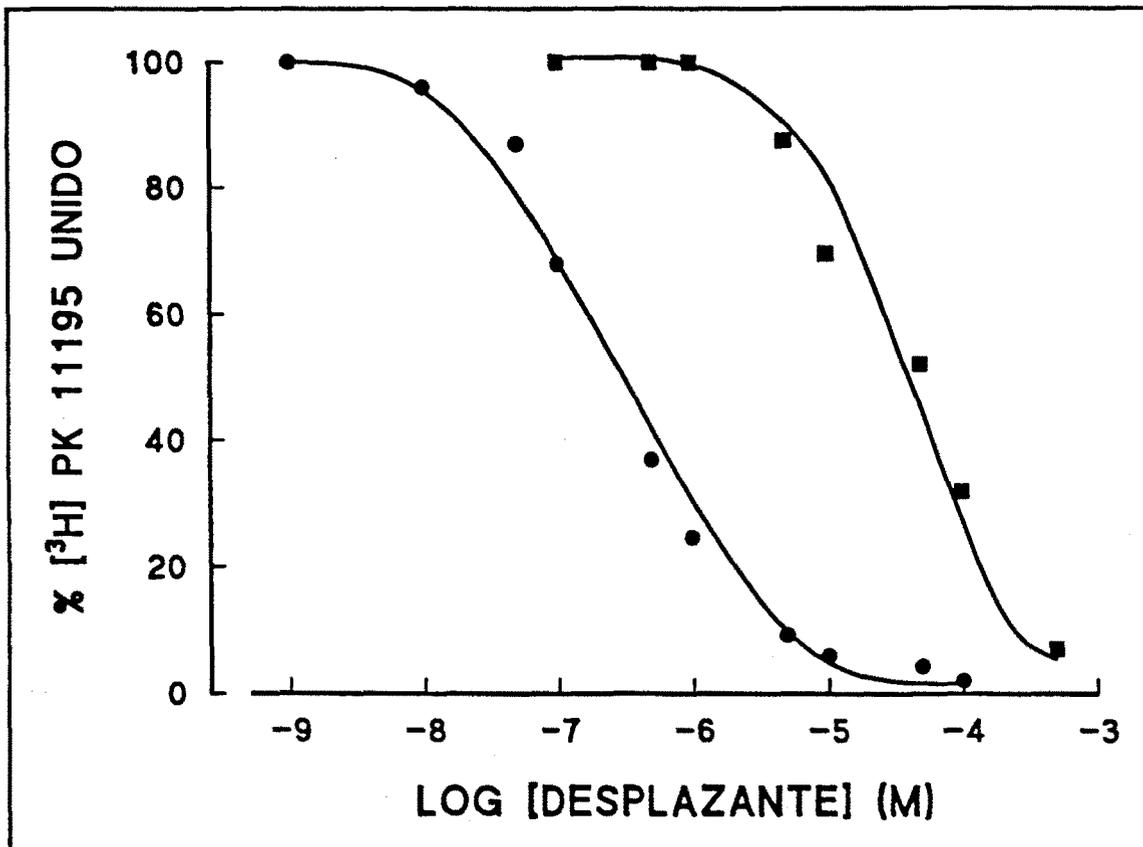


Figura 7.14.2-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [3H]-PK 11195. Círculos negros: dipiridamol. Cuadrados negros: NBTI.

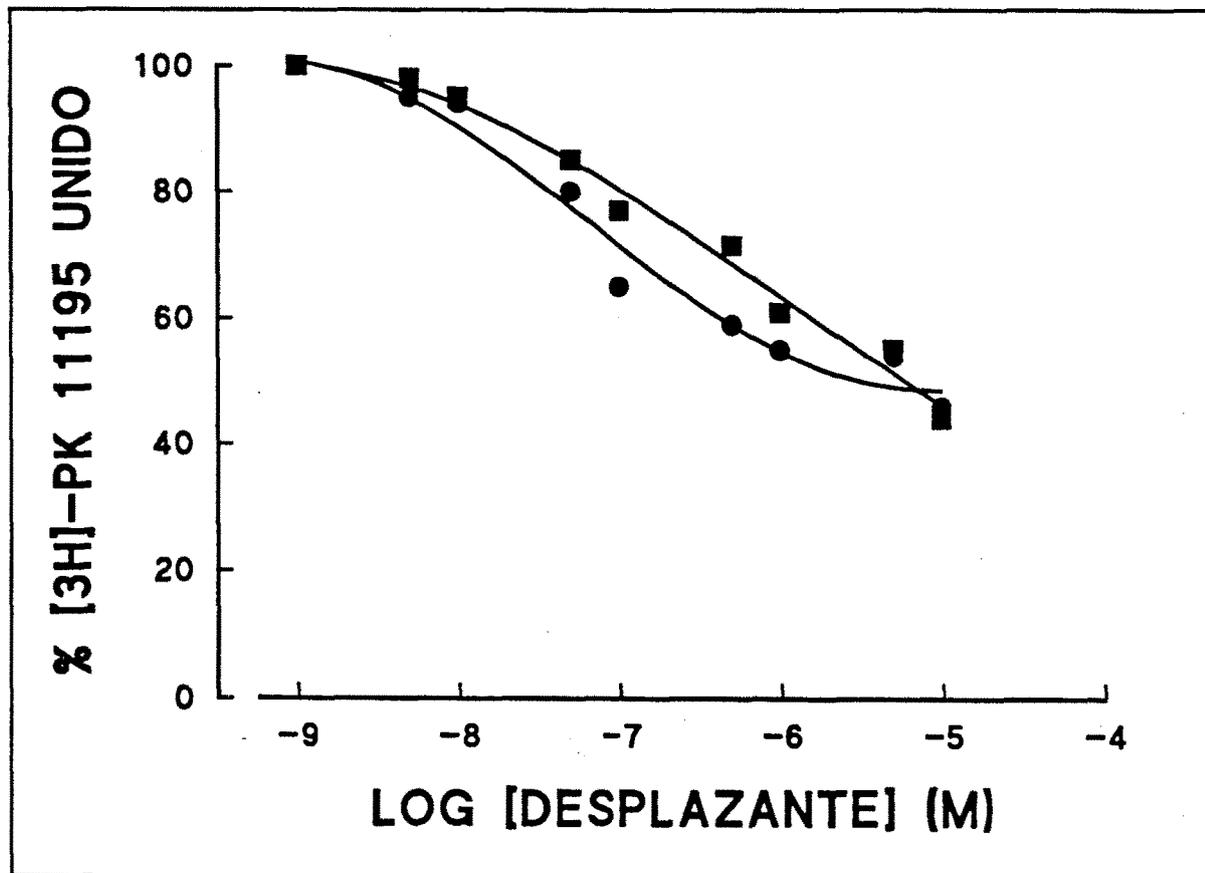
7.14.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP /ATP.

Figura 7.14.3.-Estudio de competición realizados en próstata de rata utilizando [3H]-PK 11195. Círculos: carboxiatractilósido. Cuadrados: α-β-metilen-ATP.

7.14.4.-Interacción del lugar de unión del [³H]-PK 11195 con antagonistas del calcio, antiandrógenos y el ligando endógeno.

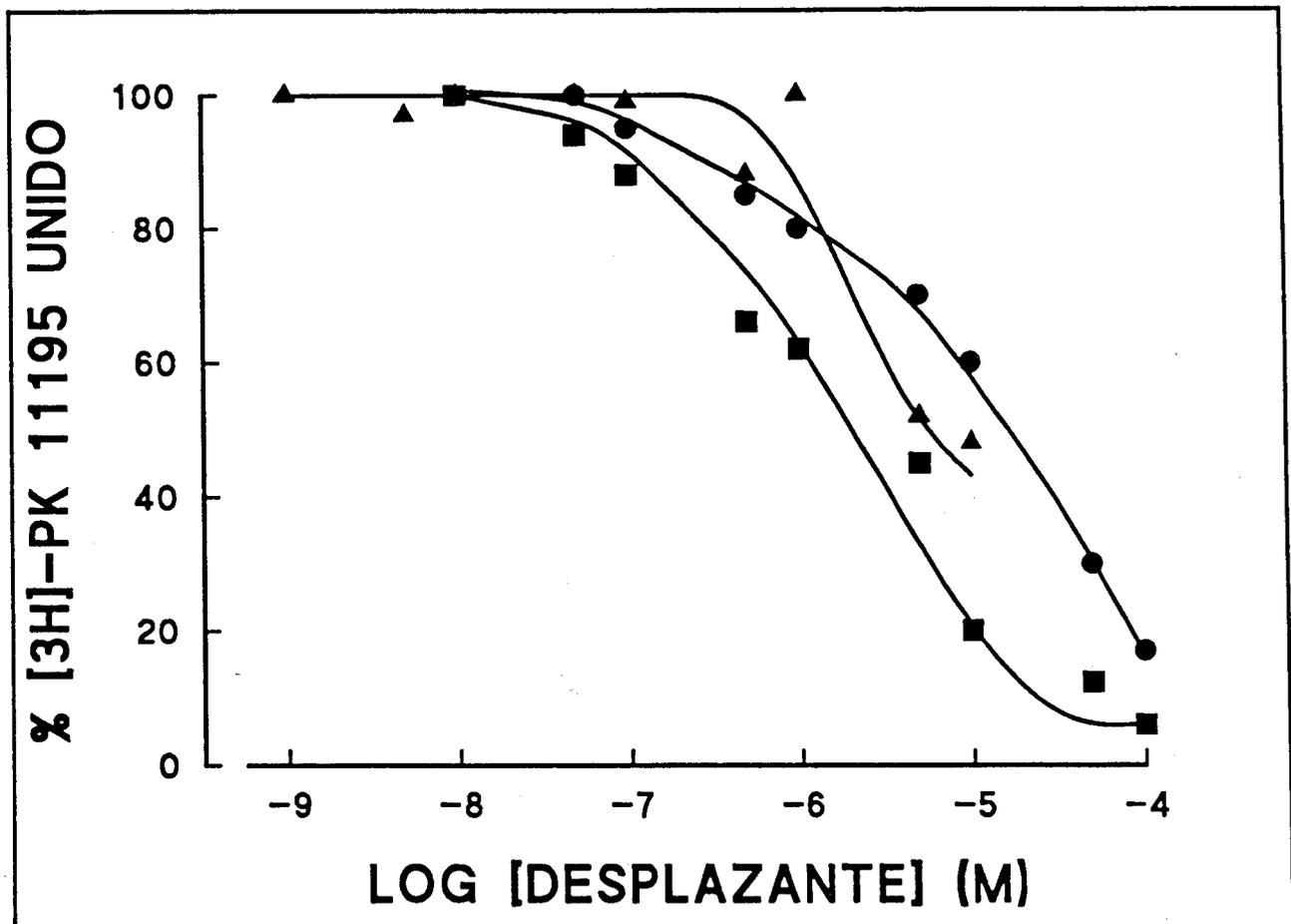


Figura 7.14.4.-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [³H]-PK 11195. Cuadrados: Nitrendipino. Círculos: Flutamida. Triángulos: Protoporfirina IX.

