

1243

194-111



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y QUIMICA TERAPEUTICA

UNIDAD DE FARMACOLOGIA Y FARMACOGNOSIA

**IDENTIFICACION DE UN TRANSPORTADOR DE
ADENOSINA A PARTIR DE ESTUDIOS SOBRE EL
RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO**

Luegado 23-10-1992

Tres. - Sobresaliente

Grado - Sobresaliente



Memoria que presenta D. David Pubill Sánchez,
dirigida por el Dr. Jorge Camarasa García y la
Dra. Elena Escubedo Rafa, para la obtención del
Grado de Licenciatura.

Barcelona, Septiembre de 1992.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739629

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Camarasa García y a la Dra. Elena Escubedo Rafa, por haber aceptado la dirección del presente trabajo y haberlo hecho posible gracias a su experiencia, conocimientos y continua dedicación.

Al Dr. Tomás Adzet, Director de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por haberme permitido trabajar en este laboratorio y por el interés mostrado por la realización de este trabajo.

Al Dr. P.J. Martorell, del Servicio de Urología del Hospital del Sagrat Cor de Barcelona, y al Dr. F. Tresserra, del Servicio de Anatomía Patológica de la Mútua de Terrassa, por habernos proporcionado las muestras humanas de adenoma y próstata control, respectivamente.

A la Dra. A.H. Newman, del NIDA Addiction Research Center de Baltimore (U.S.A.), por habernos facilitado el AHN 086.

A Antoni Camins, junto a quien he trabajado, por la amistad, trato y conocimientos que de él he recibido. A Francesc Xavier Sureda, por haberme iniciado en la "inmersión" en el mundo del *binding* y por la ayuda prestada. Asimismo, quiero agradecer a Andrés Jiménez, Tere Ramos y Josep Rodríguez, el haber colaborado conmigo en la realización de los últimos experimentos de este trabajo.

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

A todos los compañeros y profesores de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia, por el ambiente de convivencia, compañerismo y respeto mutuo creados.

Finalmente, agradezco a mi familia y amigos la estima y apoyo que me han ofrecido durante la realización de mis estudios.

INDICE.

INDICE.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
-------------------------------	---

I. PARTE TEORICA.

1.- LAS BENZODIACEPINAS.....	4
1.1.- Generalidades.....	4
1.2.- Receptores benzodiazepínicos.....	6
1.2.1.- El receptor benzodiazepínico central.....	6
1.2.2.- Los receptores omega.....	10
1.2.3.- Multiplicidad de los receptores benzodiazepínicos.....	11
2.- EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO.....	13
2.1.- Definición.....	13
2.1.1.- Relaciones estructura-actividad respecto al receptor benzodiazepínico periférico.....	15
2.2.- Localización del receptor benzodiazepínico periférico en el SNC de roedores.....	15
2.3.- Localización en tejidos periféricos de rata.....	16
2.4.- Distribución subcelular.....	17
2.5.- El ligando endógeno del receptor benzodiazepínico periférico.....	18
2.5.1.- El DBI como ligando endógeno.....	19
2.5.1.- Las porfirinas como ligando endógeno.....	22
2.5.3.- Ligandos endógenos poco específicos.....	24
2.6.- Propiedades moleculares del receptor benzodiazepínico periférico.....	24
2.6.1.- Caracterización molecular.....	24
2.6.2.- Lugares de unión.....	28
2.6.3.- Relación con el transportador ATP/ADP mitocondrial.....	29
2.6.4.- Relación con el lugar de unión mitocondrial de baja afinidad	

para las dihidropiridinas.....	30
2.6.5.- Variación interespecífica.....	32
2.7.- Papel biológico de los RBPs.....	33
2.7.1.- Participación de las benzodiazepinas en la modulación del sistema inmune.....	33
2.7.2.- Relación con el sistema endocrino.....	34
2.8.- Relevancia clínica de los RBPs.....	39
2.8.1.- Implicaciones patológicas.....	39
2.8.2.- Los RBPs en tumores humanos: aplicaciones del PK 11195..	41
2.9.- Otras acciones de las benzodiazepinas a nivel periférico.....	43
2.9.1.- Acciones directas.....	43
2.9.2.- Interacción con otros fármacos.....	44
3.- UPTAKE DE ADENOSINA.....	47
3.1.- Papel fisiológico de la adenosina.....	47
3.2.- Transporte de nucleósidos: concepto de <i>uptake</i>	48
3.3.- Receptores de adenosina en testículo.....	50
3.4.- Inhibición del <i>uptake</i> de adenosina.....	52

II. PARTE EXPERIMENTAL.

4.- MATERIAL Y METODOS.....	55
4.1.- Obtención de los órganos de interés para el estudio.....	55
4.1.1.- Obtención de la próstata y testículos de rata.....	55
4.1.2.- Obtención de la próstata humana.....	56
4.2.- Procesamiento de los órganos: obtención del pellet mitocondrial.....	56
4.3.- Determinación proteica.....	56
4.3.1.- Preparación del colorante.....	57
4.3.2.- Descripción del ensayo.....	57
4.4.- Tampones y disoluciones.....	58

4.5.- Condiciones generales para determinar la unión de un ligando a un receptor.....	59
4.6.- Condiciones del ensayo.....	61
4.7.- Separación del radioligando unido del libre.....	62
4.8.- Técnica del centelleo líquido.....	64
4.8.1.- Proceso de centelleo.....	65
4.8.2.- Proceso de detección y cuantificación.....	65
4.9.- Tratamiento de los resultados.....	66
4.10.- Influencia de la temperatura y la concentración proteica.....	67
4.10.1.- Efecto sobre la unión del [^3H]Ro 5-4864.....	67
4.10.2.- Estudios realizados con [^3H]PK 11195 en próstata de rata....	67
4.11.- Descripción de los ensayos de unión.....	70
4.11.1.- Incubación.....	70
4.11.2.- Ensayos de saturación.....	72
4.11.3.- Ensayos cinéticos.....	75
4.11.4.- Ensayos de competición.....	78
4.12.- Ensayos de <i>uptake</i> de adenosina.....	80
4.12.1.- Obtención de la proteína y tampones.....	80
4.12.2.- Condiciones y generalidades de los ensayos de <i>uptake</i>	81
4.12.3.- Ensayos de saturación.....	82
4.12.4.- Ensayos de inhibición.....	83
4.12.5.- Tratamiento de los resultados.....	84
4.13.- Fármacos, reactivos y material empleados.....	84
5.- RESULTADOS.....	86
5.1.- Expresión de los resultados.....	86
5.1.1.- Estudios de saturación.....	86
5.1.2.- Estudios cinéticos.....	93
5.1.3.- Estudios de competición.....	97
5.1.4.- Estudios de transporte.....	99

INTRODUCCION

INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

La Farmacología moderna intenta siempre explicar las acciones de los fármacos mediante su interacción con receptores específicos o mediante una modulación altamente selectiva de los sistemas enzimáticos y/o de neurotransmisión del organismo.

Las benzodiacepinas son un grupo de fármacos ampliamente utilizado, y sus acciones sobre el sistema nervioso central son de sobra bien conocidas. Sin embargo, en la década de los 80, se descubrieron una serie de acciones periféricas de estos compuestos que no han estado suficientemente caracterizadas. Dichas acciones derivarían de su interacción con receptores específicos fuera del SNC: los receptores benzodiacepínicos periféricos.

Parte de estas acciones periféricas han sido descritas por el grupo de investigación de esta Unidad, fundamentalmente mediante ensayos "in vitro" en conducto deferente, duodeno, aurícula y tráquea de rata. Asimismo, esta línea de investigación ha caracterizado el receptor benzodiacepínico periférico en mitocondria de conducto deferente y vesícula seminal de rata mediante ensayos de unión de radioligandos, y ha iniciado dicha caracterización en próstata de rata y adenoma de próstata humana.

Hacía falta, pues, continuar esta caracterización en próstata de rata y adenoma de próstata humana para obtener un mejor conocimiento de estos receptores, intentar determinar su papel fisiológico y poder establecer posibles diferencias a nivel de especie. Varios investigadores han descrito el incremento en la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en ciertos tumores respecto al mismo tejido sano, y la utilidad de los ligandos de estos receptores como marcadores tumorales. La próstata humana se convierte en un material biológico sumamente útil para investigar si la hiperplasia tisular implica un aumento en la concentración de receptores periféricos a las benzodiazepinas.

El hecho de que ciertas sustancias inhibitoras del transporte de nucleósidos interactúen con el receptor benzodiazepínico periférico nos llevó a medir el transporte de adenosina en la fracción mitocondrial de testículo de rata, y a caracterizar por primera vez un lugar de transporte de nucleósidos en membrana mitocondrial, lo cual abre una nueva línea de trabajo para nuestro grupo de investigación.

LOS OBJETIVOS de la presente memoria son los siguientes:

- Completar la caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en próstata de rata con [^3H]Ro 5-4864 mediante la realización de diversos ensayos de competición.

- Caracterizar dicho receptor en próstata de rata utilizando [^3H]PK 11195, antagonista selectivo de dicho receptor y que, según describen varios investigadores, posee mayor afinidad que el Ro 5-4864 en varias especies, entre las que se encuentra la especie humana. Para ello se llevarán a cabo estudios de saturación, cinéticos y de competición. Además, se evaluará la influencia de la concentración proteica y de la temperatura sobre la unión de este radioligando.

- Completar la caracterización de estos receptores con [³H]PK 11195 en adenoma de próstata humana mediante la realización de estudios de competición por diversas sustancias.

- Comparar la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en próstatas humanas afectadas de adenoma con la presente en próstatas control.

- Iniciar la caracterización del transportador de nucleósidos descubierto en membrana mitocondrial mediante ensayos de transporte de [³H]adenosina y de inhibición de dicho transporte por diversas sustancias en la fracción mitocondrial de testículo de rata.

El inicio de la caracterización del transportador de nucleósidos descubierto en membrana mitocondrial marca el comienzo de una nueva línea de trabajo con buenas expectativas en la profundización del conocimiento de las funciones fisiológicas de la mitocondria.

I.- PARTE TEORICA.

1.- LAS BENZODIACEPINAS.

1.1.- Generalidades.

Las benzodiazepinas constituyen un grupo de fármacos que ha llegado a ser el más prescrito de los psicótrópos. El primer compuesto de este grupo, el clordiazepóxido, fue sintetizado por error, cuando lo que se intentaba formar era un N-óxido de quinazolina, y se introdujo en clínica a principios de los años 60. Posteriormente se comprobó que el clordiazepóxido se metabolizaba a 2-benzodiazepinonas, moléculas de igual o superior potencia y más fáciles de sintetizar; este descubrimiento llevó a la síntesis del diazepam, cabeza de serie de este nuevo grupo de fármacos.

Diversas experiencias en animales 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, abriendo con ello un nuevo campo en el tratamiento de la ansiedad.

Todos los compuestos del grupo tienen en común el anillo benzodiazepínico, sustituidos por nitrógeno en las posiciones 1 y 4 (1,4-benzodiazepinas) o, más recientemente, en 1 y 5 u otros isómeros que incorporan diversos heterociclos.

Debido a su elevada liposolubilidad se distribuyen ampliamente por todo el organismo, atravesando las barreras hematoencefálica y placentaria. Presentan un elevado porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, en ocasiones superior al 90 %. Sufren metabolismo fundamentalmente hepático, ocasionando con mucha frecuencia metabolitos también activos; datos a tener en cuenta en casos de insuficiencia hepática y tratamientos prolongados. La eliminación por orina de las formas activas es reducida, siendo mayor la de sus metabolitos. Se excretan también por la leche materna.

Según la vida media de las formas activas en el organismo se clasifican en: de acción corta, intermedia y larga. La vía de administración más usada es la oral, aunque en algunos casos también se usa la vía endovenosa.

Estos fármacos presentan acción ansiolítica, miorrelajante central, anticonvulsivante, antiepiléptica e hipnótica. Han sustituido en gran parte a los barbituratos y al meprobamato (fármacos que también presentan estas acciones) ya que presentan menor incidencia de efectos indeseables, mayor margen terapéutico y una acción ansiolítica más marcada. En tratamientos largos pueden producir farmacodependencia y tolerancia, pero la frecuencia de la aparición de estos síntomas y su gravedad es mucho menor que para los otros depresores del sistema nervioso central.

Las benzodiacepinas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de la ansiedad, pero son ineficaces en la esquizofrenia y de discutida utilidad en el tratamiento de la ansiedad no neurótica. A dosis superiores a las ansiolíticas producen sedación e hipnosis, siendo de utilidad en el tratamiento del insomnio. El diazepam y clonazepam se usan también por vía endovenosa en el tratamiento de las convulsiones producidas en el *status epilepticus* o por agentes tóxicos (tétanos). También se usan como relajantes musculares, en la medicación e inducción preanestésica y en el tratamiento de la abstinencia producida por la supresión del alcohol. La intoxicación por benzodiacepinas puede revertirse con la

administración del antagonista flumazenil (Ro 15-1788).

1.2.- Receptores benzodiazepínicos.

Existen como mínimo dos categorías de lugares de unión para las benzodiazepinas. La más conocida es la funcionalmente asociada al receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), de localización limitada al sistema nervioso central (SNC) y que se conoce como **receptores benzodiazepínicos centrales**. La acción de las benzodiazepinas con los receptores centrales provoca los efectos farmacológicos antes descritos. Bastrup y Squires (1977) descubrieron lugares de fijación para las benzodiazepinas fuera del SNC, no relacionados con el GABA y ampliamente distribuidos por todo el organismo, incluidos el encéfalo y la médula espinal; pero con una distribución y especificidad farmacológica totalmente diferente a la de los receptores centrales, denominándose **receptores benzodiazepínicos periféricos o mitocondriales** por su distribución subcelular.

1.2.1.- El receptor benzodiazepínico central.

En 1975, estudios electrofisiológicos demostraron que las benzodiazepinas producían una modulación alostérica en el complejo macromolecular sobre el que se une el ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos (Haefele y col. 1975).

La unión del GABA a su complejo receptor de las membranas sinápticas (hasta hace poco denominado receptor GABA_A) provoca la apertura del canal de cloruro que contiene, lo cual conlleva una inhibición de la neurotransmisión. La interacción de las benzodiazepinas agonistas con lugares específicos de este complejo macromolecular provoca un cambio conformacional que aumenta la afinidad del receptor por el GABA, con lo cual, el canal de Cl⁻ estará más tiempo abierto y la inhibición será mayor.

Las benzodiacepinas que interaccionan con este receptor se pueden clasificar como agonistas, antagonistas y agonistas inversos. Las usadas en clínica por sus efectos típicos ansiolíticos, miorelajantes, etc. son agonistas. Los antagonistas dificultan o inhiben la unión del agonista, mientras que los agonistas inversos interaccionan con el receptor pero manifestando efectos opuestos a los que provocan los agonistas (el canal se cierra, con lo cual disminuye la acción del GABA).

Por otra parte, el complejo receptor del GABA presenta dos dominios más: uno para moléculas del tipo picrotoxina y otro para moléculas de tipo barbiturato. Los barbituratos pueden además bloquear directamente los canales de cloruro e interferir los movimientos de calcio; de ahí su acción depresora más potente.

En 1978 se demostró que el GABA y el muscimol (estructuralmente relacionado con el GABA y agonista periférico de los receptores GABA_A), incrementaban la fijación del diazepam tritiado en homogeneizados de tejido cerebral, libres de GABA endógeno. Este efecto era estereoespecífico e inhibido por la bicuculina, un antagonista del receptor GABAérgico. Estos descubrimientos fueron fundamentales para dilucidar el mecanismo de acción central de las benzodiacepinas. 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 benzodiacepínico central y el receptor del GABA.

Inicialmente se pensó que el lugar de unión de las benzodiacepinas era específico para las mismas; sin embargo, existe una serie de compuestos no benzodiacepínicos que son capaces de desplazar potente y completamente las benzodiacepinas 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 el 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 de la unidad.

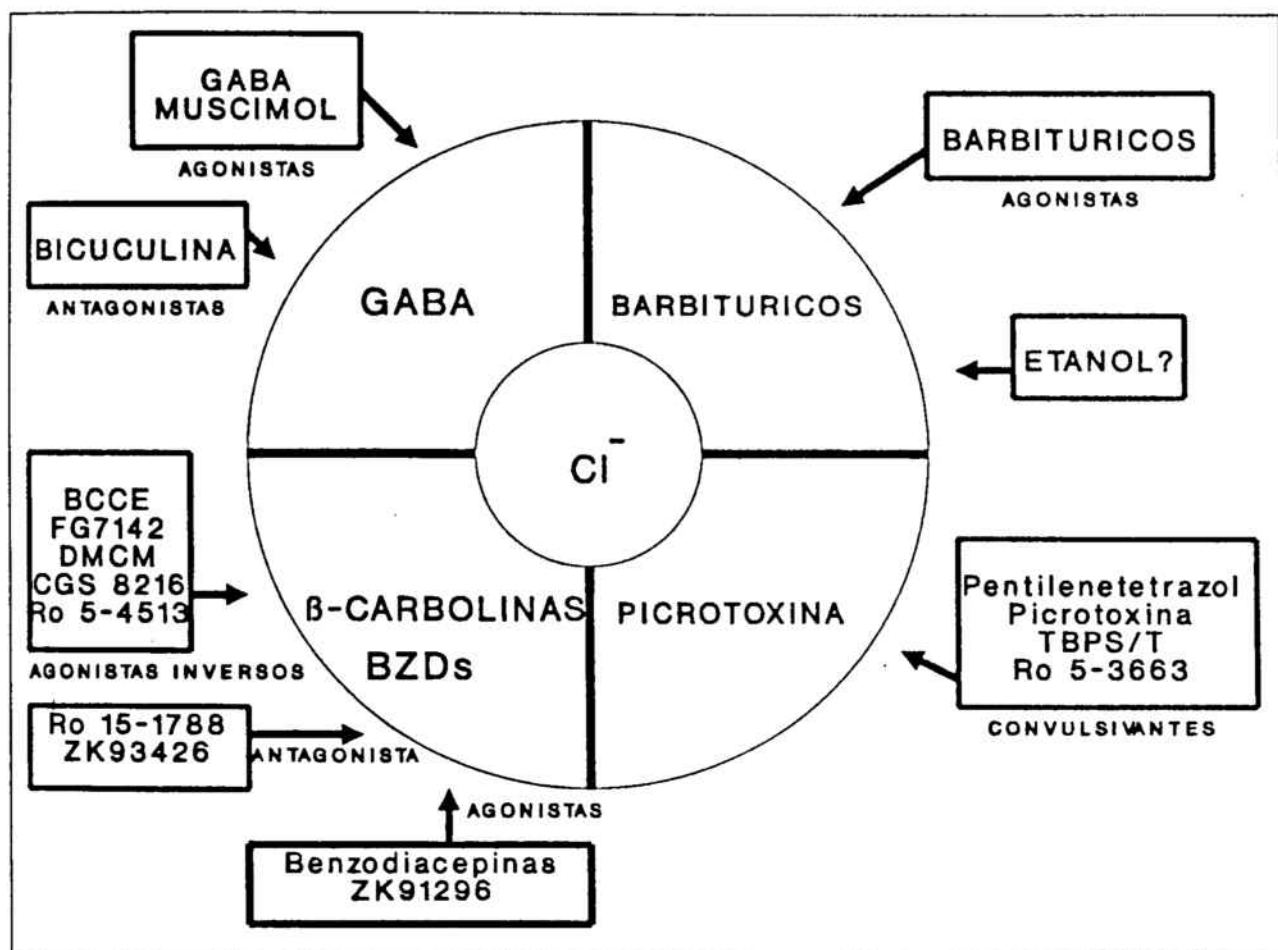
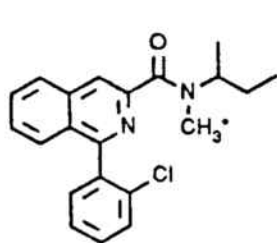


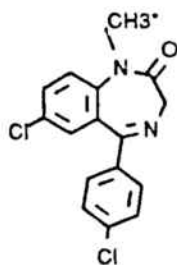
Figura 1.1.- Complejo molecular GABA/BENZODIACEPINAS/IONOFORO Cl^- En la figura se representa los diferentes lugares de unión dentro del complejo y se remarca algunos ejemplos de los ligandos que interactúan con ellos. (Flórez, 1989).

Los trabajos realizados utilizando 1,4-benzodiazepinas sugieren que el receptor benzodiazepínico es heterogéneo, existiendo dos subpoblaciones de receptores denominados BZ_1 y BZ_2 . 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 BZ_1 .

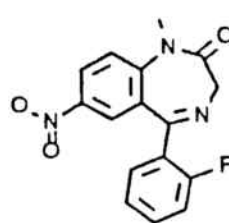
En esta página, se representan las estructuras químicas de diversas benzodiazepinas y otras sustancias relacionadas con los receptores benzodiazepínicos.



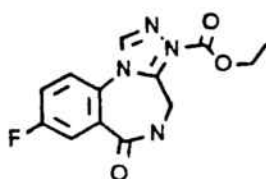
[3H]-PK 11195



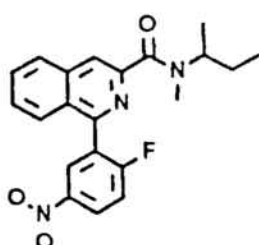
[3H]-Ro 5-4864



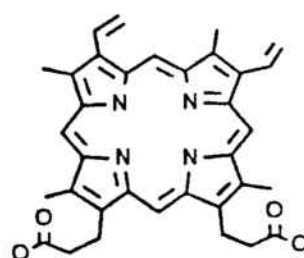
Flunitrazepam



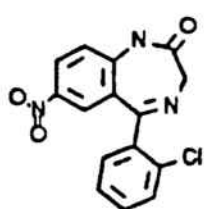
Ro 15-1788



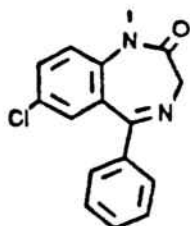
PK 14105



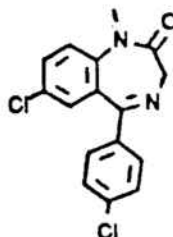
Protoporfirina IX



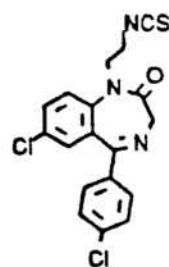
Clonazepam



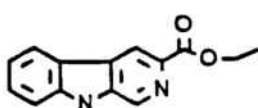
Diazepam



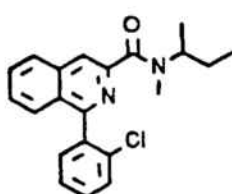
Ro 5-4864



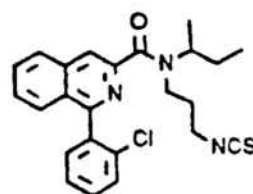
AHN 086



BCCE



PK 11195



AHN 070

1.2.2.- Los receptores omega.

La aparición de nuevas sustancias de estructura no benzodiazepínica pero de gran afinidad por los receptores benzodiazepínicos llevó en 1988 a Langer y Arbilla a postular la existencia de tres tipos de receptores benzodiazepínicos. De este modo se establecieron tres subtipos de receptores benzodiazepínicos: ω_1 , ω_2 y ω_3 .

Los receptores ω_1 y ω_2 son receptores centrales, mientras que los ω_3 corresponden a los receptores periféricos. En la siguiente tabla se esquematizan los ligandos específicos de cada uno de estos subtipos de receptores:

Nombre antiguo	Nombre 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

* Hasta el momento, no existen ligandos selectivos para el receptor ω_2

Tabla 1.1.- Clasificación de los receptores benzodiazepínicos propuesta por Langer y Arbilla.

El zolpidem es una imidazopiridina que muestra elevada afinidad por el receptor ω_1 y que produce sedación e hipnosis a dosis menores que las anticonvulsi-

vantes, mientras que las benzodiacepinas presentan una actividad anticonvulsivante a dosis inferiores a las que producen sedación.

Mediante estudios autorradiográficos y de fotoafinidad se diferenció la localización de los receptores ω_1 y ω_2 . La diferente localización cerebral de los sitios ω_1 y ω_2 y los efectos observados en animales con el zolpidem permitió formular hipótesis en cuanto al posible papel que pudiera desempeñar cada subtipo. El hecho de que los receptores ω_1 estén localizados preferentemente en las zonas corticales sensomotrices y en los lugares sensomotores talámicos sugiere que este subtipo de receptor pudiera estar implicado en los efectos hipnóticos. Por el contrario, la localización en regiones límbicas de los ω_2 , así como en la amígdala y en el hipocampo, podría responsabilizarle de los efectos ansiolíticos y anticonvulsivantes. La presencia exclusiva de receptores ω_2 en la médula espinal indicaría que estos sitios están probablemente implicados en los efectos miorrelajantes.

En 1991, Doble y col. postularon la existencia de hasta seis subunidades α en el receptor GABA_A (hasta el momento se creía que sólo estaba constituido por dos subunidades α y dos β), invalidando así la nomenclatura en subtipos ω al dejarla incompleta.

1.2.3.- Multiplicidad de los receptores benzodiacepínicos.

Diferentes experimentos han llevado recientemente a formular la atractiva hipótesis de la existencia de multiplicidad en los receptores benzodiacepínicos centrales. Según esta idea, existirían distintos subtipos de receptor en diferentes áreas cerebrales según su función fisiológica. En un inicio se sugirieron dos subtipos para el receptor GABA_A: BZ₁ y BZ₂. El BZ₁ está presente en todo el encéfalo, pero predomina en el cerebelo, mientras que el BZ₂ se encuentra principalmente en córtex, hipocampo y médula espinal.

Se supone que el receptor GABA_A está formado por tres subunidades: α , β

y γ . Se han clonado los ADN que codifican las posibles isoformas de dichas subunidades y todos los resultados apuntan a que las responsables de la multiplicidad de estos receptores son las subunidades α . De este modo se han encontrado al menos seis fenotipos de subunidad α , nombradas mediante números del 1 al 6 (Doble y Martin, 1991). Hasta el momento, se dispone de un ligando selectivo para la subunidad $\alpha 1$, el zolpidem. Para la subunidad $\alpha 6$ se dispone del agonista inverso sarmazenil y parece ser que la isoforma $BZ_{\alpha 6}$ podría estar implicada en los efectos farmacológicos del etanol.

En la siguiente figura se esquematiza mediante un diagrama de Venn la farmacología de los lugares de reconocimiento a benzodiazepinas α (1-6):

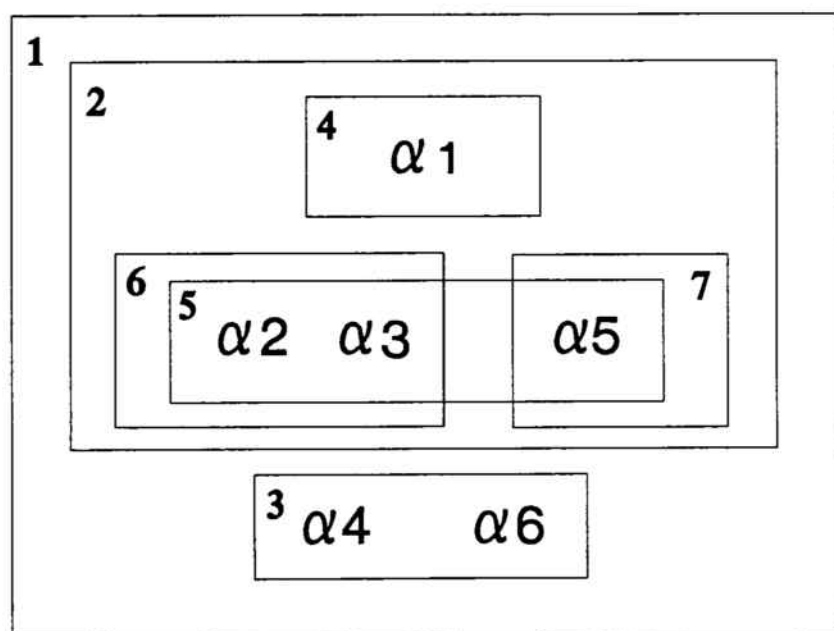


Figura 1.2.- En la caja 1, todos los receptores tienen alta afinidad por muscimol y sarmazenil. En la caja 2 todos tienen alta afinidad por el diazepam. En la 3, todos los receptores tienen baja afinidad por el diazepam. La caja 4 contiene los anteriormente llamados BZ_1 : alta afinidad por el CL218872 y el zolpidem. La caja 5 comprende los antiguos BZ_2 : baja afinidad por el CL218872 y el zolpidem. La afinidad por el zolpidem y β -CCE es: caja 4 > 6 > 7. Afinidad por el CL218872: caja 4 > 7 > 6

2.- EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO.

2.1.- Definición.

En 1977, Bastrup y Squires describieron nuevos lugares de fijación para el [³H]Diazepam en riñón y, posteriormente, se describieron en casi todos los tejidos, incluido el SNC. Estos nuevos sitios de unión eran diferentes del receptor GABA_A, presentando respecto a él diferente especificidad por diversas sustancias (ver tabla 2.1). A este nuevo tipo de receptores se les denomina receptores benzodiazepínicos periféricos (RBPs) debido a su inicial descubrimiento en tejidos ajenos al SNC. Debido a que se localizan principalmente en mitocondria, también se les denomina receptores benzodiazepínicos mitocondriales (RBMs).

Una característica de este tipo de receptor es la elevada afinidad que presenta por dos grupos de sustancias: uno, determinadas benzodiazepinas como el Ro 5-4864 (4'-clorodiazepam) y, otro, derivados isoquinoleín-carboxamídicos como el PK 11195; mientras que su afinidad por el clonazepam y otras benzodiazepinas de alta especificidad por el receptor central es prácticamente nula. Otro grupo de ligandos introducido más recientemente es el de las quinoleín-propanamidas, como el PK 14067 y de estructura similar a las isoquinoleín-carboxamidas. De esta manera se establece un orden de afinidades característico para este receptor: PK 11195 > Ro 5-4864 > diazepam >> clonazepam.

Los receptores benzodiazepínicos periféricos no están acoplados a sitios de reconocimiento del GABA, mientras que los denominados centrales sí. Además de los receptores GABA_A y RBPs se han descrito recientemente otros lugares de unión para las benzodiazepinas (Taft y col. 1984; Kirkness y col. 1988) que, aunque también están fuera del SNC, demuestran un perfil de afinidades diferente al de los RBPs y aún no bien definido y, por tanto, no son objeto del presente trabajo. Así pues, el término "receptor benzodiazepínico periférico" se refiere a un sitio de unión de benzodiazepinas y otras sustancias distinto y bien definido, y no a lugares alternativos de unión de benzodiazepinas en tejidos periféricos. A pesar de la connotación de su nombre, los RBPs se encuentran en el SNC a niveles iguales o, en algunos casos, mayores que los de GABA_A (Marangos y col. 1982; Villiger 1985).

	GABA-BZD	RBPs
Especificidad por BZDs	Diazepam Flunitrazepam Clonazepam Flumazenil	Diazepam Flunitrazepam Ro 5-4864
Otros ligandos	Imidazopiridinas β-carbolinas Barbituratos Muscimol t-Butilbiciclofosforotionato	Imidazopiridinas Isoquinoleín-carboxamidas Quinoleín-propanamidas Porfirinas
Subunidades proteicas	50-58 kd	18 kd (30 kd?)
Densidad en: SNC Tejidos perifericos	Neuronas>glía Baja-ausentes	Glía>neuronas Muy variable
Localización subcelular	Membrana plasmática	Mitocondrial

Tabla 2.1.- Comparación entre las propiedades que diferencian a los receptores GABA_A de los RBPs.

2.1.1.- Relaciones estructura-actividad respecto al receptor benzodiazepínico periférico.

Se ha demostrado que un grupo metilo situado en el nitrógeno en posición 1 de la benzodiazepina es básico para la unión al RBP. Por ejemplo, el Ro 5-2180 es muy parecido al diazepam pero carece del grupo 1-metilo, lo cual hace que su afinidad por el RBP disminuya a 10 μ M frente al 79 nM del diazepam. La necesidad del grupo 1-metil se cree que es debida a su capacidad para ceder electrones hacia el anillo A de la molécula benzodiazepínica, aumentando de este modo la nucleofilia del anillo B adyacente, con lo que se facilita la interacción con grupos electrófilos.

El átomo de halógeno situado en posición 4' aumenta la afinidad por los receptores periféricos, presentando las moléculas que contienen cloro una afinidad 10 veces mayor que las que contienen flúor. Otra posición que determina la afinidad es la 7, sobre la cual los halógenos son mucho mejores sustituyentes que los grupos nitro para la unión a los RBPs.

Mediante el uso de las quinoleín-propanamidas (-)PK14067 y (+)PK 14068, dos enantiómeros, se ha puesto de manifiesto la estereoespecificidad de la unión a estos receptores, ya que la afinidad de las dos sustancias difería en dos órdenes de magnitud (Dubroeuq y col. 1986).

2.2.- Localización del Receptor Benzodiazepínico Periférico en el SNC de roedores.

Se han realizado estudios autorradiográficos (Gehlert y col. 1985) que demuestran una localización diferente de los RBPs respecto a los centrales a nivel de SNC.

En estudios iniciales en rata (Richards y col. 1982; Benavides y col. 1983),

en ratón (Anholt y col. 1984) y en cobayo (Weissman y col. 1985) se demostró la existencia de una elevada 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 coroides y revestimiento ependimal de los ventrículos. También se encuentra una elevada densidad de RBPs en las células gliales. En estudios autorradiográficos en cerebro de gato (Benavides y col. 1984) utilizando [^3H]PK 11195 se demostró la presencia de RBPs en neuronas, únicamente a nivel de sustancia gris, ya que están ausentes en la sustancia blanca.

Asimismo, se ha demostrado la existencia de elevadas densidades de RBPs a nivel del sistema auditivo y de la visión; en el núcleo que regula la presión sanguínea; en los sistemas motores vestibulo-cerebelosos y extrapiramidales; y en zonas del hipocampo y del estriado (Shoemaker y col. 1983; Richards y col. 1983). También se encuentran RBPs en el nervio óptico y la médula espinal.

Parece ser que, filogenéticamente, el receptor periférico es de aparición más tardía que el central, ya que se ha detectado en el cerebro de mamíferos, mientras que la densidad de estos receptores en otras especies es inferior.

2.3.- Localización en tejidos periféricos de rata.

Estudios autorradiográficos realizados en animal entero (Anholt y col. 1985) muestran una elevada densidad de RBPs en el córtex adrenal, piel, corazón, glándulas salivares, regiones del riñón (principalmente la porción ascendente del asa de Henle y en el túbulo convulvulado distal), epitelio pulmonar y lingual, en el revestimiento de arterias pulmonares y en el timo. También se han encontrado RBPs en conducto deferente (Escubedo y col. 1991; 1992) y en vesícula seminal (Camins y col. 1992).

En estudios autorradiográficos realizados con órganos endocrinos (De Souza y col. 1985) se ha encontrado también una gran densidad de RBPs en pituitaria,

principalmente en el lóbulo posterior, mientras que el lóbulo intermedio y anterior presentan menor densidad. En la glándula adrenal se encuentran preferentemente localizados en el córtex, presentando la zona glomerular externa la mayor densidad.

En los testículos, se encuentra una distribución para el [^3H]Ro 5-4864 a nivel del tejido intersticial, donde se encuentran las células de Leydig, responsables de la producción de testosterona. Se encuentran densidades más bajas en el epitelio de los túbulos seminíferos, en las células de Sertoli y en el espermatozoide.

Parece ser pues que hay una relación entre densidades altas de RBPs y tejidos relacionados con la esteroidogénesis. Sin embargo, hay tejidos como el corazón que presentan elevadas densidades de RBPs, por lo cual, parece ser que la relación alta/baja densidad de receptores pudiera estar relacionada con la fuente de energía metabólica (Anholt y col. 1985). Tejidos con niveles bajos de RBPs como parte del cerebro, músculo esquelético y músculo liso dependen del consumo de glucosa; mientras que tejidos con niveles elevados de estos receptores como el córtex adrenal, piel y músculo cardíaco obtienen la mayor parte de su energía metabólica de la fosforilación oxidativa. Una relación entre el metabolismo aeróbico y los RBPs podría explicar la elevada densidad detectada en el corazón. A pesar de todo esto, no se descarta la relación entre el receptor benzodiazepínico periférico y la síntesis hormonal.

2.4.- Distribución subcelular.

En 1986 Anholt y col. encontraron una relación entre el receptor benzodiazepínico periférico y la monoamino-oxidasa, con lo cual se asociaron los RBPs a la membrana mitocondrial. La separación de las membranas externa e interna mediante un ligero tratamiento con digitonina hacía que descendiera la unión del [^3H]PK 11195 a su receptor y se liberara junto a la monoamino oxidasa. De esta manera se demostraba que los RBPs se localizaban en la membrana mitocondrial

externa, ya que la monoamino-oxidasa es un excelente marcador de dicha membrana.

Posteriormente surgió la controversia con los estudios realizados por Mukherjee y col. (1989) en pulmón de cobayo, donde se demostraba que el RBP está estrechamente relacionado con la adenilato kinasa, que se encuentra en la superficie externa de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, no existe ninguna relación entre el receptor periférico y la citocromo oxidasa, marcador específico de la membrana mitocondrial interna.

Estos estudios permiten concluir que la localización subcelular de los RBPs puede ser distinta en diferentes tejidos o, visto de otro modo, que podrían encontrarse en los puntos de contacto de la membrana mitocondrial externa con la interna, que se cofraccionan al añadir marcadores de la membrana interna (Krueger y Papadopoulos, 1992).

Por los resultados obtenidos por autorradiografías (Anholt y col. 1985) y por estudios de fraccionamiento subcelular (Antkiewitz y col. 1988) parece ser que los niveles de RBPs en mitocondria son bastante variables y no parecen ser constituyentes de todas las mitocondrias. Por ejemplo, se ha detectado su ausencia aparente en las células cromafines de la médula adrenal (Kataoka y col. 1984) y en determinados cultivos primarios (Syapin y col. 1979).

2.5.- El ligando endógeno del receptor benzodiazepínico periférico.

La identificación del ligando endógeno del RBP ayudaría a determinar su función en el organismo. Hasta el momento se han propuesto dos posibles candidatos: uno lo constituiría el péptido denominado "inhibidor del binding del diazepam" (diazepam binding inhibitor o DBI), que presenta efectos similares para el receptor central que para el periférico. En segundo lugar, están sustancias de tipo porfirina.

2.5.1.- El DBI como ligando endógeno.

El DBI es un péptido de 10 KD que presenta una serie de características indicativas de que puede ser el precursor de una familia de péptidos moduladores alostéricos del receptor GABA_A, actuando en el lugar de unión de las benzodiazepinas. El DBI y sus derivados comparten la capacidad de desplazar específicamente las benzodiazepinas de sus receptores, tanto en cerebro como en tejidos periféricos. Se ha identificado el DBI de la especie humana, el cual contiene 105 aminoácidos, mientras que el de rata y bovino contienen 86 (Gray y col. 1986).

A partir del DBI y por digestión enzimática con tripsina se genera un octadecaneuropeptido, el ODN, que contiene los 18 aminoácidos de la fracción 33-50 del DBI. También se ha aislado otra fracción, denominada triacontatetraneuropeptido (TTN), formada por los 34 aminoácidos de las posiciones 17-50 del DBI; así como el icosapentaneuropeptido, que es el fragmento 26-50. 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 a otros péptidos localizados en dichas vesículas. Cuando se produce una despolarización neuronal, estos péptidos son liberados al espacio extracelular. A nivel de la glía, el DBI no es procesado a ODN ni secretado extracelularmente, pero puede actuar sobre el receptor benzodiazepínico mitocondrial.

Para establecer las propiedades desplazantes del DBI en los receptores benzodiazepínicos, Barbaccia (1986) comprobó la capacidad de desplazamiento de varios péptidos resultantes del DBI sobre el [³H]PK 11195 en fracciones mitocondriales de astrocitos y del [³H]flumazenil en los receptores del GABA de cultivos de neuronas corticales de rata. El ODN era capaz de desplazar al flumazenil del receptor GABA_A con una K_i de 5 nM, pero no desplazaba al PK 11195 de los receptores mitocondriales de los astrocitos. Por otro lado, el TTN

desplazaba al PK 11195 con una K_i de 10 μ M pero no al flumazenil del receptor GABA_A. El TTN desplaza también al [³H]Ro 5-4864 de sus lugares de unión en membranas de bulbo olfatorio a concentraciones micromolares (Slobodyansky y col. 1991), mientras que no afecta a la unión del flumazenil. Estos resultados llevan a pensar que el ODN modula alostéricamente la acción del GABA sobre el receptor GABA_A, mientras que el TTN y el DBI se unen principalmente a los RBMs.