TABLA A: Inhibición de la unión específica del [³H]-PK 11195 en próstata de rata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
R0 5-4864	9.04 ± 1.06 (3)	0.81 ± 0.13
PK 11195	3.45 ± 1.18 (3)	0.92 ± 0.11
PK 14105	4.35 ± 1.08 (3)	1.02 ± 0.11
Diazepam	284.12 ± 47.12 (3)	0.97 ± 0.03
Clonazepam	> 10.000 (3)	-----
Flutamida	26.636 ± 3.426 (3)	0.86 ± 0.08
Nitrendipino	4.796 ± 1.983 (3)	0.87 ± 0.12
BAY K8464	5.758 ± 1.657 (3)	0.89 ± 0.09
Protoporfirina IX	5.050 ± 3.203 (3)	0.33 ± 0.02
Atractilósido	6.457 ± 2.027 (4)	0.11 ± 0.08
α,β-METILEN-ATP	13.717 ± 5.169 (3)	0.24 ± 0.04
Dipiridamol	141.54 ± 53.46	0.81 ± 0.14
NBTI	33.386 ± 11.323 (3)	1.01 ± 0.15

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

7.15.-Estudios de desplazamiento realizados con [³H]-Ro 5-4864 en próstata de rata.

7.15.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

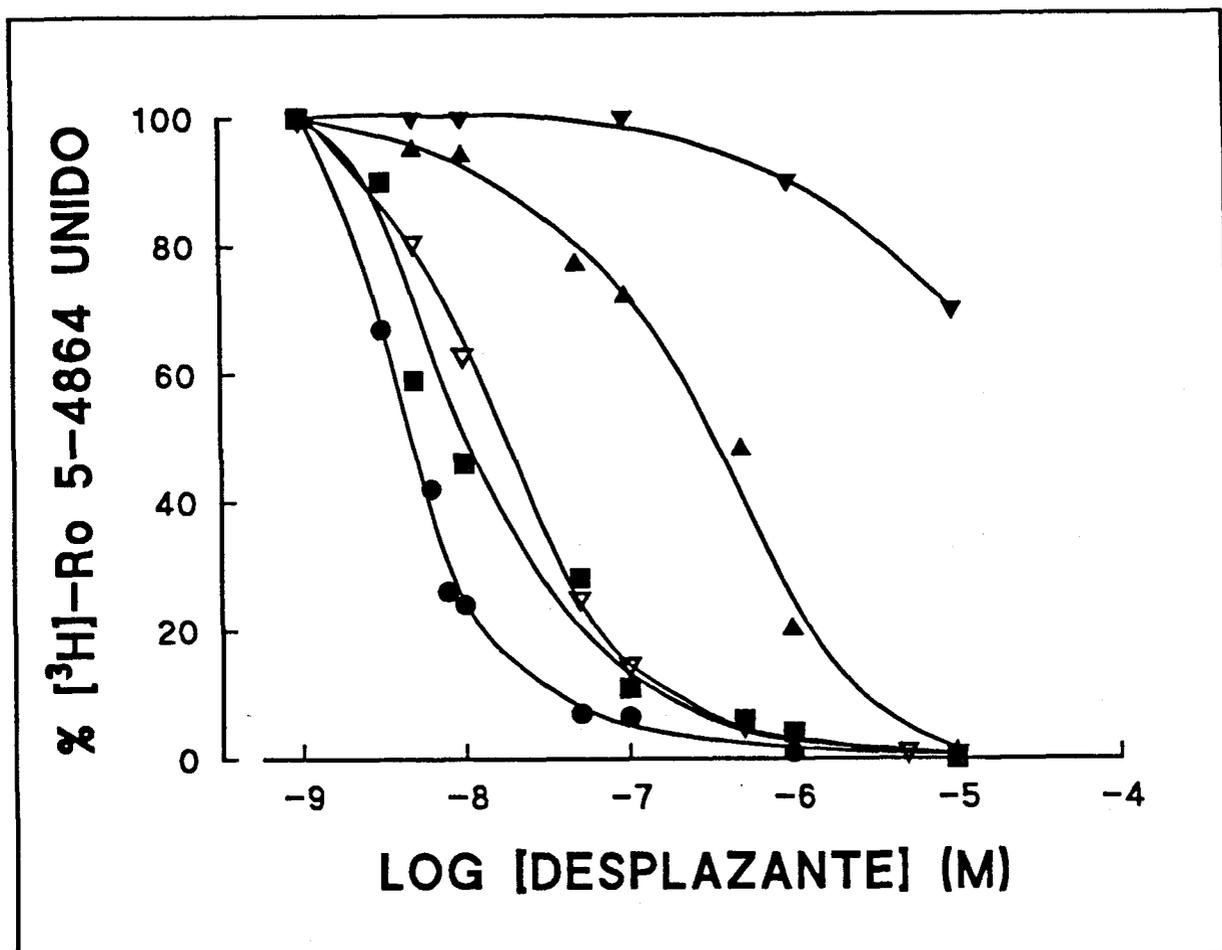


Figura 7.15.1-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864. Círculos negros: PK 11195. Triángulos invertidos blancos: PK 14105. Cuadrados negros: Ro 5-4864. Triángulos negros: diazepam. Triángulos invertidos: clonazepam.

7.15.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina, antiandrógenos y ligando endógeno.

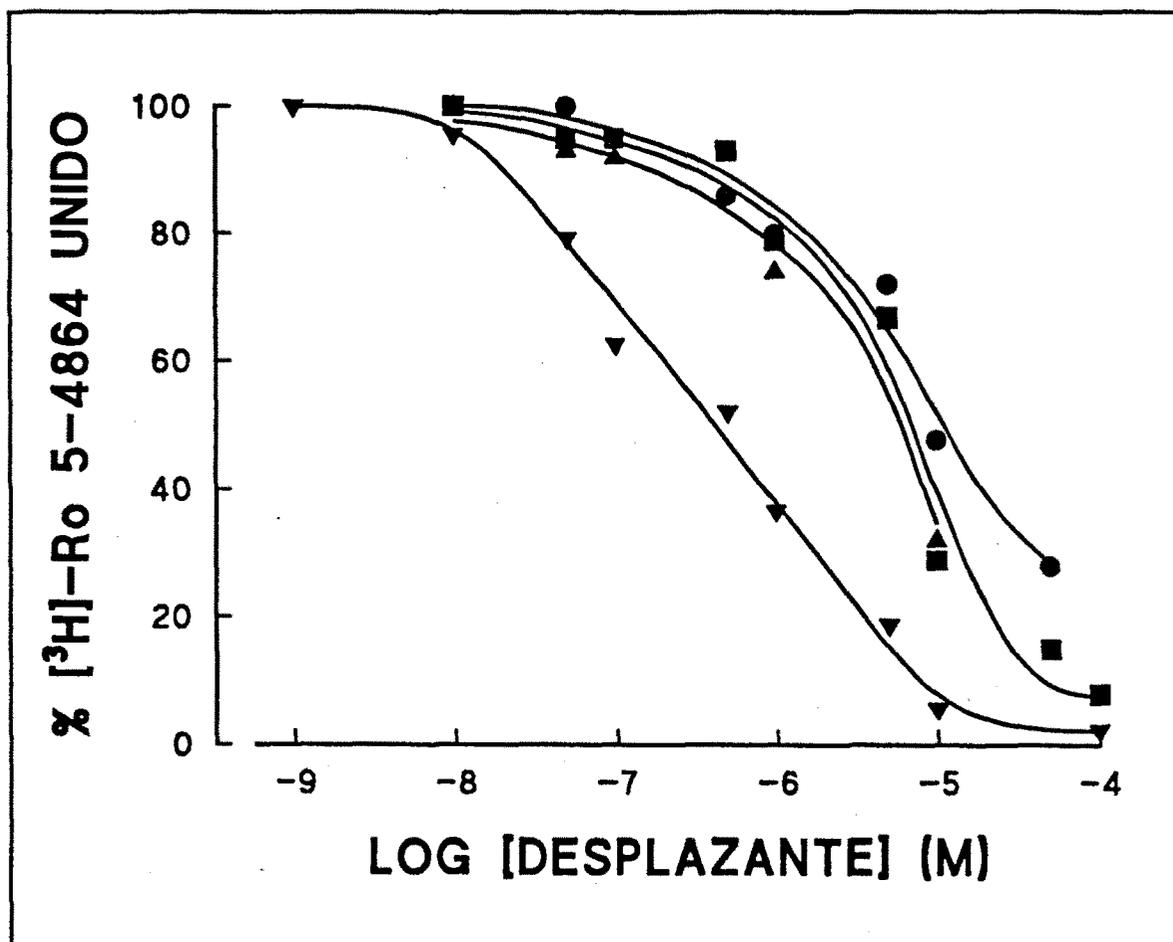


Figura 7.15.2.-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Triángulos invertidos: dipiridamol. Cuadrados negros: flutamida. Triángulos: ciproterona. Círculos: protoporfirina IX.

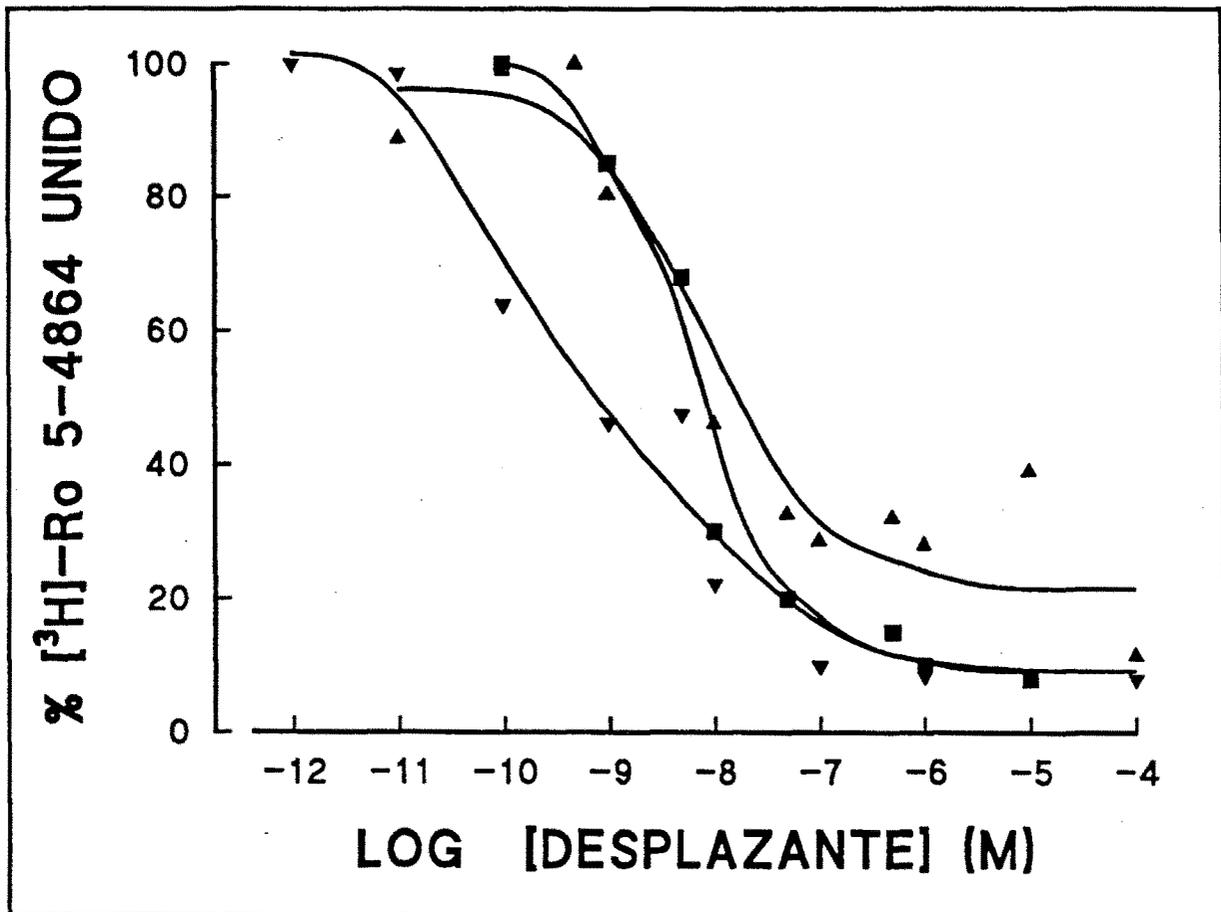
7.15.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP /ATP.