Funciones y localización del DBI y sus derivados.

Para determinar el papel fisiológico que puede desempeñar el DBI se han llevado a cabo estudios en pacientes con desórdenes neuropsiquiátricos (Barbaccia y col. 1986), midiendo los niveles de DBI en líquido cefalorraquídeo y comparándolos con los de individuos normales. Los resultados demuestran que hay un incremento del DBI en pacientes que sufrían depresión respecto a los individuos normales.

También se ha demostrado que los niveles de DBI y de RBMs aumentan después de inducir estrés agudo por ruido en ratas (Ferrarese y col. 1991). El DBI y sus productos de degradación (ODN y demás) aumentaban selectivamente en el hipocampo de las ratas estresadas. El aumento de DBI venía precedido y seguido por un descenso neto de los receptores de GABA_A y un aumento de los RBMs. De manera análoga, en el córtex adrenal, el contenido de DBI y RBMs aumentaba durante la primera hora siguiente a la inducción del estrés y era paralelo a un aumento de los niveles de corticosterona en plasma.

En 1987 Masakazu demostró que el tratamiento crónico con diazepam en rata provocaba un aumento de los niveles de DBI, del ARN_m que lo codifica, y de ODN, pero sólo a nivel de cerebelo y córtex, mientras que en hipocampo y estriado no se detectaron cambios. El nivel de ODN se incrementó en un orden cinco veces superior al del DBI. Parecía pues que el DBI podría participar en el control de funciones cerebrales.

Butterworth y col. (1991) estudiaron los efectos de la anastomosis porto-cava en cerebro de rata mediante inmunocitoquímica, valiéndose de un anticuerpo de alta actividad específica sobre el ODN y comprobaron que los niveles de ODN en cerebro habían aumentado.

Se ha propuesto que el DBI actúa en la liberación de insulina (Chen y col. 1988), ya que al añadirlo a preparaciones aisladas de páncreas ésta se ve inhibida. Mediante técnicas de radioinmunoensayo utilizando [¹²⁵I]DBI (Johansson y col. 1990) se ha puesto de manifiesto una asociación entre el glucagón y el DBI debido a que, en micrografías de inmunofluorescencia en páncreas de rata, se ha visto que el DBI se solapa con el glucagón y no con la somatostatina, sugiriendo un posible papel de este péptido en la producción o modulación de hormonas a nivel de los islotes de Langerhans.

En 1989, Besman y col. comprobaban que el estímulo de la liberación de colesterol era mediada por los RBMs. Se ha demostrado (Papadopoulos y col. 1991) que tanto el DBI como el TTN activan la síntesis de esteroides mediante una interacción con los RBMs, provocando un incremento del transporte de colesterol hacia la matriz mitocondrial y la posterior síntesis de pregnenolona.

La patogenia de las encefalopatías hepáticas podría estar ligada a alteraciones en los niveles de péptidos endógenos como el DBI (Butterworth y col. 1990), ya que se ha demostrado que los niveles de DBI en líquido cefalorraquídeo de pacientes con encefalopatía hepática eran tres veces más elevados que en individuos sanos. El flumazenil se usa para disminuir los efectos cerebrales de esta enfermedad ya que desplaza al DBI de sus lugares de unión. Lavoie y col. (1990) encontraron aumentada la densidad de RBPs en muestras de cerebro procedentes de autopsias de pacientes cirróticos con encefalopatía hepática; aumento que iba ligado a cambios morfométricos de los astrocitos. Parece ser que los RBMs podrían estar implicados en el metabolismo oxidativo cerebral, y su alteración podría tener significancia patofisiológica en las encefalopatías hepáticas.

Los estudios realizados con técnicas inmunohistoquímicas (Tonon y col. 1990) demuestran que el ODN no presenta una localización neuronal en cerebro de rata, sino que se encuentra localizado en la glía, ya que desplaza al [³H]diazepam de sus lugares de unión de manera más potente en la glía que en las neuronas (Bender y col. 1986). Dicha localización del ODN coincide con la localización de los RBPs cerebrales.

También se ha localizado DBI, el ARN_m que lo codifica y ODN en testículos de rata (Rhêaume y col. 1990), concretamente a nivel de células de Leydig. Dado que, tal como ya se ha dicho, estas células contienen una elevada densidad de RBPs, se formula la hipótesis de que el ODN y/u otros péptidos relacionados con el DBI pudieran jugar un papel en la regulación de estas células.

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 glándula mamaria de cabra por una ácido graso sintetasa está mediado por una aciltransferasa, resultando como productos acil-CoA ésteres (Knudsen y col. 1990). Estos ésteres son transportados y almacenados intracelularmente gracias a una proteína a la que se unen los ácidos grasos (FABP). Parte de la FABP comprende un péptido de 10 KD que induce la síntesis de ácidos grasos de cadena media. Este péptido, que se denominó ACBP (acil-CoA binding protein) tiene una secuencia que coincide con la del DBI, sugiriéndose por ello que el DBI puede ser un péptido estructural con acciones hormonales.

2.5.2.- Las porfirinas como ligando endógeno.

El descubrimiento de que los lisados de eritrocitos desplazaban al Ro 5-4864 y al PK 11195 de sus lugares de unión en mitocondrias renales propició el estudio

y purificación de extractos metanólicos de diversos tejidos, demostrándose que diferentes porfirinas interaccionaban con los RBPs con afinidad submicromolar (Snyder y col. 1987; Verma y Snyder, 1988).

La identificación de las porfirinas como ligandos endógenos y la asociación del receptor benzodiazepínico periférico con la membrana mitocondrial externa sugiere una posible relación funcional entre ambos. La etapa inicial y final en la biosíntesis de porfirinas tiene lugar dentro de la mitocondria; a continuación 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 podrían atravesar la membrana mitocondrial externa utilizando la vía del canal aniónico voltaje dependiente.

Proteínas citosólicas que utilizan porfirinas como grupo prostético, tales como 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 córtex adrenal, en las células productoras de esteroides de los testículos y en los ovarios, ya que los citocromos intervienen en la biosíntesis de esteroides adrenales y gonadales.

De las diferentes porfirinas estudiadas, la que presenta una mayor afinidad por el RBM es la protoporfirina IX, con una K_i de $14,5 \pm 10,7$ nM.

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.

2.5.3.- Ligandos endógenos poco específicos.

Se ha descrito que diversos extractos de plasma y orina de humanos pueden inhibir competitiva y selectivamente la unión del Ro 5-4864 al receptor benzodiazepínico periférico (Beaumont y col. 1983). Otros investigadores han descrito inhibidores de la unión del [^3H]Ro 5-4864 en extractos metanólicos acidificados de 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 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.

Se ha descrito un isoenzima de la fosfolipasa A_2 como modulador endógeno de la unión de 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 RBP, o generaría ácidos grasos libres que competirían por dicho receptor (Verma y col. 1990). Otros estudios demuestran que algunos fosfolípidos y ácidos grasos insaturados pueden inhibir la unión del [^3H]Ro 5-4864 a los RBPs a concentraciones micromolares.

2.6.- Propiedades moleculares del receptor benzodiazepínico periférico.

2.6.1.- Caracterización molecular.

El aislamiento y caracterización molecular del RBP permitiría clarificar su papel dentro del organismo. Para el aislamiento de este receptor se han usado ligandos que se unen covalentemente al mismo (Mukhin y col. 1990) mediante la realización de un fotomarcaje con luz ultravioleta. Los tres ligandos utilizados fueron el [^3H]flunitrazepam, el [^3H]PK 14105 y el [^3H]AHN 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: una de 35 kD y otra de 30 kD. Utilizando [³H]AHN 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 (McCabe y col. 1989).

Un candidato propuesto para esta proteína de 30 kD sería el canal aniónico voltaje-dependiente (VDAC) (Snyder y col. 1987), 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, una isoquinoleíncarboxamida similar al PK 11195, se aisló en riñón de rata una proteína con un peso de 18500 daltons (Skowronski y col. 1988). Doble y col. ya habían aislado en 1987 un polipéptido de 17-18 kD en membrana cardíaca de rata, también aislado en córtex adrenal de bovino (Parola y col. 1990) y de igual peso molecular. A este péptido se le denominó "lugar de unión para el PK" (PKBS) (Antkiewicz y col. 1988), 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 podría ser un complejo formado por varias moléculas, de modo que las benzodiazepinas y las isoquinoleínas se unirían a lugares o dominios distintos del mismo.

En el caso del lugar de unión del [³H]PK 14105, la única proteína que presenta un peso molecular de 15-18 KD es la fosfolipasa A₂. En experiencias realizadas con ácido araquidónico, producto de la acción de la fosfolipasa A₂, se ha podido observar cómo inhibe la unión de la benzodiazepina Ro 5-4864 pero no la

de la isoquinoleína PK 11195 (Skowroski y col. 1987).

Otra proteína candidata de la membrana externa mitocondrial de 15 kD es la glutathion-S-transferasa. La protoporfirina IX se une a este enzima a concentraciones 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 el nexo de unión entre estas dos moléculas. Parece ser pues que estas proteínas podrían estar asociadas formando un complejo molecular del que podría formar parte el receptor benzodiazepínico periférico. Una de sus funciones sería la de realizar transporte de moléculas entre el citoplasma y los compartimientos mitocondriales (Mannella y col. 1984; Schwaiger y col. 1987; Fiek y col. 1982).

Mc Enery y col. (1992) aislaron el RBM y comprobaron inmunológicamente que se componía de 3 subunidades proteicas. La primera, de 18 kD, era marcada por la unión del [³H]PK 11195. Las otras dos, de 30 y 32 kD, contenían los sitios de unión para las benzodiazepinas [³H]AHN 086 y [³H]flunitrazepam. Mediante la utilización de anticuerpos selectivos identificaron la subunidad de 30 kD como el carrier de nucleótidos de adenina (ADC), mientras que la de 32 kD fue identificada como el canal aniónico voltaje-dependiente (VDAC). A pesar de que los ligandos de tipo isoquinoleín-carboxamida marcan diferentes subunidades que los benzodiazepínicos, ambos sitios de unión interactúan alostéricamente, ya que la unión de ambos tipos de ligandos es mutuamente competitiva a concentraciones de orden nanomolar. Es más, la eosino-5-maleimida y el cloruro mercuríco inhiben la unión del PK 11195 al receptor mediante la interacción con los grupos sulfhidrilo presentes en el ADC.

El VDAC y el ADC, proteínas de la membrana mitocondrial externa e

interna respectivamente, junto a la subunidad de 18 kD podrían involucrar el RBP en lugares de transporte funcionalmente importantes en los puntos de contacto de las dos membranas mitocondriales.

Se ha clonado el ADN que codifica para el lugar de unión de las isoquinoleín-carboxamidas, la subunidad de 18 kD (Sprengel y col. 1989), y se ha expresado en células humanas de riñón, obteniéndose un péptido de 18943 daltons muy hidrofóbico. De su secuencia aminoacídica se deduce que no es típicamente mitocondrial, resultados que concuerdan con otros estudios (Doble y col. 1985; Olson y col. 1988) que sugieren que el RBP no tiene una localización exclusiva a nivel de compartimentos mitocondriales. Más recientemente se transfectó el DNA que codifica para esta subunidad en humanos a una levadura (especies que no tienen lugares de reconocimiento para las benzodiazepinas) y se comprobó que el resultado de su expresión presentaba las mismas características de unión que las obtenidas en líneas celulares humanas, existiendo lugares de unión para las benzodiazepinas y para las isoquinoleín-carboxamidas (Riond y col. 1991). Estos estudios evidenciaron que la proteína de 18 kD contenía los dominios de unión para las dos familias de compuestos. Pero, paralelamente, la subunidad de 30-35 kD seguía marcándose junto a la de 18 kD con los ligandos del RBP, con lo cual se reafirmaba su relación con el mismo aunque se necesitaban concentraciones nanomolares relativamente altas de PK 11195 y de Ro 5-4864 para desplazar al AHN 086 de esta subunidad. Otros intentos de purificación del receptor periférico en su estado nativo (McEnery y col. 1989) habían demostrado que junto a la subunidad de 18 kD copurificaba la de 30 kD y que, una vez separadas, la subunidad de 18 kD presentaba sitios de unión para los dos grupos de ligandos, al igual que se había visto en levadura posteriormente.

Así pues, se sugiere que la subunidad de 18 kD es la responsable de la manifestación del RBP, aunque es muy posible que la de 30 kD afecte sus propiedades de unión. También se sugiere que el RBP es un complejo macromolecular donde la subunidad de 30-35 kD estaría en íntima asociación con la de 18.

Tampoco se excluye que pueda existir un sitio de unión para las benzodiazepinas distinto sobre la subunidad de 30-35 kD. Recientes estudios de clonaje proponen que pueda haber diferentes tipos de RBPs.

2.6.2.- Lugares de unión.

Se han propuesto diversas hipótesis que postulan la existencia de dos lugares de unión en el receptor benzodiazepínico periférico: uno para las benzodiazepinas como el Ro 5-4864 y otro para las isoquinoleín-carboxamidas como el PK 11195.

La fosfolipasa A_2 actúa de manera distinta sobre la unión de los dos ligandos (Havoundjian y col. 1986), provocando una disminución en la afinidad para el [3H]Ro 5-4864 y un incremento en los lugares de unión del [3H]PK 11195 sin afectar su afinidad. Se supone que la fosfolipasa A_2 puede afectar al contorno lipídico del mismo.

Incubando por separado ambos radioligandos con el receptor en presencia de dietilpirocarbonato (Benavides y col. 1984) se comprobó que disminuían los lugares de unión para el PK 11195 sin afectar a su afinidad, mientras que la unión del Ro 5-4864 no se veía afectada. El dietilpirocarbonato actúa bloqueando los residuos de histidina, con lo cual se concluye que los residuos de este aminoácido son fundamentales para la unión del PK 11195. El efecto del dietilpirocarbonato sobre la unión del PK 11195 es revertido por una incubación con Ro 5-4864, atribuyéndose este efecto a que esta benzodiazepina provoca un cambio conformacional en el receptor, desenmascarando los residuos de histidina. El ácido araquidónico bloquea el efecto protector del Ro 5-4864 sobre la acción del dietilpirocarbonato (Skowronski y col. 1987).

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 o reducen estos grupos afectan considerablemente dicha unión.

La hipótesis propuesta por Skowronski y col. (1987) 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. No se descarta tampoco que dentro del mismo receptor estén solapados los lugares de unión para ambas sustancias.

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

Mediante estudios termodinámicos se ha propuesto que el Ro 5-4864 es un agonista del RBP, mientras que el PK 11195 se comporta como un antagonista. La unión del PK 11195 va asociada a un pequeño cambio en la entalpía y a un incremento sustancial de la entropía, mientras que la unión del Ro 5-4864 está inducida por la entalpía.

2.6.3.- Relación con el transportador ATP/ADP mitocondrial.

En la mitocondria existe un transportador de naturaleza proteica que se encarga de transferir ATP al citosol desde el interior de la mitocondria y devolver el ADP al espacio mitocondrial, ya que, por sí solos, estos nucleótidos no lograrían atravesar la membrana mitocondrial interna. Este transportador fue caracterizado (Klingenberg y col. 1966) y se descubrió la existencia de inhibidores específicos para el mismo. Existen dos grupos de inhibidores de este *carrier*: glucósidos de

origen vegetal con grupo atractilogenina (atractilósido, carboxiatractilósido) y compuestos de origen bacteriano como el bongtrexato y sus isómeros. De todos los inhibidores, el carboxiatractilósido es el más potente.

Se ha puesto de manifiesto una cierta relación entre este carrier y el receptor benzodiazepínico periférico, ya que se ha comprobado que inhibidores como el atractilósido y el carboxiatractilósido interfieren de algún modo la unión de las benzodiazepinas periféricas. Así, en estudios realizados en conducto deferente (Escubedo y col. 1992) y en vesícula seminal de rata (Camins y col. 1992) demuestran que tanto el carboxiatractilósido como el atractilósido desplazan con afinidad nanomolar la unión del [^3H]Ro 5-4864, de forma no competitiva. Por otra parte, el atractilósido sólo desplaza al [^3H]PK 11195 a concentraciones micromolares, lo cual hace pensar que la ocupación del *carrier* modula de algún modo la unión al sitio del Ro 5-4864 en el RBP.

2.6.4.- Relación con el lugar de unión mitocondrial de baja afinidad para las dihidropiridinas.

Los antagonistas de los canales de calcio son un grupo de fármacos que deben sus efectos a la interacción con la subunidad α_1 de los canales de calcio L voltaje-dependientes. Estos fármacos se dividen en tres grupos estructurales diferentes: 1,4.-dihidropiridinas (nifedipino, nitrendipino, nimodipino, nicardipino, etc.), fenilalquilaminas (verapamilo) y benzotiazepinas (diltiazem). Además de unirse a los canales de calcio L, estos fármacos son capaces de interactuar con otras estructuras celulares, tales como el transportador de nucleósidos de la membrana plasmática, la glicoproteína P y el lugar de baja afinidad y alta capacidad para las dihidropiridinas mitocondrial.

El lugar de alta capacidad y baja afinidad para los antagonistas del calcio de tipo dihidropiridina ha sido caracterizado (Zernig y col. 1988), presentando una elevada B_{max} (1 nmol/mg de proteína) y una alta K_D (593 nM para el [^3H]nitren-

dipino). Por otra parte, parece ser que la unión de las dihidropiridinas a este receptor está regulada de manera alostérica por nucleótidos, especialmente por ATP. Otras características de este lugar son la estabilidad al calor (lo cual sugiere cierta rigidez, probablemente por puentes disulfuro) y que no presenta estereoselectividad. Se ha visto que la cadena en posición 5 del anillo dihidropiridínico es la mayor determinante de la afinidad de estas sustancias para este lugar de unión, siendo los sustituyentes de tipo isopropilo los que confieren más afinidad (nitrendipino>nifedipino>nimodipino).

Los antagonistas del calcio de tipo fenilalquilamina presentan mucha menos afinidad para este lugar, mientras que la de las benzodiacepinas es prácticamente nula.

Uno de los diversos candidatos a contener este sitio de unión es el complejo molecular que contiene al receptor benzodiacepínico periférico ya que, además de tener una localización mitocondrial, se ha comprobado que la unión del [³H]Ro 5-4864 se ve desplazada competitivamente por nitrendipino y nifedipino a concentraciones micromolares, aunque la unión del [³H]nitrendipino no se ve afectada por Ro 5-4864 (Cantor y col. 1984). La unión de benzodiacepinas más selectivas al receptor central, como clonazepam y flunitrazepam, no se ve afectada por dihidropiridinas.

Estudios realizados en corazón de cobayo (Mestre y col. 1984) muestran que tanto el Ro 5-4864 como el PK 11195 disminuyen la fuerza contráctil del corazón. Posteriormente se comprobó que estos efectos eran mediados por canales de calcio voltaje-dependientes y no por los RBPs como se podía suponer.

Se ha sugerido que el RBP y el lugar de unión de alta capacidad y baja afinidad para dihidropiridinas son moléculas separadas, pero solapadas en el mismo compartimento mitocondrial (Doble y col. 1985).

2.6.5.- Variación interespecífica.

Pese a que en la rata el Ro 5-4864 y el PK 11195 presentan una afinidad similar para el RBP, se ha comprobado que en otros animales la afinidad del RBP por el Ro 5-4864 es mucho menor. Parece ser que la mayor afinidad del Ro 5-4864 por el RBP se da tejidos de roedor; así, la potencia de dicha sustancia para desplazar al [3 H]PK 11195 en córtex fue la siguiente: rata = cobayo > gato = perro > conejo (Awad y col. 1987).

En ternera y gato se encuentran más lugares de unión para el PK 11195 que para el Ro 5-4864. En cerebro de trucha, el PK 11195 presenta una elevada afinidad para el RBP, mientras que la del Ro 5-4864 es del orden micromolar y, en estudios de competición, la protoporfirina IX presenta una afinidad mayor que la del Ro 5-4864 (Eshleman y col. 1989).

Se propuso entonces que las variaciones interespecíficas de afinidad por los ligandos del RBP podrían deberse a dos causas: a variaciones estructurales en el receptor producidas por mutaciones de índole genético, o a variaciones en el entorno fosfolipídico. Para determinar la causa se solubilizó el receptor y se determinó la afinidad por los dos ligandos, comprobándose que las diferencias se mantenían (Awad y col. 1989). Este experimento permitió concluir que las variaciones interespecíficas en el RBP se deben a la diferente estructura molecular de la proteína que constituye el receptor y no a en el entorno de membrana.

Mediante estudios autorradiográficos con [3 H]Ro 5-4864 en cerebro humano se ha comprobado que áreas como el plexo coroides, bulbo olfatorio, córtex y núcleo caudado presentan un número de lugares de unión inferior al de cerebro de rata por esta sustancia (Pazos y col. 1986). Por tanto, en la especie humana, es mejor utilizar el PK 11195 que el Ro 5-4864 para marcar el RBP.

2.7.- Papel biológico de los RBPs.

2.7.1.- Participación de las benzodiacepinas en la modulación del sistema inmune.

Los ligandos del receptor benzodiacepínico periférico desempeñan un papel inmunomodulador, ya que se ha demostrado que el Ro 5-4864 y el diazepam estimulan la quimiotaxis de los monocitos humanos, mientras que el PK 11195 antagoniza este efecto (Ruff y col. 1985). Diversos estudios autorradiográficos confirman la presencia de RBPs en sistema inmune de rata, bazo y timo. Además, se observa una asociación de RBPs con los linfocitos T y los macrófagos. Un estudio realizado con pacientes ansiosos demuestra una disminución de la densidad de RBPs en sus linfocitos (Ferrarese y col. 1990), mientras que los tratados con diazepam no experimentaron tal descenso.

El PK 11195 estimula "in vivo" la respuesta humoral, pero sólo cuando se administra vía intracerebral, lo cual sugiere que la respuesta inmune puede estar mediada por receptores del SNC (Lenfant y col. 1988).

Se ha observado un incremento de RBPs en bazo y timo de ratas con artritis inducida respecto a ratas control. Se postula que este incremento de receptores puede deberse a la secreción de interleukina-1 por parte de los macrófagos activados, que induciría la expresión de estos lugares de unión en 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 provoca en la descendencia una supresión de la respuesta inmune (Schlumpf y col. 1990), además de un cambio en la afinidad del PK 11195 por los linfocitos, que es mayor que en ratas no tratadas. Estos datos sugieren una acción directa de las benzodiacepinas sobre los linfocitos, que puede estar mediada por los RBPs. Posteriormente, se ha comprobado que las benzodiacepinas a nivel periférico inhiben la proliferación de los linfocitos a concentraciones micromolares.

2.7.2.- Relación con el sistema endocrino.

Varios estudios demuestran que el sistema endocrino regula de algún modo los RBPs. La hipofisectomía provoca una disminución de estos receptores en glándula adrenal y testículo de rata. La castración de las ratas no tiene efecto sobre el número de RBPs en la glándula adrenal, del mismo modo que la adrenalectomía no modifica el número de estos receptores en los testículos. Estos estudios mostraron una relación entre los RBPs y la hipófisis (Anholt y col. 1985) y fueron posteriormente corroborados por Fares y col. (1987). En riñón no se manifestó un descenso de los RBPs tras la hipofisectomía. La administración de ACTH a las ratas hipofisectomizadas provoca un incremento de los RBPs comparado con las no tratadas o las que no sufrieron la intervención.

La adrenalectomía causa una reducción significativa en la densidad de RBPs en el riñón (Basile y col. 1985). Todos estos datos vienen a demostrar que el RBP está sometido a un proceso de regulación hormonal. Además, se ha demostrado que, tras someter ratas a un tratamiento crónico con estradiol se produce una *up-regulation* en riñón y una *down-regulation* en testículos de los RBPs (Gavish y col. 1986), mientras que el número de receptores centrales y de RBPs en corazón no se afectó.

El tratamiento crónico con progesterona (10 días) en ratas macho incrementa la densidad de RBPs tanto en córtex cerebral como en riñón, sin afectar a la población de receptores del hipocampo, testículos o corazón. El incremento en riñón puede deberse 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. 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) y el receptor del GABA en

córtex de rata (Belelli y col. 1990). Esta interacción podría explicarse a través de una modulación por parte de los RBPs sobre la biosíntesis de hormonas esteroideas (Amsterdam y col. 1991).

El hipertiroidismo, causado experimentalmente por la administración crónica de levotiroxina en ratas, provoca un incremento de receptores benzodiazepínicos, tanto centrales como periféricos, sin producir cambios en la afinidad de los ligandos. Esta modulación por parte de la T_4 sobre los receptores benzodiazepínicos puede atribuirse a una acción directa de ésta sobre los receptores o puede reflejar un mecanismo de adaptación compensatorio a la tirotoxicosis subsecuente (Gavish y col. 1986). Estudios de competición realizados en cerebro de rata muestran que la unión del [3H]Ro 5-4864 y [3H]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 del número de RBPs en riñón. Cuando se administra aldosterona se revierte el efecto, pero dicha hormona es incapaz de provocar un incremento en los animales control. Estos resultados indicaban que los cambios en la población de receptores eran debidos a la adaptación que experimentaba la nefrona renal frente a la pérdida de hormonas mineralocorticoides (Basile y col. 1987).

Las hormonas sexuales femeninas afectan también la población de receptores en órganos como el ovario, útero, oviducto y la pituitaria. La administración de gonadotrofina coriónica y dietilestilbestrol en ratas inmaduras hipofisectomizadas, provoca el restablecimiento del número de RBPs que previamente había disminuído, sugiriéndose que dicha disminución es debida a una deficiencia de estrógenos y de gonadotrofina coriónica (Bar-Ami y col. 1989). La actividad de la gonodotrofina coriónica incluye a la de las hormonas FH y LH. El efecto de incrementar el número de RBPs puede ser debido a la estimulación de la síntesis de estrógenos en 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 de secreción de progesterona y estradiol. Dosis altas de esta benzodiacepina provocan un descenso de dicha secreción, y dosis altas de diazepam o PK 11195 provocan un incremento, demostrándose de este modo el efecto sobre la secreción de esteroides de la placenta de ligandos del receptor periférico (Barnea, 1989). Estos ligandos intervienen también en la síntesis de determinadas hormonas esteroideas, 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 benzodiacepínicos periféricos y el sistema adrenérgico. La simpatectomía química provocada tras la administración de 6-hidroxidopamina induce un incremento en la población de RBPs en hipotálamo, estriado y ventrículo cardiaco; un descenso en la glándula pineal y no la modifica en otros órganos como el riñón, pulmones, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo y bulbo olfatorio (Basile y col. 1988).

Está demostrado que la regulación por parte de la ACTH en glándula adrenal sobre la corticoidogénesis requiere la síntesis de una proteína denominada "proteína activadora de la esteroidogénesis". Se ha logrado aislar y purificar 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, dando lugar a una estimulación de la esteroidogénesis a nivel mitocondrial. El papel del DBI, mediante su interacción con el receptor benzodiacepínico periférico, sería el de mediador intracelular de la ACTH en la corteza adrenal o de las gonadotrofinas en células de Leydig y de ovario.

Los RBPs como mediadores del transporte de colesterol a través de las membranas mitocondriales.

En los últimos años ha adquirido una gran interés el papel fisiológico que pueden tener los RBPs sobre el transporte del colesterol desde el citosol al interior de la mitocondria, y es la teoría más aceptada.

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 hasta el primer enzima de esta ruta biosintética, el citocromo P-450_{scc}, situado en la membrana interna mitocondrial y que cataliza el paso de colesterol a pregnenolona. Dicha reacción es el paso limitante de la esteroidogénesis y principal lugar de regulación por estímulos fisiológicos. Asimismo, la presencia elevada de RBPs en células donde la esteroidogénesis es importante y su localización mitocondrial avalan esta hipótesis acerca del papel del receptor benzodiacepínico periférico.

Diversos trabajos han citado los efectos que provocan las benzodiacepinas periféricas en estas rutas biosintéticas. En células adrenales de ratón, el PK 11195 y el resto de ligandos del RBP estimulan la esteroidogénesis, demostrando el PK 11195 la mayor potencia (Mukhin y col. 1989). En células de Leydig y adrenales de ratón, el flunitrazepam inhibe la acción sobre la esteroidogénesis de la ACTH y de la gonadotrofina coriónica. De esta manera, se demuestra que la acción antagonista del flunitrazepam está mediada por los RBPs, que medían la síntesis de esteroides activada por hormonas (Papadopoulos y col. 1991).

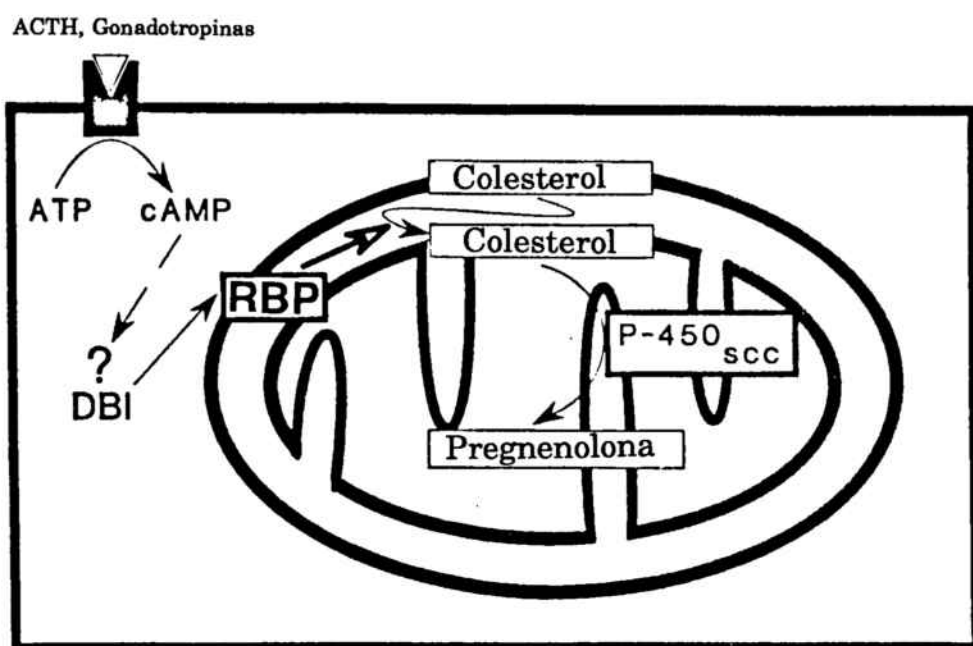


Figura 2.1.- Representación esquemática del mecanismo celular y del papel del RBP en la biosíntesis de esteroides. Las hormonas interactúan inicialmente con la superficie celular, estimulando la producción de AMP_c. Este segundo mensajero es responsable de la producción de un factor citosólico, todavía no caracterizado pero que se cree que pudiera ser el DBI, requerido para activar el transporte de colesterol hacia el interior de la mitocondria.

El DBI y su péptido derivado TTN estimulan la formación de pregnenolona en células de Leydig y adrenocorticales, mientras que el ODN presenta una menor potencia (Papadopoulos y col. 1991).

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

- El RBP puede comprender todo o parte del aparato traslocador mitocondrial.

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

- El RBP, en asociación con el traslocador, puede participar en el transporte de colesterol.

El problema radica en saber si estos receptores participan sólo en este proceso o si participan además en el transporte de otros componentes hacia la membrana mitocondrial interna. De este modo, podría explicarse el transporte de la protoporfirina IX hacía la membrana interna para su conversión en grupo hemo.

Recientemente se ha descrito que ciertos tipos de células gliales podrían ser esteroideogénicas. Este hallazgo, junto al hecho de que ligandos del RBP modifican algunas funciones del SNC afectando a la síntesis de esteroides, podría perfilar una conexión entre el receptor periférico y el SNC. Se ha comprobado que la conductancia a través de los canales de cloruro del receptor GABA_A aumenta bajo la acción de ciertos metabolitos reducidos de la progesterona (Majewska y col. 1986; Puia y col. 1990), mientras que el sulfato de pregnenolona, esteroide que se encuentra en el cerebro, actúa como antagonista de la acción del GABA sobre los canales de cloruro (Majewska y col. 1987; Mienville y col. 1989). Estos descubrimientos pueden ayudar a perfilar una hipótesis sobre la posible conexión entre los receptores GABA_A y los RBPs: la regulación de los RBPs podría inducir cambios en la biosíntesis de esteroides, que tendría lugar en tejidos periféricos o en las células gliales del SNC, y este hecho retroalimentaría sobre la función del receptor GABA_A (Krueger y Papadopoulos, 1992). De todos modos, esta hipótesis es aún muy especulativa y se requieren más trabajos para confirmarla.

2.8.- Relevancia clínica de los RBPs.

2.8.1.- Implicaciones patológicas.

Ciertas lesiones cerebrales o tumores provocan un aumento del número de

RBP. La administración de ácido kaínico en el cuerpo estriado o vía sistémica en animales de experimentación proporciona modelos experimentales de la corea de Huntington y de la enfermedad de Alzheimer, respectivamente. En la enfermedad de Alzheimer se ha detectado un incremento en la población de los lugares de unión para el [^3H]PK 11195 en córtex frontal y temporal (Diorio y col. 1990) y en plaquetas (Bidder y col. 1990). En la corea de Huntington se ha encontrado también un incremento de lugares de unión para el [^3H]Ro 5-4864 (Schoemaker y col. 1982). La muerte de células neuronales que se da en estas patologías comporta una gliosis paralela que implica un incremento en el número de RBPs, ya que las células gliales presentan una elevada densidad de estos receptores. Se propone la posibilidad de utilizar la densidad de RBPs como marcadora del daño neuronal.

Enfermedades como la esclerosis múltiple, la enfermedad isquémica cerebrovascular y el glioma maligno cursan también con un incremento paralelo de los RBPs (Benavides y col. 1988).

En plaquetas de esquizofrénicos tratados crónicamente con neurolépticos se ha detectado una disminución de la unión del [^3H]PK 11195 (Gavish y col. 1986), así como en pacientes epilépticos tratados con carbamacepina (Weizman, 1987) y en riñón, corazón y cerebelo de ratones tratados crónicamente con fenobarbital (Weizman y col. 1989).

Se ha estudiado también el incremento de RBPs en roedores con isquemia cerebral inducida por termocoagulación eléctrica. Los estudios autorradiográficos revelaron la presencia de una elevada cantidad de estos receptores en glía, existencia de una proteína fibrilar ácida (GFAP), presencia de astrocitos e incremento de los RBPs en macrófagos, con lo cual se postula la posible utilidad de la medida de densidad de RBPs como marcadora de la activación celular (Benavides y col. 1990). Estudios posteriores (Myers y col. 1991) han confirmado el incremento de unión del [^3H]PK 11195 a macrófagos en procesos de isquemia cerebral. Parece ser que estos procesos podrían estar mediados por citoquinas tales

como la interleukina 1 y el factor α de necrosis tumoral (Bourdiol y col. 1991) que, liberadas por los monocitos, serían las responsables del incremento de los RBPs.

2.8.2.- Los RBPs en tumores humanos: aplicaciones del PK 11195.

La utilización del [^{11}C]PK 11195 como emisor de positrones de vida corta ha permitido el estudio de los RBPs "in vivo". Los primeros experimentos de este tipo se realizaron en corazón de perro y humanos (Charbonneau y col. 1986). Starosta-Rubinstein y col. (1987) fueron los primeros en sugerir el potencial papel que podrían desempeñar los ligandos del RBP como marcadores tumorales, dada la creciente importancia que se atribuía a las benzodiazepinas en procesos de regulación del crecimiento neoplásico. De este modo realizaron autorradiografías después de la administración "in vivo" de [^3H]PK 11195 y [^3H]flunitrazepam en ratas con gliomas intracraneales, comprobando que estas sustancias marcaban específicamente las zonas tumorales. Estos autores proponen la utilización del [^{11}C]PK 11195 en tomografía de emisión de positrones (TEP) o de [^{125}I]PK 11195 en gamma-grafías como medio de diagnóstico de tumores primarios del SNC en humanos, ya que estos medios permiten discernir mejor si se trata de un tumor y no, por ejemplo, un edema, que la resonancia magnética nuclear o la tomografía axial computerizada.

El motivo de uso de estas sustancias como marcadores tumorales, principalmente de cerebro, es que los tejidos afectados presentan un notable incremento de RBPs, a los cuales se unen:

En gliomas experimentales inducidos en rata el número de RBPs aumentaba más de 20 veces su valor normal (Black y col. 1989; Ikezaki y col. 1990; Black y col. 1990). En tumores gliales humanos se ha descrito también un incremento de la unión específica del [^3H]PK 11195 (Black y col. 1990), proponiéndose esta sustancia como marcador tumoral. El incremento de unión de las benzodiazepinas a tumores gliales se correlaciona de forma directamente proporcional a la

malignidad del tumor. El marcaje de glioblastomas con [^{11}C]PK 11195 ya se ha experimentado "in vivo" en humanos (Pappata y col. 1991) observándose la notable acumulación de la sustancia en el tumor mediante TEP. Recientemente se ha comprobado que los ligandos del RBP inducen cambios morfológicos y proliferación de mitocondrias (hasta un 250 % de incremento) en cultivos de células de glioma de tipo C6 y T98G (Shiraishi y col. 1991).

En cambio, los derivados benzodiazepínicos [^3H]Ro 5-4864 y [^3H]flunitrazepam muestran una baja afinidad para cultivos de células humanas de glioblastoma U251 y D54 (Olson y col. 1988). Parece ser que, en humanos, los derivados benzodiazepínicos presentan menos afinidad que los isoquinoleínicos, con lo cual el papel de marcador tumoral quedaría relegado para el PK 11195.

Por lo que respecta al DBI, el asunto no está todavía muy claro: se ha detectado DBI en glioblastomas y astrocitomas, mientras que se ha encontrado ausente en meningiomas, craneofaringiomas y neurinomas (Ferrarese y col. 1989). Además, el contenido de DBI resultó ser menor en los tejidos tumorales que en tejido normal, y la protoporfirina IX no desplaza a bajas concentraciones al PK 11195 de tejido de glioblastoma (Broaddus y col. 1990); con lo cual, el papel del ligando endógeno en estos procesos no está muy claro. Otro dato que demuestra la complejidad del tema es que se ha detectado en glioblastoma humano dos lugares de unión para los derivados isoquinoleínicos, uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad (Broaddus y col. 1990). Por otro lado, el córtex humano presenta un solo lugar de unión y de afinidad moderada.

Respecto a otros tumores, se ha descrito un incremento de los lugares de unión del PK 11195 en muestras de pacientes con adenocarcinoma de colon (Katz y col. 1990) y de cáncer de ovario respecto a muestras control. Los tumores benignos de ovario presentaban valores que no diferían significativamente de los normales, con lo cual se sugiere que este incremento pueda ser usado como marcador biológico de la malignidad de procesos tumorales.

En otro trabajo, sin embargo, se detecta una disminución en la densidad de RBPs en tumores de glándula submandibular de rata inducidos por dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA) (Mukherjee y col. 1990). Dicha disminución se atribuye a un descenso en la capacidad de unión de los RBPs en mitocondria, bien por un descenso del número de mitocondrias o bien por un fenómeno de *down-regulation* sobre los receptores. Es posible que haya cierta especificidad celular en los efectos que provoca la malignidad sobre los RBPs.

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

2.9.1.- Acciones directas.

Las BZDs, a nivel periférico, inhiben la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico por un mecanismo que parece comportar la inhibición de la síntesis de tromboxanos y de ácido 12-hidroxiheptadecatrienónico. La ciclooxigenasa utiliza un grupo protoporfirínico como cofactor, al cual podrían unirse las BZDs e inducirle un descenso de actividad, con la consecuente inhibición de la agregación plaquetaria (Fonlupt y col. 1990). Estos efectos han llevado a sugerir la hipótesis del uso de las BZDs para la prevención o retardo de la tromboaterosclerosis (Cuparencu y col. 1989).

También se ha descrito un efecto sobre la respiración en células neuronales consistente en la inhibición del consumo de O₂ en el tercer estado de la respiración, relacionado con el flujo electrónico y la síntesis de ATP (Larcher y col. 1989).

En el sistema cardiovascular, el Ro 5-4864 provoca un incremento del flujo coronario que no es antagonizado por el PK 11195. El mecanismo de acción de este efecto podría estar relacionado con la existencia de canales de calcio sobre los que podrían actuar las BZDs (Grupp y col. 1987).

Las bezodiazepinas provocan "in vitro" la relajación de útero de rata por un

mecanismo que podría estar ligado a la inhibición del influjo de calcio (Kazanietz y col. 1990).

Las benzodiacepinas periféricas inhiben ciertos tipos de crecimiento celular. En cultivos de glioma y neuroblastoma tienen un efecto antiproliferativo (Wang y col. 1984). Esta inhibición del crecimiento celular tiene lugar a concentraciones micromolares, con lo cual se descarta la participación de los RBPs, sino que se relaciona con la capacidad de estos fármacos de inhibir el *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 ADN, mientras que a concentraciones micromolares inhiben su síntesis. En células de melanoma de ratón se han caracterizado dos lugares de unión para el [³H]diazepam, sugiriéndose que el lugar de afinidad es el responsable de la melanogénesis (Matthew y col. 1981).

2.9.2.- Interacción con otros fármacos.

Se ha demostrado una interacción entre los barbituratos y el RBP. De este modo, la administración de fenobarbital en ratón provoca un incremento significativo en la densidad de RBPs en el corazón, riñón y cerebelo respecto a muestras control (Weizman y col. 1989). Asimismo, la administración de pentobarbital en rata revierte la disminución en la densidad de receptores en el riñón provocada por el estrés (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 fármaco, que provoca una reducción del tono simpático (Marthy y col. 1986). O podría explicarse también por el efecto del diazepam sobre el carrier mitocondrial Na⁺/Ca²⁺ en corazón y cerebro .

La administración "in vivo" de 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 el papel del Ro 5-4864 como agonista del receptor periférico y del PK 11195 como antagonista (Benavides y col. 1984).

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

La población de receptores benzodiacepínicos está modulada por el estrés. Mediante un generador de shocks se provoca en ratas una disminución en la densidad de RBPs en tejidos como el corazón y el riñón (Drugan y col. 1990). La supresión de la dieta en ratas provoca, asimismo, una disminución del número de RBPs. Esta relación puede deberse al estrés, que provocaría cambios metabólicos, o a un efecto sobre la disminución de ACTH causado por una hipercolesteremia debida a la falta de alimentación (Weizman y col. 1990).

Pacientes tratados con carbamazepina experimentan una "up-regulation" en la densidad de RBPs de las plaquetas con respecto a controles. Este cambio puede deberse a posibles alteraciones hormonales que puede provocar el tratamiento con este fármaco, las cuales afectarían al RBP (Weizman y col. 1987).

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

Se ha demostrado que el diazepam presenta una acción vasodilatadora en corazón. La unión del [^3H]diazepam al corazón es desplazada por el dipiridamol, fármaco utilizado en clínica por su acción vasodilatadora coronaria (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 cerebro, pero no en corazón ni en riñón. De este modo podría ser que los RBPs participaran de alguna manera en el desarrollo de dependencia al alcohol (Syapin y col. 1988).

3.- UPTAKE DE ADENOSINA.

3.1.- Papel fisiológico de la adenosina.

Desde hace más de 50 años, la adenosina ha sido ampliamente reconocida como un importante neuromodulador. Este nucleósido juega un papel crucial en el metabolismo energético de las células y se ha reconocido como mensajero causante de efectos bioquímicos específicos que tienen como resultado diferentes respuestas fisiológicas. Muchos factores metabólicos indican que la adenosina actúa en células cercanas a los lugares donde se forma.

En 1929, Drury y Szent-Györgyi describieron los efectos cardiovasculares de la adenosina, y hasta ahora diversos trabajos han demostrado sus acciones en diversos órganos y sistemas.

La adenosina posee efectos cronotrópico e inotrópico negativos; actúa como vasodilatador en casi todos los vasos sanguíneos reduciendo el tono del músculo liso vascular e incluso podría mediar la autorregulación del flujo sanguíneo a un órgano en respuesta a una demanda metabólica local (Berne, 1980; Winn y col. 1981). En el SNC, inhibe la liberación de neurotransmisores, produce sedación y presenta actividad anticonvulsivante. También participa en la calidad del sueño,

en la regulación de funciones autónomas como la respiración y la presión sanguínea, en la ansiolisis, ataques y en la protección contra la muerte neuronal. Asimismo, la adenosina puede regular la liberación renal de renina, inhibir la agregación plaquetaria, modular la función de los linfocitos, inducir broncoespasmo e inhibir la lipólisis en los adipocitos.

Estas acciones vienen dadas por la interacción de la adenosina con receptores específicos que, según la clasificación de Burnstock (1978) se dividen en P_1 y P_2 según su afinidad por la adenosina o por nucleótidos de adenina. Así, para los P_1 las potencias relativas son: adenosina $>$ AMP $\geq$ ADP $\geq$ ATP, mientras que para el receptor P_2 son: ATP $\geq$ ADP $\geq$ AMP $\geq$ adenosina. Metilxantinas como la cafeína y la teofilina actúan como antagonistas de los receptores P_1 , pero son inactivas sobre los P_2 . Los receptores P_1 pueden dividirse a la vez en subtipos de receptor adenosínico A_1 y A_2 . Originalmente, esta nomenclatura estaba basada en la capacidad de la adenosina o sus análogos por inhibir (A_1) o estimular (A_2) adenilato ciclasa al interaccionar con el receptor, pero estudios más recientes han descrito las potencias relativas con las que análogos de la adenosina actúan sobre cada subtipo de receptor, aceptándose más la clasificación de este modo, ya que la activación de los receptores puede estar acoplada a sistemas efectores diferentes del de adenilato ciclasa. Basándose en la afinidad por el [3 H]NECA (5'-N-etilcarboxamido adenosina), un ligando no selectivo, los receptores A_2 se han subdividido en los subtipos A_{2A} (alta afinidad) y A_{2B} (baja afinidad).

3.2.- Transporte de nucleósidos: concepto de uptake.

Se considera pues a la adenosina como un neurotransmisor/neuromodulador y, como tal, es liberada y recaptada en diversos tejidos. A pesar de que los lugares y mecanismos por los cuales la adenosina es liberada no están todavía muy claros, se sabe que es transportada por un sistema de transporte de nucleósidos por difusión facilitada (Wu y Phillis, 1984; Paterson y col. 1985). Tan pronto como es transportada al citosol, la adenosina suele sufrir metabolismo de algún tipo gracias

a enzimas específicos que existen en la célula tales como adenosina-kinasa o adenosina-deaminasa entre otros. Si se intentara medir el transporte de este nucleósido, éste se vería afectado por el metabolismo que sufriría la fracción ya transportada, ya que se alteraría el equilibrio y la medida correspondería a transporte más metabolismo. Para evitar estas variaciones, los experimentos para medir el transporte se realizan con tiempos de incubación muy cortos (normalmente entre 10 y 30 segundos) para evitar al máximo el metabolismo. De todos modos, tampoco es posible asegurar la no existencia de metabolismo en tiempos tan cortos, ya que, aunque se añadan al medio inhibidores específicos de determinados enzimas, pueden existir otros que no se inhiban. Por todo esto, los experimentos se realizan a tiempos de incubación cortos, pero el término *transporte* es sustituido por el término inglés *uptake*, que comprende el transporte más el metabolismo que haya podido haber o no.

Donde más extensamente se ha medido el transporte de adenosina ha sido en eritrocitos y en ciertas células tumorales de mamíferos. El transporte de nucleósidos ha sido definido en la mayoría de casos como un proceso de difusión facilitada bidireccional y no concentrativo. Más recientemente se ha medido el *uptake* en diferentes tejidos del SNC tales como: cortes de cerebro (Davies y Hambley, 1986), sinaptosomas (Bender y col. 1980), y células cerebrales cultivadas (Bender y Hertz, 1986) o aisladas (Geiger y col. 1988).

Un método de determinar la existencia de un transportador de nucleósidos es la determinación de la afinidad de la preparación por la [^3H]nitrobenziltioinosina (NBTI, NBI o NBMPR), ya que los sitios donde se une con gran afinidad son considerados como transportadores de nucleósidos funcionales (Jarvis y Young, 1980; Cass y col. 1981; Jarvis y col. 1982; Marangos y col. 1982; Geiger y col. 1985) que poseen una capacidad constante de máxima traslocación de uridina (Jarvis y col. 1982). En eritrocitos humanos, la inhibición de la unión del NBTI es predictiva de que este compuesto es capaz de inhibir el transporte de nucleósidos (Hammond y col. 1983). Más recientemente también se ha usado el [^3H]dipiridamol como

marcador de transportadores de nucleósidos (Bisserbe y col. 1986).

Sin embargo, a diferencia que en los eritrocitos, los lugares de unión para el NBTI en membranas corticales de rata presentan baja afinidad por los potentes inhibidores del transporte de adenosina que son dipiridamol y hexobendina (Marangos y col. 1982; Patel y col. 1982; Wu y Phillis, 1982; Clanachan y Hammond, 1983). Debido a estos resultados, se ha cuestionado la utilidad del NBTI como prueba del transporte de nucleósidos en el SNC (Bender y col. 1981). Se postula la heterogeneidad de los transportadores de nucleósidos debido a las diferencias de afinidad que presentan por los diferentes inhibidores del transporte (Hammond y Clanachan, 1985). Hay quien propone que en los transportadores una parte serviría como mecanismo de liberación y la otra como un mecanismo de influjo o inactivación. También se encuentran diferencias en lo que respecta a dependencia de sodio.

Se ha descrito la presencia de elevadas cantidades de adenosina en las mitocondrias de riñón de rata (Henke y col. 1989).

3.3.- Receptores de adenosina en testículo.

Se han identificado receptores adenosínicos en membranas de testículo de rata (Nakata, 1990). Se conoce poco acerca de las funciones de los receptores adenosínicos testiculares. Varios trabajos de *binding* con ciclohexiladenosina (CHA) muestran que estos receptores presentan un perfil farmacológico de tipo A₁ (Murphy y Snyder, 1981; Monaco y Conti, 1986; Stiles y col. 1986; Cushing y col. 1988). Stiles y col. demostraron que los receptores adenosínicos presentes en membrana testicular están acoplados a adenilato ciclasa de un modo inhibitorio análogo a los receptores A₁ cerebrales. Asimismo, se ha descubierto que los agonistas A₁ inhiben la secreción de inhibina dependiente de FSH en cultivos de células de Sertoli (Conti y col. 1988) y que dichos efectos son revertidos por toxina pertusis (Monaco y col. 1988).

Monaco y Conti (1986) postulan que los receptores adenosínicos presentes en testículo están principalmente situados en las células de Sertoli de los túbulos seminíferos y que están asociados funcionalmente a una inhibición de la respuesta celular. Si se extrapolan los efectos sobre el corazón se podría formular la hipótesis de que la adenosina y sus receptores testiculares estuvieran implicados en la regulación del equilibrio energético en las células de los túbulos seminíferos: podría imaginarse un modelo en el que las células de Sertoli proporcionan los sustratos metabólicos para mantener los niveles de ATP en las células germinales y que usan los receptores de adenosina como sensores del balance energético de dichas células. Cambios en la concentración de ATP en las células germinales podrían comportar una liberación de adenosina que sirviera de señal a las células de Sertoli para que regularan el envío de sustratos (Monaco y Conti, 1986). Otros trabajos, valiéndose de métodos bioquímicos y autorradiográficos, proponen una asociación de los receptores adenosínicos testiculares con el epitelio de los túbulos seminíferos (Murphy y col. 1983).

Otros trabajos implican a la adenosina y a sus análogos en la regulación del movimiento de los espermatozoides. Vijayaraghavan y Hoskins (1986) demostraron que la adenosina, la 2'deoxiadenosina y otros análogos de la adenosina que activan adenilato ciclasa en otros tejidos, estimulaban la motilidad caudal de espermatozoides de bovino, seguramente aumentando los niveles de AMP_c . Además, comprobaron como, bajo ciertas condiciones, estos nucleósidos elevaban los niveles de AMP_c e inducían a la movilidad a espermatozoides inmaduros inmóviles. Los nucleósidos que no estimulaban la movilidad caudal de los espermatozoides tampoco elevaban los niveles de AMP_c , con lo cual sugieren que la adenosina es un regulador fisiológico de la movilidad de los espermatozoides cuya acción se fundamenta en la elevación de los niveles de AMP_c .

3.4.- 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 en diversos tejidos.

Bender demostró en 1980 que el dipiridamol inhibe el *uptake* de la adenosina en sinaptosomas de cerebro de rata a tiempos de incubación largos (15 min.) de manera no competitiva, mientras que a tiempos cortos (30 s) el dipiridamol lo inhibe de manera competitiva. 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.

Plagemann y Richey (1974), concluyen que el dipiridamol provoca una disminución de la velocidad máxima del transporte de nucleósidos afectando el movimiento del carrier. El dipiridamol actúa en un lugar específico del carrier, porque puede inhibir competitivamente la unión de [^3H]NBTI al mismo.

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

- Inhibición por ansiolíticos.

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

Wu y col. (1981), demostraron una interacción entre los lugares de unión de las benzodiazepinas y los inhibidores del *uptake* de la adenosina. Dipiridamol, hexobendina, papaverina y NBTI mostraron una inhibición competitiva de la unión del [^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 la 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]NBTI 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 antidepresivos tricíclicos.

Los antidepresivos tricíclicos inhiben el *uptake* de adenosina en sinaptosomas de cerebro de rata. Entre los 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 viloxacina, con un valor de $0.1\ \text{mM}$.

- Inhibición por esteroides.

Se ha relacionado la acción anestésica que tienen algunos esteroides con la capacidad que presentan para inhibir el *uptake* de la adenosina. El acetato de dexametasona, la progesterona, el 17- β -estradiol y el 17- α -etinilestradiol inhiben el *uptake* con un rango de valores de CI_{20} entre 4.8 μ M y 6 μ 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 del transporte.

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

4.- MATERIAL Y METODOS.

4.1.- Obtención de los órganos de interés para el estudio.

4.1.1.- Obtención de la próstata 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 bajo condiciones estándar de temperatura ($22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y mantenidas en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (de 8 am a 8 pm) con libre acceso a pienso (Letica IPM-R20) y al agua de bebida. Las ratas permanecieron 24 horas en ayuno antes de ser sacrificadas.

El sacrificio se realizó mediante traumatismo craneal seguido de arteriotomía carotídea. A continuación, se colocaron los animales sobre una mesa quirúrgica donde se les practicó una laparatomía media que dejó al descubierto el paquete intestinal. Los órganos para el estudio fueron extraídos y depositados en placas de Petri que contenían tampón Tris-sacarosa a pH 7,4, donde fueron limpiados de grasa, tejido conectivo, etc. y, seguidamente, troceados para facilitar su posterior homogeneización en un Polytron, manteniéndose en estos pasos una temperatura entre 0 y 4°C .

4.1.2.- Obtención de la próstata humana.

Las muestras se obtuvieron a partir de intervenciones quirúrgicas practicadas a pacientes afectados de adenoma de próstata. Los fragmentos fueron congelados en nitrógeno líquido y seccionados en un criostato a -22°C , estableciéndose el correspondiente diagnóstico según Rosai (1989). Las próstatas control procedieron de necropsias de adultos jóvenes.

4.2.- Procesamiento de los órganos: obtención del pellet mitocondrial.

Al órgano troceado y pesado se le añade tampón Tris-sacarosa pH 7,4 en proporción 1:10 (p/v) y se homogeneiza en un Polytron (Kinematica) durante 20 s. a velocidad máxima. El homogeneizado se distribuye en tubos de centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min. a 4°C . El sobrenadante obtenido de este proceso se trasvasa a otros tubos y se lleva a centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. más. El pellet resultante se resuspende en el mismo volumen anterior de tampón Tris-sacarosa y se vuelve a centrifugar a 8000 rpm otros 10 min.

El pellet así obtenido recibe el nombre de **preparación cruda mitocondrial**, y se mantuvo siempre entre 0 y 4°C para evitar su degradación antes de realizar la determinación de la concentración protéica.

4.3.- Determinación proteica.

Ya que la unión de un radioligando a un receptor depende de la concentración proteica en el medio de incubación, es necesario determinarla y ajustarla a la concentración deseada. El método de Bradford (1976) tiene las ventajas de ser rápido y muy sensible, ya que permite la detección de cantidades de proteína del orden de microgramos. Se fundamenta en una reacción colorimétrica con el 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, a la cual se mide la absorbancia.

Frente al método de Lowry presenta la ventaja de que no se producen interferencias debidas a iones como el K^+ y el Mg^{2+} , EDTA y glúcidos; pero se producen interferencias de alteración del color en presencia de algunos detergentes como el Triton X-100 y el SDS entre otros, requiriéndose en este caso realizar controles.

4.3.1.- Preparación del colorante.

Se pesan 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 y se disuelven en 50 ml de etanol. Se añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85 % p/v y se enrasa hasta 1 l con agua destilada.

4.3.2.- Descripción del ensayo.

Para la determinación proteica es necesario elaborar primero una recta patrón de albúmina sérica bovina (ASB). Se parte de una disolución de ASB al 0,025 % p/v de la que se toman mediante micropipeta los volúmenes necesarios que contengan 2, 4, 6, 8 y 10 μg de proteína. Se depositan en tubos de ensayo, se completa con tampón Tris-HCl pH 7,4 hasta 50 μl y se añade 1 ml de solución colorante. También se prepara un blanco que contiene 0,1 ml de tampón Tris-HCl y 2 ml de la solución colorante.

A partir del pellet a determinar suspendido en 0,5 ml de tampón Tris-HCl se hace una primera dilución 1:10 (10 μl /100 μl) con tampón y de ésta tres más 1:5 (10 μl /50 μl), a las que se añade 1 ml de la solución colorante.

Pasados 15 min. desde la adición del colorante se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. El aparato utilizado fue un espectrofotómetro

Shimadzu UV-1203.

Los valores de absorbancia de la concentración problema se interpolan en la recta de regresión obtenida de la recta patrón y, teniendo en cuenta las diluciones efectuadas, se obtiene el valor de la concentración proteica problema.

Tras la determinación proteica los tubos que contienen la proteína obtenida se congelan a -30°C, donde se almacenan hasta su utilización en los ensayos de unión.

4.4.- Tampones y disoluciones.

Para la realización de los ensayos de unión es necesario trabajar en un pH entre 7 y 8, dentro del rango fisiológico. El agente tamponante más utilizado en este tipo de ensayos es el Trizma®-HCl [hidrocloruro de Tris(hidroximetil)-aminometano], y que se abrevia como Tris-HCl. A partir de una disolución de Tris-HCl 1 M se preparan dos tipos de tampón:

Tampón Tris-HCl (sacarosa 250 mM):

Se utiliza en la obtención de la preparación cruda mitocondrial, para mantener las condiciones más idóneas para el órgano una vez se ha extraído del animal y para su centrifugación una vez troceado y homogeneizado. Su composición es la siguiente:

- Tris-HCl 1 M 0,5 ml.
- Sacarosa 8,55 g.
- NaOH c.s.p. pH 7,4
- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

Tampón Tris-HCl 50 mM:

Se emplea para la incubación del radioligando con la proteína y para realizar las diluciones de los fármacos desplazantes. Se compone de:

- Tris-HCl 1M 50 ml.
- NaOH 1N c.s.p. pH 7,4
- Agua destilada c.s.p. 1 l.

Solución de polietilenimina al 1 % v/v.

Se requiere para tratar los filtros con el fin de disminuir la unión inespecífica a los mismos, tal como se explicará más adelante.

- Polietilenimina al 50 % 1 ml
- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

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

Una forma de determinar la unión de una sustancia a un receptor es empleando esta sustancia marcada radiactivamente (generalmente tritiada) y que se denomina **radioligando**, incubarla junto a la proteína que contiene dicho receptor y medir la radiactividad unida a la misma mediante sistemas de contaje. Por otra parte, para caracterizar un receptor es necesario, además de utilizar un ligando de alta especificidad para el mismo, mantener unas condiciones determinadas de temperatura, pH, concentración protéica y tiempo de incubación con el fin de obtener el máximo de unión específica.

La **unión específica** es aquella que se establece entre el ligando y el receptor objeto de estudio. Dicha unión es imposible de determinar directamente

ya que el ligando tiende también a unirse inespecíficamente a otros sitios, es decir, que paralelamente se produce **unión inespecífica**. La unión inespecífica se puede deber a la liposolubilidad del ligando, por la cual se une a, por ejemplo, lípidos de membrana; a la atracción de cargas entre el ligando y otros lugares distintos del receptor; y a fenómenos de adsorción en la proteína o en el filtro empleado para separar el radioligando unido del libre entre otras causas. Una característica fundamental de la unión inespecífica es que se incrementa linealmente conforme se incrementa la concentración de radioligando, ya que no llega a saturarse. La **unión total** es, pues, la suma de la unión específica más la inespecífica, con lo que la unión específica se obtendrá restando la unión inespecífica de la total:

$$\text{UNION ESPECIFICA} = \text{UNION TOTAL} - \text{UNION INESPECIFICA}$$

Para determinar la unión inespecífica se incubaba el radioligando con la proteína y, además, con un exceso de ligando frío (sin marcar) que puede ser el mismo que el radioligando u otra sustancia que presente afinidad por el receptor. La concentración de fármaco frío empleada suele ser 100 veces mayor que el valor de la K_D del radioligando. Al lograrse así una concentración saturante de ligando frío y, al ser la unión de un ligando a su receptor un proceso dinámico, ambos ligandos (marcado y frío) competirán por la misma población de receptores y ésta se saturará de ligando frío. De este modo el radioligando sólo se unirá de forma significativa a 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** permiten determinar la densidad de receptores en un tejido, (la $B_{\max}$); y la afinidad del ligando por el receptor, que se expresa mediante la K_D y que se define como la concentración de ligando necesaria para ocupar el 50 % de la $B_{\max}$. Los **ensayos cinéticos de asociación** permiten determinar el tiempo necesario para que el radioligando se una al receptor y se alcance el equilibrio termodinámico, así como

la constante de asociación K_1 . Los **ensayos cinéticos de disociación** proporcionan el valor de la constante de disociación K_1 . Haciendo el cociente entre la constante de disociación y la de asociación se obtiene la K_D , que tiene que ser del mismo orden que la hallada en los estudios de saturación.

Finalmente, los **ensayos de competición** permiten el estudio de la afinidad que otros fármacos puedan tener por el receptor que se estudia al desplazar a determinadas concentraciones el radioligando. El procesamiento de los datos obtenidos en estos ensayos permite obtener la CI_{50} (concentración inhibitoria 50 %), que es la concentración de sustancia que desplaza el 50 % del radioligando unido específicamente al receptor. De estos ensayos también se obtiene la K_1 , que es una medida de la afinidad de la sustancia desplazante por el receptor.

4.6.- Condiciones del ensayo.

- Tiempo de incubación.

En los ensayos de saturación y competición el tiempo de incubación del radioligando con la proteína ha de ser el suficiente para que se alcance el equilibrio entre el radioligando y el receptor. Cabe destacar que el tiempo que se tarda en alcanzar el equilibrio depende de la concentración de radioligando, por lo cual se suelen usar concentraciones bajas del mismo para determinar dicho tiempo.



Para determinar el tiempo de incubación será necesario realizar un estudio de unión a diferentes tiempos de incubación y ver a partir del que se alcanza la saturación.

- Temperatura.

La unión del radioligando a su receptor varía en función de la temperatura. Por ello es necesario realizar ensayos de unión a diferentes temperaturas y ver a cuál se produce la máxima unión específica. Mientras que algunos ligandos requieren temperaturas fisiológicas, otros presentan mayor unión específica a temperaturas entre 0 y 4°C. La causa por la cual se podría explicar una mayor unión a baja temperatura podría ser una menor degradación del radioligando, una disminución de la unión inespecífica y el hecho de que algunos radioligandos tienen una mayor afinidad en estas condiciones.

- Regulación del pH.

Generalmente, el pH suele mantenerse dentro del rango fisiológico, entre 7 y 8. El agente tamponante más utilizado es el Tris(hidroximetil)-aminometano, pero no es necesariamente el mejor y, por lo tanto, para poner a punto un método hará falta determinar cuál es el tampón más adecuado para el ensayo.

- Presencia de iones y GTP.

Cationes como el Na^+ y el Mg^{2+} , entre otros, se añaden algunas veces al tampón de incubación ya que pueden hacer aumentar o disminuir la unión específica del radioligando. Del mismo modo, algunos nucleótidos como el GTP se añaden al tampón de incubación a concentraciones del orden de 100 μM al poder afectar el comportamiento del receptor que se estudia.

4.7.- Separación del radioligando unido del libre.

Una vez se ha incubado el radioligando con el receptor el tiempo necesario para que se llegue al equilibrio, hace falta separar el radioligando unido del que ha quedado libre para poder cuantificarlo posteriormente. Este proceso es muy

delicado ya que ha de ser lo más rápido posible para evitar que se altere el equilibrio y poder así obtener resultados repetitivos. La separación puede llevarse a cabo por tres técnicas:

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

Los tres métodos son válidos, pero cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes, de manera que la elección de uno de ellos dependerá de las características del ensayo a realizar.

- Separación por diálisis.

Es teóricamente la más idónea ya que el equilibrio no se altera. Consiste en dos celdas de diálisis separadas en dos cámaras de volumen conocido por una membrana de diálisis que el radioligando puede atravesar pero no la proteína. En una de las cámaras se coloca la muestra a estudiar y en otra la disolución del radioligando. El radioligando tiene tendencia a igualar las concentraciones a ambos lados de la membrana, por lo que la atravesará y se unirá a la proteína. Al llegar al equilibrio tendremos en una celda el radioligando unido a proteína más radioligando libre, mientras que en la otra tendremos radioligando libre. Como la concentración de radioligando libre será la misma en ambas celdas, la cantidad unida se obtiene por diferencia de la radiactividad de ambas celdas. La gran desventaja de este método es su inoperatividad, ya que no permite procesar gran cantidad de muestras a la vez y, por tanto suele reservarse a casos en que el radioligando presenta una baja afinidad por el receptor.

- Separación por centrifugación.

En ésta se procede a la centrifugación de la muestra una vez se ha

alcanzado el equilibrio. El pellet obtenido corresponde a la proteína más el radioligando unido, mientras que el sobrenadante contiene el radioligando libre. Un inconveniente que presenta es que el radioligando libre puede quedar retenido en el pellet originando error, por lo cual, para tratar de corregirlo, se usan medios de gran densidad como gradientes de sacarosa. Esta técnica se utiliza cuando la unión inespecífica es demasiado alta en los filtros o cuando la velocidad de disociación del complejo radioligando-receptor es elevada.

- Separación por filtración.

Es la técnica más utilizada en los ensayos de unión de un radioligando a un receptor. Para evitar la disociación del radioligando unido del receptor hace falta que la filtración sea lo más rápida posible. Para conseguirlo, la filtración se hace por vacío a través de filtros de fibra de vidrio, donde quedará retenida la proteína con el radioligando unido al receptor, y el radioligando libre quedará en el líquido filtrado. Un inconveniente es la unión inespecífica de radioligando al filtro, fenómeno que se solventa lavando con tampón el filtro varias veces una vez se ha filtrado y tratando los filtros con una solución de polietilenimina al 0,5 % antes de usarlos para evitar la unión debida a las cargas eléctricas. Para tratar los filtros también puede usarse albúmina o gelatina.

Sus ventajas son la rapidez y posibilidad de procesar un número elevado de muestras a la vez. Ha sido el método utilizado en el presente trabajo. Sus inconvenientes son la unión inespecífica al filtro, que puede ser grande en algunos sistemas, y que no se puede utilizar cuando la disociación es rápida o el radioligando presenta una baja afinidad por el receptor.

4.8.- Técnica del centelleo líquido.

Una vez se tiene el complejo radioligando-receptor retenido en el filtro es necesario detectar y cuantificar la radiación que contiene para transformarla

posteriormente a cantidad de radioligando unido. Para ello se depositan los filtros en viales de centelleo y se les añade 10 ml de líquido o cóctel de centelleo. La técnica del centelleo líquido se fundamenta en la conversión de la energía de las radiaciones emitidas por el radioligando en fotones gracias a su interacción con los compuestos orgánicos que contiene el líquido de centelleo. En el presente trabajo los radioligandos están marcados con tritio, que emite radiación β que, al interaccionar con el líquido de centelleo, será convertida en energía electromagnética (proceso de centelleo) y posteriormente cuantificada instrumentalmente (proceso de detección y cuantificación).

4.8.1.- Proceso de centelleo.

Esta etapa tiene lugar dentro del vial que contiene el radioligando y el líquido de centelleo. El líquido o cóctel de centelleo se compone de disolventes y del líquido de centelleo propiamente dicho. Los disolventes contienen grupos aromáticos que captan la energía de las radiaciones, teniendo lugar ionizaciones y excitación de moléculas. La energía generada es transferida a las moléculas del líquido de centelleo, que resultan a su vez excitadas y retornan a su estado inicial emitiendo la energía en forma de fotones.

La finalidad de este proceso es amplificar la cantidad de fotones que se emite y disminuir su energía, para que se ajuste a las características del aparato contador y a las más óptimas para cada radioisótopo.

4.8.2.- Proceso de detección y cuantificación.

En este proceso se transforman los fotones emitidos en el centelleo en impulsos eléctricos que sean detectados por el contador. Los fotones originados son captados por un fotomultiplicador que, bajo su acción, desprende electrones, consiguiendo de esta manera amplificar la señal para su posterior tratamiento electrónico. Como la cantidad de fotones emitida es directamente proporcional a

la actividad existente en el vial, para un isótopo dado, a mayor intensidad de los impulsos registrados, mayor será la cantidad de radioligando presente en el vial.

Un parámetro a tener en cuenta es la **eficiencia** de conteo (E), que es la relación entre las cuentas detectadas por el contador de centelleo, normalmente expresadas como cuentas por minuto (cpm), y la actividad real de la muestra expresada como desintegraciones por minuto (dpm):

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

En una situación ideal, la eficiencia debería de ser igual a 1 (se detectaría toda la energía radiactiva); pero en muchos casos no es así debido a que existen una serie de procesos que absorben energía radiactiva para, por ejemplo, producir reacciones químicas. Para conocer el valor real de las desintegraciones (dpm) es necesario pues conocer la eficiencia de conteo del proceso.

Al conjunto de fenómenos que impiden alcanzar el valor ideal de eficiencia se les denomina "**quenching**". Los tipos de quenching más frecuentes son el quenching por el color (si la muestra con el cóctel origina o tiene color, éste absorbe fotones) y el quenching químico (la energía se emplea para llevar a cabo reacciones químicas). Por ello es imprescindible realizar una curva de calibración de eficiencia de conteo con el líquido de centelleo que se utilice y patrones de actividad conocida para así conocer la eficiencia real y calibrar el aparato con los valores obtenidos.

4.9.- Tratamiento de los resultados.

Los datos obtenidos de la detección de la radiactividad presente en los viales, expresados en dpm, se procesan en un ordenador que ejecuta un software capaz de calcular las constantes a partir de los mismos y de representar gráficamente los resultados. El paquete de programas utilizado ha sido el

KINETIC, EBDA, LIGAND (McPherson y col. 1980).

4.10.- Influencia de la temperatura y la concentración proteica.

La temperatura de incubación y la concentración proteica son dos parámetros a considerar en todo ensayo de unión. La temperatura puede afectar la unión de un ligando al receptor, y una dependencia directa de la concentración de proteína demuestra la naturaleza proteica del mismo.

4.10.1.- Efecto sobre la unión del [^3H]Ro 5-4864.

Estudios previos realizados en esta misma Unidad con el radioligando [^3H]Ro 5-4864 en conducto deferente de rata habían demostrado que la máxima unión específica se obtenía a una temperatura entre 0 y 4°C y que un aumento de temperatura producía una disminución en la cantidad de radioligando unido específicamente. En cuanto a la concentración proteica, se encontró una relación lineal entre la cantidad de proteína presente en el medio de incubación y el incremento de la unión específica, demostrándose así la naturaleza proteica del receptor. Faltaba ahora una estimación de estos factores para la unión del [^3H]PK 11195.

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

- Influencia de la temperatura.

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la unión del [^3H]PK 11195 en próstata de rata se ha determinado la unión específica del mismo a cuatro temperaturas diferentes, manteniendo constantes los restantes parámetros. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

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

Tabla 4.1.- Influencia de la temperatura sobre la unión específica del [³H]PK 11195 en próstata de rata.

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

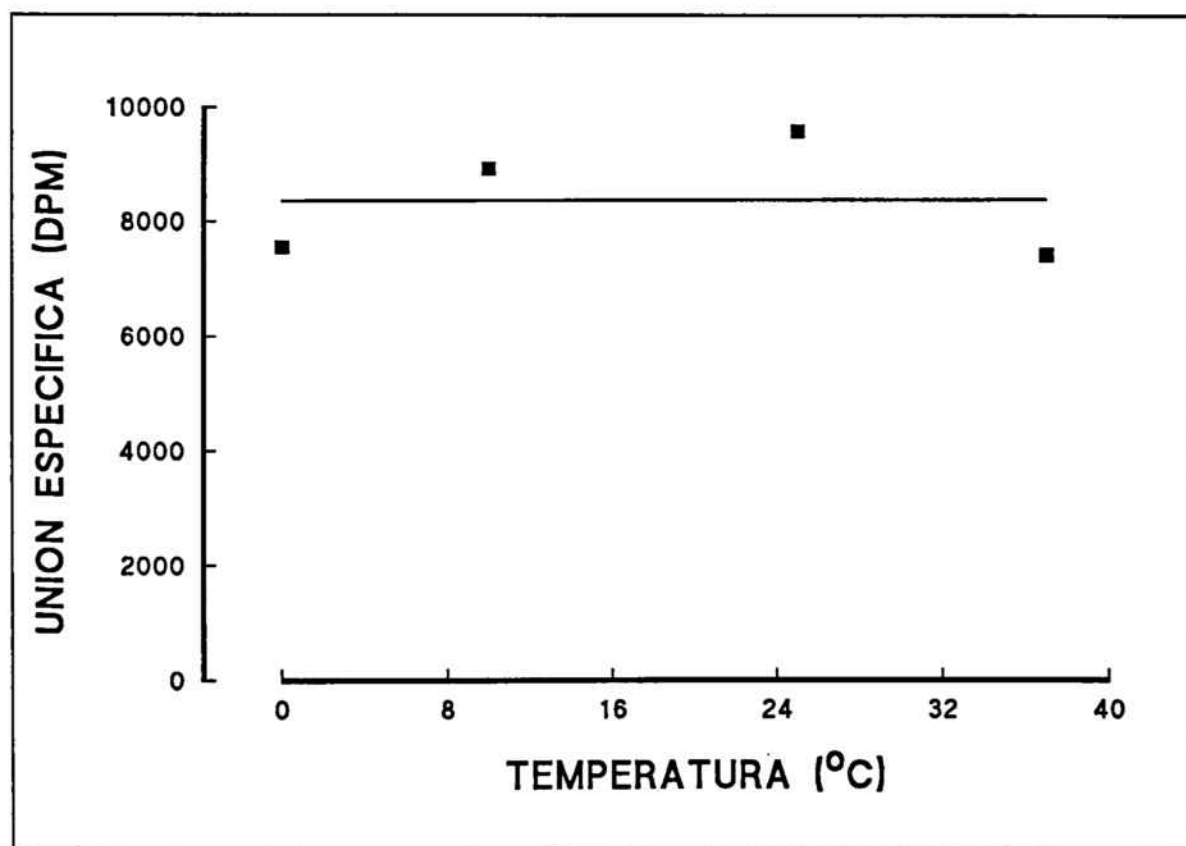


Figura 4.1.- Representación gráfica del efecto de la temperatura sobre la unión específica del [³H]PK 11195 en próstata de rata.

Como puede apreciarse, la unión del [^3H]PK 11195 no se ve afectada de manera significativa por la temperatura, diferenciándose por ello de la del [^3H]Ro 5-4864.

- Influencia de la concentración proteica.

Para valorar el efecto de la concentración proteica sobre la unión del [^3H]PK 11195 se incubaron concentraciones idénticas del radioligando con diferentes concentraciones de proteína, determinándose para cada una la unión total y la inespecífica. Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

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

Tabla 4.2.- Influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [^3H]PK 11195 en próstata de rata.

Cada resultado es la media de tres experimentos realizados por separado $\pm$ E.S.M.

La ecuación de la recta de regresión resultante fue :

$$Y = 55.14 x + 670.45$$

$$r = 0.994 \text{ (} P < 0.01 \text{)}$$

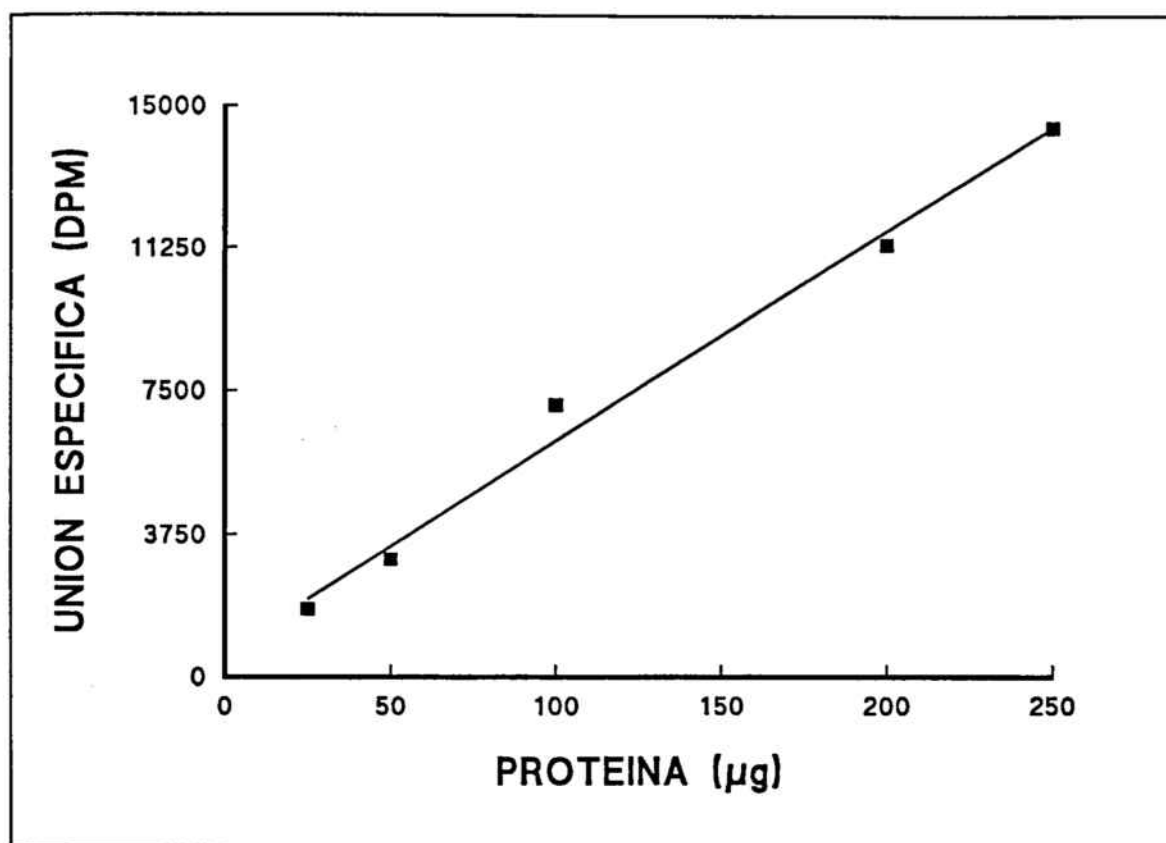


Figura 4.2.- Representación gráfica de la influencia de la concentración proteica sobre la unión específica del [^3H]PK 11195 en próstata de rata.

Con lo cual se demuestra también la naturaleza proteica para el sitio de unión del PK 11195 al encontrarse una relación directamente proporcional entre la concentración proteica y la unión específica.

4.11.- Descripción de los ensayos de unión.

4.11.1.- Incubación.

La incubación es la etapa en la que el radioligando interactúa un tiempo determinado con el receptor. En este trabajo tiene lugar entre 0 y 4°C de temperatura para los ensayos sobre el receptor benzodiazepínico periférico

(temperatura entre la que se obtiene la máxima unión específica como se muestra en el apartado anterior).

Se ha de tener en cuenta que las diluciones preparadas del radioligando se degradan con rapidez al almacenarlas en nevera aunque sea por períodos cortos de tiempo, posiblemente por el intercambio del tritio con los protones del agua. Por otra parte, es recomendable hacer las diluciones de radioligando en tubos de vidrio, ya que se ha comprobado que el plástico lo afecta. Por todo ello, las diluciones de radioligando se realizaron en tubos de vidrio en el momento en que se iba a realizar la experiencia y en la cantidad justa que se iba a utilizar, a partir de la solución madre suministrada por el proveedor (normalmente etanólica), utilizándose de forma extemporánea.