Figura 7.15.3.-Estudio de competición realizados en próstata de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Triángulos invertidos: carboxiatractilósido. Cuadrados: atractilósido. Triángulos: α-β-metilen-ATP.

7.15.4.-Interacción del lugar de unión del [^3H]-Ro 5-4864 con antagonistas del calcio.

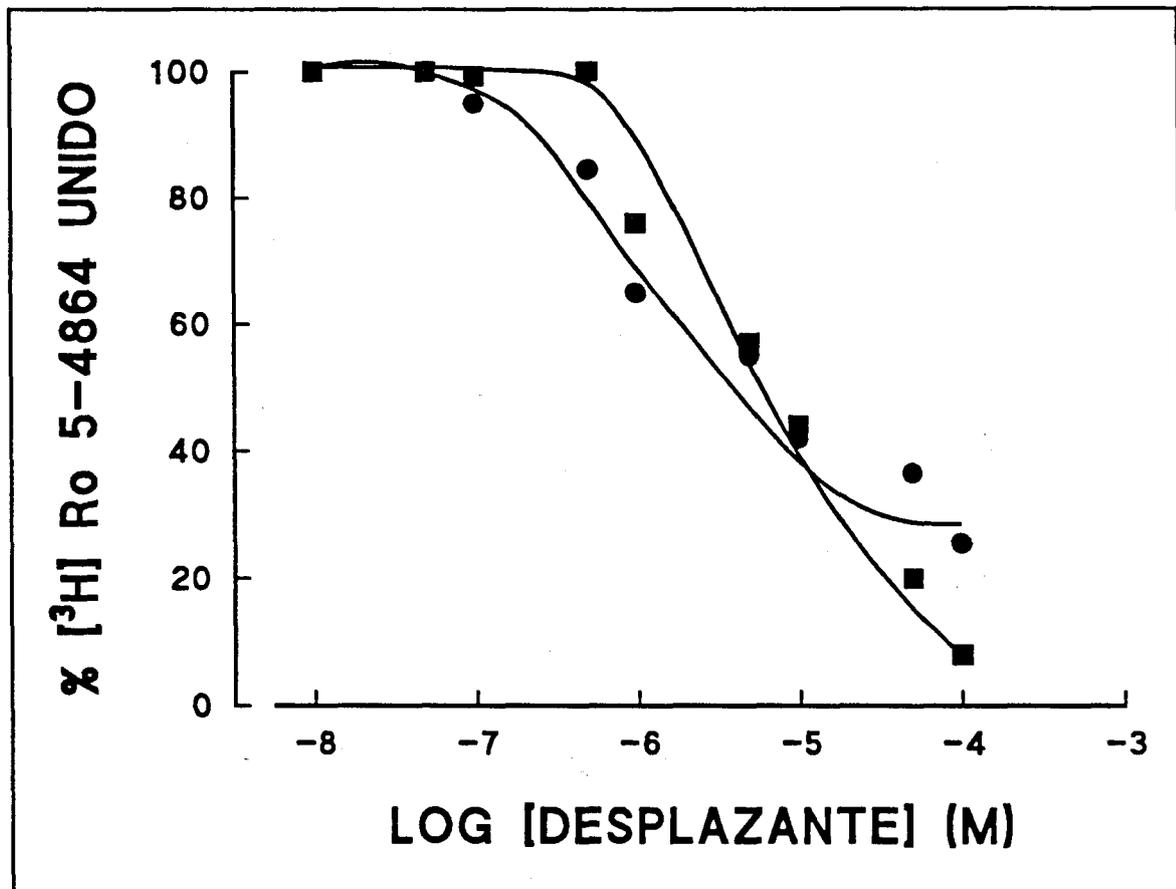


Figura 7.15.4.-Estudios de competición realizados en próstata de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864 Cuadrados: Nitrendipino. Círculos: BAY K8464.

TABLA B: Inhibición de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en próstata de rata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
R0 5-4864	4.55 ± 0.23 (3)	0.91 ± 0.05
PK 11195	1.89 ± 0.39 (4)	0.97 ± 0.11
Diazepam	167.77 ± 78.86 (3)	0.97 ± 0.03
Clonazepam	> 10.000 (3)	-----
Flutamida	7011 ± 901 (3)	0.90 ± 0.08
Ciproterona	> 10.000	1.10 ± 0.21
Protoporfirina IX	6831 ± 2791 (3)	0.81 ± 0.07
Atractilósido	12.83 ± 10.49 (4)	0.18 ± 0.02
CAT	11.56 ± 5.21 (3)	0.35 ± 0.01
α,β-METILEN-ATP	1.06 ± 0.96 (3)	0.52 ± 0.18

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

7.16.-Estudios de desplazamiento realizados con [^3H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata.

7.16.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

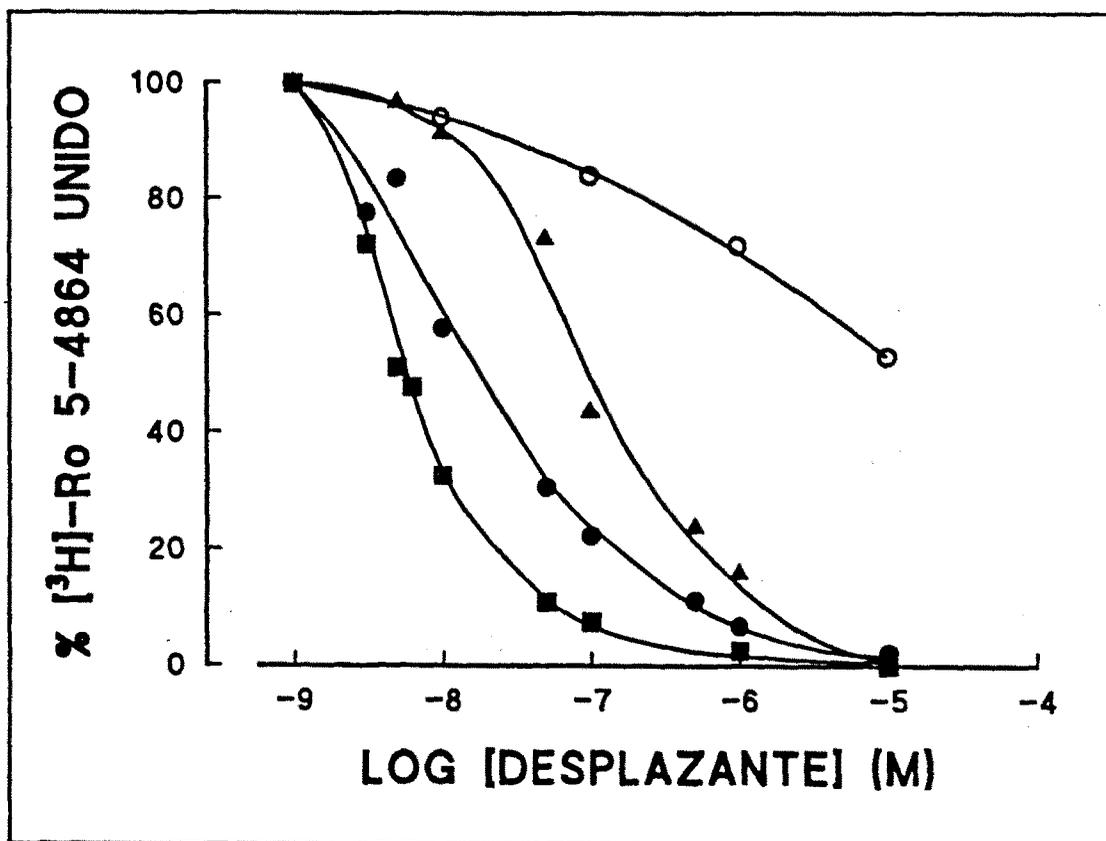


Figura 7.16.1-Estudios de competición realizados en vesícula seminal de rata utilizando [^3H]-Ro 5-4864. Cuadrados: PK 11195. Círculos negros: Ro 5-4864. Triángulos: diazepam. Círculos blancos: clonazepam.

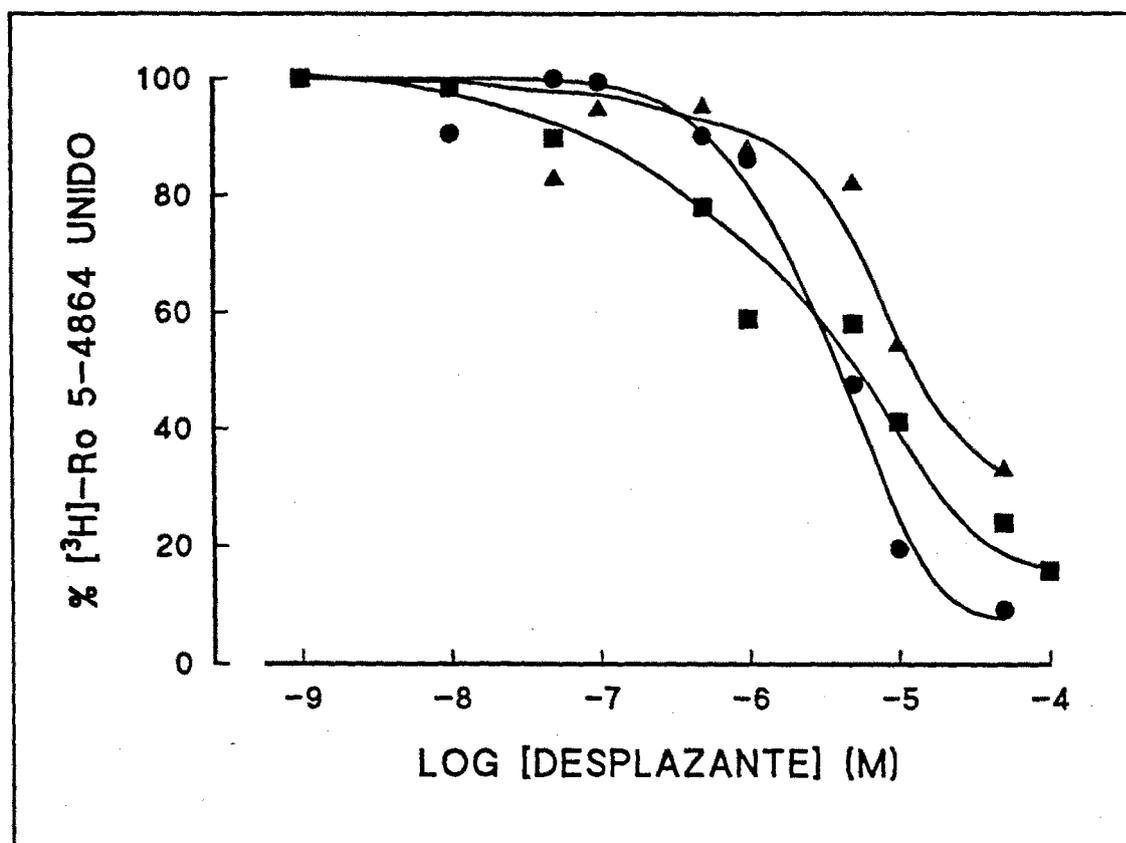
7.16.2.-Estudios antiandr6genos y ligando end6geno.