Incubación en ensayos sobre el receptor benzodiazepínico periférico.

Como se ha citado anteriormente, tiene lugar a una temperatura entre 0 y 4°C (tubos introducidos en hielo picado). El tiempo de incubación, obtenido de los ensayos cinéticos de asociación, ha sido de 2 horas. Las concentraciones proteicas fueron siempre las mismas para un ensayo determinado, manteniéndose entre los 100 y 200 µg de proteína en los 250 µl de volumen de incubación.

La reacción se inicia al poner en contacto 125 µl de la suspensión de extracto crudo mitocondrial, a una concentración de 0,8 - 1,6 mg/ml, con 125 µl de una dilución de radioligando a una concentración tal que, en el volumen final y según el tipo de ensayo, dé la concentración final deseada de radioligando (que suele ser entre 1 y 2 nM excepto para los ensayos de saturación, en los que es más concentrado).

Los tubos con radioligando y proteína se mantuvieron en hielo durante 2 horas, transcurridas las cuales se paró la reacción añadiendo 4 ml de tampón frío Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y se filtró el contenido a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) en un aparato de filtración múltiple (Millipore) conectado a una

bomba de vacío, lavándose a continuación los filtros dos veces con 4 ml de tampón y, una vez secos, se colocaron en viales a los que se añadió 10 ml de cóctel de centelleo, y se midió la radiactividad presente en la muestra al cabo de 24 h con un contador de centelleo β . Los filtros habían sido previamente tratados con una solución de polietilenimina al 0,5% antes de utilizarlos tal como se ha explicado en apartados anteriores.

Los radioligandos utilizados permanecieron siempre a -30°C en su disolución etanólica de origen.

4.11.2.- Ensayos de saturación.

En estos ensayos se mide el aumento de unión específica al aumentar la concentración de radioligando, manteniéndose constantes el tiempo de incubación y la concentración proteica. La cantidad de complejo radioligando-receptor se calcula en función de la concentración de radioligando libre. De estos ensayos se obtienen dos constantes de gran importancia para la caracterización de un receptor, que son la K_D (que mide la afinidad del radioligando por el receptor); y la B_{max} , que proporciona la densidad de receptores de un tejido. A menor valor de K_D , mayor será la afinidad del radioligando por el receptor.

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

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

donde B es la cantidad de radioligando unido, B_{max} la máxima cantidad de radioligando unido al receptor (es decir, el número máximo de receptores), y F es la cantidad de radioligando libre. Esta ecuación genera una hipérbola rectangular,

como se puede observar en la figura 4.3. 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 de la B_{max} .

El procedimiento a seguir para realizar estos ensayos es preparar diluciones del radioligando a concentraciones crecientes para conseguir llegar a ocupar todos los receptores presentes en el tejido de estudio, manteniéndose constante la concentración proteica y el tiempo de incubación. De cada concentración de radioligando se efectuarán controles para saber la cantidad de radiactividad total depositada en cada tubo, así como la unión inespecífica en presencia de ligando frío a una concentración 10^{-5} M. La evolución de la unión total a inespecífica a diferentes concentraciones de radioligando se muestra en la siguiente figura:

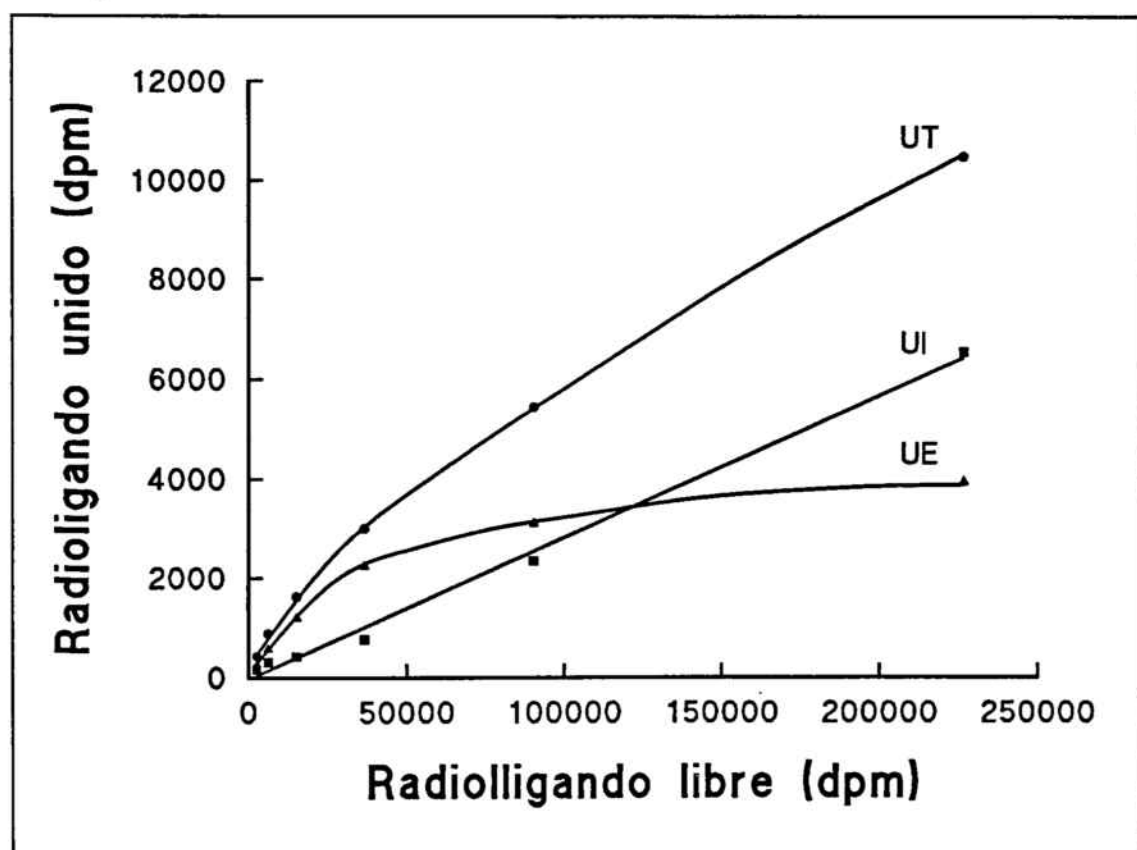


Figura 4.3.- Evolución de la unión de un radioligando a diferentes concentraciones. UT: unión total. UI: unión inespecífica. UE: unión específica.

Hay casos en que la K_D del radioligando por el receptor es demasiado elevada, de manera que se requeriría una cantidad también elevada de radioligando para saturar los receptores. Para evitar un consumo excesivo de radioligando, lo que se hace es mantener una concentración constante del mismo y alcanzar las diferentes concentraciones añadiendo a cada tubo cantidades crecientes del ligando frío hasta alcanzarlas, tal como se esquematiza en la figura 4.4, y el programa informático de tratamiento de los datos (EBDA) se encarga de hacer las pertinentes transformaciones a partir de los resultados obtenidos del experimento así realizado. Las transformaciones que permiten determinar gráficamente la K_D y la B_{max} se explicarán en el apartado de Resultados.

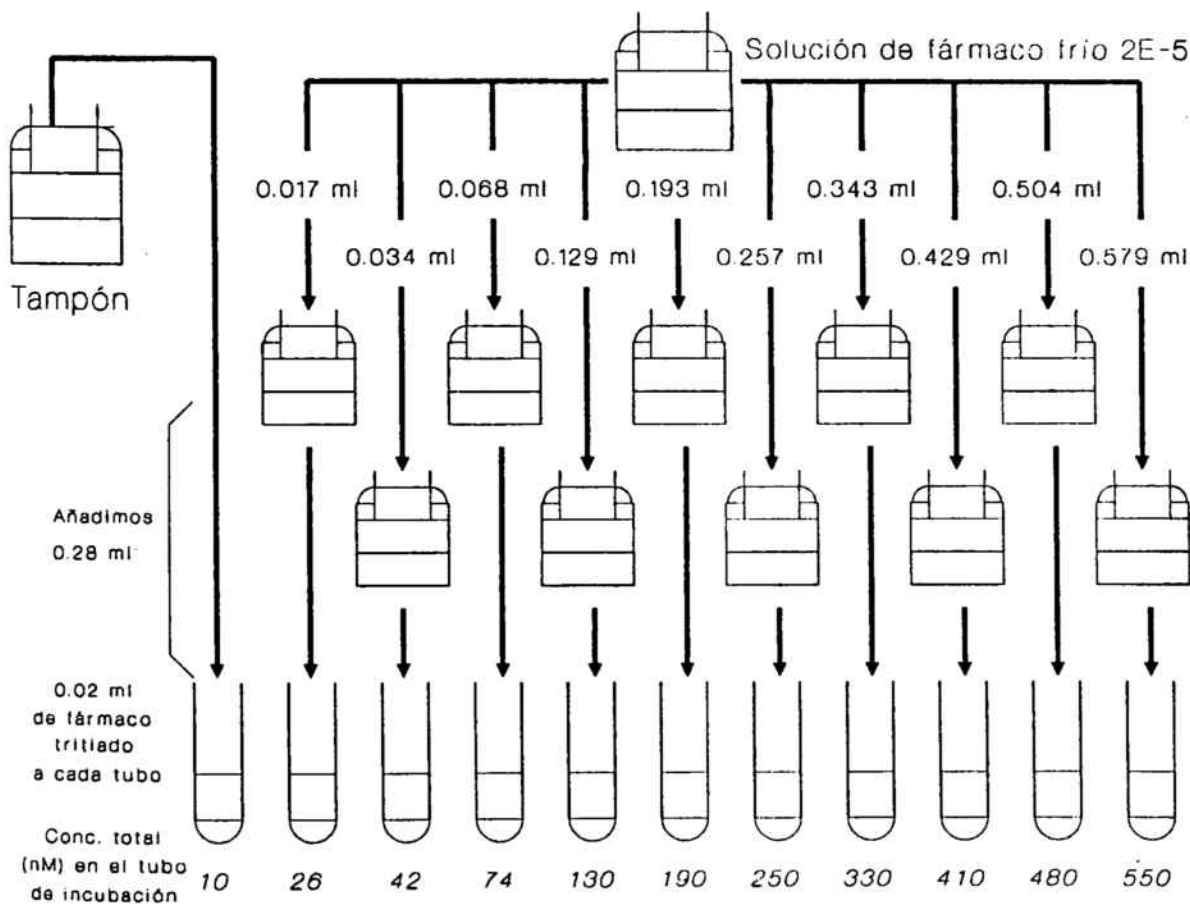


Figura 4.4.- Ejemplo de ensayo de saturación utilizando ligando frío en el medio de incubación.

4.11.3.- Ensayos cinéticos.

En estos ensayos se determina la variación de la unión de un radioligando en función del tiempo. Podemos distinguir 2 tipos: ensayos cinéticos de asociación y cinéticos de disociación.

La finalidad de los ensayos de asociación es determinar el tiempo que se tarda en saturar el número máximo de receptores a una concentración de radioligando determinada. De este modo se obtiene el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre radioligando y receptor a esta concentración de radioligando, que será de utilidad en los ensayos de saturación y competición. Además, de estos estudios se obtiene la **constante de asociación (K_{+1})** y de los de disociación la **constante de disociación (K_{-1})**. Si tenemos en cuenta que:

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

los estudios cinéticos nos permiten obtener la K_D que, óptimamente, ha de ser del mismo orden que la obtenida mediante los estudios de saturación.

La metodología a seguir consiste en preparar tubos con la misma concentración de radioligando y proteína, pero variando el tiempo de incubación. En este caso, hemos escogido un intervalo de tiempo que comprende desde 1 minuto hasta dos horas (1', 3', 5', 7', 10', 15', 30', 60', 90', y 120'), procediéndose a la filtración de los tubos una vez se cumple el tiempo de incubación que tiene fijado cada uno. De cada tiempo se realiza la correspondiente unión total y unión inespecífica, esta última en presencia de una concentración de ligando frío de 10^{-5} M.

Una vez realizado el ensayo de asociación, se determina la unión específica (UT-UI) para cada tiempo y se representa la curva de asociación que, si se

linealiza con el método de pseudo primer orden o se trata con un software de regresión no lineal nos dará el valor de K_{+1} . De manera alternativa, puede calcularse el logaritmo neperiano de la cantidad de radioligando unido en el equilibrio (B_e) dividida por la diferencia entre B_e y la cantidad de radioligando unido en el tiempo t (B) y representarlo respecto al tiempo según la ecuación:

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

y con ello se obtiene una recta cuya pendiente nos da el valor de K_{obs} , tal como muestra el siguiente ejemplo:

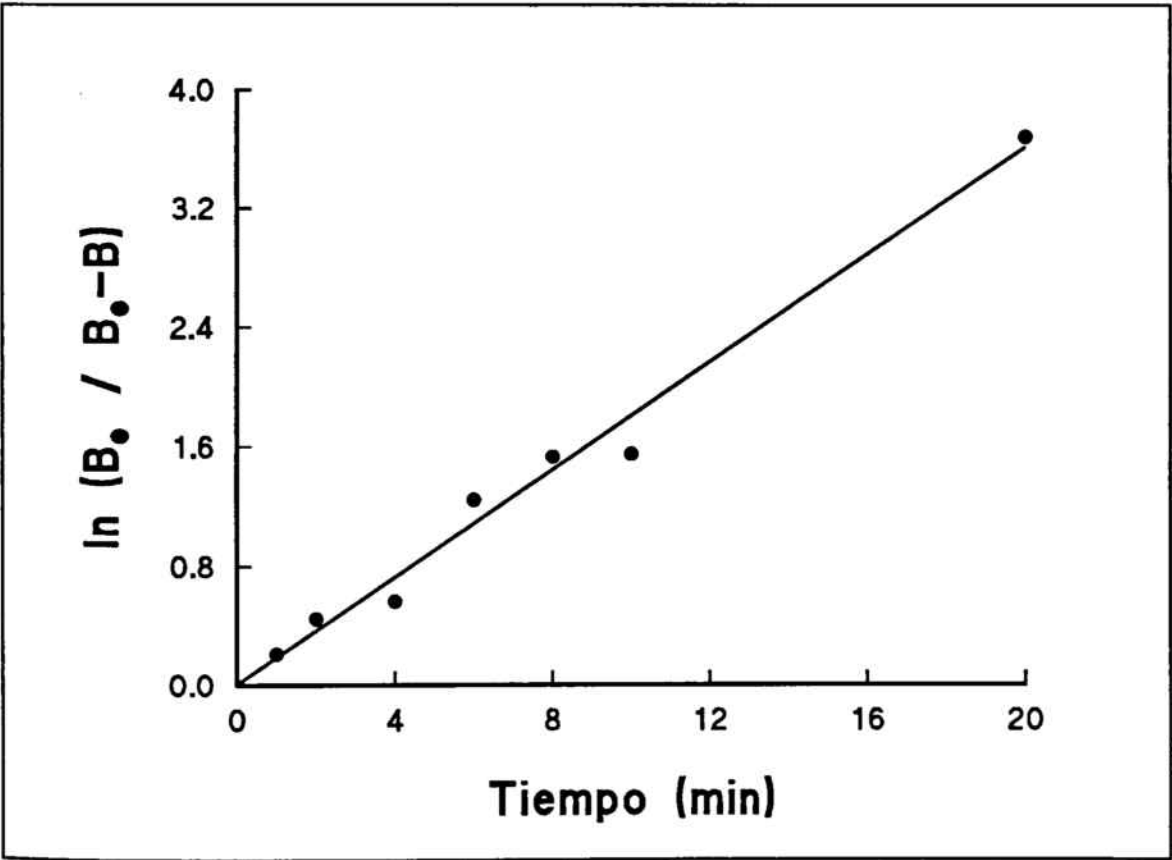


Figura 4.5.- Representación del $\ln (B_e / B_e - B)$ respecto al tiempo de incubación. El valor de la pendiente de la recta es la K_{obs} .

Los ensayos cinéticos de disociación proporcionan el valor de K_1 . Para realizar el ensayo se incuban los tubos con la proteína y el radioligando el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio y, pasado este tiempo, se añade una cantidad de ligando frío tal que su concentración final sea de 10^{-5} M para que disocie el radioligando unido del receptor. La representación de la unión específica en función del tiempo transcurrido desde la adición del ligando frío es la curva de disociación.

A partir de la curva de disociación y con un programa de regresión no lineal puede obtenerse la K_1 . Otra manera de obtener esta constante es representar el logaritmo neperiano del cociente entre la unión específica a un tiempo determinado (B) y la resultante en el tiempo 0 de adición del ligando frío (B_0) respecto al tiempo, siendo el valor de la pendiente de la recta de regresión resultante $-K_1$, tal como muestra la siguiente gráfica:

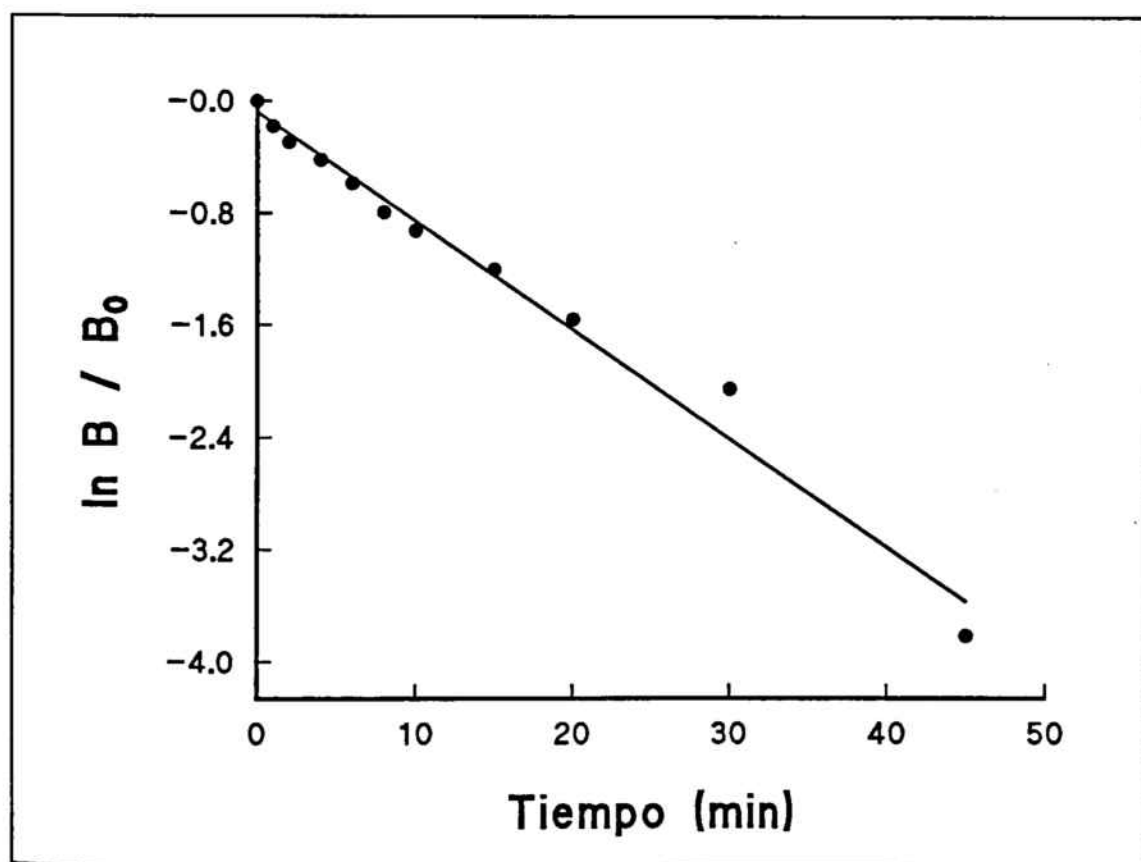


Figura 4.6.- Representación del $\ln (B / B_0)$ respecto al tiempo de disociación.

A partir del valor de K_1 se puede obtener el valor de la vida media de disociación:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_{-1}}$$

4.11.4.- Ensayos de competición.

En estos ensayos se mide la afinidad que tiene un determinado compuesto, no marcado radiactivamente, para el receptor que se estudia en función de su capacidad para competir con el radioligando por el mismo receptor. Los parámetros que se mantienen constantes son las concentraciones de radioligando y de proteína, que se ponen en contacto con diferentes concentraciones de la sustancia competidora. El tiempo de incubación para estos ensayos sobre el receptor benzodiazepínico periférico ha sido de 2 horas, transcurridas las cuales se procedió al filtrado del contenido de los tubos tal como se ha explicado anteriormente. A medida que la concentración de competidor es mayor, cabe esperar una menor cantidad de radioligando unido al receptor.

Estos estudios sirven también para demostrar una especificidad farmacológica, es decir, el radioligando que se estudia debe ser desplazado o, mejor dicho, competir con todos los fármacos de su mismo grupo farmacológico.

Si se representa la unión específica frente al logaritmo de la concentración de competidor o desplazante se obtiene una curva sigmoidea (figura 4.7) en el caso de que exista un único lugar de unión. La ecuación que relaciona la concentración de radioligando unido (B) con la concentración de desplazante (I) es la siguiente

$$B = \frac{B_{\max} \cdot F}{F + K_D \left(\frac{1+I}{K_I} \right)}$$

siendo K_i la afinidad del competidor por el receptor. La concentración de desplazante a la cual la unión del radioligando es la mitad de la total (sin desplazante) se denomina CI_{50} , o concentración inhibidora 50 %.

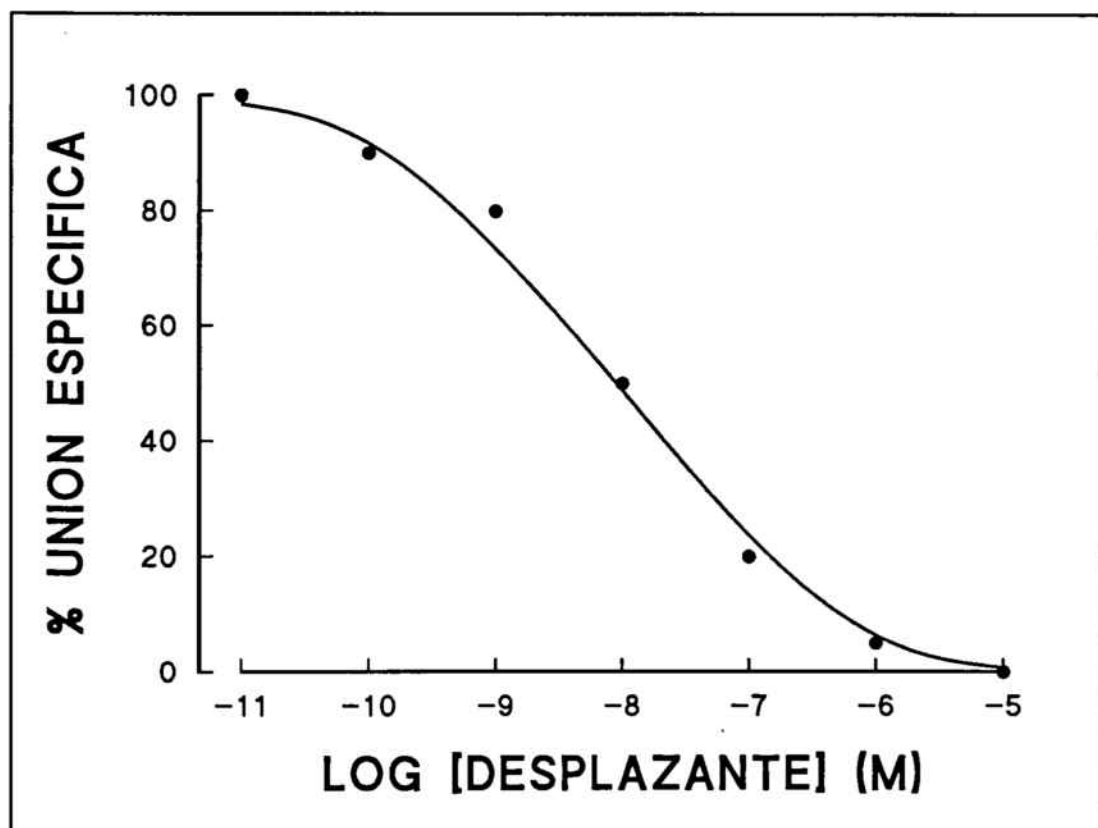


Figura 4.7.- Representación ejemplo de la disminución de la unión específica respecto a la concentración de fármaco desplazante.

4.12.- Ensayos de uptake de adenosina.

4.12.1.- Obtención de la proteína y tampones.

Para los ensayos de *uptake* de adenosina se ha utilizado igualmente la fracción mitocondrial de testículo de rata, cuya obtención ya se ha descrito en los apartados 4.1 y 4.2. La única variación en el proceso ha sido el colocar los tubos con el pellet resuspendido en un baño a 37° C durante 5 minutos antes de la segunda centrifugación a 8000 rpm, con el propósito de que se degradara la adenosina endógena que pudiera haber y hacer de este modo las mitocondrias más ávidas para transportar adenosina exógena. Además, el agente tamponante utilizado ha sido el HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazino-N'-(2-etanosulfónico)) en lugar del Trizma®-HCl.

Los tampones utilizados en estos ensayos han sido los siguientes:

Tampón HEPES-sacarosa (pH 7,5).

Se utiliza en la homogeneización del tejido y en la obtención del pellet mitocondrial. Se compone de:

HEPES sódico	2,6 g.
Sacarosa	102,6 g
HCl	c.s.p. pH 7,5
Agua destilada	c.s.p. 1 l.

Tampón HEPES incubación (pH 7,4).

Constituye el medio de incubación para el proceso de *uptake* y con él se efectúan las diluciones de proteína, [³H]Adenosina, adenosina fría e inhibidores. Su composición es:

NaCl	8,18 g.
D-glucosa	0,9 g.
MgCl ₂ (6-hidrato)	0,4 g.
CaCl ₂	0,14 g.
K ₂ HPO ₄	0,26 g.
HEPES sódico	2,6 g.
HCl	c.s.p. pH 7,4
Agua destilada	c.s.p. 1 l.

4.12.2.- Condiciones y generalidades de los ensayos de *uptake*.

El transporte de adenosina a través de la membrana mitocondrial se ha cuantificado en función de la cantidad de adenosina tritiada que se incorpora del medio de incubación al interior de la mitocondria y que, por tanto, podrá separarse por filtración de la adenosina libre de manera análoga a como se ha descrito en apartados anteriores para los ensayos de unión.

El volumen de incubación final ha sido en todos los ensayos de 1 ml, y la concentración proteica de 0,4 mg/ml. Como en este proceso se requiere una cierta funcionalidad del transportador, la incubación se llevó a cabo en un baño a 37° C. En cuanto al tiempo de incubación, se determinó en ensayos previos que al cabo de 10 min. se obtenía el máximo de cuentas. El inconveniente de tiempos de incubación tan largos es que, a más tiempo, mayor cantidad de sustrato podría (si existen los enzimas necesarios) metabolizarse y dar resultados falseados; por lo cual, también se realizaron ensayos a 5 minutos de incubación y a 30 segundos. La incubación a 30 s debería ser más fiable pero no por ello la más interesante, tal como se verá en posteriores apartados.

El proceso de *uptake* se inicia con la adición de 0,1 ml de una disolución de [³H]adenosina a una concentración determinada a un tubo que contiene la suspensión proteica en tampón de incubación a 37° C, iniciándose así la

incubación.

La unión inespecífica se determinó incubando la misma cantidad de radioligando y proteína que para la unión total a 0° C y en presencia de un exceso de adenosina fría (10 μ M). A temperaturas tan bajas el transportador no funciona y, por tanto, sólo se unirá adenosina tritiada a lugares inespecíficos.

Pasado el tiempo de incubación se paró la actividad del transportador mediante la adición de 50 μ l de una mezcla de dipiridamol y dilazep a concentraciones tales que en el volumen final fueran 100 y 1000 μ M respectivamente, y se procedió inmediatamente a filtrar el contenido de los tubos después de la adición de 4 ml de tampón de incubación frío, lavándose seguidamente los filtros 2 veces con 4 ml de tampón. Los filtros y el dispositivo de filtración por vacío fueron los mismos que se han descrito para los ensayos de unión.

Los filtros se depositaron en viales de centelleo, se añadió 10 ml de cóctel Biogreen 1 y la radiactividad presente se valoró al cabo de 12 horas en un contador de centelleo líquido.

4.12.3.- Ensayos de saturación

Su finalidad es obtener los parámetros K_M y V_{max} para el transportador. La K_M (constante de Michaelis) es la concentración de sustrato a la cual la mitad de los centros activos del enzima o transportador están ocupados (equivaldría a la K_D de los ensayos de unión); mientras que la V_{max} (velocidad máxima) es la cantidad de complejo enzima-sustrato formada por unidad de tiempo cuando los centros del enzima están saturados de sustrato (equivalente a la B_{max} de ensayos de unión). Ambos parámetros se relacionan directamente ya que la K_M es aquella concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción se reduce a la mitad de V_{max} .

Estos ensayos se realizan incubando tubos que contienen la misma cantidad

de extracto mitocondrial con cantidades crecientes de adenosina.

Dado que la adenosina suele presentar valores de K_M en el rango micromolar para sus transportadores, las concentraciones que se tendrían que preparar de adenosina tritiada deberían de ser elevadas. Para evitar un gasto excesivo de radioligando se procedió a realizar las saturaciones de 10 y 5 minutos de incubación mediante el método de la adición de fármaco o sustancia fría (adenosina no tritiada en este caso), tal como se explica en el apartado 4.11.2. Para la saturación a 30 segundos se siguió otra estrategia: se mantuvo una relación constante de 1 Ci de adenosina tritiada por cada milimol de adenosina total, ya que a tiempos tan cortos el método de adición de adenosina fría nos hubiera proporcionado resultados de incorporación muy bajos al no poder entrar la suficiente cantidad de [^3H]adenosina para ser detectada a concentraciones totales altas.

Para los ensayos de saturación a 5 min. en ausencia de sodio, se substituyó el cloruro sódico del tampón de incubación por una cantidad equimolar de cloruro de colina. Los experimentos se realizaron de manera análoga a la ya descrita.

4.12.4.- Ensayos de inhibición.

En estos ensayos se mantuvo constante la concentración de [^3H]adenosina a 10 nM y se midió el transporte en tubos que contenían diferentes concentraciones de inhibidor. Para ello se preincubaron los tubos que contenían 0,1 ml de suspensión proteica (para una concentración final de 0,4 mg/ml) con 0,8 ml de tampón de incubación con el inhibidor a la concentración deseada, a 37° C durante 3 minutos, pasados los cuales se añadió los 0,1 ml de solución de adenosina tritiada. Se dejó pasar el tiempo de incubación necesario antes de parar la reacción y filtrar. Los tiempos de incubación para estos ensayos fueron también de 10 min. 5 min. y 30 seg.

4.12.5.- Tratamiento de los resultados.

En un principio, los datos obtenidos de las saturaciones, expresados en dpm, se introdujeron en el programa informático de cálculo de parámetros enzimáticos ENZFITTER, pero posteriormente se trabajó con los programas EBDA y LIGAND debido a que daban los mismos resultados y proporcionaban más versatilidad para su posterior manipulación en una hoja de cálculo.

4.13.- Fármacos, reactivos y material empleados.

Fármacos y reactivos.

Se han utilizado los siguientes compuestos y reactivos:

- [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, clonazepam y dilazep (Hoffman-La Roche).
- AHN 086 (Dra. A.H. Newman).
- Protoporfirina IX, S-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)-6-tioguanosina (HNBTG), S-(p-nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI), atractilósido, carboxiatractilósido, adenosina, Trizma®-clorhídrico, HEPES sódico y cloruro de colina (Sigma).
- Nifedipino, Nitrendipino y BAY-K 8464 (Bayer AG).
- Dipiridamol (Boehringer Ingleheim).
- Sacarosa, D-glucosa, cloruro sódico, cloruro magnésico (6-hidrato), cloruro cálcico, hidrogenofosfato potásico (Panreac).
- Albumina sérica bovina (Merck).
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma).
- Polietilenimina (sol. acuosa 50 % V/V) (Sigma).
- Cóctel de centelleo Biogreen 1 (Scharlau).

Las soluciones stock de cada fármaco se han preparado, en el caso del PK 11195, Ro 5-4864, diazepam, clonazepam, AHN 086, protoporfirina IX, nitrendipino, nifedipino, BAY-K 8464, NBTI y dipiridamol en etanol absoluto. El PK 14105 se ha disuelto en dimetilsulfóxido. El resto de los compuestos utilizados se ha disuelto en agua destilada. Las diferentes disoluciones se almacenaron en nevera y no más de una semana.

Material fungible:

- Tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm (Corning).
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (2,5 mm).
- Viales de centelleo de 20 ml (Aulabor).

Aparatos:

- Homogeneizador de tejidos Polytron (Kinematica).
- Centrífuga preparativa Beckman J2-21.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1203.
- Aparato de filtración múltiple por vacío (Millipore).
- Contador de centelleo líquido β LKB Wallac 1217 Rackbeta.

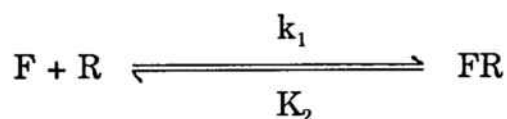
5.- RESULTADOS.

5.1.- Expresión de los resultados.

En el capítulo anterior ya se han mencionado los diferentes ensayos que son necesarios para la caracterización de receptores de membrana mediante la unión de radioligandos. De estos experimentos se obtienen datos que, una vez procesados, nos proporcionan las constantes que caracterizan el receptor estudiado. Este apartado recoge las ecuaciones y expresiones matemáticas que dan lugar a estas constantes.

5.1.1.- Estudios de saturación.

La interacción fármaco-receptor puede describirse mediante una serie de ecuaciones basadas en los principios de A. J. Clark, según las cuales, dicha interacción obedece la ley de acción de masas, es decir:



donde F es el fármaco, hormona o neurotransmisor, R el receptor, FR el complejo

fármaco-receptor resultante, k_1 la constante de asociación y k_2 la constante de disociación.

La velocidad de asociación y disociación iniciales serán, respectivamente:

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

$$V_d = k_2 [FR]$$

El equilibrio se alcanzará cuando ambas velocidades se igualen, es decir:

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

agrupando términos obtenemos:

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

donde K_A es la constante de asociación en el equilibrio, pero es más habitual que la afinidad del fármaco por el receptor se exprese como la K_D (constante de disociación en el equilibrio), que será la inversa de K_A y tendrá como unidad molar, es decir:

$$K_D = \frac{k_2}{k_1}$$

Si se representa gráficamente en abcisas la concentración de radioligando y en ordenadas la unión al receptor, se obtiene una hipérbola rectangular que

obedece a la ecuación:

$$Y = \frac{a \cdot x}{b + x}$$

Si $Y = [*FR]$, $x = [*F]$, $b = K_D$ y $a = R_{TOT}$ (nº total de receptores), entonces:

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

Si la K_D es la concentración de radioligando que ocupa la mitad del total de receptores, entonces:

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

y, si lo sustituímos en la anterior ecuación, obtenemos:

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

y, dividiendo ambos miembros por $[R_{TOT}]$:

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

$$K_D = [*F]$$

Otra deducción importante es que la meseta que se describe en la gráfica representa la ocupación máxima de los receptores específicos por *F, lo cual se demuestra del siguiente modo:

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

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

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

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

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

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

Esta gráfica, donde se representa la concentración de radioligando respecto a su unión, permite determinar una de las propiedades de los receptores: la **saturabilidad**. A elevadas concentraciones de radioligando se ocuparán prácticamente todos los receptores, ya que éstos están presentes en un número limitado.

La representación de Scatchard.

En la anterior demostración, se mencionaba que son necesarias concentraciones de radioligando muy elevadas para ocupar la totalidad de receptores presentes en una muestra. Por esta razón, se usa la representación de Scatchard para determinar la B_{max} . En ésta, se representa en abscisas la concentración de radioligando unido (B o $[*FR]$) frente al cociente de radioligando unido dividido por el libre (B/F o $[*FR]/[*F]$).

Si consideramos la ecuación, ya vista:

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

es la misma que (cambiando las abreviaciones):

$$B = \frac{F \cdot B_{max}}{K_D + F};$$

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

dividiendo ambos miembros por F:

$$\left(\frac{B}{F} \cdot K_D\right) + B = B_{\max};$$

y, aislando B/F, obtenemos:

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

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

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D}B + \frac{B_{\max}}{K_D}$$

Por lo tanto, si un ligando interacciona con un solo tipo de población de receptores, se obtiene una recta cuya intersección con el eje de abscisas proporciona el valor de $B_{\max}$ y cuya pendiente es $-K_A$. Si la población de receptores no es de un solo tipo y las K_D para cada tipo son diferentes, se obtiene una curva que se puede descomponer en dos rectas, cuya pendiente será la $-K_A$ de cada población.

Representación de Hill.

La representación de Hill es otra transformación de los datos obtenidos en los ensayos de saturación que permite determinar si la interacción que se estudia es o no bimolecular.

La ecuación de Hill es la siguiente:

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

cuando $n = 1$, la interacción obedece la ley de acción de masas para reacciones bimoleculares. En esta ecuación, n representa el número de lugares de unión por molécula de receptor. Para representarla más cómodamente esta expresión matemática se puede transformar reagrupando términos y aplicando logaritmos:

$$(B \cdot K'_D) + (B \cdot [F]^n) = B_{\max} \cdot [F]^n;$$

$$B \cdot K'_D = (B_{\max} - B) \cdot [F]^n;$$

$$\frac{B}{B_{\max} - B} K'_D = [F]^n;$$

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

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

La pendiente de la representación de Hill, n , se denomina coeficiente de Hill (n_H). Si el valor de dicho coeficiente es igual a 1, entonces la K_D' es igual a K_D . En este caso, la población de receptores ocupada por el radioligando será de un solo tipo, la interacción fármaco-receptor será bimolecular y cumplirá la ley de acción de masas. En el caso de que hubiera más de un tipo de población de receptores ocupada, el coeficiente de Hill sólo podría ser 1 si las afinidades del radioligando por los subtipos de receptor fueran iguales y los diferentes lugares de unión no interaccionaran entre sí.

Si n_H es mayor que 1, existe cooperatividad negativa en la interacción fármaco-receptor. Si es menor que 1, hay diversas posibles interpretaciones: existe cooperatividad negativa, o hay diferentes poblaciones de receptores que no interaccionan entre sí o bien hay múltiples estados interconvertibles en los que la afinidad varía.

5.1.2.- Estudios cinéticos.

En la interacción de tipo bimolecular, como ya se ha mencionado, la k_1 es la constante de asociación y la k_2 es la de disociación. A continuación se muestran las deducciones que permiten obtener estas constantes a partir de la unión de radioligando al receptor en función del tiempo.

La formación de *FR respecto al tiempo se puede expresar como:

$$\frac{d[*FR]}{dt} = K_1[*F][R] - k_2[FR]$$

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

Se considera que, en las condiciones de incubación, [*F] es mucho más grande que [R]. Por lo tanto, [*F] no varía, mientras que [R] sí lo hace conforme se va formando más [*FR]. Debido a esto, podemos 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 neta de *FR es, como ya se ha dicho, cero. Por tanto, en el equilibrio:

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

$$k_2 = \frac{k_1'[R_{TOT}]}{[FR]_{eq}} - k_1';$$

Sustituyendo k_2 en la primera ecuación, se obtiene:

$$\frac{d[FR]}{dt} = k'_1([R_{TOT}] - [FR]) - (k'_1 \frac{R_{TOT}}{[FR]_{eq}} - k'_1)[FR];$$

$$\frac{d[FR]}{dt} = k'_1[R_{TOT}] \frac{[FR]_{eq} - [FR]}{[FR]_{eq}};$$

$$\frac{d[FR]}{[FR]_{eq} - [FR]} = \frac{k'_1[R_{TOT}]}{[FR]_{eq}} dt;$$

Integrando esta ecuación entre t_1 y t_2 :

$$\ln \frac{[FR]_{eq} - [FR]_{t1}}{[FR]_{eq} - [FR]_{t2}} = \frac{k'_1[R_{TOT}]}{[FR]_{eq}} (t_2 - t_1)$$

Para $t = 0$:

$$\ln \frac{[FR]_{eq}}{[FR]_{eq} - [FR]_t} = \frac{k'_1[R_{TOT}]}{[FR]_{eq}} t;$$

Si, como se ha visto anteriormente:

$$k_2 + k_1' = \frac{k_1' [R_{TOT}]}{[FR]_{eq}}$$

y, como $k_1' = k_1 [F]$, entonces:

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

La **constante observada** (k_{obs}) se define como $(k_1 [F] + k_2) = (k_1' + k_2)$. Si se representa $\ln [FR]_{eq} / ([FR]_{eq} - [FR])$ respecto al tiempo, se obtiene una recta cuya pendiente es la k_{obs} . Sus unidades son min^{-1} . De este modo, si conocemos la k_2 :

$$k_1 = \frac{k_{obs} - k_2}{[F]}$$

Para determinar la k_2 (disociación) hace falta que las condiciones del ensayo sean las adecuadas para que la asociación entre radioligando y receptor sea despreciable. Entonces:

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

donde [FR] podrá ser sustituido por [F]. Este cambio y posterior integración conduce a:

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

donde [FR] representa la unión de radioligando a cualquier tiempo y $[FR]_0$ es la unión en $t = 0$. La representación de $[*FR] / [*FR]_0$ respecto al tiempo describe una recta cuya pendiente es igual a $-k_2$ (min^{-1}).