Figura 7.16.2-Estudios de competición realizados en vesicula seminal de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Cuadrados: flutamida. Triángulos: ciproterona. Círculos: protoporfirina IX.

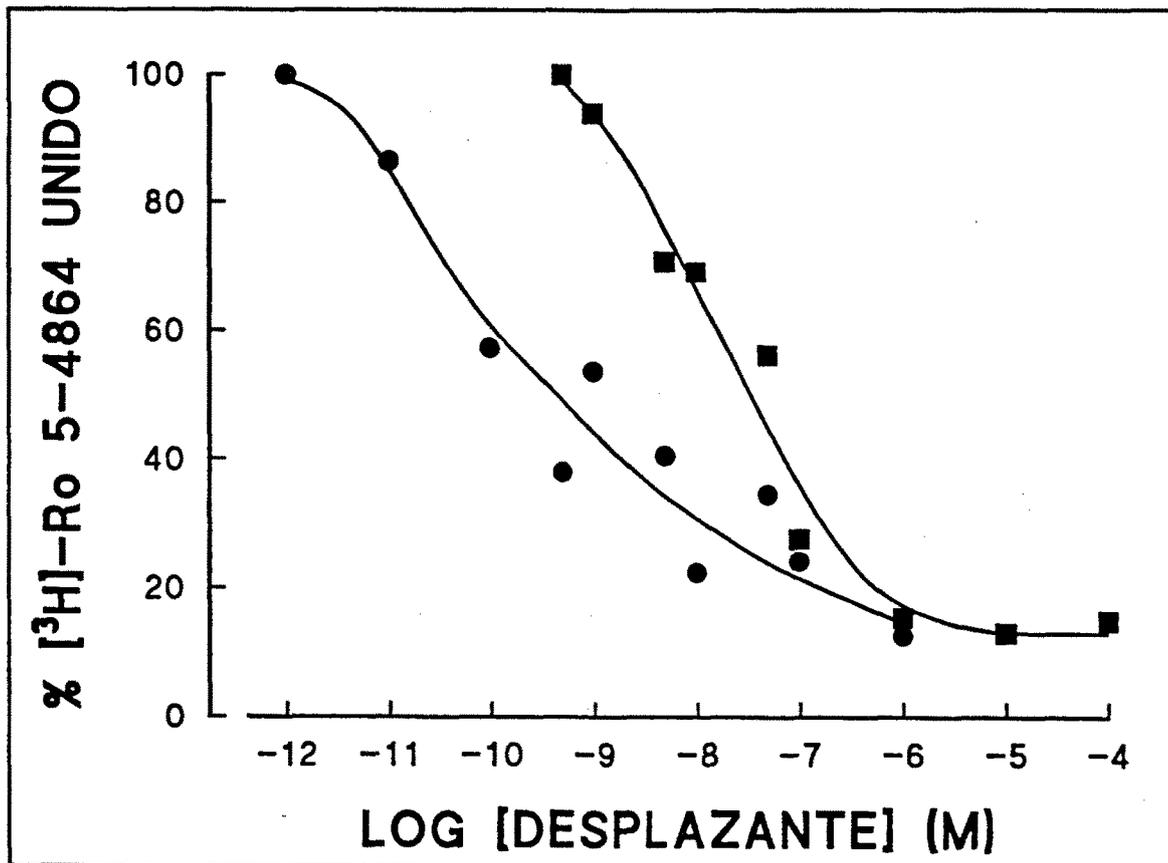
7.16.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP /ATP.

Figura 7.16.3.-Estudio de competición realizados en vesicula seminal de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Cuadrados: atractilósido. Círculos: α-β-metilen-ATP.

TABLA C: Inhibición de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en vesícula seminal de rata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
RO 5-4864	15.55 ± 4.40 (4)	0.95 ± 0.12
PK 11195	4.45 ± 0.37 (3)	0.92 ± 0.02
Diazepam	72.87 ± 8.74 (3)	0.87 ± 0.06
Clonazepam	> 10.000 (3)	-----
Flutamida	6320 ± 1452 (3)	0.87 ± 0.16
Ciproterona	> 10.000	-----
Protoporfirina IX	3020 ± 879 (3)	1.04 ± 0.02
Atractilósido	10.92 ± 3.49 (4)	0.44 ± 0.06
α,β-METILEN-ATP	0.15 ± 0.09 (3)	0.28 ± 0.10

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

7.17.-Estudios de desplazamiento realizados con [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata.

7.17.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

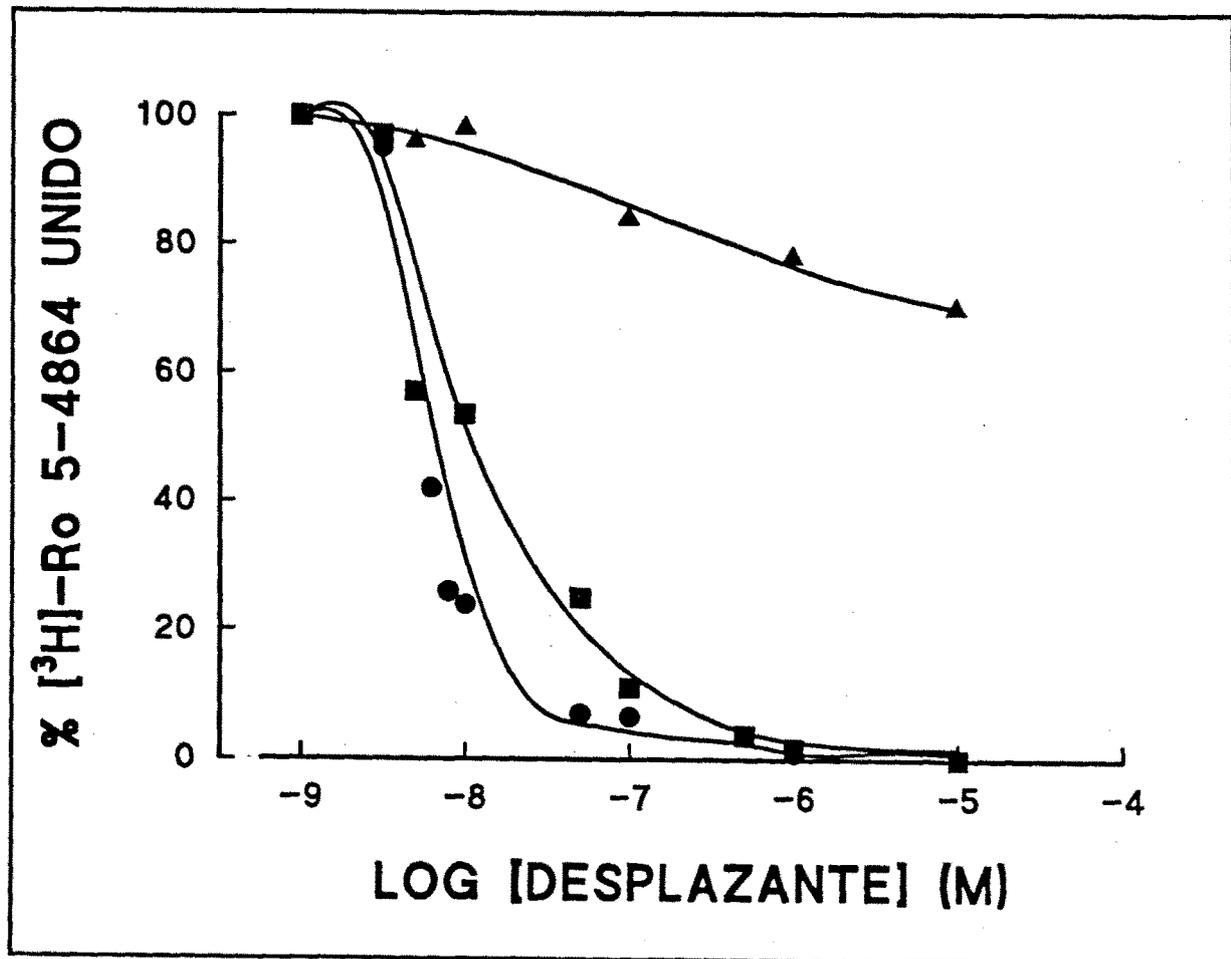


Figura 7.17.1-Estudios de competición realizados en conducto deferente de rata utilizando [³H]-Ro 5-4864. Círculos negros: PK 11195. Cuadrados: Ro 5-4864. Triángulos: clonazepam.

7.17.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina y antagonistas del calcio.

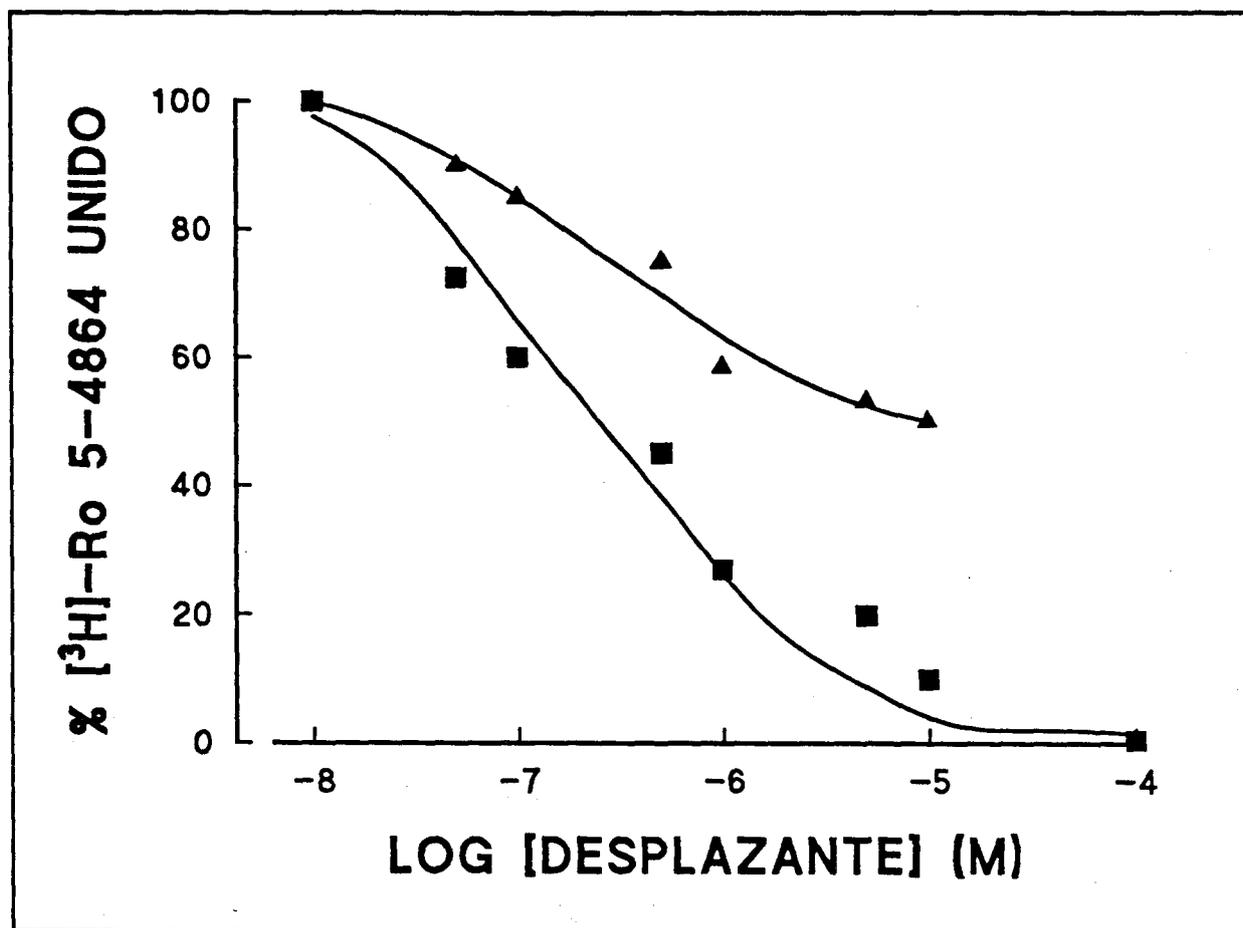


Figura 7.17.2-Estudios de competición realizados en conducto deferente de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Triángulos: nitrendipino. Cuadrados: HNBTG.

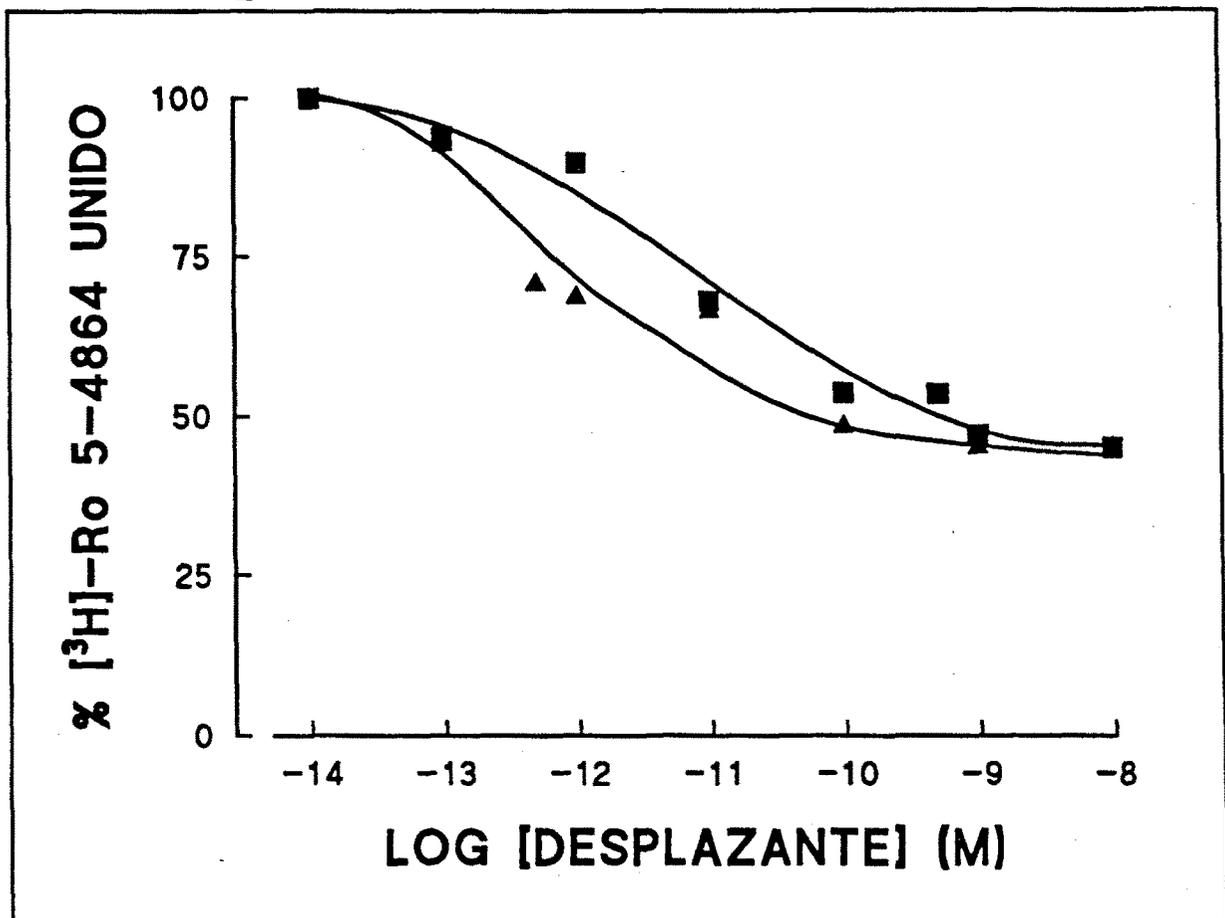
7.17.3.-Estudios con sustancias que interactúan con el carrier ADP /ATP.

Figura 7.17.3.-Estudio de competición realizados en conducto deferente de rata utilizando [3H]-Ro 5-4864. Cuadrados: carboxiatractilósido. Triángulos: α-β-metilen-ATP.

TABLA D: Inhibición de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en conducto deferente de rata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
R0 5-4864	11.38 ± 3.90 (3)	1.03 ± 0.1
PK 11195	10.06 ± 4.60 (5)	0.76 ± 0.08
Clonazepam	> 10.000 (3)	-----
Nitrendipino	1.513 ± 319 (3)	0.16 ± 0.05
HNBTG	185.06 ± 50.54 (3)	1.10 ± 0.21
Protoporfirina IX	> 10.000 (2)	-----
DCC	> 10.000 (2)	-----
CAT	1.20 ± 0.39 (4)	0.28 ± 0.09
α,β-METILEN-ATP	0.002 ± 0.001 (3)	0.13 ± 0.01

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

7.18.-Estudios de desplazamiento realizados con [³H]-PK 11195 en adenoma de próstata.

7.18.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

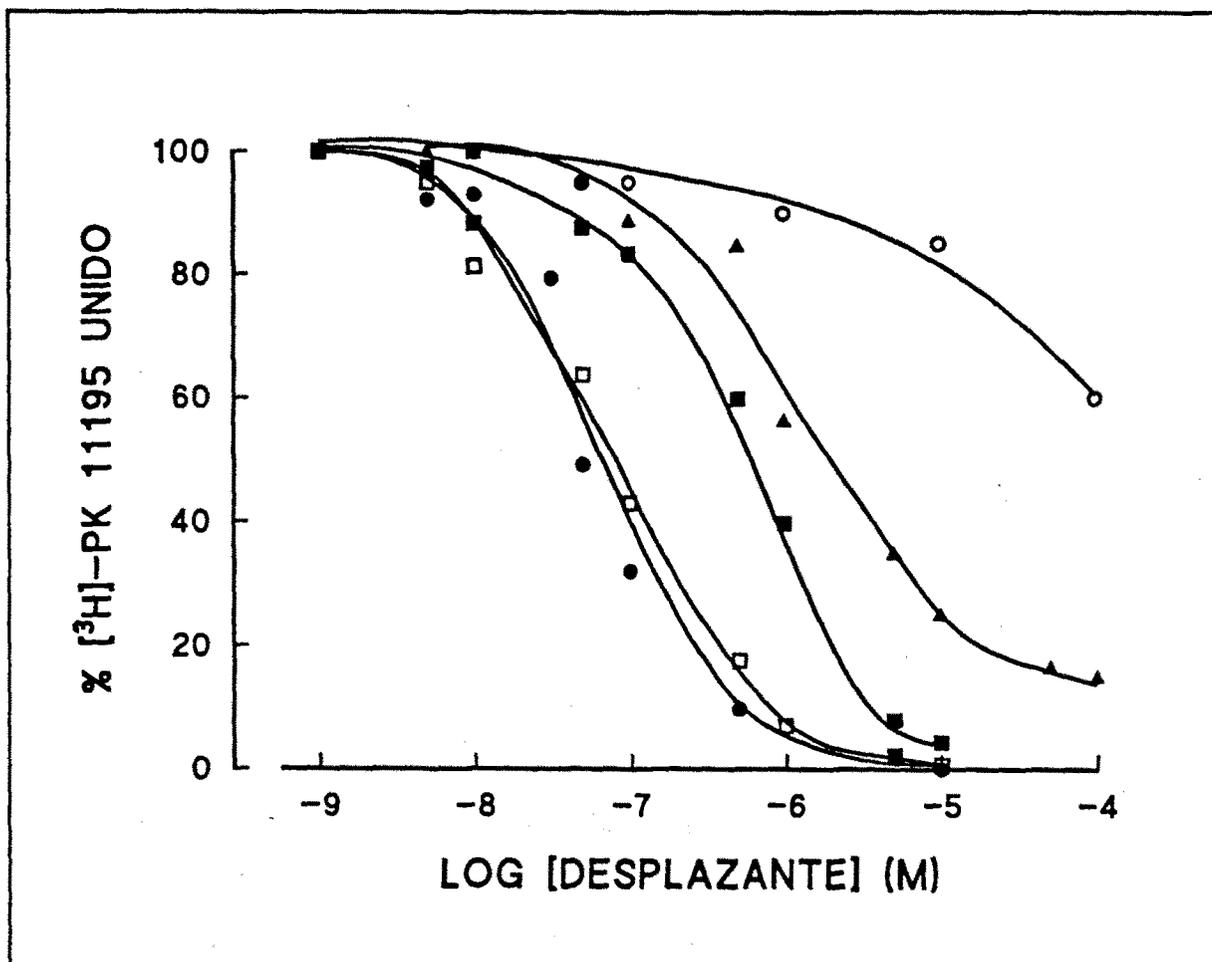


Figura 7.18.1-Estudios de competición realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195. Círculos negros: PK 11195. Cuadrados blancos: PK 14105. Cuadrados negros: Ro 5-4864. Triángulos: diazepam. Círculos blancos: clonazepam.