5.1.3.- Estudios de competición.

En estos estudios se evalúa la capacidad de diversas sustancias para desplazar el radioligando unido al receptor que se estudia. El parámetro que determina esta capacidad es, como ya se ha explicado anteriormente, la CI_{50} (concentración inhibidora 50 %), que corresponde a la concentración de fármaco desplazante que reduce a la mitad la unión del radioligando al receptor. En la sección de Material y Métodos ya se ha mencionado cómo se obtiene la gráfica en la que se aprecia la disminución de la unión específica en función de la concentración de desplazante. La CI_{50} se calcula con ayuda de programas informáticos de regresión no lineal. Esta constante es más utilizada que la K_{DI} (constante de disociación en el equilibrio para el desplazante), que no es igual a la CI_{50} ya que ésta depende de la concentración de radioligando existente en el medio. Este valor se puede calcular, bajo determinadas condiciones, mediante la ecuación de Cheng

y Prusoff:

$$K_{DI} = \frac{CI_{50}}{1 + \frac{[*F]}{K_D}}$$

Las condiciones necesarias para que esta ecuación sea válida son las siguientes:

1.- *F tiene que interaccionar con una sola población de receptores con una afinidad constante para el radioligando, y el desplazante ha de cumplir también dichas condiciones.

2.- La [*F] añadido es igual a la de libre.

3.- La concentración de R es mucho menor que la K_D para el *F o para el desplazante.

4.- La unión específica detectada es reflejo de la cantidad de *FR formado.

5.- La incubación es suficientemente larga para que se alcance el equilibrio para el radioligando y para todas las concentraciones de desplazante.

Si estas condiciones no se cumplen, se puede aplicar la siguiente fórmula:

$$K_{DI} = \frac{[I]}{1 + \frac{[*F]}{K_D} + \frac{[R_{TOT}]}{K_D} \cdot \left(\frac{K_D + [*F]/2}{K_D + [*F]} \right)}$$

Siendo [I] la concentración de desplazante:

$$[I] = CI_{50} - [R_{TOT}] + \frac{[R_{TOT}]}{2} \left(\frac{[*F]}{K_D + [*F]} + \frac{K_D}{K_D + [*F] + [R_{TOT}]/2} \right)$$

Sin embargo, estas ecuaciones no pueden aplicarse si la representación de Scatchard demuestra la existencia de dos clases de lugares de unión o el valor de la K_{DI} varía al cambiar $[R_{TOT}]$ o $[*F]$.

5.1.4.- Estudios de transporte.

La cinética de un transportador se mide como si de un enzima se tratara, aplicando los principios de Michaelis y Menten. Según éstos, el sustrato y el transportador se combinan para formar un complejo enzima-sustrato con una determinada velocidad y, posteriormente, se disocian. De estos estudios se obtienen los parámetros K_M y V_{max} , cuyo significado ya se ha explicado en la sección de Material y Métodos.

La gráfica que muestra la cinética se obtiene al representar la velocidad de reacción (V) frente a la concentración de sustrato ([S]), obteniéndose una hipérbola rectangular análoga a la de los ensayos de saturación, cuya meseta indica la ocupación de todos los transportadores. La ecuación de Michaelis-Menten, que se deduce de una forma análoga a la aplicada para los ensayos de unión, es la siguiente:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Esta ecuación justifica los datos cinéticos obtenidos en la representación gráfica. A concentraciones bajas de sustrato, cuando $[S]$ es mucho menor que K_M , $V = [S] V_{\max} / K_M$; esto es, la velocidad es directamente proporcional a la concentración de sustrato. A concentraciones de sustrato elevadas, cuando $[S]$ es mucho mayor que K_M , $V = V_{\max}$, con lo cual, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato.

La K_M y la $V_{\max}$ pueden derivarse fácilmente de las velocidades de transporte a diferentes concentraciones de sustrato si el transportador opera según la ley de acción de masas. Es conveniente transformar la ecuación de Michaelis-Menten en otra que, representada gráficamente, resulte una línea recta. Esto se consigue tomando los valores inversos de dicha ecuación, para dar:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

La representación gráfica de $1 / V$ frente a $1 / [S]$, denominada *representación de Lineweaver-Burk*, es una recta con una ordenada en el origen igual a $1 / V_{\max}$, y una pendiente de $K_M / V_{\max}$. La intersección con el eje de abscisas es igual a $-1 / K_M$.

Si se representa V frente a V / S , se obtiene la *representación de Eadie-Hofstee*, la cual, caso de originar una sola recta de pendiente negativa, indica la presencia de un solo componente de transporte; mientras que, si se puede ajustar a dos rectas, indicará la presencia de dos componentes.

5.2.- Estudios realizados en próstata de rata.

5.2.1.- Estudios de competición realizados con [^3H]Ro 5-4864.

Continuando la caracterización del receptor benzodiazepínico periférico en próstata de rata usando [^3H]Ro 5-4864 como radioligando (iniciada por nuestra línea en trabajos anteriores), se realizaron estudios de competición por diversas sustancias, cuyos resultados se muestran a continuación.

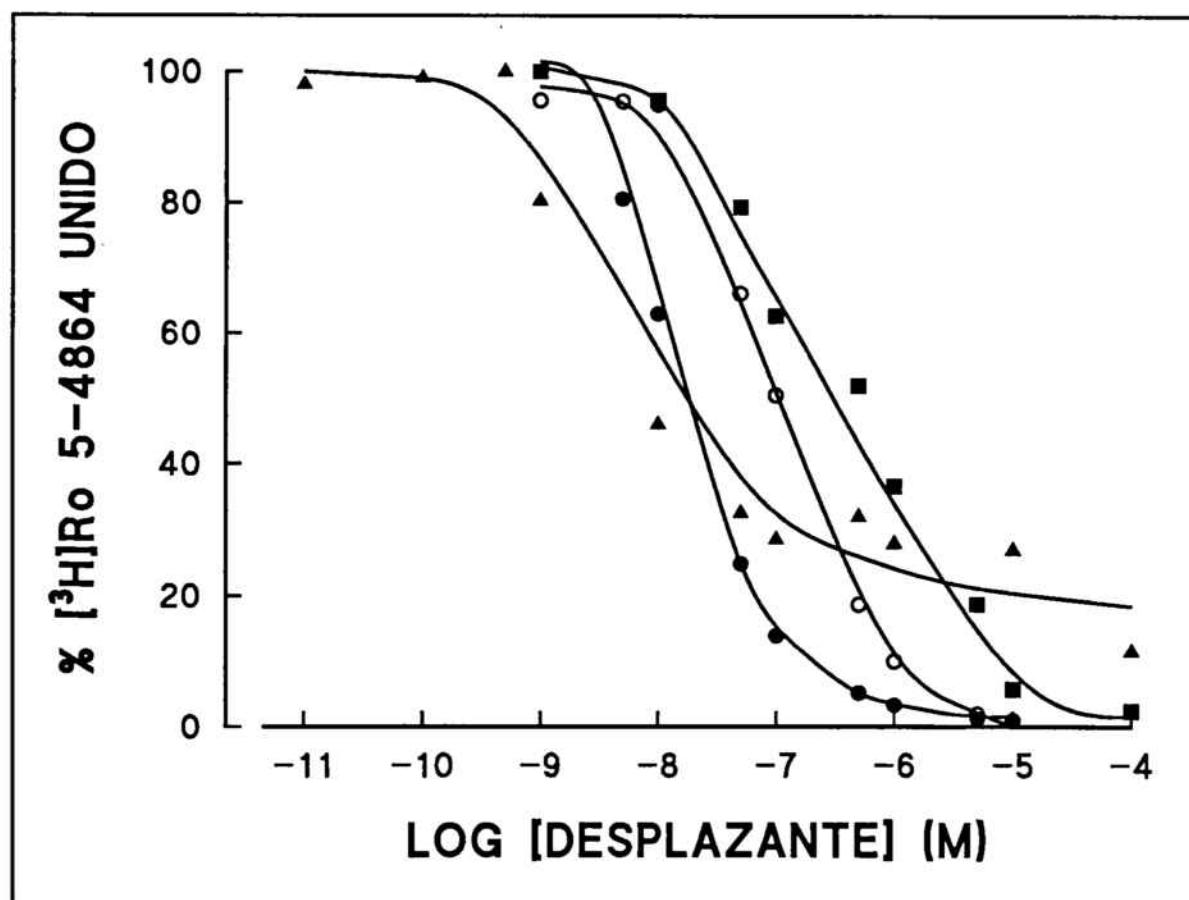


Figura 5.1.- Desplazamiento por ligandos del RBP: AHN 086 (○), PK 14105 (●); por inhibidores del *uptake* de adenosina: dipiridamol (■); y por inhibidores del *carrier* ADP/ATP: atractilósido (▲).

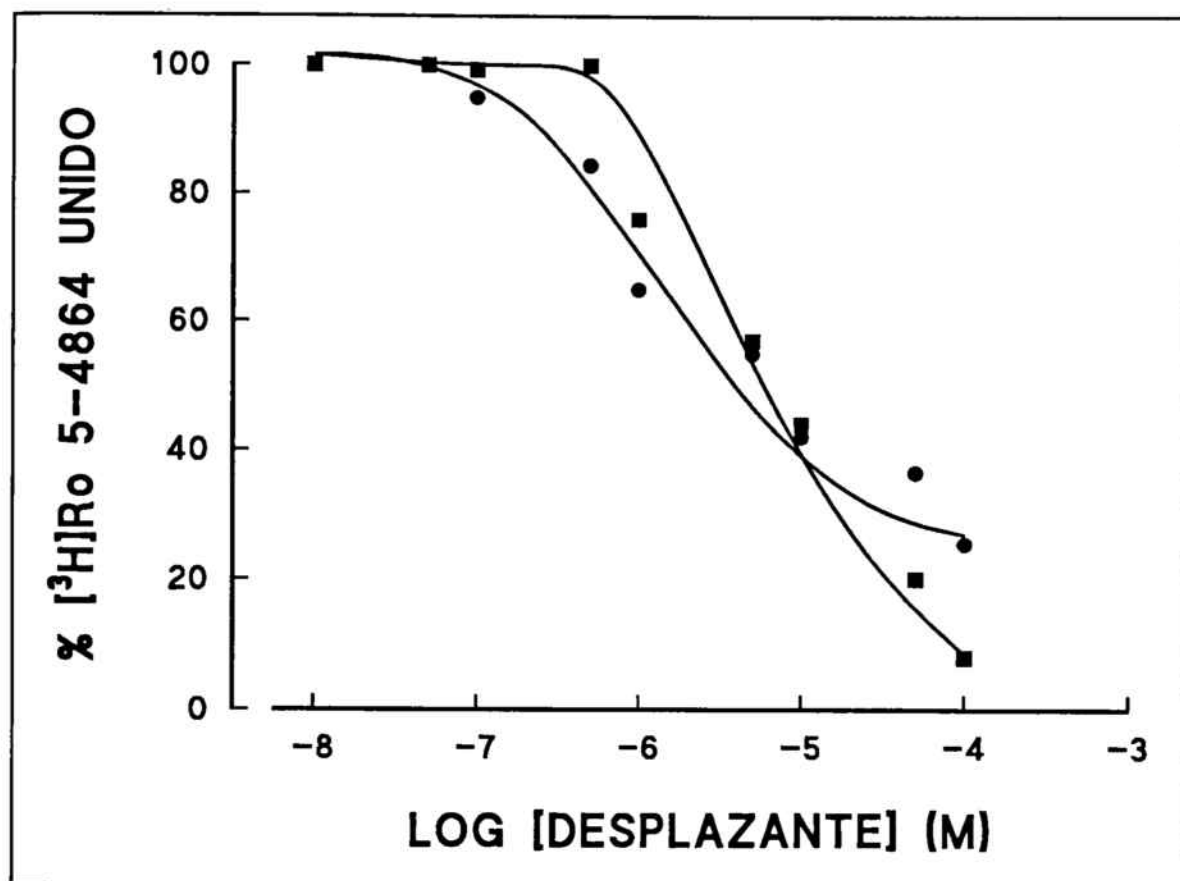


Figura 5.2.- Desplazamiento por dihidropiridinas: BAY K-8464 (●) y nitrendipino (■).

TABLA I: Inhibición de la unión específica del $[^3\text{H}]\text{Ro 5-4864}$ en próstata de rata por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
AHN 086	123,2 ± 49.5	1,03 ± 0,03
PK 14105	16,38 ± 1,015	1,02 ± 0,05
Atractilósido	12,83 ± 10,49	0,18 ± 0,02
Nitrendipino	11460 ± 5370	0,812 ± 0,02
BAY K-8464	38390 ± 16470	0,85 ± 0,23
Dipiridamol	535 ± 191	0,75 ± 0,13

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

5.2.2.- Estudios realizados con [³H]PK 11195.

5.2.2.a.- Estudios de saturación.

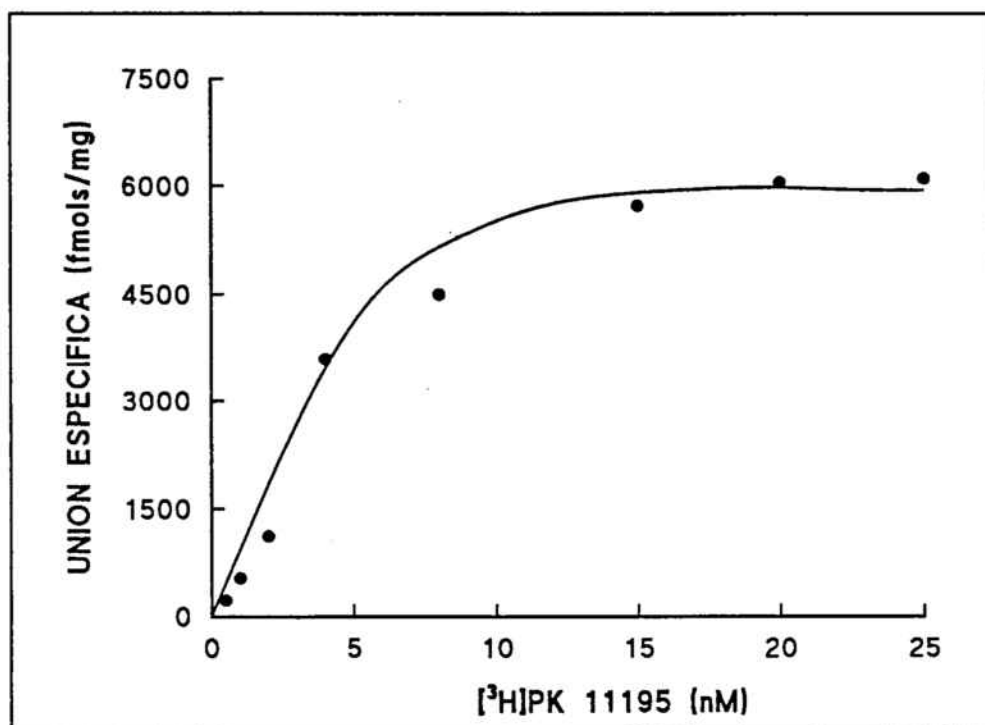


Figura 5.3.- Saturación de la unión específica del [³H]PK 11195 en próstata de rata.

Tabla II.- 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

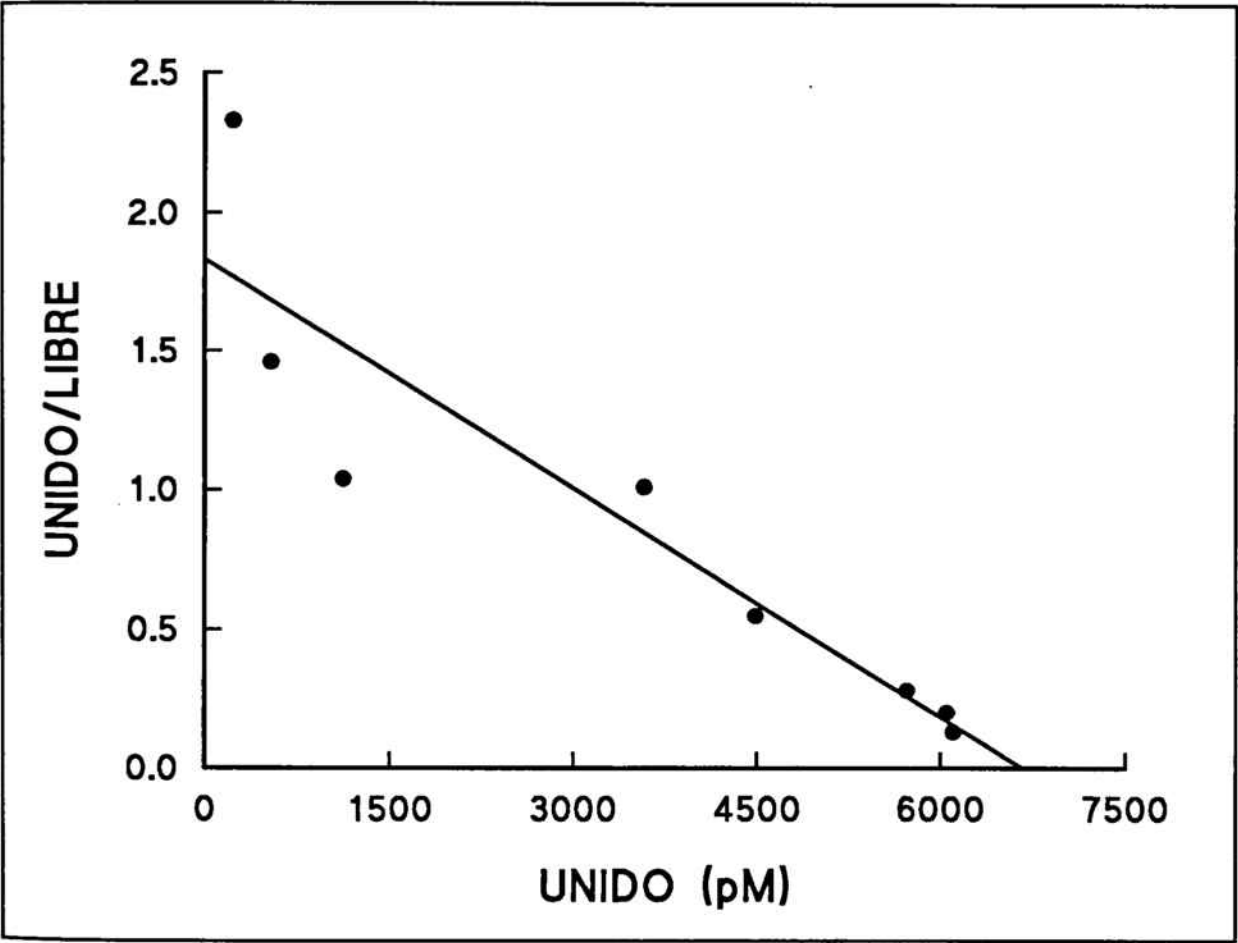


Figura 5.4.- Representación de Scatchard de la anterior saturación.

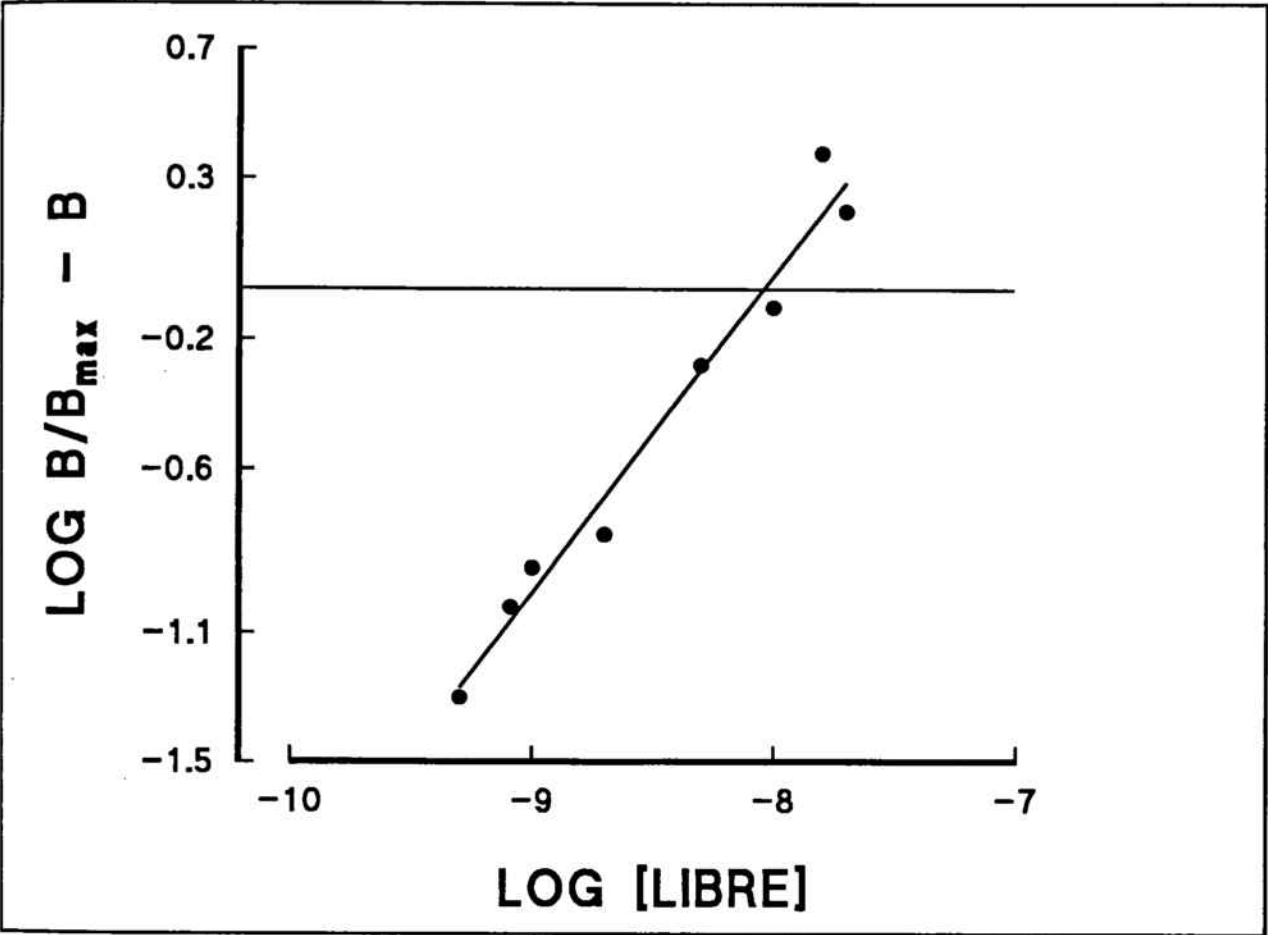


Figura 5.5.- Representación de Hill de la saturación en próstata de rata usando $[^3\text{H}]$ PK 11195 como radioligando.

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

K_D (nM)	B_{max} (fmols/mg)	n_H
$1,51 \pm 0,03$	6050 ± 583	$1,07 \pm 0,03$

5.2.2.b.- Estudios cinéticos.

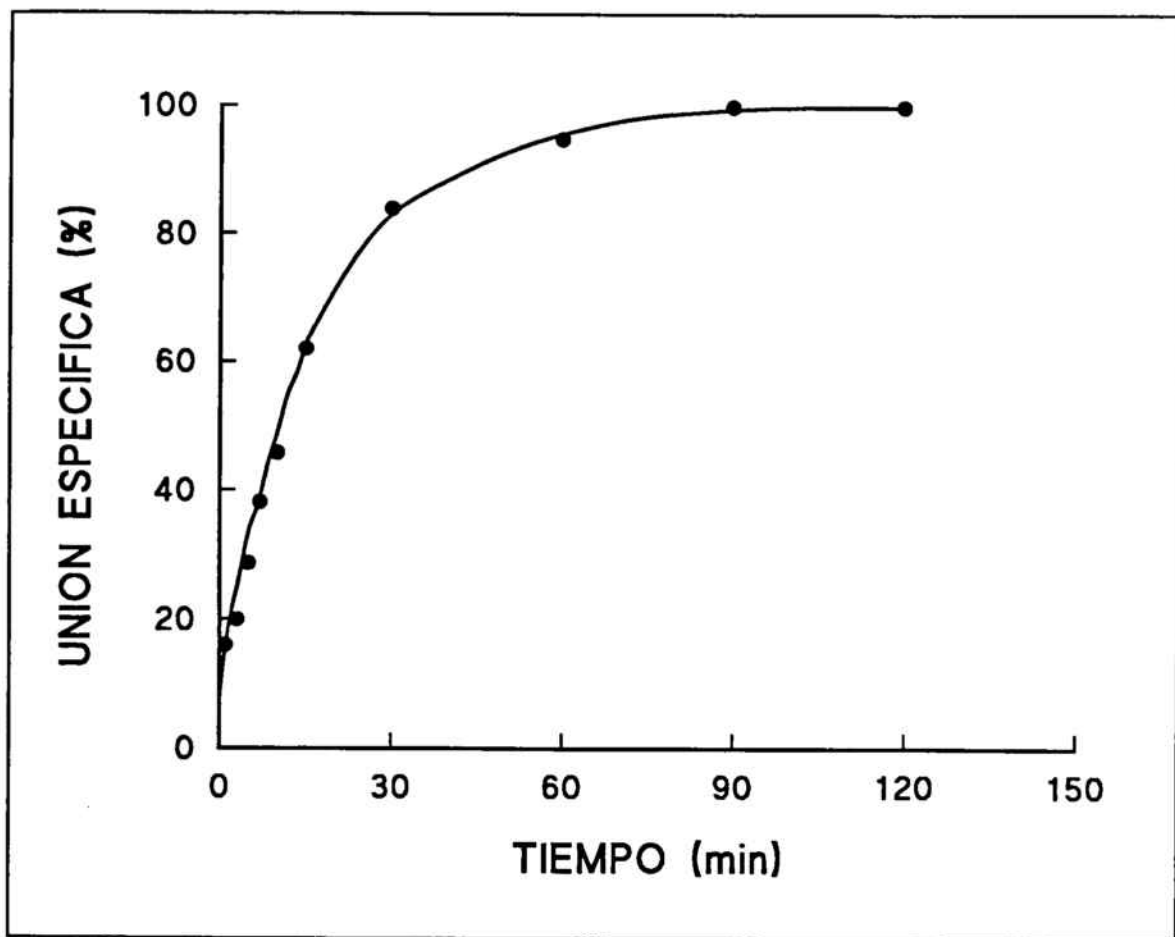


Figura 5.6.- Cinética de asociación en próstata de rata utilizando [^3H]PK 11195 como radioligando.

Tabla IV.- Valores obtenidos de la cinética de asociación en próstata de rata utilizando [^3H]PK 11195. (Media de 3 experimentos realizados por separado $\pm$ E.E.M.)

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

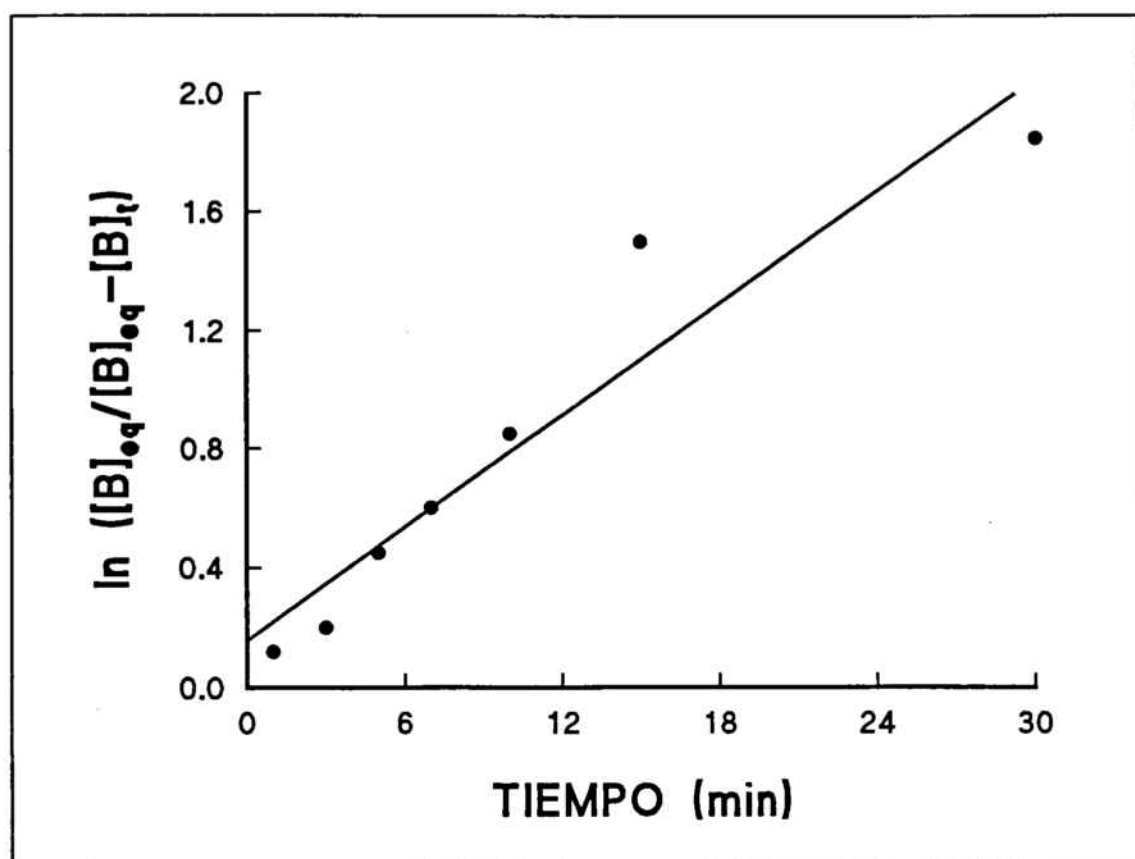


Figura 5.7.- Representación logarítmica de la anterior cinética de asociación.

Tabla V.- Constantes obtenidas de los ensayos cinéticos de asociación en próstata de rata utilizando [^3H]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)
$0,059 \pm 0,014$	$0,0051 \pm 0,0008$	$5,44 \pm 1,4 \times 10^7$	$0,11 \pm 0,005$

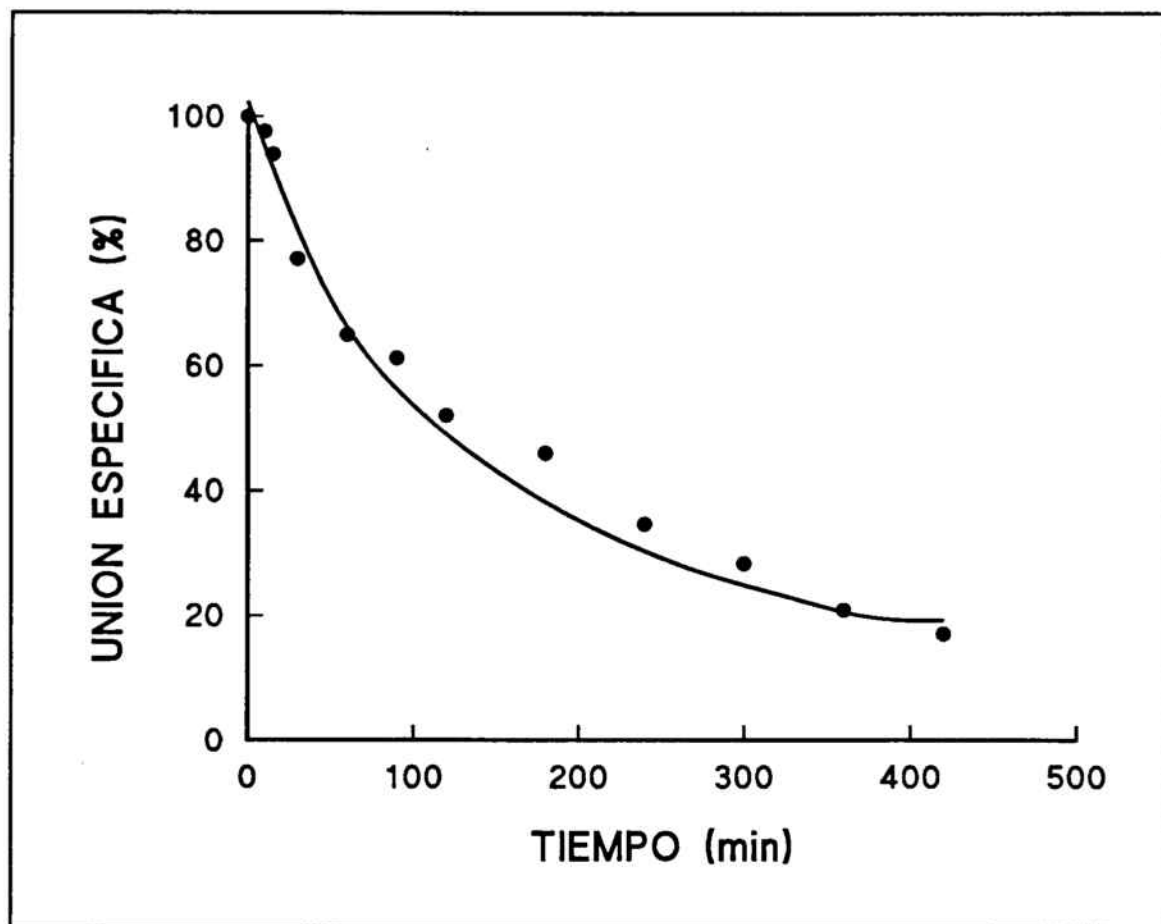


Figura 5.8.- Cinética de disociación del [³H]PK 11195 en próstata de rata.

Tabla VI.- Valores obtenidos de la cinética de disociación realizada en próstata de rata utilizando [³H]PK 11195 (Media de 3 experimentos ± E.E.M.).

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

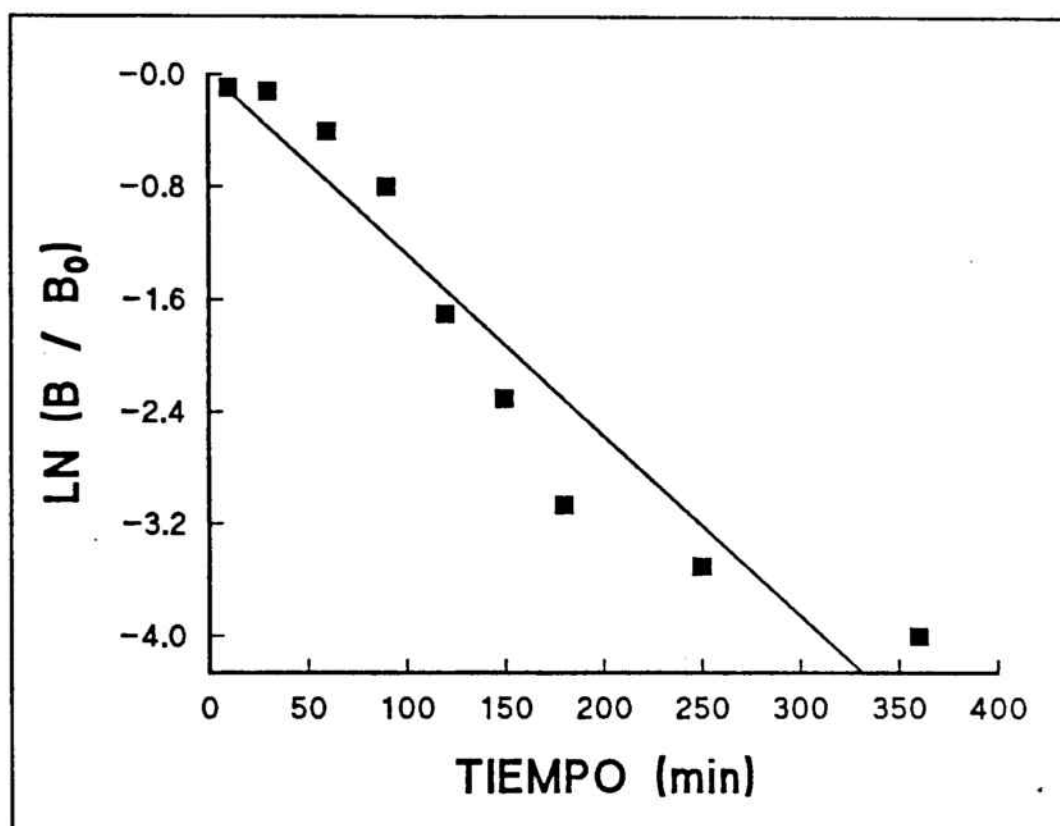


Figura 5.9.- Representación logarítmica de dicha cinética de disociación.

5.2.2.c.- Estudios de competición.

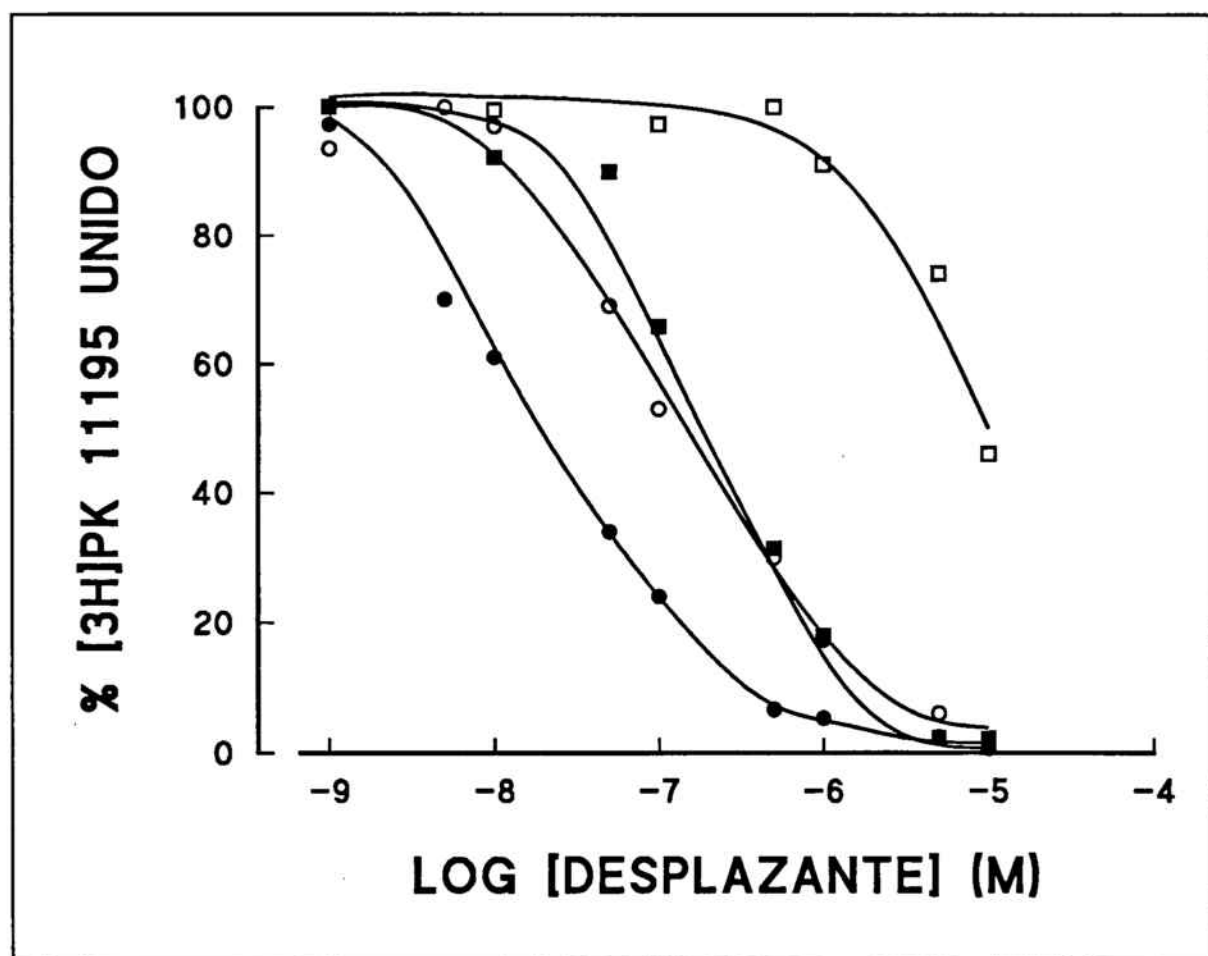


Figura 5.10.- Desplazamiento del [^3H]PK 11195 por diversas benzodiazepinas: Ro 5-4864 (●), AHN 086 (■), diazepam (○) y clonazepam (□).