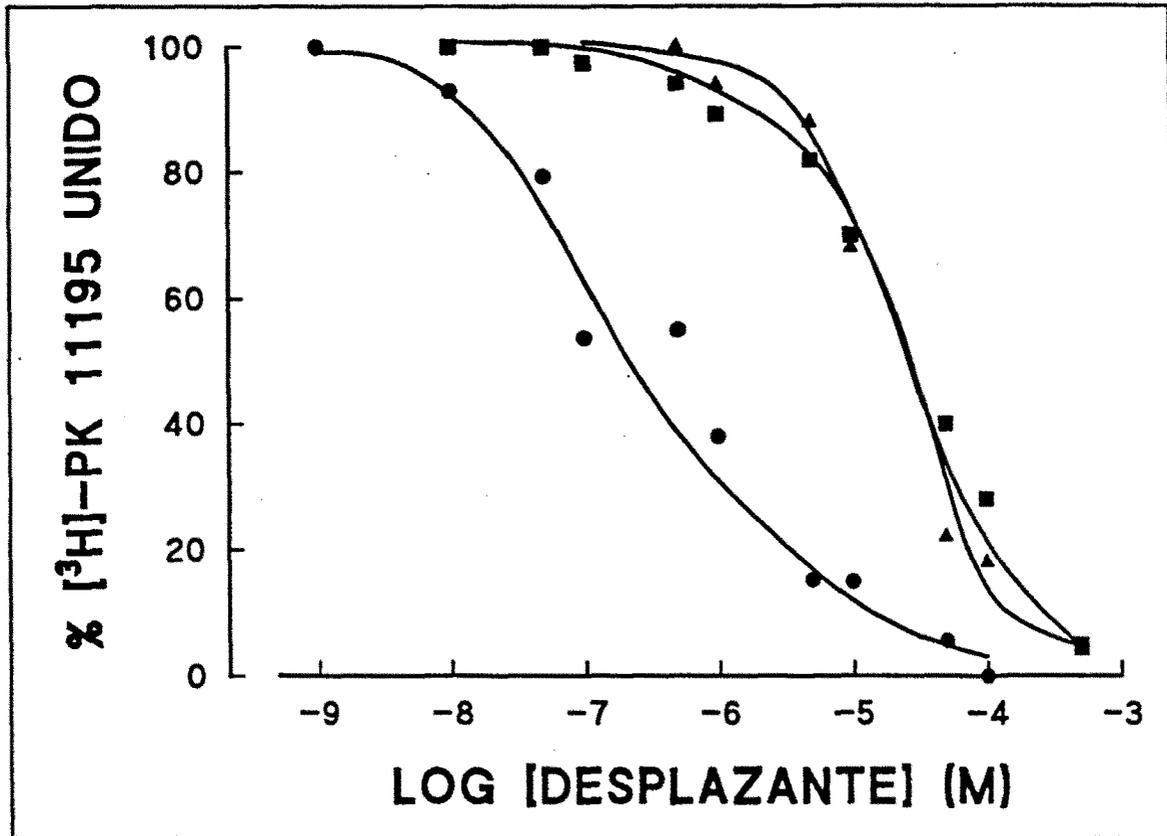
7.18.2.-Estudios con inhibidores del uptake de la adenosina.

Figura 7.18.2-Estudios de competición realizados en adenoma de próstata utilizando [3H]-PK 11195. Círculos negros: dipiridamol. Cuadros negros: HNBTG y triángulos: NBTI.

7.18.3.-Interacción del lugar de unión del [³H]-PK 11195 con antagonistas del calcio y el ligando endógeno.

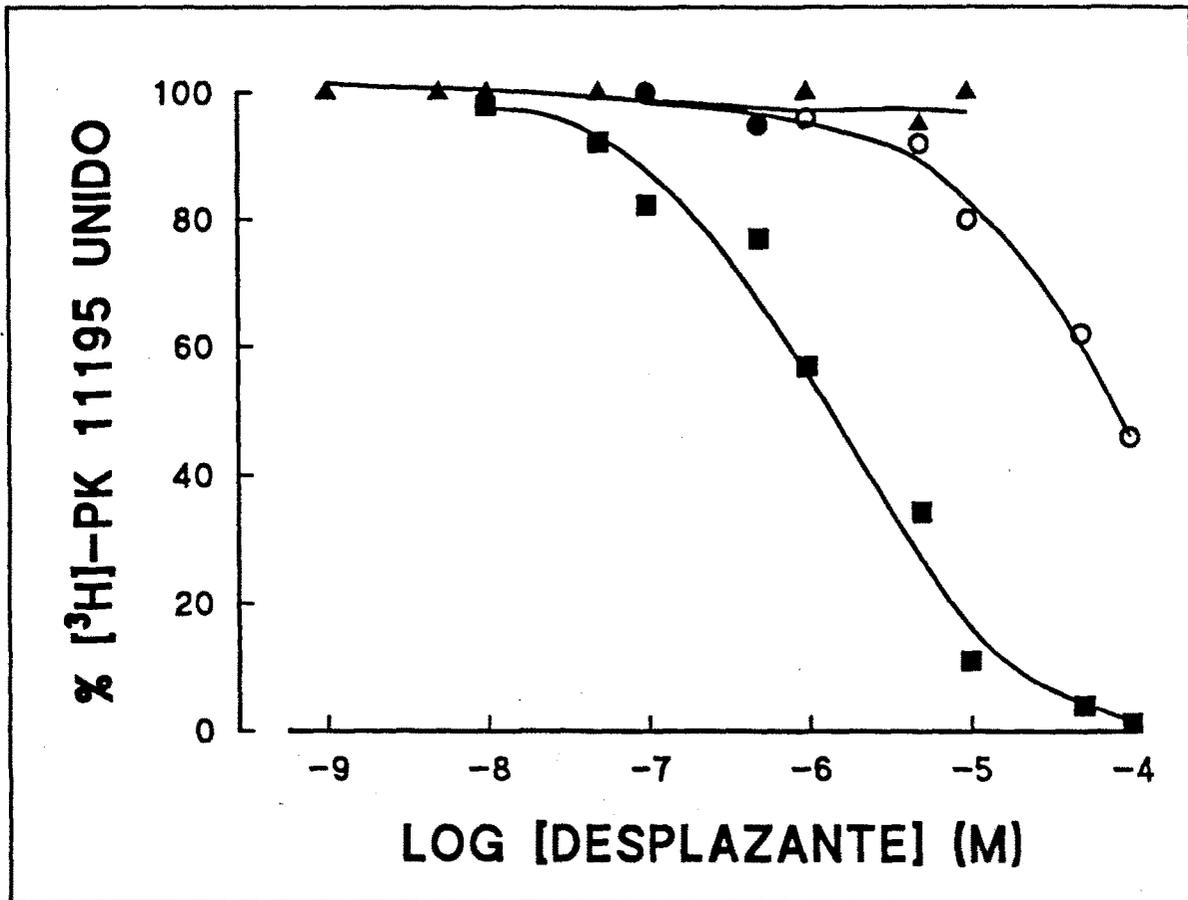


Figura 7.18.3.-Estudios de competición realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-PK 11195. Cuadrados: Nitrendipino. Circulos: Nifedipino. Triángulos: Protoporfirina IX.

TABLA E: Inhibición de la unión específica del [³H]-PK 11195 en adenoma de próstata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
R0 5-4864	1.073 ± 225 (3)	0.86 ± 0.07
PK 11195	58.83 ± 19.65 (3)	1.01 ± 0.04
PK 14105	96.35 ± 26.31 (3)	1.00 ± 0.01
Diazepam	2.381 ± 448 (3)	0.83 ± 0.12
Clonazepam	> 10.000 (3)	-----
Flutamida	26.636 ± 3.426 (3)	0.86 ± 0.08
Nitrendipino	3.122 ± 1.391 (3)	0.99 ± 0.02
Nifedipino	5.234 ± 1.568 (3)	0.89 ± 0.05
Dipiridamol	1.320 ± 880 (3)	0.71 ± 0.04
NBTI	23.590 ± 6.955 (3)	1.00 ± 0.13

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

7.19.-Estudios de desplazamiento realizados con [³H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata.

7.19.1.-Estudios de desplazamiento con benzodiazepinas periféricas y centrales.

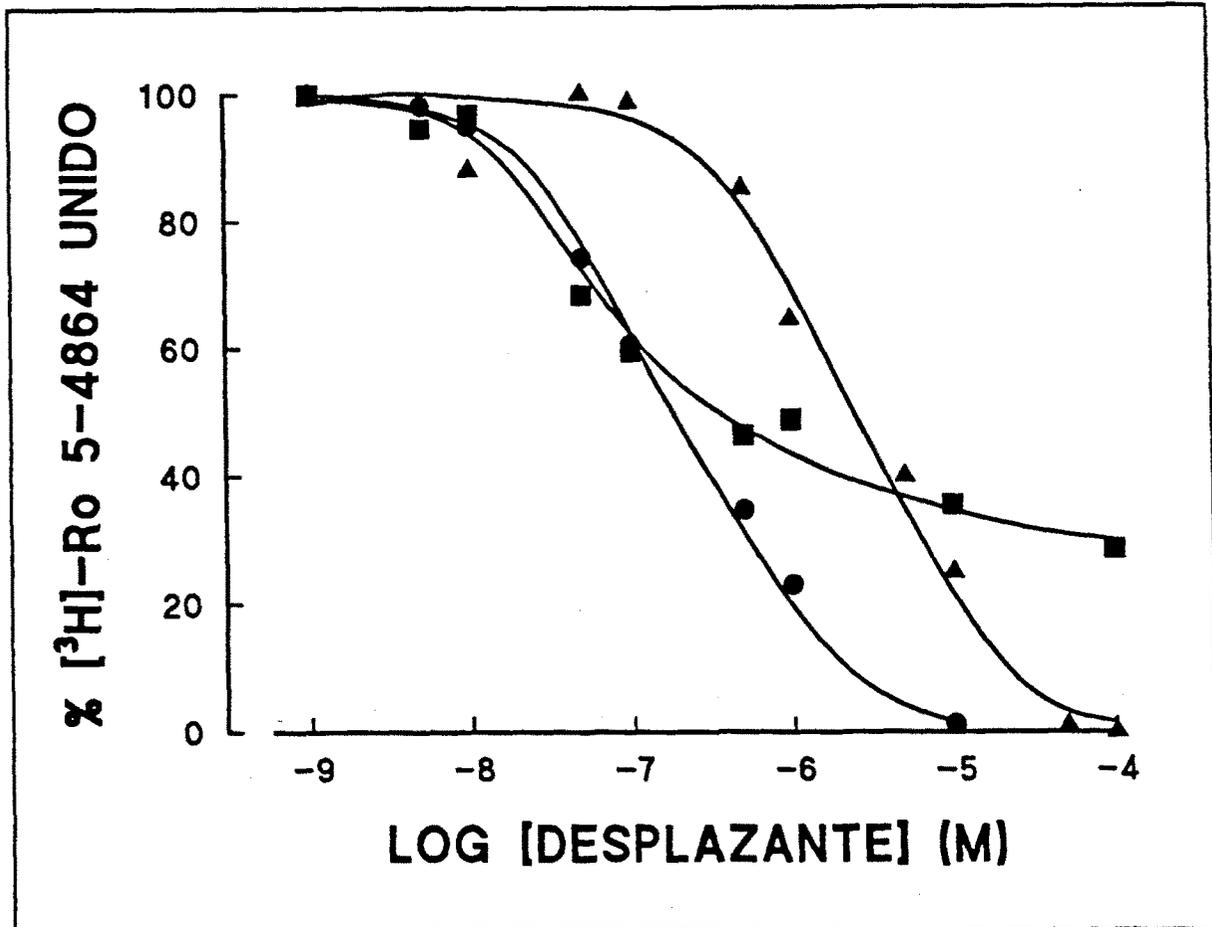


Figura 7.19.1-Estudios de competición realizados en adenoma de próstata utilizando [³H]-Ro 5-4864. Círculos negros: Ro 5-4864. Cuadros: PK 11195. Triángulos: diazepam.

TABLA F: Inhibición de la unión específica del [³H]-Ro 5-4864 en adenoma de próstata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
RO 5-4864	256.7 ± 100.75 (3)	0.90 ± 0.06
PK 11195	1221.7 ± 124.7 (3)	0.28 ± 0.06
Diazepam	3049.7 ± 1583.6 (3)	1.05 ± 0.12

Los resultados son la media de tres experiencias ± E.E.M.

8.-ESTUDIOS REALIZADOS CON [³H]-ADENOSINA**8.1.-Estudios de saturación con [³H]-adenosina.****Tabla 8.1.-Resultados obtenidos a partir del estudio de saturación con [³H]-adenosina.**

³ H]-adenosina (nM)	³ H]-adenosina captada (pmols/mg)
10	212 ± 26
100	3846 ± 557
300	10229 ± 1345
700	19451 ± 1701
5000	40891 ± 7221
10000	80485 ± 13286
50000	181475 ± 23725
100000	268171 ± 24383

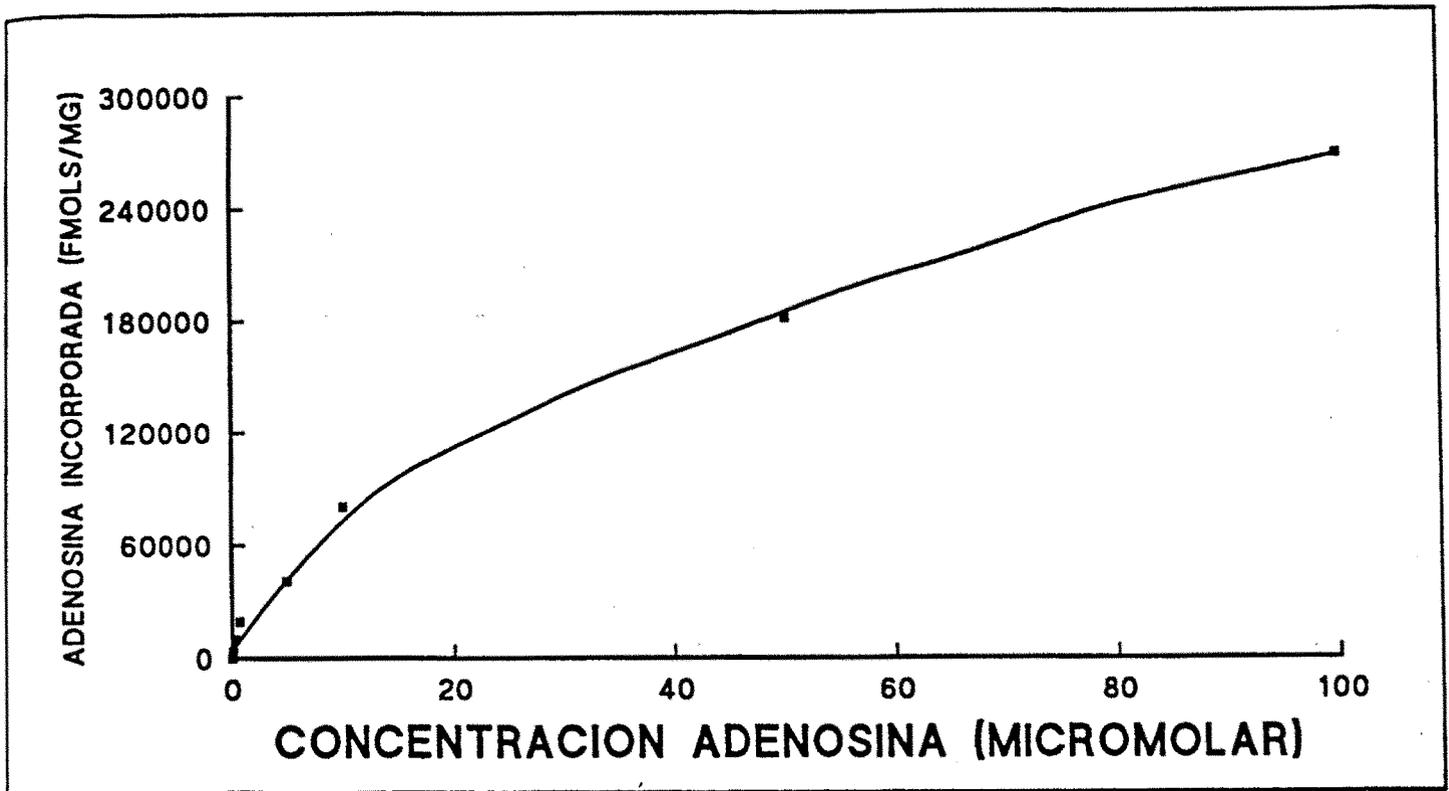


Figura 8.1.1.-Representación del uptake de [³H]-adenosina en función de la concentración de radioligando.

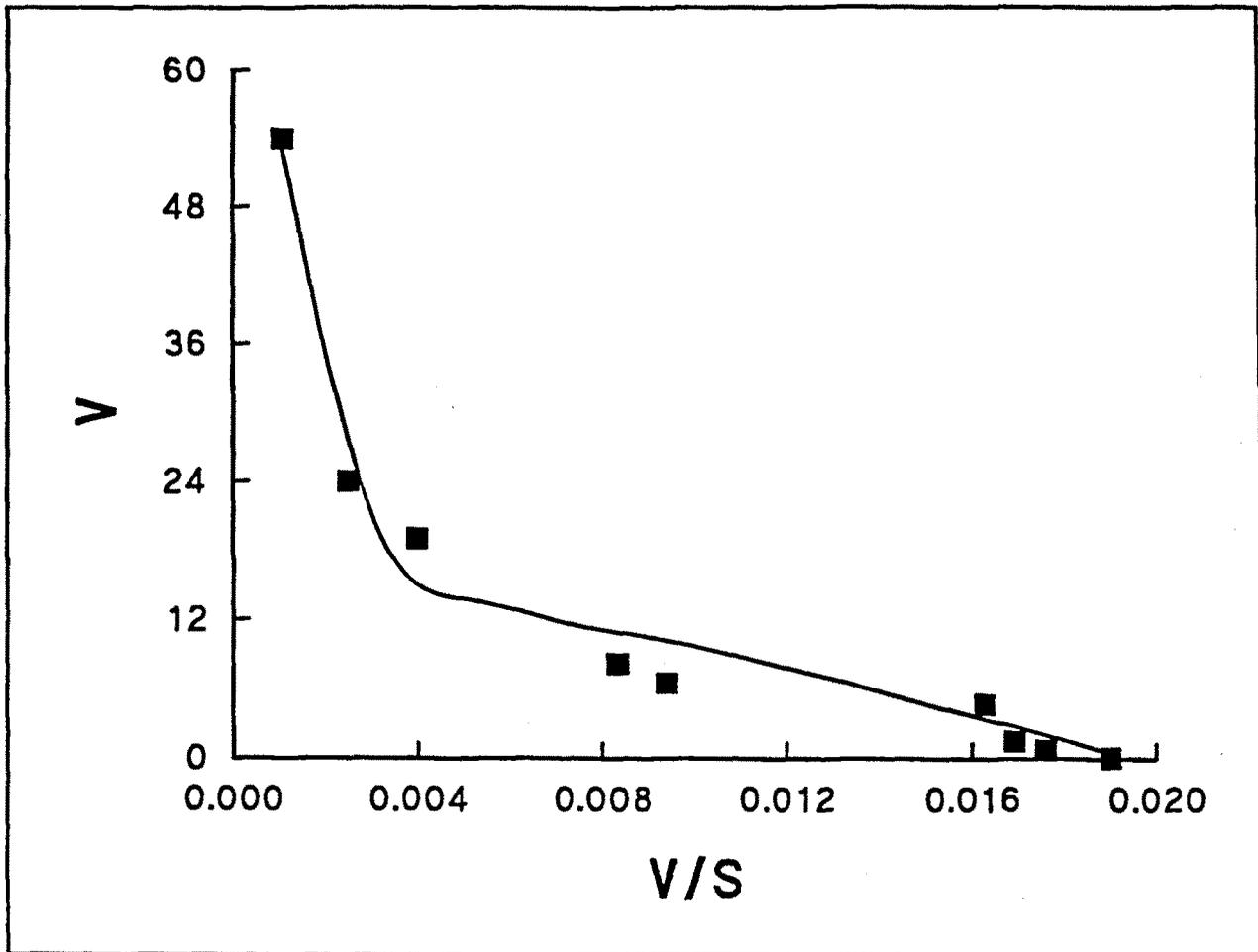


Figura 8.1.2.-Representación de Eadie-Hofstee del uptake de [³H]-adenosina testículos de rata.

Km_1	$Vmax_1$ (pmol/mg)	Km_2	$Vmax_2$ (pmol/mg)
$6.71 \pm 1.17 \times 10^{-7}$	23.47 ± 8.67	$26.05 \pm 10.44 \times 10^{-6}$	320.77 ± 112.34

8.2.-Estudios cinéticos del uptake de [³H]-adenosina a nivel mitocondrial.**Tabla 8.2.-Cinética del uptake de [³H]-adenosina en mitocondria de rata.**

Tiempo (min)	Uptake (CPM)
0.5	1098 ± 113
1	2552 ± 7
3	3231 ± 399
5	5640 ± 590
7	5657 ± 879
10	5603 ± 311