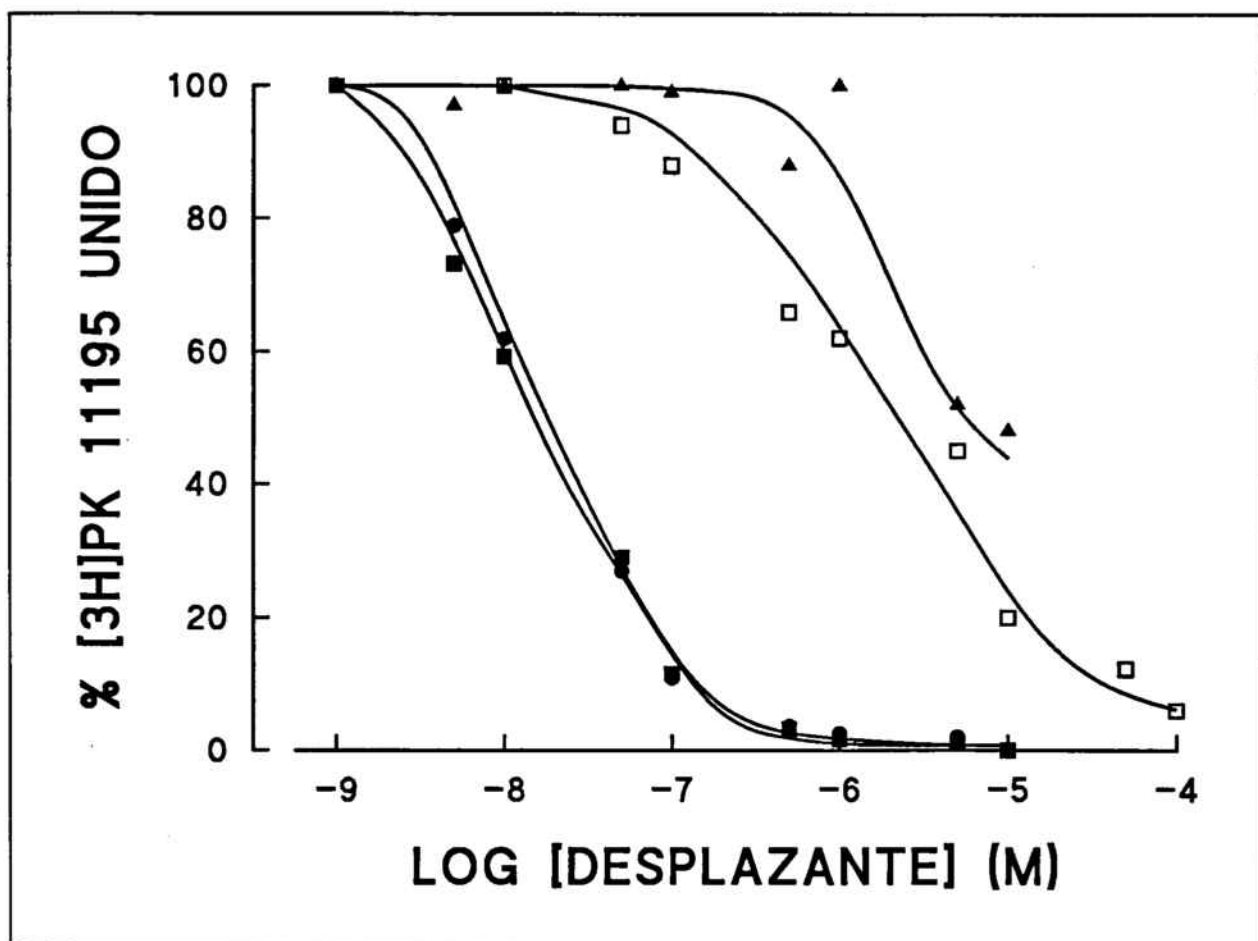


Figura 5.11.- Desplazamiento por isoquinoleín-carboxamidas: PK 11195 (●), PK 14105 (■); por el supuesto ligando endógeno protoporfirina IX (▲); y por nitrendipino (□).

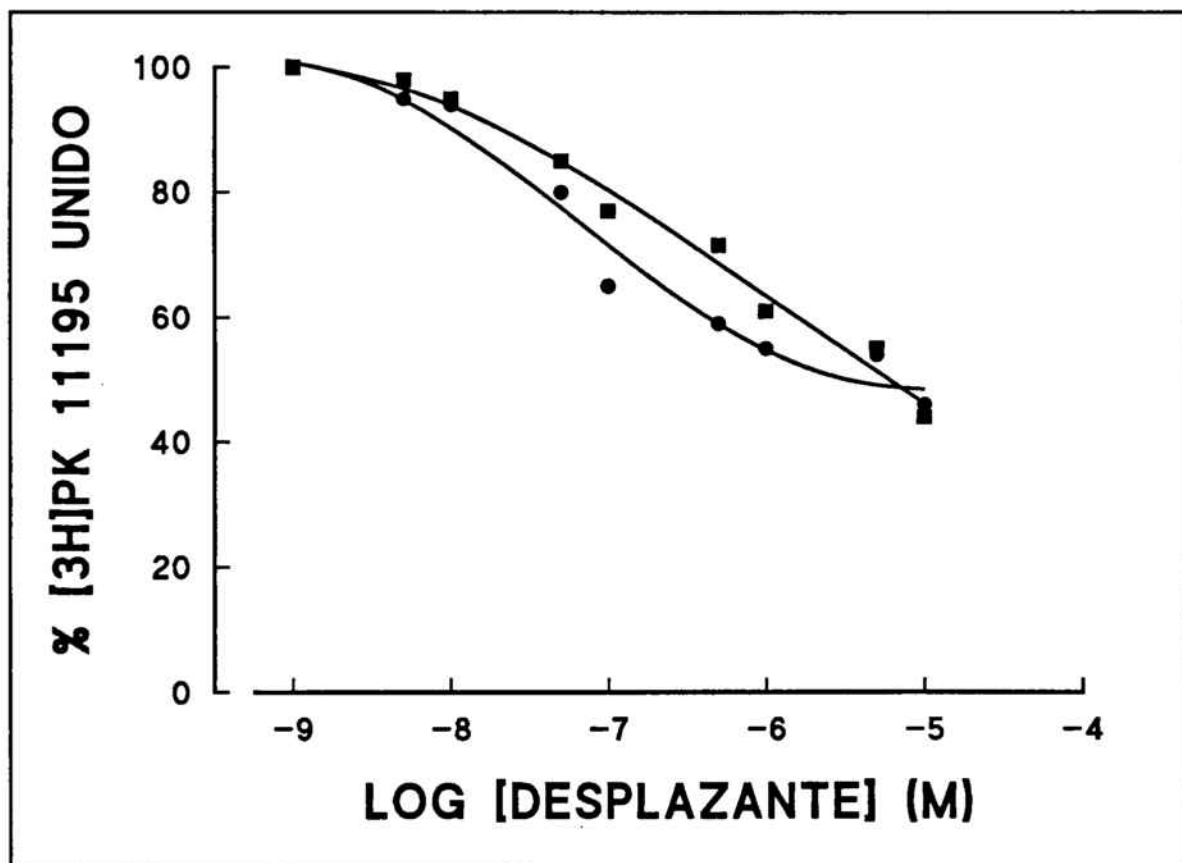


Figura 5.12.- Desplazamiento por sustancias que interaccionan con el *carrier* ADP/ATP: atractilósido (●) y α,β-metilén-ATP (■).

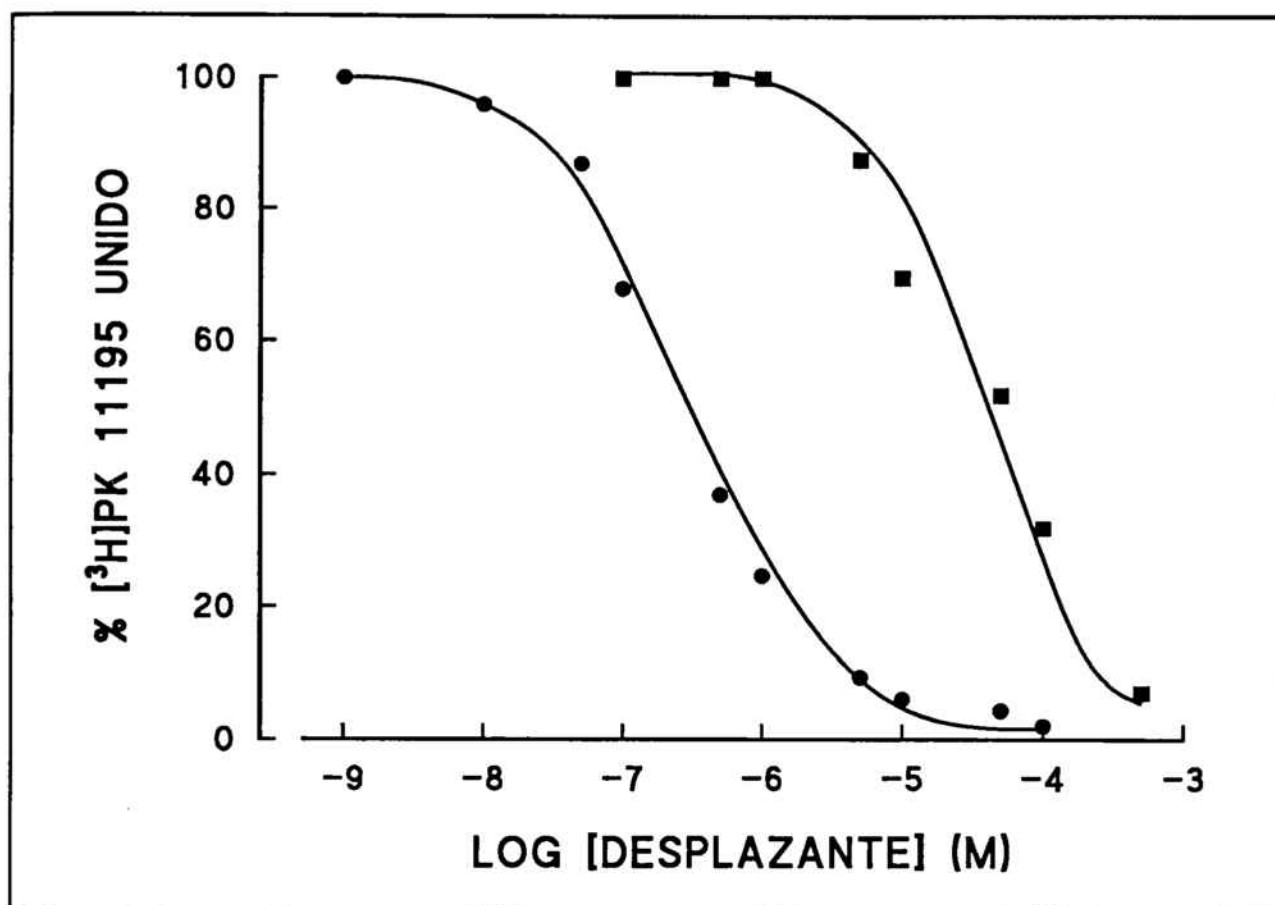


Figura 5.13.- Desplazamiento por inhibidores del transporte de nucleósidos: dipiridamol (●) y NBTI (■).

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

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
Ro 5-4864	9,04 ± 1,06	0,81 ± 0,13
AHN 086	238,2 ± 27,8	1,11 ± 0,03
Diazepam	284,12 ± 47,12	0,97 ± 0,03
Clonazepam	43711 ± 169	0,54 ± 0,06
PK 11195	3,45 ± 1,18	0,92 ± 0,11
PK 14105	4,35 ± 1,08	1,02 ± 0,11
Nitrendipino	4796 ± 1983	0,87 ± 0,12
Protoporfirina IX	5050 ± 3203	0,33 ± 0,02
Atráctilósido	6457 ± 2027	0,11 ± 0,08
α,β-metilén-ATP	13717 ± 5169	0,24 ± 0,04
Dipiridamol	141,54 ± 53,46	0,81 ± 0,14
NBTI	33.386 ± 11.323	1,01 ± 0,15

5.3.- Estudios realizados en próstata humana con [³H]PK 11195.

5.3.1.- Estudios de saturación en próstata humana.

Con el fin de poder comparar la densidad de RBPs presente en adenoma de próstata humana (obtenida en trabajos anteriores de nuestro grupo), con la presente en próstata sana, se procedió a realizar estudios de saturación con muestras de próstata humana control. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

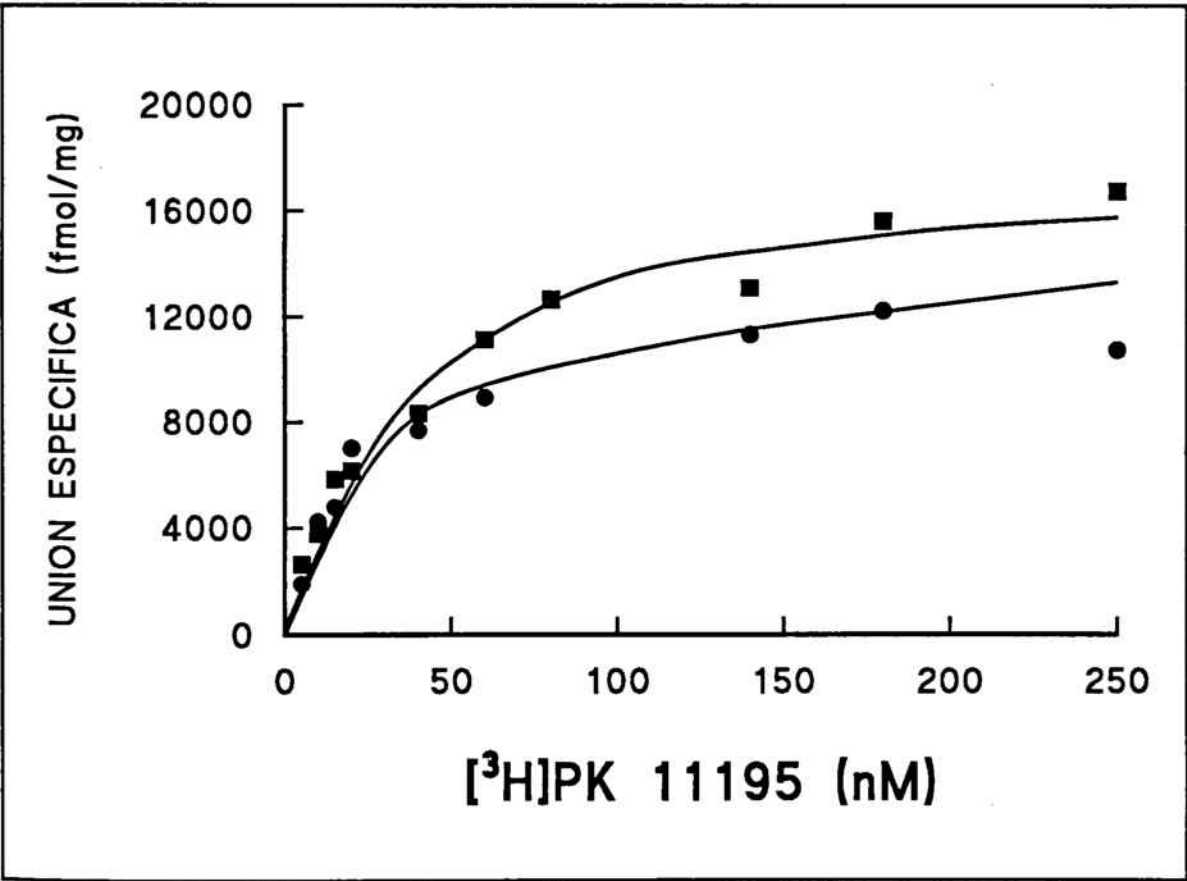


Figura 5.14.- Saturación de la unión del [³H]PK 11195 en próstata humana (●) junto a la ya obtenida en adenoma (■).

Tabla VIII.- 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 ± E.E.M.

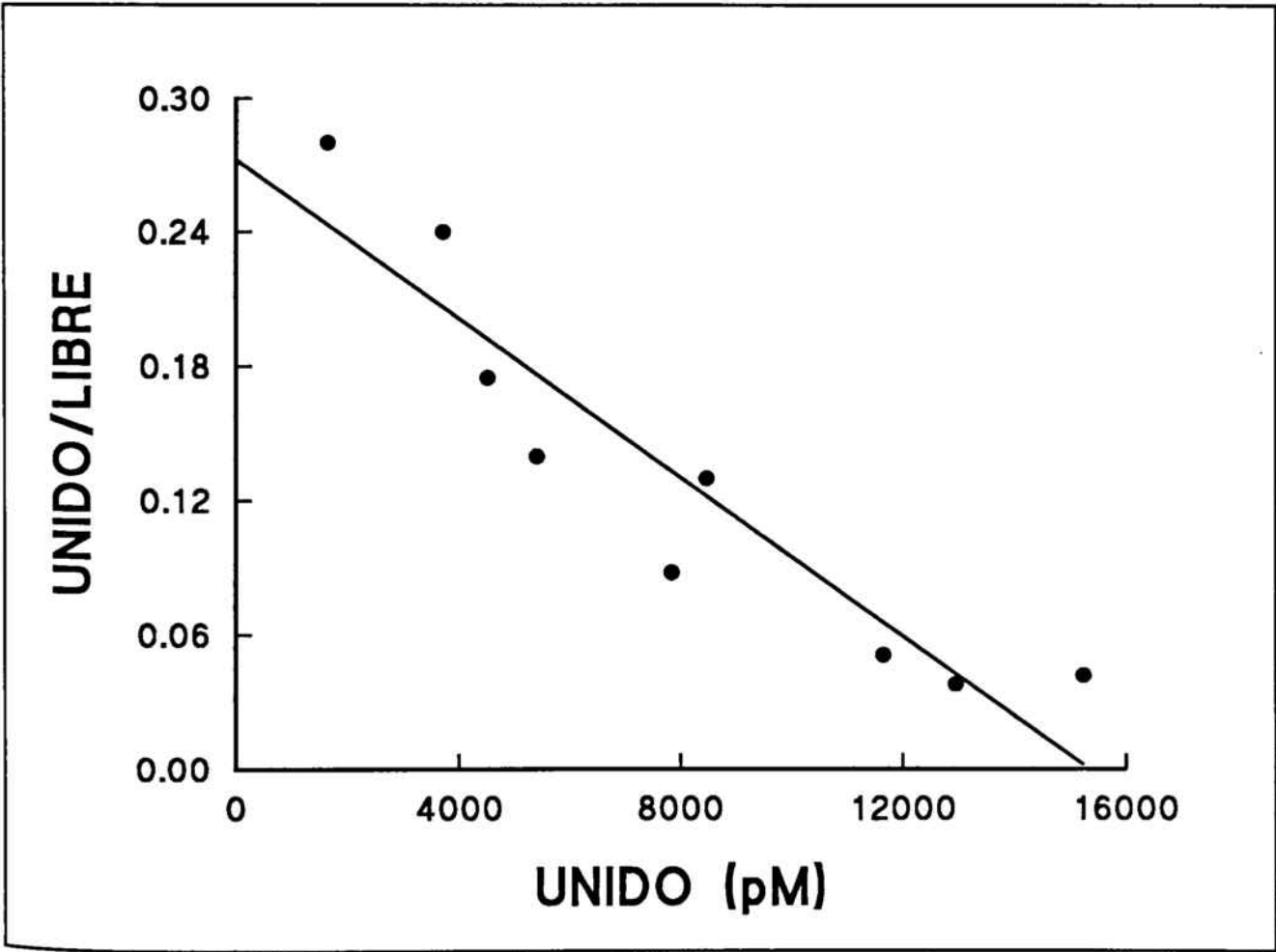


Figura 5.15.- Representación de Scatchard de la anterior saturación.

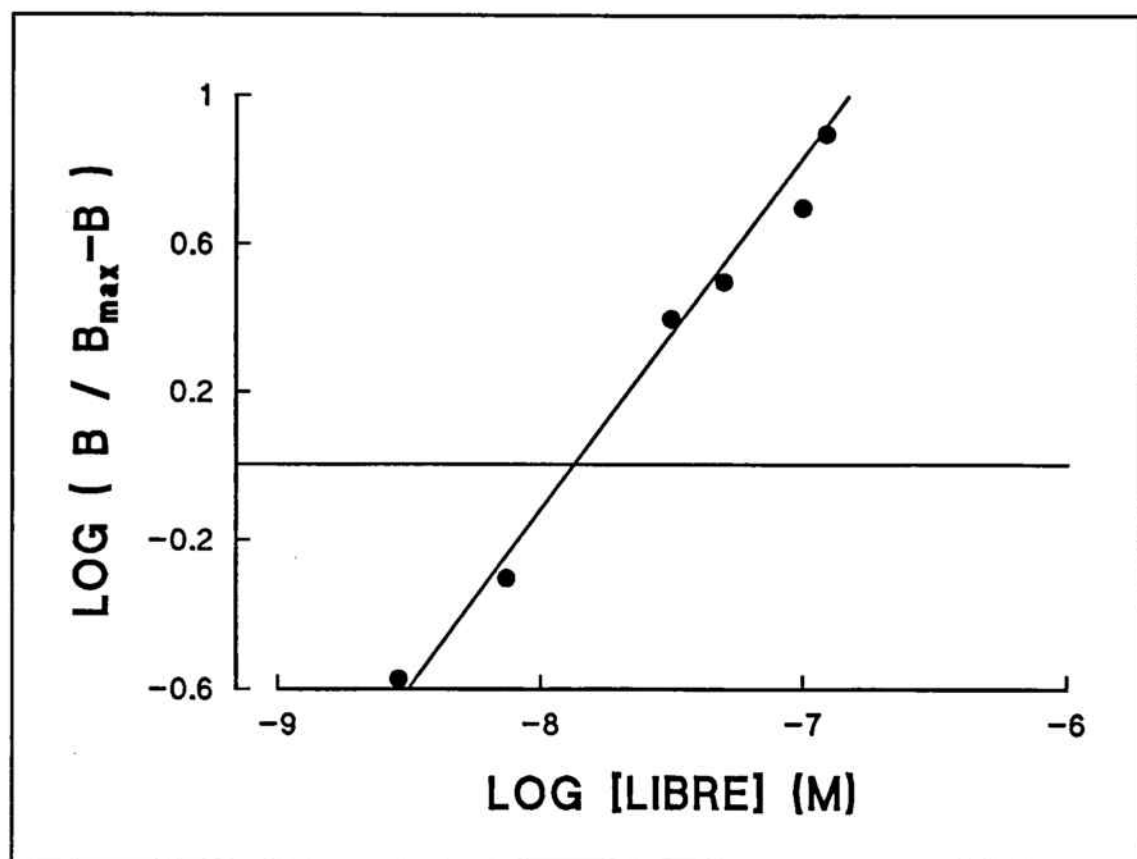


Figura 5.16.- Representación de Hill de la saturación en próstata humana utilizando $[^3\text{H}]\text{PK 11195}$ como radioligando.

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

K_D (nM)	B_{max} (fmols/mg)	n_H
$14,6 \pm 5,6$	12155 ± 1300	$0,98 \pm 0,01$

5.3.2.- Estudios de competición en adenoma.

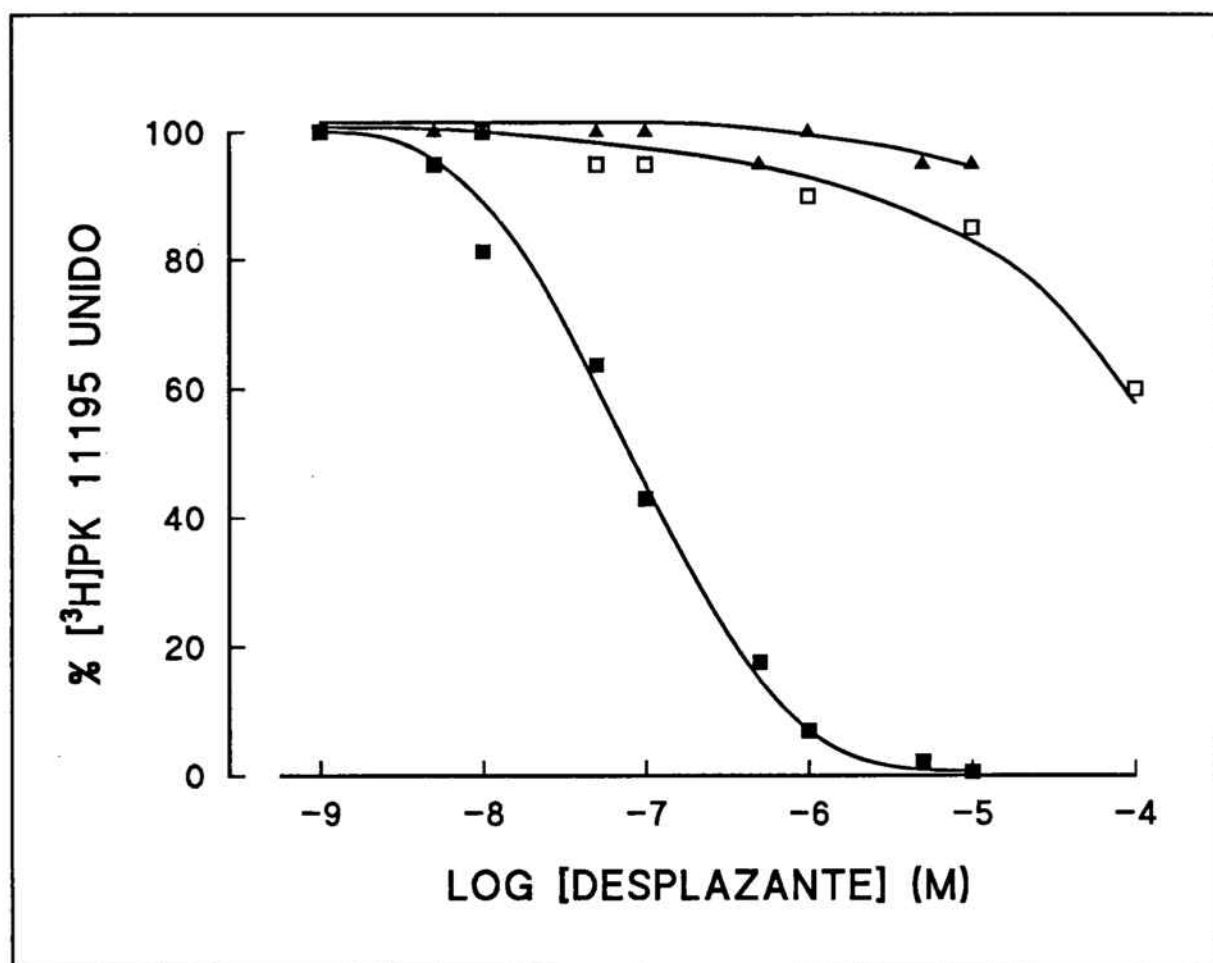


Figura 5.17.- Desplazamiento del [³H]PK 11195 por PK 14105 (■); por una benzodiazepina de acción central, el clonazepam (□); y por el supuesto ligando endógeno protoporfirina IX (▲).

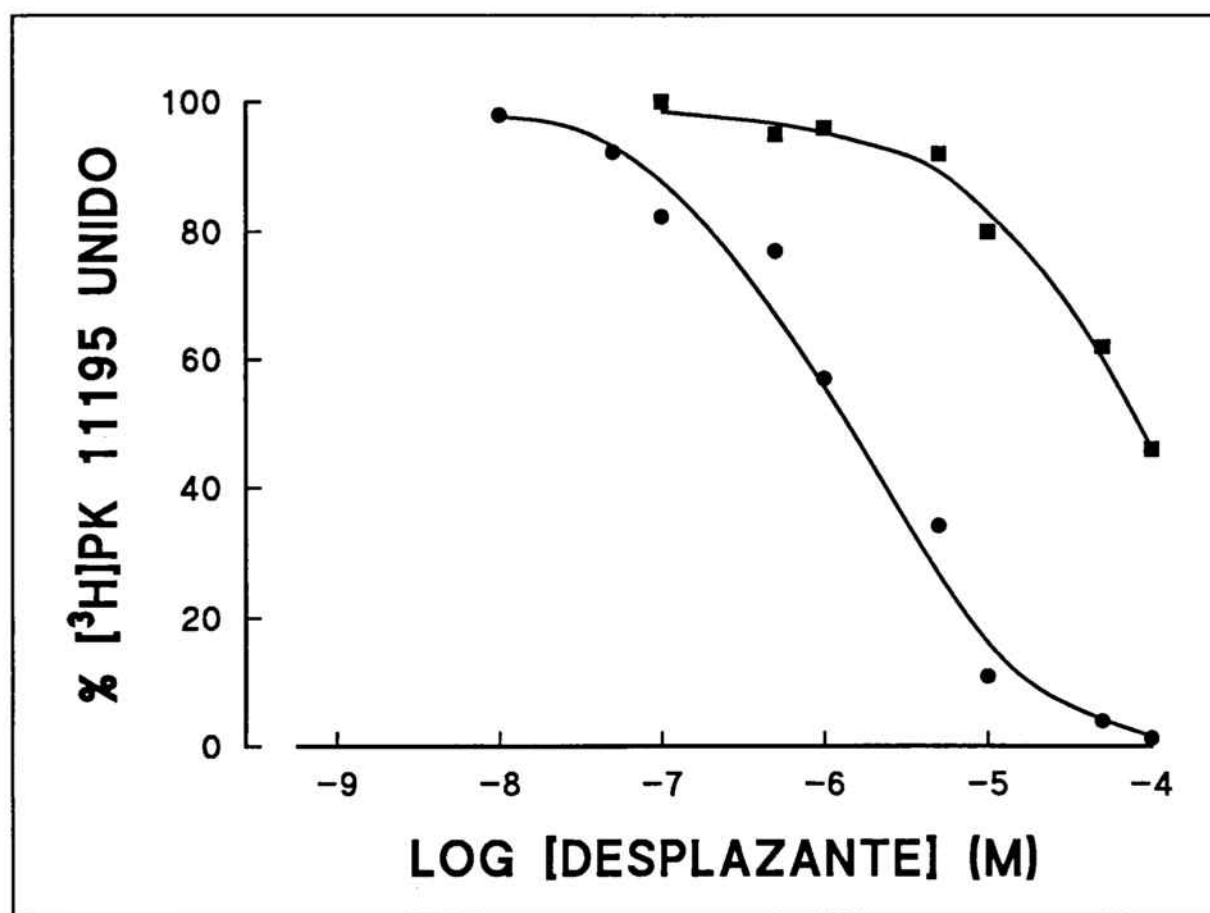


Figura 5.18.- Desplazamiento por dihidropiridinas: nitrendipino (●) y nifedipino (■).

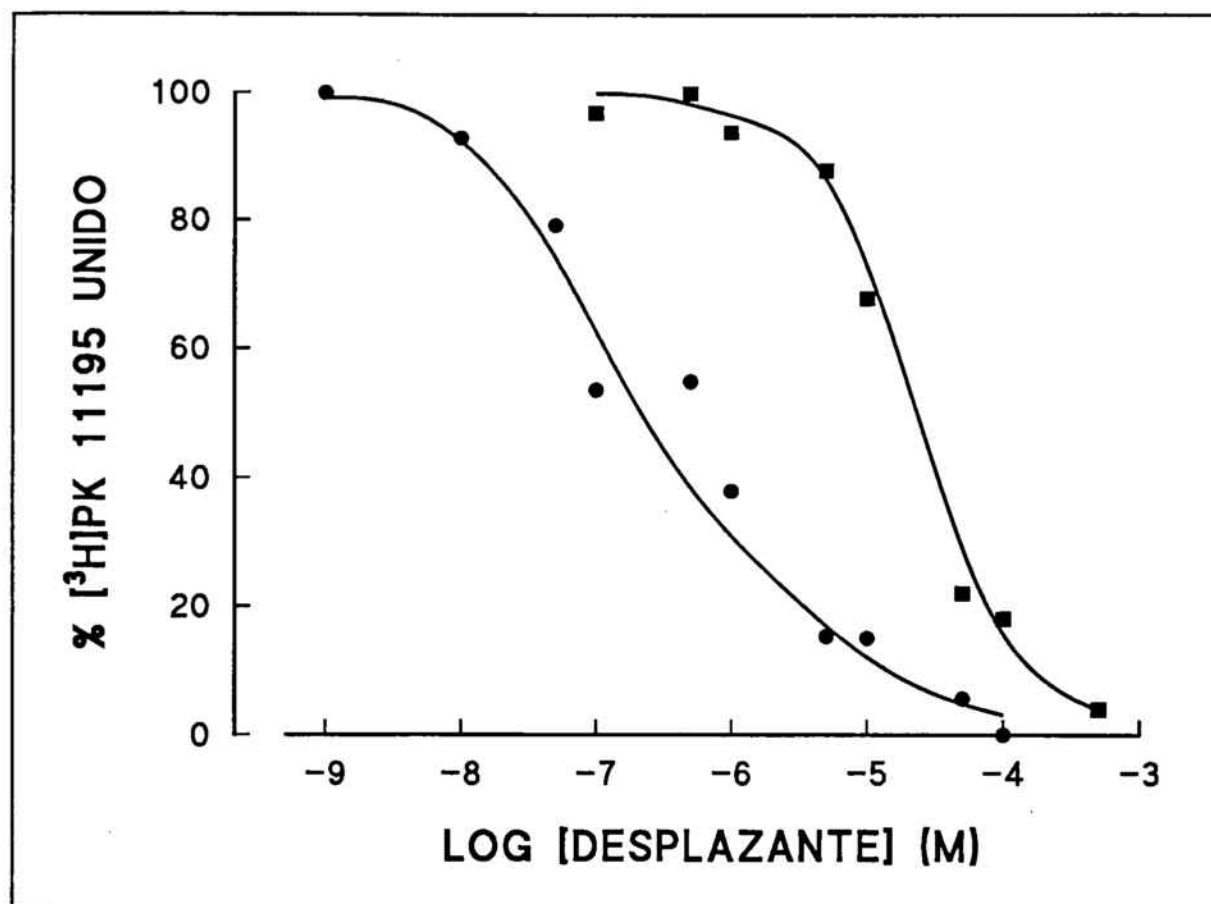


Figura 5.19.- Desplazamiento por inhibidores del transporte de nucleósidos: dipiridamol (●) y NBTI (■).

Tabla X.- Inhibición de la unión específica del $[^3\text{H}]$ PK 11195 en adenoma de próstata humana por diferentes compuestos.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)	Pendiente
Ro 5-4864	1073 ± 225	0,86 ± 0,07
PK 11195	58,83 ± 19,65	1,01 ± 0,04
PK 14105	96,35 ± 26,31	1,00 ± 0,01
Diazepam	2.381 ± 448	0,83 ± 0,12
Clonazepam	69300 ± 25052	0,27 ± 0,08
Nitrendipino	3122 ± 1391	0,99 ± 0,02
Nifedipino	5234 ± 1568	0,89 ± 0,05
Dipiridamol	1320 ± 880	0,71 ± 0,04
NBTI	23590 ± 6955	1,00 ± 0,13

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

5.4.- Estudios realizados con [³H]adenosina.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de uptake de [³H]adenosina y de la inhibición del mismo en la fracción mitocondrial de testículo de rata.

5.4.1.- Estudios de uptake.

5.4.1.a.- Acumulación de [³H]adenosina en función del tiempo.

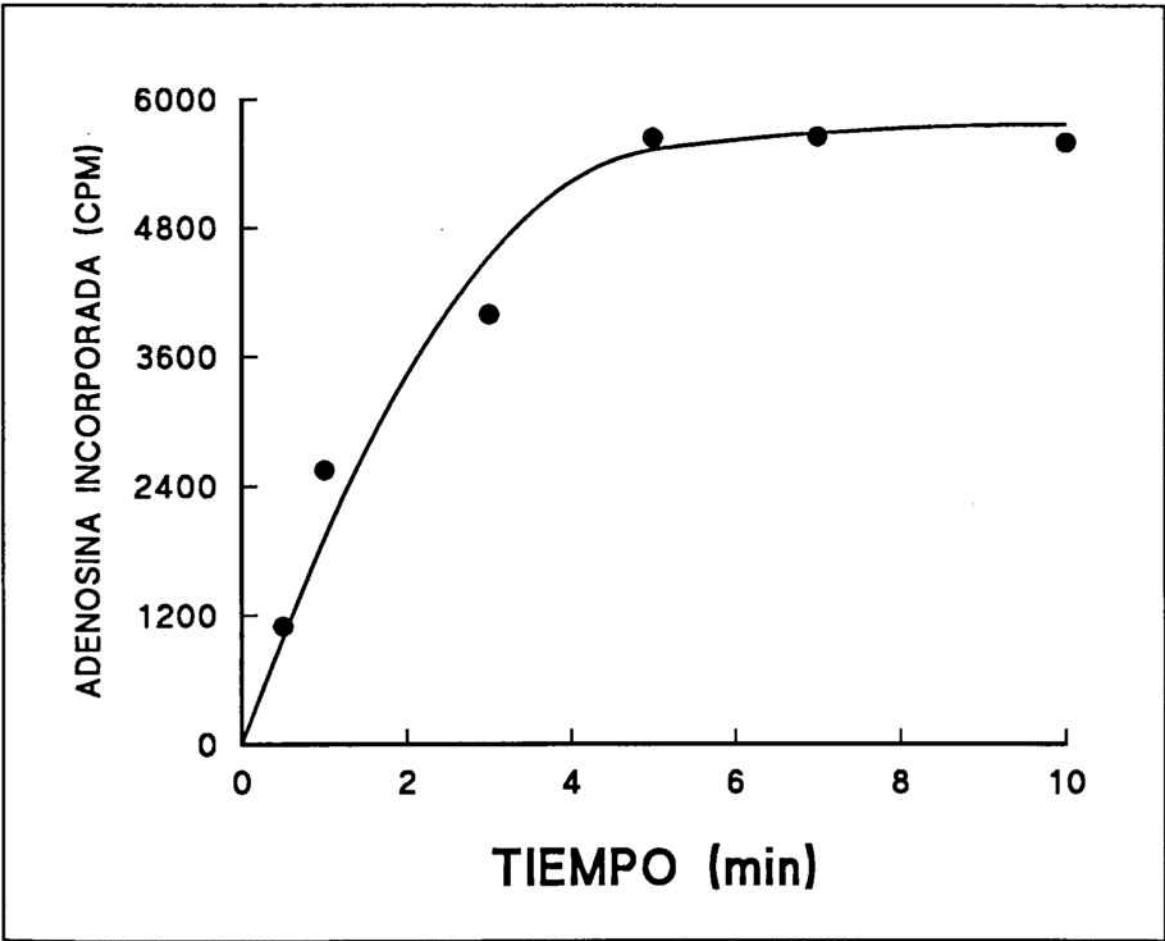


Figura 5.20.- Acumulación de [³H]adenosina (a concentración constante de 10 nM) en función del tiempo de incubación

5.4.1.b.- Saturación a diferentes tiempos de incubación.