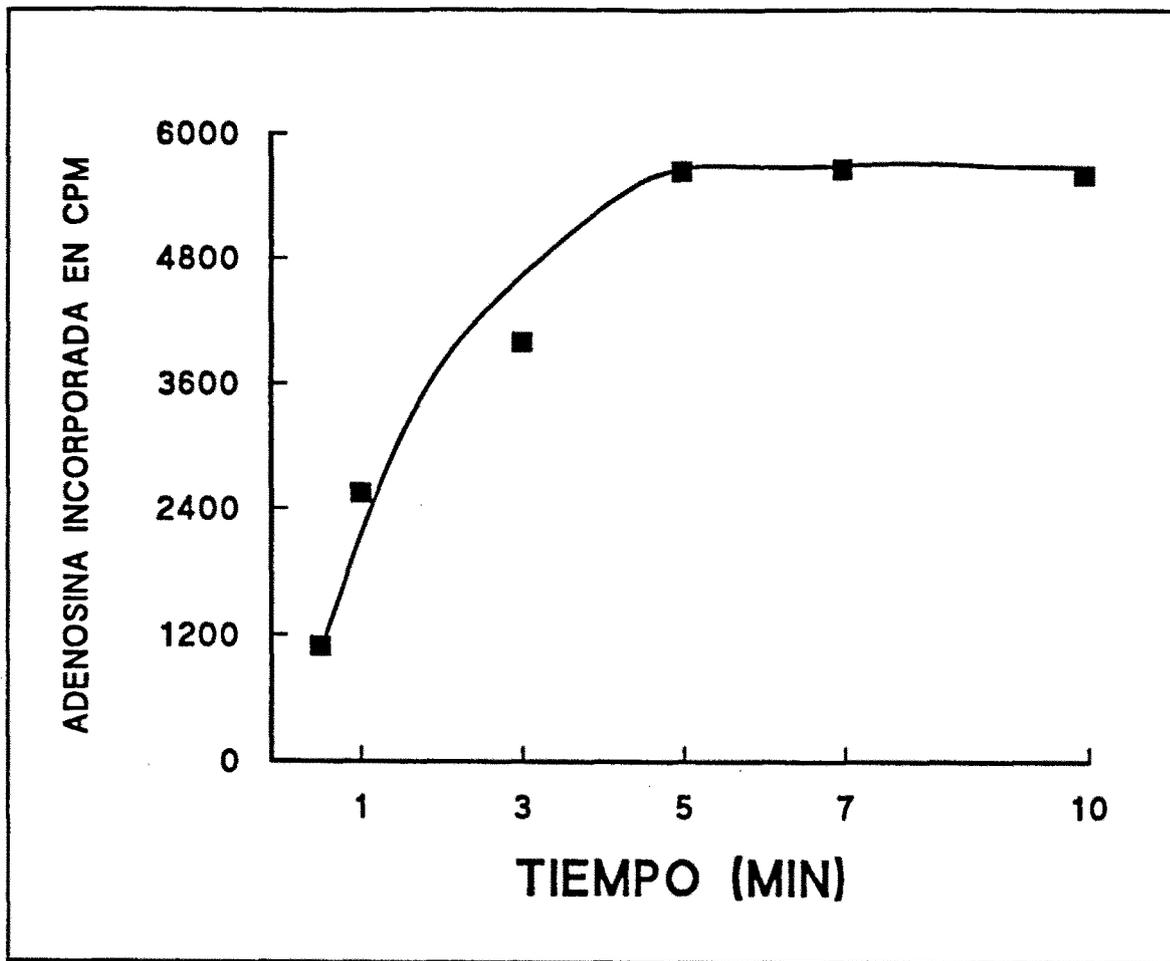


Figura 8.2.1-Representación gráfica de la cinética del uptake [³H]-adenosina.

8.3.-Estudios de inhibición del uptake de [³H]-adenosina.

Tabla 8.3.1.-Inhibición del uptake de [³H]-adenosina por PK 11195.

Concentración de fármaco	% adenosina transportada
0	100
1 x 10 ⁻⁷	96 ± 1.7
1 x 10 ⁻⁶	86 ± 3.7
5 x 10 ⁻⁶	84 ± 0.5
1 x 10 ⁻⁵	78 ± 2.9
5 x 10 ⁻⁵	44 ± 2.0
1 x 10 ⁻⁴	30 ± 5.5

Tabla 8.3.2.-Tabla de inhibición del uptake de [³H]-adenosina por AHN 086.

Concentración de fármaco	% adenosina transportada
0	100
1 x 10 ⁻⁷	93 ± 0.8
1 x 10 ⁻⁶	89 ± 1.7
5 x 10 ⁻⁶	83 ± 2.6
1 x 10 ⁻⁵	73 ± 3.3
5 x 10 ⁻⁵	31 ± 1.3
1 x 10 ⁻⁴	15 ± 3.5

Tabla 8.3.3-Inhibición del uptake de [³H]-adenosina por Ro 5-4864.

Concentración de fármaco	% adenosina transportada
0	100
1 x 10 ⁻⁷	90 ± 1.0
1 x 10 ⁻⁶	84 ± 3.1
5 x 10 ⁻⁶	65 ± 7.3
1 x 10 ⁻⁵	54 ± 6.5
5 x 10 ⁻⁵	37 ± 2.3
1 x 10 ⁻⁴	27 ± 1.7

Tabla 8.3.4-Inhibición del uptake de [³H]-adenosina por Diazepam.

Concentración de fármaco	% adenosina transportada
0	100
1 x 10 ⁻⁷	88 ± 3.2
1 x 10 ⁻⁶	80 ± 4.6
5 x 10 ⁻⁶	71 ± 3.2
1 x 10 ⁻⁵	57 ± 4.0
5 x 10 ⁻⁵	40 ± 2.8
1 x 10 ⁻⁴	31 ± 2.6

Tabla 8.3.4-Inhibición del uptake de [³H]-adenosina por OH-NBTI.

Concentración de fármaco	% adenosina transportada
0	100
1 x 10 ⁻⁹	100
1 x 10 ⁻⁸	90 ± 3.6
1 x 10 ⁻⁷	79 ± 8.5
1 x 10 ⁻⁶	72 ± 7.3
5 x 10 ⁻⁶	67 ± 5.3
1 x 10 ⁻⁵	57 ± 1.5
5 X 10 ⁻⁵	43 ± 2.1
1 X 10 ⁻⁴	33 ± 1.3
5 X 10 ⁻⁴	11 ± 1.3
1 X 10 ⁻³	10 ± 1.2

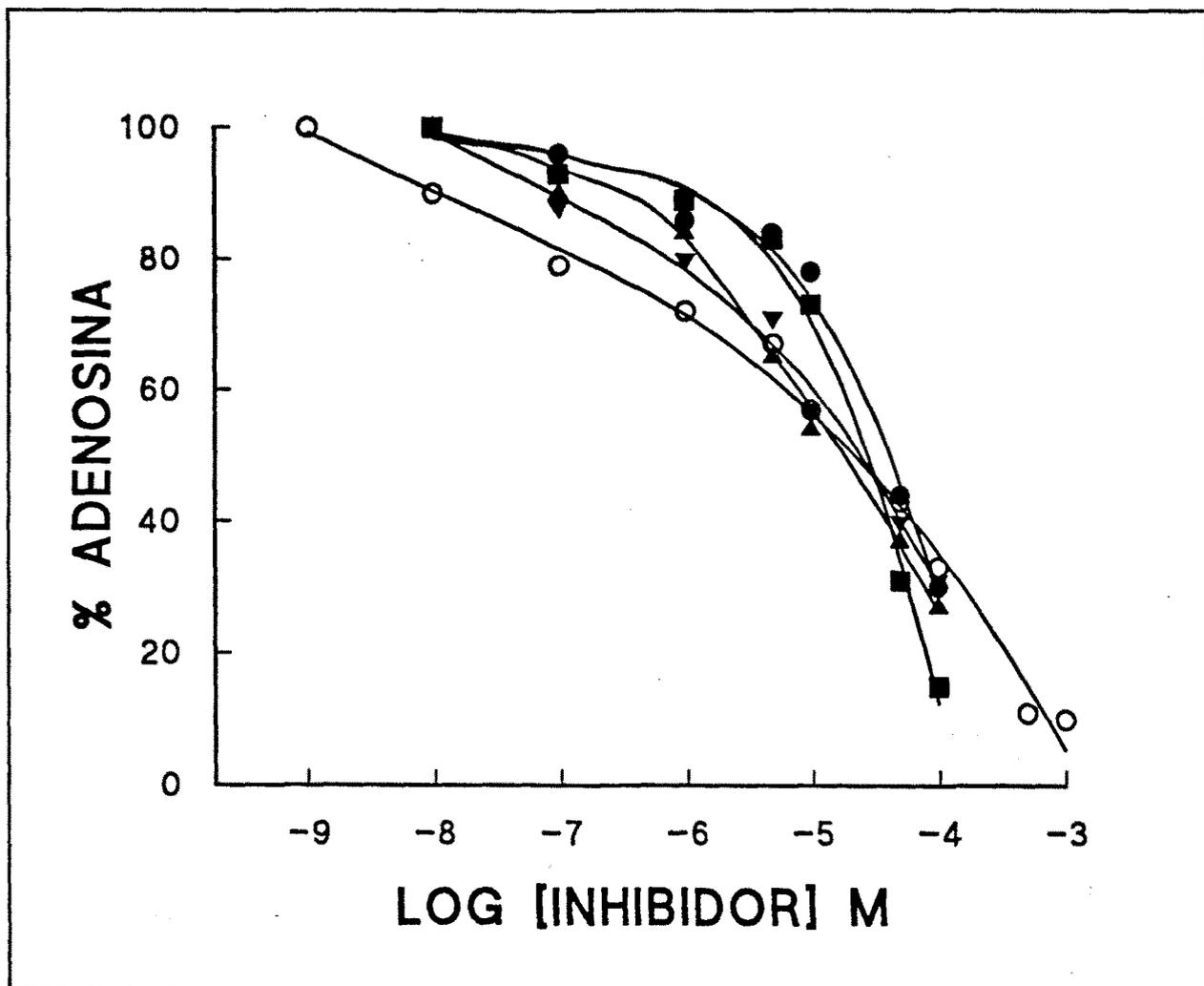


Figura 8.3.-Inhibición del uptake de $[^3\text{H}]$ -adenosina: Circulos negros: PK 11195. Cuadrados: AHN 086. Triángulos: Ro 5-4864. Triángulos invertidos: diazepam. Circulos: OH-NBTI.

FARMACOS Y REACTIVOS

Se han utilizado los siguientes compuestos:

- [³H]-Ro 5-4864, [³H]-PK.11195 y [³H]-adenosina (New England Nuclear).
- Ro 5-4864 (Fluka Chemie AG).
- PK 11195 y PK 14105 (Rhône-Poulenc Santé).
- Diazepam y Clonazepam (Hoffman-La Roche).
- Protoporfirina IX, S-(2-hidroxi-5-nitrobencil)-6-tioguanosina (HNBTG), S-(p-nitrobencil)-6-tioinosina (NBTI), atractilósido y carboxiatractilósido Trizma-clorhídrico y Hepes (Sigma).
- Flutamida (Essex).
- Ciproterona (Shering AG).
- Nifedipino, Nitrendipino y BAY K8464 (Bayer AG).
- Sacarosa (Panreac).
- Albumina bovina (Merck).

Las soluciones stock de cada fármaco se han realizado, en el caso del Pk 11195, Ro 5-4864, diazepam, clonazepam, ciproterona, flutamida, protoporfirina IX, nitrendipino, nifedipino y BAY K8464 con etanol absoluto. El PK 14105 se ha disuelto en dimetilsulfóxido. El resto de los compuestos utilizados se han disuelto en agua destilada.

Material fungible:

- Tubos de vidrio de borosilicato 12 x 75 mm (Corning).
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (2.5 mm).
- Viales de centelleo de 20 ml. (Aulabor).

Aparatos :

- Aparato de filtración múltiple, Centrífuga preparativa Beckman J2-21, homogenizador de tejidos (Polytron, Kinematica), contador de centelleo líquido LKB Wallac 1217 Rackbeta.