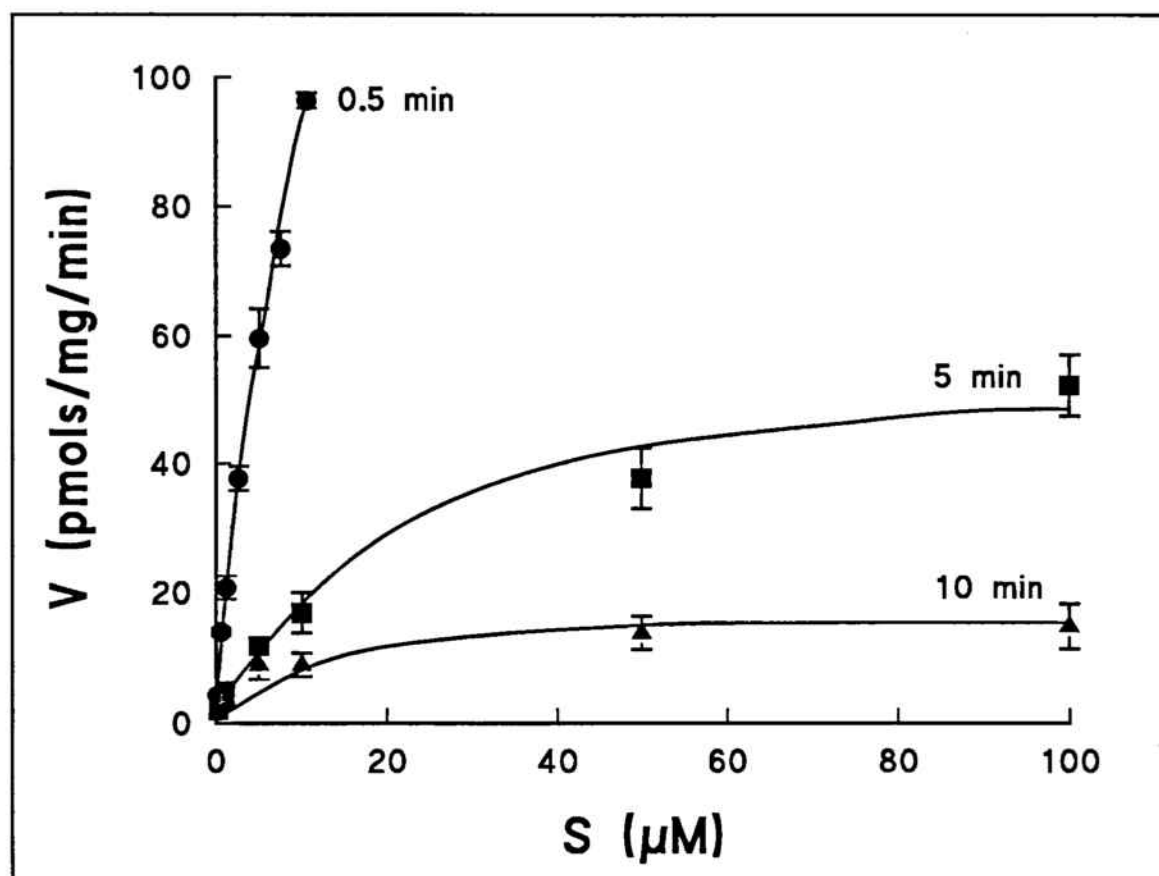


Figura 5.21.- Saturación del *uptake* de $[^3\text{H}]$ adenosina a diferentes tiempos de incubación.

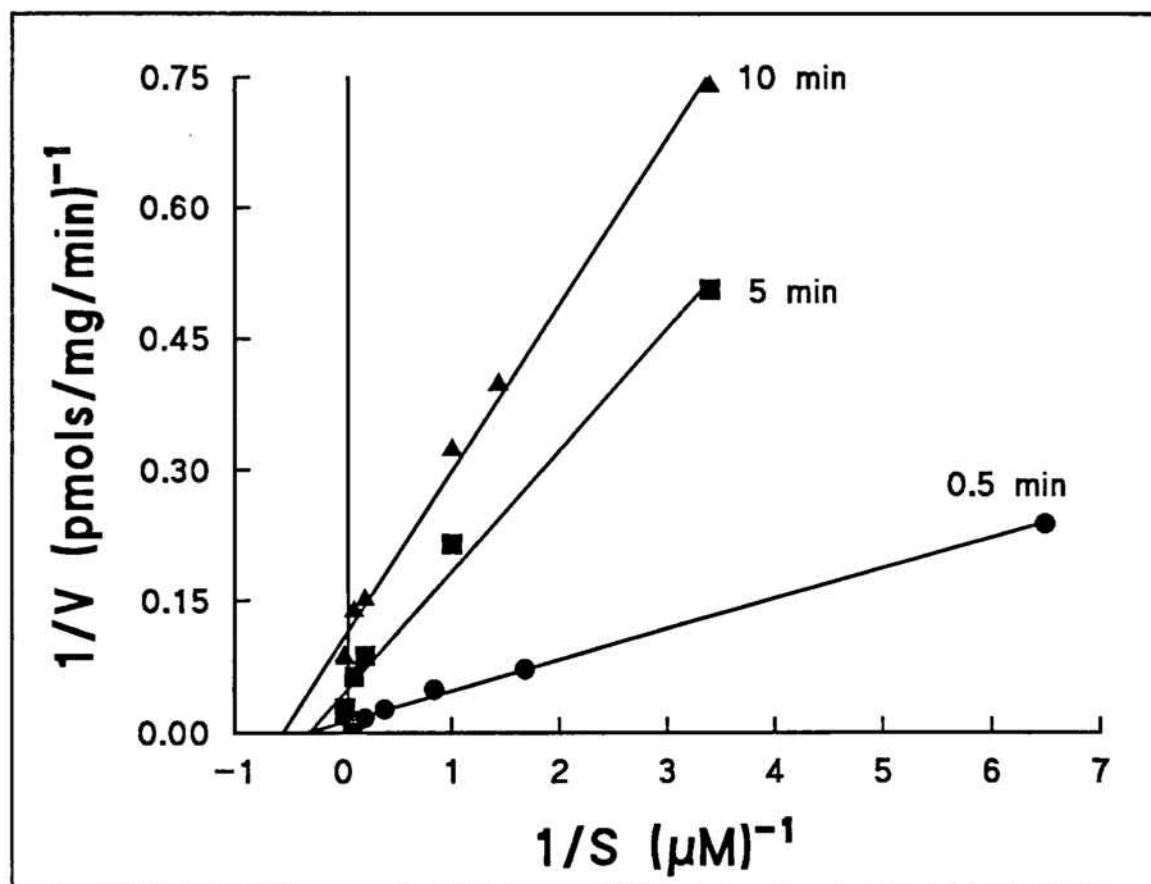


Figura 5.22.- Representación de Lineweaver-Burk de las anteriores saturaciones.

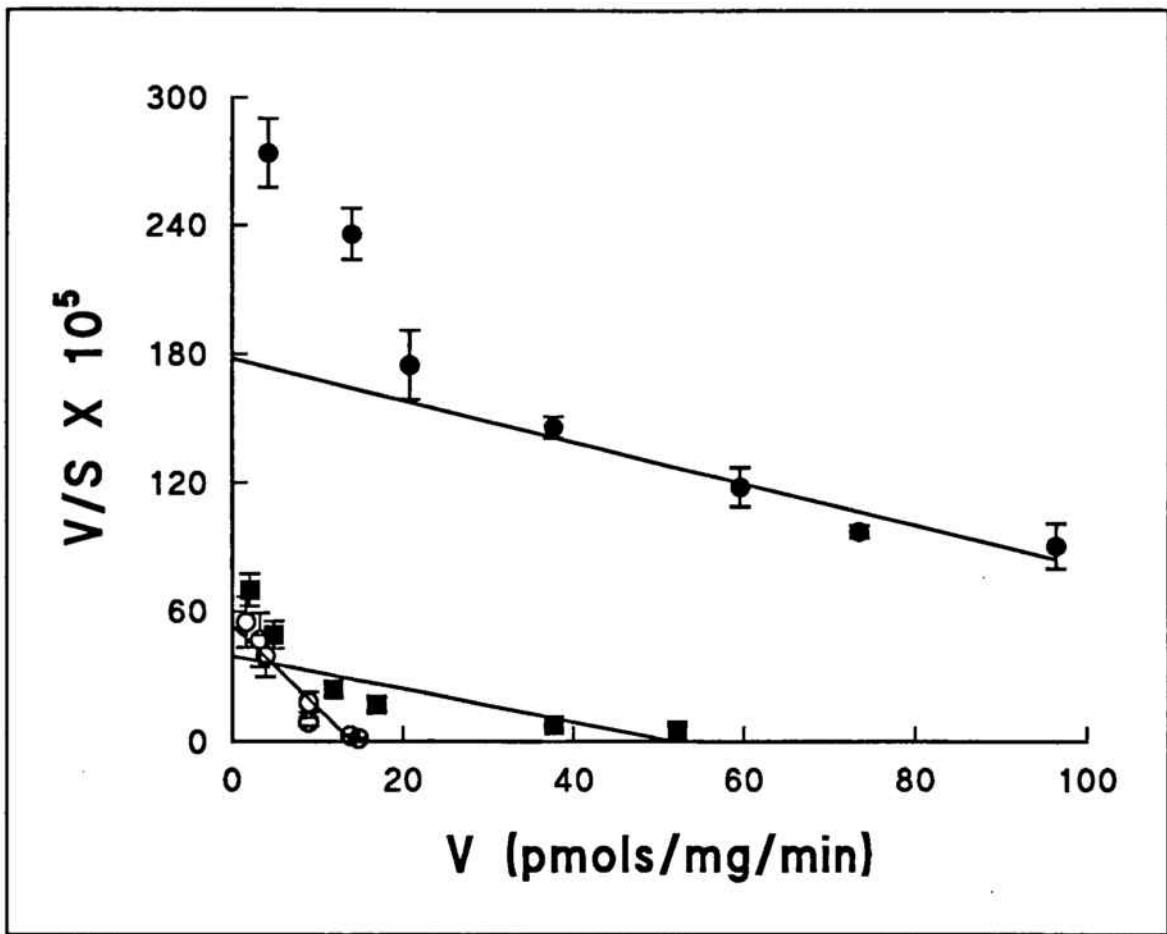


Figura 5.23.- Representación de Eadie-Hofstee de dichas saturaciones: (●) 30s; (■) 5 min.; (○) 10 min.

Los resultados a 5 min. de incubación son los que mejor permiten (aunque no hay diferencia estadísticamente significativa) ajustarse a dos cinéticas de transporte con los siguientes valores (n=3):

$$K_M1 \text{ (}\mu\text{M)} = 0,58 \pm 0,11 \text{ ; } K_M2 = 26,01 \pm 10.$$

$$V_{max}1 \text{ (pmols/mg/min)} = 4,54 \pm 2,62 \text{ ; } V_{max}2 = 69,13 \pm 10,63.$$

Los valores de K_M y V_{max} correspondientes a un ajuste monoexponencial de las tres cinéticas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XI.

Tiempo (min)	K_M (μM)	V_{max} (pmols/mg/min)	n
0,5	$3,41 \pm 0,94$	$88,50 \pm 25,8$	3
5	$1,90 \pm 0,86$	$13,74 \pm 3,87$	3
10	$1,28 \pm 0,11$	$10,08 \pm 2,27$	5

5.4.1.c.- Dependencia de sodio.

Para evaluar la dependencia del sodio que podría presentar el transportador, se realizaron experiencias de saturación con ausencia de sodio en el medio 5 a 5 min. de incubación, y se compararon los resultados con los ya obtenidos en presencia de dicho catión. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

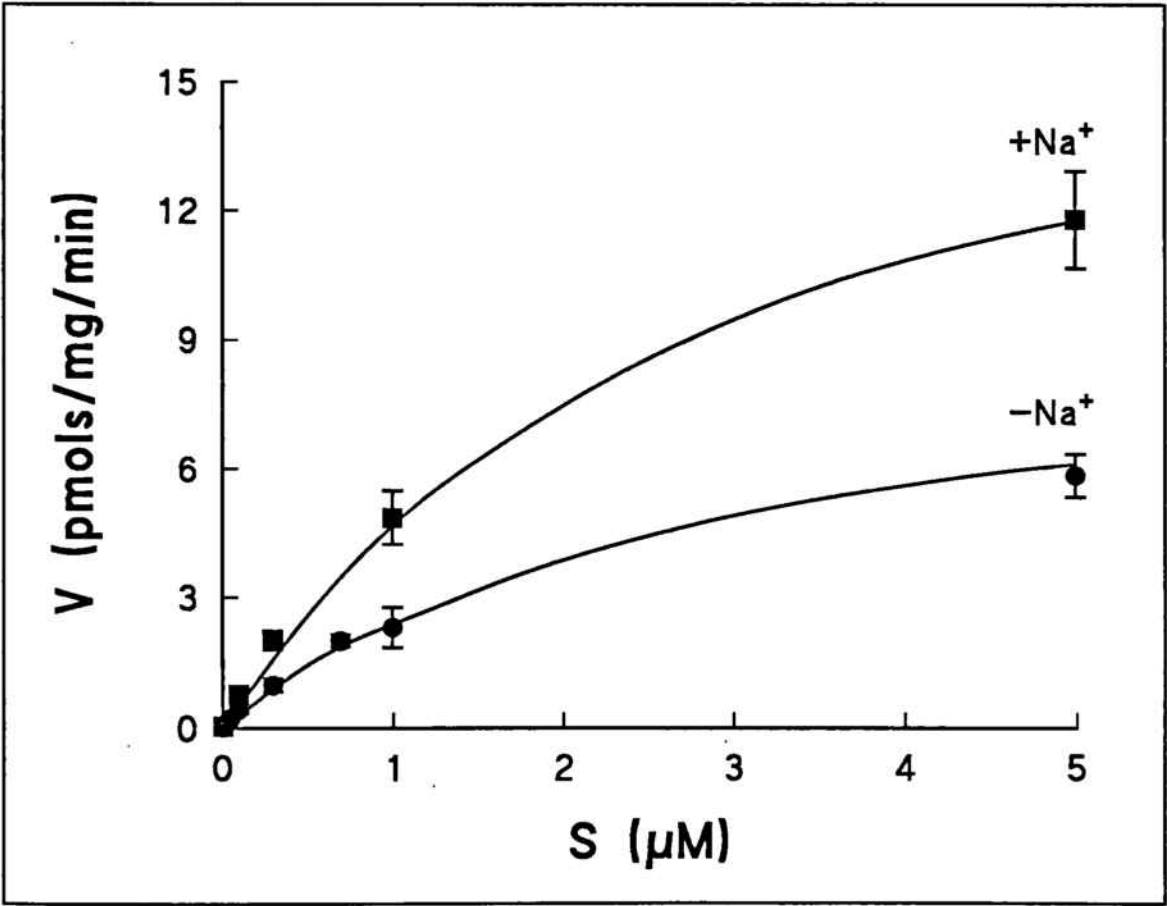


Figura 5.23.- Saturación del uptake de adenosina en presencia (■) y ausencia (●) de sodio en el medio de incubación.

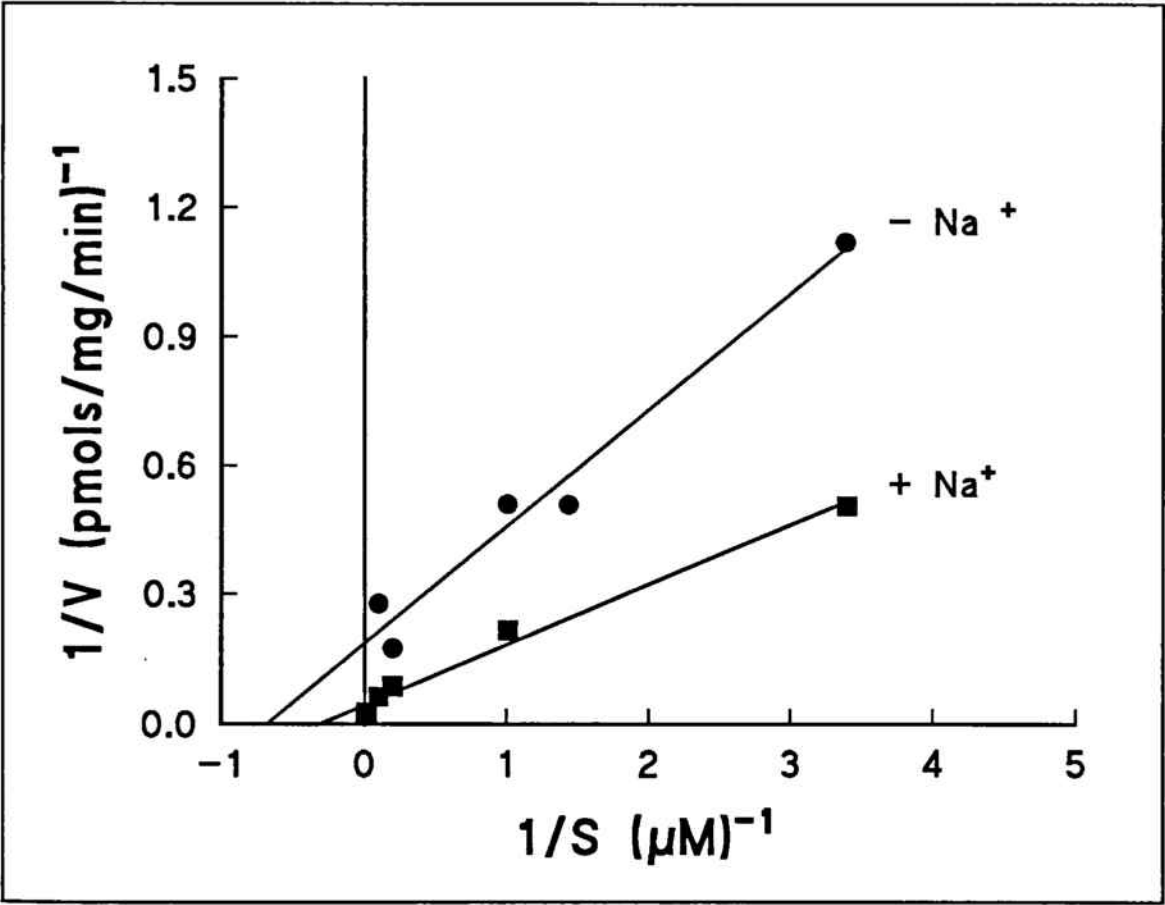


Figura 5.24.- Representación de Lineweaver-Burk de dichas saturaciones.

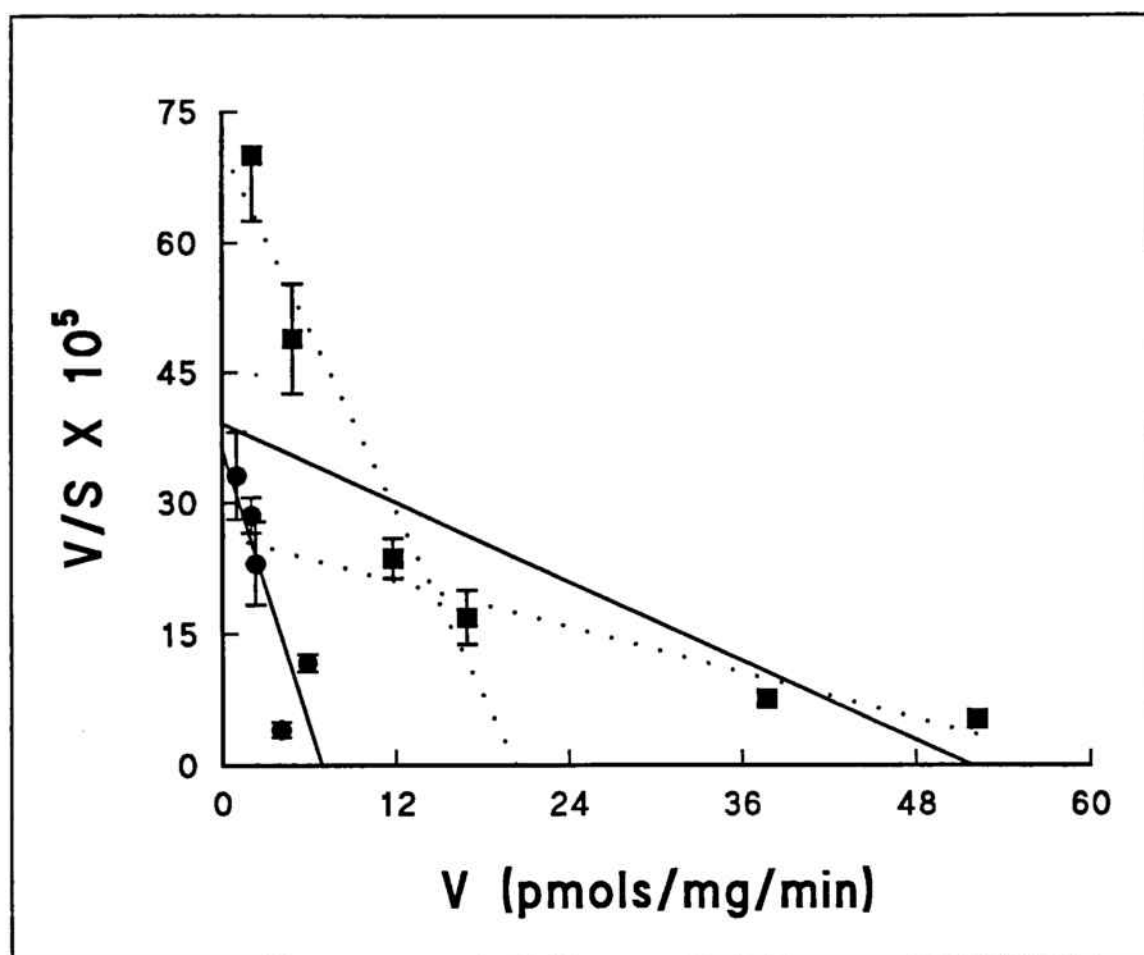


Figura 5.25.- Representación de Eadie-Hofstee de las anteriores saturaciones. En línea de puntos se muestra el posible ajuste biexponencial que puede sufrir la cinética en presencia (■) de sodio. Dicha posibilidad desaparece en ausencia (●) del mencionado catión.

En la siguiente tabla se muestran los valores de K_M y V_{max} obtenidos en ausencia de sodio.

Tabla XII.

K_M (μM)	V_{max} (pmols/mg/min)	n
$1,18 \pm 0,30$	$5,04 \pm 0,29$	3

5.4.2.- Estudios de inhibición del *uptake*.

Se realizaron ensayos de inhibición del *uptake* a 30 s y 5 min. de incubación. Se ensayaron como posibles inhibidores ligandos del receptor benzodiazepínico periférico, así como inhibidores clásicos del transporte de nucleósidos como la hexobendina. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla XIII.- Inhibición del *uptake* de adenosina por diversas sustancias a 5 min. de incubación.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Pendiente
Hexobendina	0,91 ± 0,37	0.77 ± 0.06
AHN 086	22,37 ± 0,32	1,16 ± 0,17
PK 11195	27,38 ± 5,81	0,68 ± 0,11
Diazepam	32,75 ± 8,64	0,51 ± 0,15

Los resultados son la media de 3 experiencias realizadas por duplicado ± E.E.M.

A 30 s de incubación no se detectó inhibición por estas sustancias.

DISCUSSION

6.- DISCUSION.

Los resultados obtenidos en los estudios de saturación y competición con [^3H] PK 11195 permiten demostrar la presencia de una sola clase de lugares de unión para esta sustancia en próstata de rata y próstata humana. Dichos lugares muestran el perfil de especificidad establecido para el receptor benzodiazepínico periférico, cumpliendo el orden de afinidad característico del mismo :

PK 11195 > Ro 5-4864 > Diazepam >> Clonazepam

El [^3H]PK 11195 mostró mayor afinidad en próstata de rata ($K_D = 1,51 \pm 0,03$ nM) que en próstata humana ($K_D = 14,6 \pm 5,6$ nM). Sin embargo, la densidad de receptores en próstata humana es el doble que la de rata ($B_{\text{max}} = 12155 \pm 1300$ fmols/mg en próstata humana y $B_{\text{max}} = 6050 \pm 583$). Un proceso tumoral benigno, como es la hiperplasia nodular de próstata humana, no comporta un aumento en la población de RBPs ($B_{\text{max}} = 13924 \pm 2454$ fmols/mg frente a los 12155 ± 1300 obtenidos en próstata control); por lo tanto, el aumento de dicha población no es un fenómeno característico de todas las patologías tumorales.

Debido a la menor afinidad que presenta el [^3H]Ro 5-4864 en la fracción mitocondrial de tejido humano ($K_D = 188,38 \pm 16,46$ nM frente a $12,00 \pm 2,42$ nM para el [^3H]PK 11195), nuestros estudios demuestran, al igual que los estudios

comparativos realizados por Gavish y col. (1987), que el [^3H]PK 11195 es el mejor radioligando para hacer estudios de este tipo en especies distintas a los roedores, incluida la especie humana.

El hecho de que la unión específica del [^3H]PK 11195 no se vea en nuestros estudios modificada de manera significativa por la temperatura coincide con los resultados obtenidos por Le Fur y col. (1983), según los cuales, esta sustancia sería un antagonista del RBP debido a que su unión no se ve afectada por la temperatura pero sí va acompañada de una variación de la entropía.

Asimismo, se ha demostrado una relación directa entre la unión específica del [^3H]PK 11195 y el incremento de la concentración proteica en tejido de rata, lo cual demuestra, como era de esperar, que el RBP es de naturaleza proteica.

Los ensayos cinéticos de asociación realizados en tejido de rata con [^3H]PK 11195 muestran una representación de tipo monoexponencial, lo cual confirma la existencia de una sola clase de lugares de unión para el mismo. Estos estudios nos han permitido comprobar que el equilibrio de unión de este radioligando al receptor mitocondrial de próstata de rata se alcanza a los 40 min., y se mantiene estable como mínimo durante 2 h.

La representación logarítmica obtenida a partir de los valores de la cinética de disociación del [^3H]PK 11195 es perfectamente lineal. Estos resultados concuerdan con una cinética de primer orden y, por tanto, de la disociación de un solo tipo de complejo radioligando-receptor, lo cual nos vuelve a evidenciar la presencia de una única clase de sitios de unión.

El [^3H]PK 11195 presenta una $t_{1/2}$ de disociación de 135 min. en la preparación mitocondrial de próstata de rata, valor superior a los 27,73 min. obtenidos para el [^3H]Ro 5-4864 en un trabajo anterior de nuestro grupo. Ello indica que el complejo receptor-PK 11195 se disocia mucho más lentamente que

el complejo receptor-Ro 5-4864, corroborando que el PK 11195 es un ligando mucho más afín que el Ro 5-4864 para el receptor benzodiazepínico periférico.

En los estudios de competición realizados en próstata de rata, la protoporfirina IX (postulada por Verma y col., (1987) como ligando endógeno del RBP) sólo desplazó la mitad del [^3H]PK 11195 unido. Dicha sustancia, a concentraciones micromolares, no afectó la unión de [^3H]PK 11195 en tejido de próstata humana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en glioblastomas humanos por Broaddus y Bennet (1990). Por tanto, las características de desplazamiento no competitivo de la protoporfirina IX desaparecen en tejido humano, lo que descarta su papel como ligando endógeno del citado receptor.

Moreno-Sánchez y col. (1991) postularon la estabilización de la conformación citosólica del *carrier* ADP/ATP mitocondrial por AHN 086, un ligando irreversible del RBP, así como la inhibición por dicha sustancia del transporte de succinato en mitocondria, fenómeno que podría llevarse a cabo mediante la inhibición del estado 3 de la respiración, con el succinato como sustrato. Estudios realizados en conducto deferente (Escubedo y col. 1992) y próstata y vesícula seminal de rata (Camins y col. 1992) demuestran una interacción entre el *carrier* ADP/ATP y el receptor benzodiazepínico periférico. Atractilósido y carboxiatractilósido, dos compuestos que se unen específicamente a dicho transportador, desplazan con alta afinidad (CI_{50} de orden nanomolar) la unión del [^3H]Ro 5-4864, aunque de manera no competitiva. En cambio, el atractilósido sólo desplaza a concentraciones de orden micromolar la unión del [^3H]PK 11195 en próstata de rata. Ello permite suponer que la ocupación del *carrier* ADP/ATP modula la unión de las benzodiazepinas al RBP o, en su defecto, que atractilósido y carboxiatractilósido son ligandos poco específicos de dicho *carrier* y reconocen también el lugar de unión del Ro 5-4864 en el RBP. El hecho de que la unión de los dos ligandos del RBP se vea afectada con distinta afinidad por el atractilósido y el α,β -metilén-ATP (análogo estable del ADP) sugiere que los dos radioligandos se unen posiblemente a lugares distintos del receptor, tal como proponen Skowronski y col. (1987). También se

realizó un estudio en adenoma de próstata humana para comprobar si el RBP en esta especie está o no modulado por el *carrier* ADP/ATP: ni atractilósido ni α,β -metilén-ATP desplazaron la unión del [^3H]PK 11195 en este tejido. Estos resultados confirman que el RBP presenta, en la especie humana, una configuración distinta que en roedores, prefiere estructuras isoquinoleínicas (PK 11195) y pierde el posible solapamiento con el *carrier* ADP/ATP que parece existir en rata.

Parece ser que una función importante del RBP está relacionada con varias actividades de transporte en la rata: transporte de porfirinas fuera de la mitocondria (Snyder y col. 1987); entrada, distribución y/o disponibilidad de colesterol en la mitocondria (Pappadopoulos y col. 1990) e intercambio de ADP/ATP (Escubedo y col. 1992).

Doble y col. (1985) describieron que, en corazón de rata, los RBPs y los lugares de unión de baja afinidad para las dihidropiridinas podrían ser moléculas separadas empaquetadas en el mismo compartimento membranal. En este trabajo se pone de manifiesto una interacción competitiva entre el nitrendipino y la unión del [^3H]PK 11195 en próstata de rata y humanos, mientras que, en tejido de rata, la interacción de esta dihidropiridina con el [^3H]Ro 5-4864 es no competitiva. A pesar de que no hay una total evidencia, este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que el [^3H]Ro 5-4864 y el [^3H]PK 11195 podrían interaccionar con diferentes dominios de la misma población de receptores en tejidos de rata.

Dipiridamol y NBTI, sustancias inhibidoras del transporte de nucleósidos, desplazaron competitivamente la unión del [^3H]PK 11195 en próstata de rata y humanos. Hasta el momento, la modulación del transporte de adenosina por benzodiacepinas sólo ha estado citada en membrana plasmática y sólo para el diazepam, y no para compuestos como el PK 11195.

La interacción competitiva entre los RBPs, la nitrendipina, e inhibidores del sistema de *uptake* de adenosina podría tener alguna posible relevancia terapéutica.

Los resultados obtenidos con NBTI y dipiridamol nos llevaron a pensar en la posible presencia de un transportador de adenosina en la membrana mitocondrial, y a realizar ensayos de acumulación e inhibición del transporte de [3 H]adenosina en preparación cruda mitocondrial de testículo de rata.

El paso de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana citoplasmática está regido por sistemas de transporte activo, de difusión facilitada, o de difusión pasiva. Los sistemas de transporte activo utilizan energía (ATP, por ejemplo) para bombear compuestos a través de las membranas en contra de gradiente de concentración. Esta energía puede, o bien hacer funcionar directamente el transportador, o bien establecer un gradiente de concentración secundario a través del cual fluyan compuestos polares. Tradicionalmente, se ha pensado que la adenosina era transportada bidireccionalmente a través de las membranas celulares en contra de su gradiente de concentración mediante un sistema de difusión facilitada (Plagemann y Wohlhueter, 1980; Jarvis, 1987). Este sistema parece ser relativamente selectivo para la adenosina respecto a otros nucleósidos endógenos (Wu y Phillis, 1985; Geiger y col. 1988). Hasta hace relativamente poco, no se habían descrito sistemas de transporte activo dependientes de sodio ni de adenosina ni, probablemente, de otros nucleósidos purínicos. Actualmente, se establecen 3 posibles mecanismos para el transporte de adenosina a través de la membrana citoplasmática:

- Difusión facilitada sensible a NBTI (10 nM), con una K_M entre 20 y 100 μ M para la adenosina.
- Difusión facilitada insensible a NBTI con valores similares de K_M .
- Transporte activo dependiente de sodio con una K_M de 1 a 10 μ M para la adenosina.

En nuestras experiencias se ha evidenciado que la cinética de acumulación

de adenosina en la mitocondria de testículo de rata es de tipo Michaelis-Menten. En los estudios de transporte de nucleósidos es necesario distinguir transporte de *uptake* (ver apartado 3). Es por ello que hemos medido la acumulación de [³H]adenosina a diferentes tiempos de incubación. Si existiera metabolismo intramitocondrial de la adenosina, los valores de K_M disminuirían cuanto mayor fuera el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos permiten reflejar esta hipótesis ya que, a mayor tiempo de incubación, se observa un aumento significativo de la afinidad (menor valor de K_M) y un descenso de la V_{max} . La disminución significativa de V_{max} a los 5 y 10 min. de incubación refleja, probablemente, la saturabilidad del sistema.

Aunque todas las representaciones de Eadie-Hofstee son lineales, los resultados a 5 min. de incubación permiten ser ajustados a dos cinéticas de transporte, si bien no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto a un ajuste monoexponencial.

La ausencia de sodio en el medio convierte los resultados a 5 min. de incubación en una representación de Eadie-Hofstee claramente lineal, en la que el valor de K_M no varía significativamente, pero en la que sí se produce una disminución significativa de la velocidad. Por ello deducimos que parte del transporte de adenosina a través de la membrana mitocondrial se realiza a través de un sistema de transporte activo.

La variación de los valores de V_{max} , pero no los de K_M , en presencia o ausencia de sodio indican que este ión actúa como catión de cotransporte en este sistema activo, y no como modificador alostérico.

La hexobendina, clásico inhibidor de la difusión facilitada de adenosina sensible a NBTI, fue la que presentó mayor potencia inhibidora del transporte, aunque el valor de su CI_{50} parece descartar la participación de este tipo de transporte.

Los valores de CI_{50} para AHN 086, PK 11195 y diazepam descartan, asimismo, la participación del receptor benzodiazepínico periférico en el efecto inhibidor. Aún preincubando estos compuestos con la suspensión proteica, su efecto inhibidor no se manifiesta a 30 segundos, pero sí a tiempos mayores. De ello podría formularse la hipótesis de que el sitio de unión de estos inhibidores, aunque poco específico, es sólo accesible tras la activación del transportador por la adenosina. Serían necesarios más de 30 s de activación del transportador para que el inhibidor alcanzara el equilibrio termodinámico con su sitio de unión.

Finalmente, cabe destacar que es la primera vez que se describe un sistema de transporte de nucleósidos en la membrana mitocondrial.

CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES.

1.- Se ha evidenciado la existencia de receptores benzodiazepínicos periféricos en próstata de rata utilizando [^3H]PK 11195. Este compuesto presenta una sola clase de sitios de unión determinada por el valor del coeficiente de Hill obtenido de los estudios de saturación.

2.- Los estudios cinéticos confirman la elevada afinidad que presenta dicho ligando por el receptor benzodiazepínico periférico.

3.- Los estudios de competición realizados en fracción mitocondrial de próstata de rata confirman la baja afinidad que presentan por este receptor las típicas benzodiazepinas de acción central (diazepam, clonazepam).

4.- La unión del [^3H]PK 11195 sólo se ve afectada por concentraciones micromolares de atractilósido y α,β -metilén-ATP, lo que indica que, posiblemente, PK 11195 y Ro 5-4864 se unen a lugares diferentes del mismo receptor.

5.- Los estudios realizados en próstata humana muestran la existencia de un receptor benzodiazepínico periférico para el que el [^3H]PK 11195 presenta mayor afinidad que el [^3H]Ro 5-4864.

6.- La población de receptores benzodiazepínicos periféricos en próstata humana es el doble que la de rata.

7.- Ya que la hiperplasia nodular de próstata no comporta un aumento de la población de dichos receptores, éstos no constituyen un marcador tumoral de carácter universal.

8.- Según los estudios realizados, parece descartarse que la protoporfirina IX sea el ligando endógeno del receptor benzodiazepínico periférico.

9.- Las dihidropiridinas inhiben, tanto en rata como en humanos, de forma competitiva, la unión del PK 11195.

10.- El desplazamiento por NBTI y dipiridamol es indicativo de la posible existencia de un transportador de adenosina en membrana mitocondrial.

11.- Se ha evidenciado por primera vez la presencia de un transportador de adenosina en membrana mitocondrial que presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten.

12.- El descenso de los valores de K_M con el tiempo de incubación hace sospechar la existencia de un metabolismo intramitocondrial de la adenosina.

13.- El incremento de la velocidad de transporte en presencia de sodio permite deducir la participación de un sistema de transporte activo en el que dicho catión actuaría como cotransportador.

14.- Se descarta la participación del receptor benzodiazepínico periférico en el efecto inhibitor del transporte de adenosina.

III.- BIBLIOGRAFIA.

Alho,H,Fremeau,RT,Tiedge,H,Wilcox,J,Bovolin,P,Brosius,J,Roberts,JL,Costa,1988
Diazepam binding inhibitor gene expresion: Location in brain and peripheral
tissues of rat.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,85,7018-7022.

Amiri,Z,Weizman,R,Katz,Y,Burstein,O,Edoute,Y,Lochner,A,Gavish,M,1991
Testosterone and cyproterone acetate modulate peripheral but not central
benzodiazepine receptors in rats.

Brain Res.,553,155-158.

Amsterdam,A,Sun Suh,B,1991

An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of
steroidogenic granulosa cells.

Endocrinology,129,503-510.

Anholt,RRH,Snyder,S,1985

Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole
body sections of neonatal rats.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,233,517-526.

Anholt,RRH,1986

Mitochondrial benzodiazepine receptors as potential modulators of intermediary
metabolism.

Trends Pharmacol. Sci.,6,506-511.

Anholt,RRH,Souza,EB,Kuhar,MJ,Snyder,SH,1985.

Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in
rat adrenal gland and testis.

Eur. J. Pharmacol.,110,41-46.

Anholt,R,Aebi,U,Pedersen,PL,Snyder,SH,1986b.

Solubilization and reassembly of the mitochondrial benzodiazepine receptor.
Biochemistry.,25,2120-2125.

Anseau,M,Frenckell,R,Cerfontaine,JL,Papart,P,1991.

Pilot study of PK 11195, a selective ligand for the peripheral-type benzodiazepine receptor binding sites in patients with anxious or depressive symptomatology.
Pharmacopsychiatry,24,8-12.

Antkiewicz-Michaluk,L,Mukhin,AG,Guidotti,A,Krueger,KE,1988

Purification and characterization of a protein with peripheral-type benzodiazepine binding sites.
J. Biol. Chem.,263,17317-17321.

Awad,M,Gavish,M,1987

Binding of [³H]Ro 5-4864 and [³H]PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species: species differences and heterogeneity in peripheral benzodiazepine binding sites.
J. Neurochem.,49,1407-1414.

Awad,M,Gavish,M,1988

Differential effect of detergents on [³H]Ro 5-4864 and [³H]PK 11195 binding to peripheral-type benzodiazepine binding sites.
Life Sci.,43,167-175.

Awad,M,Gavish,M,1989

Solubilization of peripheral-type benzodiazepine binding sites from cat cerebral cortex.
J. Neurochem.,52,1880-1885.

Awad,M,Gavish,M,1989

Heterogeneity between rat and calf peripheral-type benzodiazepine binding-sites: differential sensitivity to triton X-100.

J. Receptor Res.,9,369-384.

Awad,M,Gavish,M,1989

Species differences and heterogeneity of solubilized peripheral type benzodiazepine binding sites.

Biochem. Pharmacol.,38,3843-3849.

Awad,M,Gavish,M,1991

Peripheral-type benzodiazepine receptors in human cerebral cortex, kidney and colon.

Life Sci.,49,1155-1161.

Bar-Ami,S,Fares,F,Gavish,M,1989

Effect of hypophysectomy and hormone treatment on the induction of peripheral-type benzodiazepine binding sites in female rat genital axis.

Horm. Metabol. Res.,21,106-107.

Barnea,ER,Fares,F,Gavish,M,1989

Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro.

Mol. Cell. Endocrinol.,64,155-159.

Basile,A,Ostrowski,NL,Skolnick,P,1986

Aldosterone-reversible decrease in the density of renal peripheral benzodiazepine receptors in the rat after adrenalectomy.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,240,1006-1013.

Bean,BP,1989

Classes of calcium channels in vertebrate cells.

Ann. Rev. Physiol.,51,367-384.

Beaumont,K,Cheung,A,Geller,M,Fanestil,D,1983

Inhibitors of peripheral-type benzodiazepine receptors present in human urine and plasma ultrafiltrates.

Life Sci.,33,1375-1384.

Beaumont,K,Moberly,JB,Fanestil,D,1984

Peripheral-type benzodiazepine binding sites in a renal epithelial cell line (MDCK).

Eur. J. Pharmacol.,103,185-188.

Beaumont,K,Skowronski,R,Vaughn,D,Fanestil,D,1988.

Interactions of lipids with peripheral-type benzodiazepine receptors.

Biochem. Pharmacol.,37,1009-1014.

Benavides,J,Begassat,F,Phan,T,Tur,C,Uzan,A,Renault,C,Dubroeucq,MC,

Gueremy,C, Le Fur,G,1984

Histidine modification with diethylpyrocarbonate induces a decrease in the binding of an antagonist PK 11195 but not an agonist Ro 5-4864 of the peripheral benzodiazepine receptors.

Life Sci.,35,1249-1256.

Benavides,J,Bourdiol,F,Dubois,A,Scatton,B,1991

Regional pattern of increased omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding site densities in rat brain induced by systemic injection of kainic acid.

Neurosci. Lett.,125,219-222.

Benavides,J,Capdeville,C,Dauphin,F,Dubois,A,Duverger,D,Fage,D,Gotti,B,Mackenzie,ET,Scatton,B,1990

The quantification of brain lesions with an omega 3 site ligand: a critical analysis

of animal models of cerebral ischaemia and neurodegeneration.

Brain Res.,522,275-289.

Benavides,J,Cornu,P,Dennis,T,Dubois,A,Hauw,JJ,Mackenzie,ET,Sazdovitch,
V,Scatton,B,1988

Imaging of human brain lesions with an omega 3 site radioligand.

Ann. Neurol.,24,708-712.

Benavides,J,Dubois,A,Dennis,T,Hamel,E,Scatton,B,1989

Omega 3 (Peripheral type benzodiazepine binding) site distribution in rat immune
system: an autoradiographic study with the photoaffinity ligand [³H]PK 14105.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,249,333-339.

Benavides,J,Fage,D,Carter,C,Scatton,B,1987

Peripheral type benzodiazepine binding sites are a sensitive indirect index of
neuronal damage.

Brain Res.,421,167-172.

Bender,AS,Wu,PH,Phillis,JW,1980

The characterization of [³H]adenosine uptake into rat cerebral cortical
synaptosomes.

J.Neurochem.,35,629-640.

Bender,AS,Wu,PH,Phillis,JW,1981

The rapid uptake and release of [³H]adenosine by rat cerebral cortical
synaptosomes.

J. Neurochem.,36,651,660,

Besman,MJ,Yanagibashi,K,Lee,TD,Kawamura,M,Hall,PF,Shively,JE,1989

Identification of des(gly-Ile)-enzopine as an effector of corticotropin dependent
adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the

peripheral benzodiazepine receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86,4897-4901.

Bidder,M,Ratzoni,G,Weizman,A,Blumensohn,R,Norymberg,M,Tyano,S,
Gavish,M,1990

Platelet benzodiazepine binding in Alzheimer's disease.

Biol. Psychiat.,28,641-643.

Black,KL,Ikezaki,K,Santori,E,Becker,DP,Vinters,H,1990

Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to
brain tumors in rat and man.

Cancer,65,93-97.

Black,KL,Kiyonobu,MD,Toga,AW,1989

Imaging of brain tumors using peripheral benzodiazepine receptors ligand.

J. Neurosurg.,71,113-118.

Bolger,G,Mezey,E,Cott,J,Weissman,EA,Paul,SM,1984

Differential regulation of central and peripheral benzodiazepine binding sites in
the rat olfactory bulb.

Eur. J. Pharmacol.,105,143-148.

Bolger,G,Weissman,B,Lueddens,H,Basile,A,Mantione,C,Barret,J,Witkin,J,Paul,
S,Skolnick,P,1985

Late evolutionary appearance of peripheral-type binding sites for benzodiazepines.

Brain Res.,338,366-370.

Borea,PA,Caparrotta,L,Biasi,M,Fassina,G,Froldi,G,Pandolfo,L,Ragazzi,E,1989

Effect of selective agonist and antagonist on atrial adenosine receptors and their
interaction with BAYK 8644 and Nitrendipine.

Br.J.Pharmacol.,96,372-378.

Bourdiol,F,Toulmond,S,Serrano,A,Benavides,J,Scatton,B,1991

Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1 tumour necrosis factor- α and lipopolyssacharide.

Brain Res.,543,194-200.

Bradford,MM,1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem.,72,248-254.

Broadbuss,W,Bennett,J,1990

Peripheral type benzodiazepine receptors in human glioblastomas: pharmacologic characterization and photoaffinity labeling of ligand recognition site.

Brain Res.,518,199-208.

Brush,KL,Perez,M,Hawkes,MJ,Pratt,DR,Hamilton,SL,1987

Low affinity binding sites for 1,4-dihydropyridines in mitochondria and guinea pig ventricular membranes.

Biochem. Pharmacol.,36,4153-4161.

Butterworth,RF,Tonon,MC,Desy,L,Giguere,JF,Vaudry,H,Pelletier,G,1991

Increased brain content of the endogenous benzodiazepine receptor ligand octadecaneuropeptide (ODN) following portacaval anastomosis in the rat.

Peptides,12,119-125.

Calogero,AE,Kamilaris,TC,Johson,EO,Gold,PW,Chrousos,GP,1990

Peripheral benzodiazepine receptor ligands stimulate prolactin release in the rat. J. Neuroendocrinol.,2,745-750.

Camins, A, Sureda F.X., Camarasa, J., Escubedo, E. 1992

Specific binding sites for [³H]Ro 5-4864 in rat prostate and seminal vesicle
Gen. Pharmacol. En prensa.

Canonaco,M,Valenti,A,Tavolaro,R,Bettini,E,Maggi,A,1989
Differential modulation of [³H]flunitrazepam binding sites in female rat brain by sex steroid hormones.
Eur. J. Pharmacol.,170,95-99.

Charbonneau,P,Syrota,A,Crouzel,C,Valois,JM,Prenent,C,Crouzel,M,1986
Peripheral type benzodiazepine receptors in the living heart characterized by positron emission tomography.
Circulation,73,476-483.

Cox,DA,Ellinor,PT,Kirley,TL,Matlib,MA,1991
Identification of a 17-kDa protein associated with the peripheral type benzodiazepine receptor in vascular and other smooth muscle types
J. Pharmacol. Exp. Ther.,258,702-709.

Cuparencu,B,Horak,J,Marmo,E,De Santis,D,Lampa,E,Lo Sasso,C,F. Rossi,F,1991
The influence of the peripheral-type benzodiazepine receptor antagonist PK 11195 on blood glucose and serum lipid levels in rats.Interactions with diazepam.
Curr. Ther. Res.,49,409-414.

Cuparencu,B,Trif,I,Horak,J,Cucuianu,M,Balazs,L,Sasso,C,Matera,MG,Loffreda,A,Marmo,E,1989
Inhibition of platelet aggregation by some benzodiazepines.
Curr.Ther.Res,45,198-204.

Cushing,D,J,McConnaughey,MM,Mustafa,SJ,1988
Characterization of adenosine bonding sites in bovine testicular tissue using 8-cyclopentyl-1,3-[³H]dipropylxanthine.

Eur. J. Pharmacol.,152,353-356.

Cymerman,U,Pazos,,Palacios,JM,1986

Evidence for species differences in peripheral benzodiazepine receptors: an autoradiographic study.

Neurosci. Lett.,66,153-158.

Czajkowski,C,Farb,DH,1989

Identification of an intracellular pool of gamma aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors en route to the cell surface of brain neurons in culture.

Mol. Pharmacol.,35,183-188.

Dar,D,Wweizman,A,Karp,L,Grinshpoon,A,Bidder,M,Kotler,S,Bleich,A,Gavish,M, 1990

Platelet peripheral benzodiazepine receptors in repeated stress

Life Sci.,48,341-346.

Das,S,Sikpi,M,Skolnick,P,1987

Characterization of [³H]Ro 5-4864 binding to peripheral benzodiazepine receptors in guinea pig alveolar type II cells.

Biochem. Pharmacol.,36,2221-2224.

Davies,LP,Cook,AF,Poonian,M,Taylor,KM,1980

Displacement of [³H]diazepam binding in rat brain by dipyridamole and by 1-methylisoguanosine, a marine natural product with muscle relaxant activity.

Life Sci.,26,1089-1095.

Davies,P,Huston,V,1981

Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole.

Eur. J. Pharmacol.,73,209-211.

Deckert,J,Marangos,PJ,1986

Hormonal interactions with benzodiazepine binding sites in vitro.

Life Sci.,39,675-683.

Deckert,J,Morgan,PF,Marangos,PJ,1988

Adenosine uptake heterogeneity in the mamalian CNS? Uptake inhibitors as probes and potential neuropharmaceuticals.

Life Sci.,42,1331-1345.

De Lorenzo,RJ,Burdette,S,Holderness,J,1981

Benzodiazepine inhibition of the calcium-calmodulin protein kinase system in brain membrane.

Science,213,546-548.

Devaud,LL,Murray,TF,1988

Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,247,14-22.

Diorio,DL,Welner,SA,Tulandi,T,Lal,S,Suranyi-Cadotte,BE,1990

Effect of increasing estradiol levels on platelet peripheral benzodiazepine binding sites in women undergoing human menopausal gonadotropin treatment.

Neuropsychobiology,23,169-172.

Diorio,D,Welner,S,Butterworth,RF,Meaney,MJ,Suranyi-Cadotte,B,1991

Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex.

Neurobiol. Aging,12,255-258.

Doble,A,Martin,IL, 1992

Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety.

Drugan,RC,Basile,AS,Crawley,JN,Paul,SM,Skolnick,P,1988

Characterization of stress-induced alterations in [³H]Ro 5-4864 binding to peripheral benzodiazepine receptors in rat heart and kidney.

Pharmacol. Biochem. Behav.,30,1015-1020.

Drugan,RC,Holmes,PV,Stringer,AP,1991

Sexual dimorphism of stress induced changes in renal peripheral benzodiazepines receptors in rat.

Neuropharmacology,30,413-416.

Drummer,HL,Woolley,DE,1991

Toxicokinetics of Ro 5-4864 lindane and picrotoxin compared

Pharmacol. Biochem. Behav.,38,235-242.

Dubois,A,Benavides,J,Peny,B,Duverger,D,Fage,D,Gotti,B,Mackenzie,E,Scatton,B,1988

Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding site in rat and cat.

Brain Res.,445,77-90.

Dunwiddie,TV,1985

The physiological role of adenosine in the central nervous system.

Int. Rev. Neurobiol.,27,63-139.

Duval,JL,Post,RM,Marangos,PJ,1989

Pyruvate dehydrogenase interactions with peripheral-type benzodiazepine receptors.

J. Neurochem,52,110-116.

- Erme,P,Chiesi,M,Longoni,S,Fulbright,J,Hermesmeyer,K,1989
Relaxation of rat vascular by peripheral benzodiazepine modulators.
J. Clin. Invest.,84,493-498.
- Escubedo,E,Camins,A,Talaverón,C,Camarasa,J,1992
Characterization of [^3H]Ro 5-4864 binding sites in rat vas deferens.
J. Neurochem.,58,39-45.
- Escubedo, E., Camarasa, J., Pallás,M., Adzet,T., 1991
Peripheral benzodiazepines potentiate the effect of adenosine in rat vas deferens.
J. Pharm. Pharmacol., 43, 49-50.
- Eshleman,AJ,Murray,TF,1989
Differential binding properties of the peripheral type benzodiazepine ligands
[^3H]PK 11195 and [^3H]Ro 5-4864 in trout and mouse brain membranes.
J. Neurochem.,53,494-502.
- Fares,F,Barami,S,Haj-yehia,Y,Gavish,M,1989
Hormonal regulation of peripheral benzodiazepine binding sites in female rat
adrenal gland and kidney.
J. Recept. Res.,9,143-157.
- Fares,F,Gavish,M,1986
Characterization of peripheral benzodiazepine binding sites in human term
placenta.
Biochem. Pharmacol.,35,227-230.
- Fares,F,Weizman,A,Zlotogorski,D,Gavish,M,1987
Ontogenic development of peripheral benzodiazepine binding sites in rat brain,
heart, and lung.
Brain Res.,408,381-384.

Ferrarese,C,Appollonio,I,Frigo,M,Gaini,SM,Piolti,R,Frattola,L,1989

Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumors.

Ann.Neurol.,26,564-568.

Ferrarese,C,Appollonio,I,Frigo,M,Perego,M,Pierpaoli,C,Trabucchi,M,Frattola,L,1990

Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in human blood mononuclear cells.

Neuropharmacology,29,375-378.

Ferrarese,FC,Appollonio,I,Frigo,M,Perego,M,Piolti,R,Trabucchi,M,Frattola,L,1990

Decreased density of benzodiazepine receptors in lymphocytes of anxious patients: reversal after chronic diazepam treatment.

Acta Psychiat. Scand.,82,169-173.

Ferrarese,C,Mennini,T,Pecora,N,Pierpaoli,C,Frigo,C,Marzorati,C,Gobbi,M,Bizzi,A,Codegoni,A,Garattini,S,Frattola,L,1991.

Diazepam binding inhibitor (DBI) increases after acute stress in rat.

Neuropharmacology,30,1445-1452.

Ferry,A,Jaillon,P,Lecoq,B,Jozefczak,C,1989

Pharmacokinetics and effects on exercise heart rate of PK 11195 (52028RP),an antagonist of peripheral benzodiazepine receptors, in healthy volunteers.

Fund. Clin. Pharmacol.,3,383-392.

French,JF,Rapoport,RM,Matlib,MA,1989

Possible mechanism of benzodiazepine induced relaxation of vascular smooth muscle.

J. Cardiovasc. Pharmacol.,14,405-411.

Gavish,M,Awad,M,1987

Binding of [³H]Ro 5-4864 and [³H]PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species: species differences and heterogeneity in peripheral benzodiazepine binding sites.

J. Neurochem.,49,1407-1414.

Gavish,M,Weizman,A,Karp,L,Tyano,S,Tanne,Z,1986

Decreased peripheral benzodiazepine binding sites in platelets of neuroleptic treated schyzophrenics.

Eur. J. Pharmacol.,121,275-279.

Gerrish,KE,Putnam,CW,Laird,HE,1990

Prolactin-stimulated mitogenesis in the NB2 rat lymphoma cell: lack of protoporphyrin IX effects.

Life Sci.,47,1647-1653.

Gorman,AM,O'Beirne,GB,Regan,CM,Williams,DC,1989

Antiproliferative action of benzodiazepine in cultured brain cells is no mediated through the peripheral-type benzodiazepine acceptor.

J. Neurochem.,53,849-855.

Griffith,JA,Woolley,DE,1989

Central and perypheral benzodiazepines and kinetics of lindane-induced toxicity. Pharmacol. Biochem.Behav.,32,367-376.

Grupp,IL,French,JF,Matlib,MA,1987

Benzodiazepine Ro 5-4864 increases coronary flow.

Eur. J. Pharmacol.,143,143-147.

Guidotti,A,Forchetti,CM,Corda,MG,Konkel,D,Bennett,CD,Costa,E,1983

Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous

polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,80,3531-3535.

Hammond,JR,Clanachan,AS,1985

Species differences in the binding of [³H]nitrobenzylthioinosine to the nucleoside transport system in mammalian central nervous system membranes: evidence for interconvertible conformations of the binding site/transporter complex.

J. Neurochem.,45,527-535.

Hammond,J,Jarvis,SM,Paterson,ARP,Clanachan,AS,1983

Benzodiazepine inhibition of nucleoside transport in human erythrocytes.

Biochem. Pharmacol.,32,1229-1235.

Hammond,JR,Paterson,ARP,Clanachan,AS,1981

Benzodiazepine inhibition of site-specific binding of nitrobenzylthioinosine, an inhibitor of adenosine transport.

Life Sci.,29,2207-2214.

Haumont,LM,Horak,J,Sebestova,L,Masek,K,1988

In vivo immunomodulating activity of PK 11195, a structurally unrelated ligand for peripheral benzodiazepine binding sites. The possible involvement of central nervous system receptors.

Int.J.Immunother.,IV(2),125-129.

Havoundjian,H,Cohen,RM,Paul,SM,Skolnick,P,1986

Differential sensitivity of central and peripheral type benzodiazepine receptors to phospholipase A₂.

J. Neurochem.,46,804-811.

Henke,W,Ziegler,M,Dubiel,W,Jung,K,1989

Adenosine formation by isolated rat kidney mitochondria.

FEBS Lett.,254,5-7.

Hevia,A,Serrano,JS,Fernandez-Alonso,A,Castillo,JR,1987

Efectos del diazepam y Ro 5-4864 sobre la agregación plaquetaria en un modelo de ansiedad animal.

Rev. Farmacol. Clin. Exp.,4,353-357.

Holck,M,Osterrieder,W,1985

The peripheral high affinity benzodiazepine binding site is not coupled to the cardiac calcium channel.

Eur. J. Pharmacol.,118,293-301.

Hulligan,JP,Spector,S,Taniguchi,T,Wang,JKT,1983

The binding of [³H]diazepam to guinea-pig ileal longitudinal muscle and the in vitro inhibition of contraction by benzodiazepines.

Br.J.Pharmacol.,78,321-327.

Hu,PS,Lindgren,E,Jacobson,KA,Fredholm,BB,1987

Interaction of dihydropyridine calcium channel agonists and antagonists with adenosine receptors.

Pharmacol. Toxicol.,61,121-125.

Ikezaki,K,Black,K,1989

Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepines.

Cancer Lett.,49,115-120.

Ikezaki,K,Black,K,Toga,AW,Santori,EM,Becker,DP,Smith,ML,1990

Imaging peripheral benzodiazepine receptors in brain tumors in rats: in vitro binding characteristics.

J. Cer. Blood Flow Metab.,10,580-587.

- Johansson,O,Hilliges,M,Ostenson,C,Sandberg,E,Efendic,S,Mutt,V,1991
Immunohistochemical localization of porcine diazepam-binding inhibitor (DBI) to rat endocrine pancreas.
Cell Tissue Res.,263,395-398.
- Johnston,ME,Geiger,JD,1989
Sodium-dependent uptake of nucleosides by dissociated brain cells from the rat.
J. Neurochem.,52,75-81.
- Karaki,H,Weiss,GB,1988
Calcium release in smooth muscle.
Life Sci.,42,111-122.
- Katz,Y,Eitan,A,Amiri,Z,Gavish,M,1988
Dramatic increase in peripheral benzodiazepine binding sites in human colonic adenocarcinoma as compared to normal colon.
Eur.J.Pharmacol.,148,483-484.
- Katz,Y,Eitan,A,Gavish,M,1990
Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma
Oncology,47,139-142.
- Katz,Y,Weizman,A,Gavish,M,1989
Ligands specific to peripheral benzodiazepine receptors for treatment of porphyrias.
Lancet,29,932-933.
- Kazanietz,MG,Elgoyhen,AB,1990
Relaxant effect of benzodiazepines on uterine rings isolated from estrogen treated rats
Eur. J. Pharmacol.,185,231-234.

Klingenberg,M,Appel,M,1980

Is there a common binding center in the ADP,ATP carrier for substrate and inhibitors?

FEBS Lett.,119,195-199.

Klingenberg,M,Appel,M,Oelrichs,PB,1985

Wedeloside,a powerful inhibitor and ligand of the mitochondrial ADP/ATP carrier.

FEBS Lett.,189,245-249.

Klingenberg,M,Grebe,K,Scherer,B,1974

The binding of atractylate and carboxy-atractylate to mitochondria.

Eur.J.Biochem.,52,351-363.

Klingenberg,M,Heldt,HW,1982

The ADP/ATP translocation in mitochondria and its role in intracellular compartmentation.

Eur.J.Biochem,192,101-122.

Knudsen,J,1990

Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview.

Mol. Cell Biochem.,98,217-223.

Krueger,KE,1991

Peripheral-type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepines.

Neuropsychopharmacology,4,237-244.

Krueger,KE,Papadopoulos,V,1990

Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells.

J. Biol. Chem.,265,15015-15022.

Krueger,KE,Pappadopoulos,V,1992

Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis.
Annu. Rev. Pharmacol.and Toxicol.,32,211-237.

Laird,HE,Gerrish,KE,Duerson,KC,Putnam,CW,Russell,DH,1989

Peripheral benzodiazepine binding sites in Nb 2 mode lymphoma cells: effects on prolactin-stimulated proliferation and ornithine decarboxylase activity.
Eur. J. Pharmacol.,171,25-35.

Langer,SZ,Arbilla,S,1988

Imidazopyridines a tool for the characterization of benzodiazepine receptors: a proposal for a pharmacological classification as omega receptor subtypes.
Pharmacol. Biochem. Behav.,29,763-766.

Larcher,JC,Vayssiere,JL,Marquer,FJ,Cordeau,LR,Keane,PE,Bachy,A,Gros,F,Croizat,BP,1989

Effects of peripheral benzodiazepines upon the O₂ consumption of neuroblastoma cells.
Eur.J.Pharmacol.147,145-150.

Lee,CW,Jarvis,SM,1988

Nucleoside transport in rat cerebral-cortical synaptosomes.Evidence for two types of nucleoside transport.
Biochem. J.,249,557-564.

Le Fur,G,Guilloux,F,Rufat,P,Benavides,J,Uzan,A,Renault,C,Dubroeucq,MC,Guerey,C,1983

Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK11195.
Life Sci,32,1849-1856.

Le Fur,G,Vaucher,N,Perrier,M,Flamier,A,Benavides,J,Renault,C,Dubroeuq,
M,Guérémy,C,Uzan,A,1983

Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites
[³H]Ro 5-4864 and [³H]PK 11195, by thermodynamic studies.
Life. Sci.,33,449-457.

Le Fur,G,Uzan,A,Renault,C,Gueremy,C,Bénavidès,J,Dubroeuq,MC,1986

Stereoselective inhibition of the binding of [³H]PK 11195 to peripheral type
benzodiazepine binding sites by a quinolinepropanamide derivative.
Eur.J.Pharmacol.,128,269-272.

Long,C,Stone,TW,1986

The effects of adenosine on receptor sensitivity in the rat vas deferens.
Eur.J.Pharmacol.,132,11-19.

Lukeman,D,Fanestil,D,1987

Interactions of diuretics with the peripheral-type benzodiazepine receptor in the
rat kidney.
J. Pharmacol. Exp. Ther.,241,950-955.

Marano,G,Massotti,M,Spagnolo,A,Carpi,A,1990

Enhancement of pharmacologically induced bronchoconstriction by Ro 5-4864.
Eur.J.Pharmacol.,179,237-240.

Martini,C,Giannaccini,G,Lucacchini,A,1983

Solubilization of rat kidney benzodiazepine binding sites.
Biochem. Biophys. Acta,728,289-292.

Massotti,M,Mele,L,De Luca,C,1990

Involvement of the "peripheral" benzodiazepine receptor type (w3) in the tolerance
to the electroencephalographic effects of benzodiazepines in rats: comparison of

diazepam and clonazepam.

Pharmacol.Biochem.Behav.,35,933-936.

Matthew,E,Laskin,JD,Zimmerman,EA,Weinstein,IB,Hsu,KC,Engelhardt,DL,
1981

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

Proc.Natl. Acad. Sci. USA,78,3935-3939.

Mccabe,R,Schoenheimer,J,Skolnick,P,Newman,AH,Rice,K,Reig,JA,Klein,D,1989
[³H]AHN 086 acylates peripheral benzodiazepines receptors in the rat pineal
gland.

FEBS. Lett.,244,263,267,

Mendoça,A,1989

Diazepam enhances the inhibitory action of adenosine on transmission at the frog
neuromuscular junction.

Eur.J.Pharmacol.,164,347-354.

Mestre,M,Carriot,T,Neliat,G,Uzan,A,Renault,C,Dubroeucq,MC,Gueremy,C,Dobl
e,A,Le Fur,G,1986

PK 11195, an antagonist of peripheral type benzodiazepine receptors, modulates
BAY K-8644 sensitive but not 225 β -or H₂-receptor sensitive voltage operated
calcium channels in the guinea pig heart.

Life Sci.,39,329-339.

Mestre,M,Boquetard,G,Uzan,A,Gueremy,C,Renault,C,Dubroeucq,MC, Le
Fur,G,1985

PK 11195, an antagonist of peripheral benzodiazepine receptors, reduces
ventricular arrhythmias during myocardial ischaemia and reperfusion in the dog.
Eur.J. Pharmacol.,112,257-260.

Mhatre,M,Ticku,MK,1989

Chronic ethanol treatment selectively increases the binding of inverse agonists for benzodiazepine binding sites in cultured spinal cord neurons.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,251,164-168.

Mihara,S,Fujimoto,M,1989

High-Affinity binding sites for PK 11195, but not for Ro 5-4864, in porcine aortic smooth muscle.

Life Sci,44,1713-1720.

Mihara,S,Sakata,T,Fujimoto,M,1990

Interaction of lipocortin I with peripheral-type benzodiazepine binding sites

Eur. J. Pharmacol.,189,233-236.

Miller,L,Paritz,A,Greenblatt,D,Theoharides,T,1988

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

Pharmacology,36,52-60.

Miyata,M,Mocchetti,I,Ferrarese,C,Guidotti,A,Costa,E,1987

Protracted treatment with diazepam increases the turnover of putative endogenous ligands for the benzodiazepine / β -carboline recognition site.

Proc. Natl. Acad. Sci.USA,84,1444-1448.

Mizoule,J,Gauthier,A,Uzan,A,Renault,C,Dubroeuq,MC,Guérémy,C,Le Fur,,1985

Opposite effects of two ligands for peripheral type benzodiazepine binding sites PK 11195 and Ro 5-4864 in a conflict situation in the rat.

Life Sci.,36,1059-1068.

Monaco,L,Conti,M,1986

Localization of adenosine receptors in rat testicular cells.

Biol. of. Reprod.,35,258-266.

Moreno-Sanchez,R,Bravo,C,Gutierrez,J,Newman,AH,Chiang,PK,1991

Release of Ca from heart and kidney mitochondria by peripheral-type benzodiazepine receptor ligands.

Int. J. Biochem.,23,207-213.

Mukherjee,S,Mohammad,A,R,Das,S,K, 1990

Effects of dimethylbenz[a]anthracene-induced malignancy on the subcellular distribution of peripheral benzodiazepine receptors in submandibular glands of rats.

Biochem. Pharmacol.,40,1589-1594.

Mukhin,AG,Papadopoulos,V,Costa,E,Krueger,KE,1989

Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86,9813-9816.

Mukhin,AG,Zhong,P,Krueger,KE,1990

Cofraction of the 17kD PK 14105 binding site protein with solubilized peripheral-type benzodiazepine binding sites.

Biochem. Pharmacol.,40,983-989.

Murphy,KMM,Goodman,RR,Snyder,SH,1983.

Adenosine receptor localization in rat testes: biochemical and autoradiographic evidence for association with spermatocytes.

Endocrinology,83,1134-1299.

Munson,PJ,Rodbard,D,1980

LIGAND: a versatile computerized approach characterization of ligand-binding systems.

Anal. Biochem.,107,220-239.

- Myers,R,Manjil,LG,Cullen,BM,Price,GW,Franckwiak,RSJ,Cremer,JE,1991
Macrophage and astrocyte populations in relation to [³H]PK 11195 binding in rat cerebral cortex following a local ischaemic lesion.
J. Cer. Blood Flow. Metab.,11,314-322.
- Nakata,H,1990.
A₁ adenosine receptor of rat testis membranes.Purification and partial characterization.
J. Biol. Chem.,265,671-677.
- Newman,AH,1990
Irreversible ligands for drug receptor characterization.
Ann. Rep. Med. Chem.,25,271-280.
- Nielsen,M,Witt,MR,Thogersen,H,1988
[³H]diazepam specific binding to rat cortex in vitro is enhanced by oleic, arachidonic and docosahexenoic acid isolated from pig brain.
Eur.J.Pharmacol.,146,349-353.
- Olah,ME,Siles,GL,1992
Adenosine receptors.
Annu. Rev. Physiol,54,211-225.
- Olson,J,Junck,L,Young,A,Mancini,W,1988
Isoquinoline and peripheral type benzodiazepine binding in gliomas. implications for diagnostic imaging.
Cancer Res.,48,5837-5841.
- Palmieri,F,De Pinto,V,1989
Purification and properties of the voltage-dependent anion channel of the outer mitochondrial membrane.

J.bioenerg.biomemb.,21,417-425.

Papadopoulos,V,Berkovich,A,Krueger,E,Costa,E,Guidotti,A,1991

Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors.

Endocrinology,129,1481-1488.

Papadopoulos,V,Mukhin,AG,Costa,E,Krueger,KE,1990

The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis.

J. Biol. Chem.,265,3772-3779.

Papadopoulos,V,Nowzari,FB,Kreuger,K,1991

Hormone stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors.

J. Biol. Chem.,266,3682-3687.

Pappata,S,Cornu,P,Samson,Y,Prenant,C,Benavides,J,Scatton,B,Crouzel,C,Hauw,JJ,Syrota,A,1991

PET study of carbon 11 PK 11195 binding to peripheral benzodiazepine sites in glioblastoma: a case report.

J.Nucl. Med.,32,1608-1610.

Parola,AL,Laird,HE,1990

The bovine peripheral-type benzodiazepine receptor: a receptor with low affinity for benzodiazepines.

Life. Sci.,48,757-764.

Parola,AL,Mackenzie,NE,Laird,HE,1990

Photochemical derivatization of agarose: synthesis of an affinity agarose using a

photoaffinity ligand specific for the peripheral-Type benzodiazepine receptor
Anal. Biochem.,189,107-114.

Parola,A,Stump,DG,Pepperl,DJ,Krueger,DJ,Regan,JW,Laird,HE,1991
Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine peripheral-type
benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein.
J. Biol. Chem.,266,14082-14087.

Pazos,A,Cymerman,U,Probst,A,Palacios,JM,1986
Peripheral benzodiazepine binding sites in human brain and kidney:
autoradiographic studies.
Neurosci. Lett.,66,147-152.

Pellow,S,File,SE,1984
Behavioural actions of Ro 5-4864: A peripheral-type benzodiazepine?
Life Sci.,35,229-240.

Phillis,JW,Swanson,TH,Barraco,RA,1984
Interactions between adenosine and nifedipine in the rat cerebral cortex
Neurochem. Int.,6,693-699.

Price,GW,Ahier,RG,Hume,SP,Myers,R,Manjil,L,Crener,JE,Lutrhra,SK,Pascali,C
,Pike,V,Frackowiak,RSJ,1990
In vivo binding to peripheral benzodiazepine binding sites in lesioned rat brain:
comparison between [³H]PK 11195 and [¹⁸F]PK 14105 as markers of neuronal
damage.
J. Neurochem,55,175-185.

Raeburn,D,Miller,L,Summer,W,1987
Peripheral benzodiazepine receptor and airway smooth muscle relaxation.
J. Pharmacol. Exp. Ther.,245,557-562.

Ramagopal,MV,Mustafa,SJ,1988

Effect of adenosine and its analogues on calcium influx in coronary artery.

Am.Physiol.Soc.,255,H1492-H1498.

Rheaume,E,Tonon,MC,Smih,F,Simard,J,Desy,L,Vaudry,H,Pelletier,G,1990

Localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide in rat testis.

Endocrinology,127,1986-1994.

Richards,J,Mohler,H,Haefely,W,1982

Benzodiazepine binding sites: receptors or acceptors?

Trends Pharmacol. Sci.,3,233-235.

Riond,J,Mattei,M,Kaghad,M,Dumont,X,Guillemont,J,LeFur,G,Caput,D,Ferrara,P,1991

Molecular cloning and chromosomal localization of human peripheral type benzodiazepine receptor.

Eur. J. Biochem,195,305-311.

Riond,J,Vita,N,Le Fur,G,Ferrara,P,1989

Characterization of a peripheral-type benzodiazepine binding site in the mitochondrial of chinese hamster ovary cells.

FEBS. Lett.,245,238-244.

Ritta,N,Campos,MB,Calandra,RS,1986

Effect of gaba and benzodiazepines on testicular androgen production.

Life Sci.,40,791-798.

Ruff,MR,Pert,CB,Weber,RJ,Wahl,LM,Wahl,SM,Paul,SM,1985

Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes.

Science,229,1281-1283.

Ruiz,F,Hernandez,J,Ribeiro,JA,1988

Theophylline antagonizes the effect of diazepam on ventricular automaticity.

Eur. J. Pharmacol.,155,205-209.

Ruth,P,Flockerzi,V,Nettelblatt,EV,Oeken,J,Hofmann,F,1985

Characterization of the binding sites for nimodipine and(-)-desmethoxyverapamil in bovine cardiac sarcolemma.

Eur. J. Biochem.,150,313-322.

Saano,V,Rago,L,Raty,M,1989

Peripheral benzodiazepine binding sites.

Pharmacol. Ther.,41,503-514.

Sadzot,B,Frost,JJ,1990

Benzodiazepine Receptors.

Neuroreceptors,8,109-127.

Sarter,M,Schneider,HH,1988

High density of benzodiazepine binding sites in the substantia innominata of the rat.

Pharmacol. Biochem. Behav.,30,679-682.

Scatton,B,Benavides,J,Dubois,A,Bourdiol,F,1990

Proliferation of omega 3 binding sites in the immune organs and leg infiltrate of rats with adjuvant induced arthritis.

Int. J. Tissue. Reac.,12,15-20.

Schlumpf,M,Parmar,R,Ramseier,HR,Lichtensteiger,W,1990

Prenatal benzodiazepine immunosuppression: Possible involvement of peripheral benzodiazepine site.

Dev. Pharmacol. Ther.,15,178-185.

Schoemaker,H,Bliss,M,Yamamura,H,1981

Specific high-affinity saturable binding [³H]Ro 5-4864 to benzodiazepine binding sites in the rat cerebral cortex.

Eur. J. Pharmacol.,71,173-175.

Schoemaker,H,Boles,R,Horst,W,Yamahura,H,1983

Specific high-affinity binding sites for [³H]Ro 5-4864 in rat brain and kidney.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,225,61-69.

Schoemaker,H,Morelli,M,Deshmukh,P,Yamamura,HI,1982

[³H]Ro 5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia.

Brain Res.,248,396-401.

Shin-ichi,M,Tsuneaki,S,Masafumi,F,1990

Interaction of lipocortin I with peripheral-type benzodiazepine binding sites.

Eur. J. Pharmacol.,189,233-236.

Shiraishi,T,Black,KL,Ikezaki,K,Becker,DP,1991

Peripheral benzodiazepines induces morphological changes and proliferation of mitochondria in glioma cells.

J. Neurosc. Res., 30,463-474

Shoyab,M,Gentry,LE,Marquardt,H,Todaro,GJ,1986

Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepineoid (Endozepine) from bovine and human brain.

J. Biol. Chem.,261,11968-11973.

Singh,P,Ojha,TN,Sharma,RC,1990

Quantitative structure-activity relationship study on some ligands acting as

inhibitors of benzodiazepine-receptor binding.

Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.,67,151-154.

Skolnick,P,Paul,SM,1988

The benzodiazepine/gaba receptor chloride channel complex.

ISI Atlas of Sci:Pharmacology,19,22-30.

Skowronski,R,Fanestil,DD,Beamont,K,1988

Photoaffinity labeling of peripheral-type benzodiazepine receptors in rat kidney mitochondria with [³H]PK 14105.

Eur. J. Pharmacol.,148,187-193.

Slobodyansky,E,Guidotti,A,Wambebe,C,Berkovich,A,Costa,E,1989

Isolation and characterization of a rat brain triakontatetrapeptide, a postranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site.

J. Neurochem.,53,1276-1284.

Snyder,SH,Verma,A,Trifiletti,R,1987

The peripheral type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands.

FASEB J.,1,282-288.

Speth,RC,Wastek,GJ,Yamamura,HI,1979

Benzodiazepine receptors: temperature dependence of [³H]flunitrazepam binding.

Life Sci.,24,351-358.

Stepien,H,Kunert-radek,J,Stanisz,A,Zerek-Melen,G,Pawikowski,M,1991

Inhibitory effect of porphyrins on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro.

Biochem. Biophys. Res. Commun.,174,313-322.

Stryer,L.,1988

Bioquímica, 3ª edición.

Editorial Reverté.

Suranyi-cadotte,B,Lal,S,Nair,N,Lafaille,F,Quirion,R,1987

Coexistence of central and peripheral benzodiazepine binding sites in the human pineal gland.

Life Sci.,40,1537-1543.

Syapin,PJ,Alkana,RL,1988

Chronic ethanol exposure increases peripheral-type benzodiazepine receptors in brain.

Eur. J. Pharmacol.,147,101,109,

Tacconi,M,Salmona,M,1988

Differential effects of benzodiazepines on phospholipid methylation in hippocampus and cerebellum of rats.

Life Sci. 525-531

Taft,W,DeLorenzo,R,1984

Micromolar-affinity benzodiazepine receptors regulate voltage-sensitive calcium channels in nerve terminal preparations.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,81,3118-3122.

Taniguchi,T,Wang,J,Spector,S,1980

Properties of [³H]diazepam binding to rat peritoneal mast cells.

Life. Sci.,27,171-178.

Tong,Y,Rhéaume,E,Simard,J,Pelletier,G,1991

Localization of peripheral benzodiazepine binding sites and diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA in mammary glands and dimethylbenz(α)anthracene.

(DMBA)-induced mammary tumors in the rat.

Reg. Pep.,33,263-273.

Tonon,MC,Désy,L,Nicolas,P,Vaudry,H,Pelletier,G,1990

Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain.

Neuropeptides,15,17-24.

Triggle,DJ,Langs,DA,Janis,RA,1989

Ca channel ligands: structure function relationships of the 1,4-dihydropyridines.

Med. Res. Rev.,9,123-180.

Triggle,DJ,Rampe,D,1989

1,4-dihydropyridine activators and antagonists: structural and functional distinctions.

Trends Pharmacol. Sci.,10,507-511.

Verma,A,Nye,JS,Snyder,SH,1987

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

Proc.Natl. Acad. Sci. USA.,84,2256-2260.

Verma,A,Snyder,S,1989

Peripheral type benzodiazepine receptors.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.,29,307-322.

Vijayaraghavan,S,Hoskins,DD,1986

Regulation of Bovine Sperm Motility and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate by Adenosine and Its Analogues.

Biol. of Reprod.,34,468-477.

Wang,JKT,Taniguchi,T,Spector,S,1984

Structural requirements for the binding of benzodiazepines to their peripheral-type sites.

Mol. Pharmacol.,25,349-351.

Watjen,F,Baker,R,Herbert,R,1989

Novel benzodiazepine receptor partial agonist: Oxadiazolyylimidazobenzodiazepines

Am. Chem. Soc.,32,2282-2291.

Weissman,BA,Cott,J,Jackson,JA,Bolger,GT,Weber,KH,Horst,WD,Paul,SM,Skolnick,P,1985

Peripheral-type Binding sites for benzodiazepines in brain: Relationship to the Convulsant actions of Ro 5-4864.

J. Neurochem.,44,1494-1499.

Weis,SRB,Post,RM,1991

Contingent tolerance to carbamazepine: a peripheral-type benzodiazepine mechanism.

Eur. J. Pharmacol.,193,159-163.

Weizman,R,Gavish,M,1989

Chronic diazepam treatment induces an increase in peripheral benzodiazepine binding sites.

Clin. Neuropharmacol.,12,346-351.

Wu,PH,Phillis,JW,1984

Uptake by central nervous tissues as a mechanism for the regulation of extracellular adenosine concentrations.

Neurochem. Int.,6,613-632.

Zernig,G,Glossmann,H,1988

A novel 1,4-dihydropyridine-binding site on mitochondrial membranes from guinea-pig heart, liver and kidney.

Biochem. J.,253,49-58.

Zernig,G,Moshammer,T,Graziadei,I,Glossmann,H,1988

The mitochondrial high-capacity low-affinity [³H]nitrendipine binding site is regulated by nucleotides.

Eur.J.Pharmacol.,157,67-73.

Zivin,JA,Waud,DR,1986

Analysis of one-component saturable systems such as ligand binding, enzyme kinetic uptake and transport data.

J. Pharmacol. Meth.,16,1-22.

"IDENTIFICACION DE UN TRANSPORTADOR DE ADENOSINA A PARTIR DE ESTUDIOS SOBRE EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO".

FE DE ERRATAS

- Pág. 124, línea 3. Donde dice "...en el medio 5 a 5 min. ..." debe decir "... en el medio a 5 min. ..." .
 - Pág. 128, línea 11. Donde dice "... y $B_{\max} = 6050 \pm 583$." debe decir "... y $B_{\max} = 6050 \pm 583$ en la de rata).".
 - Pág. 131, línea 22. Donde dice " desplazaron competitivamente ..." debe decir "desplazaron de forma no competitiva y competitiva, respectivamente ..."
-