



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Mecanismo de acción de las benzodiazepinas a nivel periférico

Mercè Pallàs Lliberia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y QUIMICA TERAPEUTICA

UNIDAD DE FARMACOLOGIA Y FARMACOGNOSIA

**'MECANISMO DE ACCION DE LAS BENZODIACEPINAS
A NIVEL PERIFERICO'**

Tesis que presenta Dña. Mercè Pallás Libería,
dirigida por el Dr. Jorge Camarasa García y la
Dra. Elena Escubedo Rafa, para la obtención del
Grado de Doctor en Farmacia.

Barcelona, Septiembre de 1991.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Unidad de Farmacología
y Farmacognosia

Prof. Dr. Jorge Camarasa

Núcleo Universitario de Pedralbes
Tel. (93) 330 99 16
08028 Barcelona

Facultad de Farmacia

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

CERTIFICAN: Que la presente Memoria titulada "Mecanismo de acción de las benzodiazepinas a nivel periférico", presentada por Mercè Pallás Llibería, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, Septiembre de 1991.

Dr. Jorge Camarasa

Dra. Elena Escubedo

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081303

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, al Dr. D. Jorge Camarasa y a la Dra. Dña. Elena Escubedo por guiarme y apoyarme durante el desarrollo de esta Tesis. Asimismo, quiero agradecerles la confianza y el sincero interés que han mostrado hacia mí y que hayan sabido transmitirme su pasión y dedicación hacia el trabajo de investigación.

Al Dr. D. Tomás Adzet, Director de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia, por el interés que siempre me ha dispensado.

Al Dr. D. José Iglesias, por haber facilitado mi trabajo en el Laboratorio Farmacología y Farmacognosia.

A M^a Carmen Núñez y Andrés Jimenez, por compartir conmigo parte del trabajo experimental de esta Tesis y ofrecerme su amistad.

Al Dr. D. Juan Carlos Laguna y al Dr. D. Manel Merlos por mostrarme siempre su sincero interés y prestarme su ayuda cuando ha sido necesaria.

A M^a Teresa Iglesias por su cariño y su inestimable ayuda en parte del trabajo experimental facilitando la realización de esta Tesis.

También desearía mostrar mi gratitud a todos los integrantes de la misma línea de investigación, con quienes he compartido los medios, la finalidad y el interés de una misma meta.

A todos los compañeros de la Unidad por compartir conmigo tantas horas en el laboratorio, en especial a Rosa y Rosa M^a.

A Carmen Pueyo, por seguir siendo mi mejor amiga después de todos estos años.

El reconocimiento hacia mis padres que han sabido inculcarme el valor y la satisfacción del trabajo bien hecho. Sin su interés y apoyo no hubiera podido seguir adelante.

Muy especialmente a José Luis, por entender lo que representa mi trabajo, no dejar nunca de animarme en todo momento y por compartir las mismas inquietudes.

INDICE

INDICE

INTRODUCCION	1
---------------------------	----------

I.-PARTE TEORICA

1.-BENZODIAZEPINAS	7
1.1-Introducción.....	7
1.2.-Características químicas	7
1.3.-Mecanismos moleculares de acción de las benzodiazepinas a nivel central	9
1.3.1.-Acción sobre la neurotransmisión	9
1.3.2.-El receptor benzodiazepínico central	10
1.3.3.-Organización del complejo supramolecular	11
1.3.5.-Relación funcional entre el receptor gabaérgico y el benzodiazepínico	14
1.4.-Agonistas, antagonistas y agonistas inversos	16
1.5.-Ligando endógeno	17
2.-EL RECEPTOR BENZODIAZEPINICO PERIFERICO.....	18
2.1.-Características diferenciales con el receptor benzodiazepínico central .	18
2.2-Localización del receptor benzodiazepínico periférico	22
2.2.1.-Distribución tisular	22
2.2.1.1.-Localización y regulación en tejidos periféricos	22
2.2.1.2.-Localización y regulación en el sistema nervioso central	23
2.2.2.-Distribución subcelular	24
2.3.-Características moleculares	25
2.4.-Ligandos endógenos potenciales para los receptores periféricos	28
2.5.-Relevancia fisiológica de los lugares de unión periféricos	31

3.-NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA	34
3.1.-Inositolfosfatos como segundos mensajeros	35
3.2.-Lípidos precursores de segundos mensajeros	36
3.3.-Metabolismo de los inositolfosfatos	37
3.4.-Acciones de los segundos mensajeros derivados de los fosfatidilinositoles	39
3.4.1.-Inositol 1,4,5-trifosfato y liberación de calcio	39
3.4.2.-Diacilglicerol y proteínaquinasa C	40
3.5.-Activación de la fosfolipasa C por una proteína G	41
4.-NEUROTRANSMISION COLINERGICA	44
4.1.-Proteínas G	45
4.1.1.-Estructura de las proteínas G	46
4.1.2.-Mecanismo de activación y acción de las proteínas G	46
4.1.3.-Proteínas G; su identificación por toxinas	48
4.2.-Proteínas G y canales iónicos	49
4.2.1.-Control indirecto de los canales iónicos por las proteínas G	49
4.2.2.-Control directo de los canales iónicos por proteínas G	50
5.-IMPORTANCIA DEL CALCIO	51
5.1.-Movilización del calcio intracelular	52
5.1.1.-Almacenes intracelulares de calcio	52
a.-Retículo endoplásmico	52
b.-Mitocondria	52
5.1.2.-Liberación de calcio inducida por calcio (CICR)	54
5.1.3.-Liberación de calcio inducida por inositoltrifosfato	54
5.2.-Movilización de calcio en la membrana plasmática	55
5.2.1.-Canales de calcio voltaje-dependientes	55
5.2.1.1.-Antagonistas del calcio	58
5.2.2.-Canales de calcio receptor-dependientes	61
5.3.-El ión de calcio en la contracción	63
5.4.-Benzodiazepinas y canales de calcio	65
5.4.1.-Relación de las benzodiazepinas centrales con el canal de calcio	65

5.4.2.-Relación de las benzodiazepinas periféricas con el canal de calcio ...	66
5.4.3.-Especificidad de acción de las benzodiazepinas en los canales de calcio.....	67

II.-PARTE EXPERIMENTAL

A.-EXPERIENCIAS EN CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA	69
1.-Obtención y montaje en baño de órganos del conducto deferente de rata	69
2.-Protocolo experimental de la estimulación del conducto deferente con noradrenalina exógena	70
2.1.-Resultados	71
2.2.-Influencia de la concentración de calcio en la solución fisiológica nutritiva sobre las contracciones inducidas por noradrenalina exógena	76
3.-Protocolo experimental de la estimulación con calcio	80
3.1.-Resultados	81
4.-Protocolo experimental de la despolarización inducida por KCl	86
4.1.-Resultados	86
4.2.-Influencia de la concentración de calcio en la solución fisiológica nutritiva en las contracciones inducidas por KCl	100
5.-Protocolo experimental de las contracciones inducidas eléctricamente .	101
5.1.-Efecto de las benzodiazepinas, PK 11195 y algunos antagonistas del calcio en las contracciones inducidas eléctricamente	104
5.1.1.-Resultados	105
5.1.2.-Influencia de la concentración de calcio del medio en las contracciones inducidas eléctricamente	119
5.2.-Modificación por benzodiazepinas y PK 11195 del efecto de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente	121
5.2.1.-Resultados de la estimulación eléctrica en presencia de adenosina	124
6.-Estudio de la movilización de calcio	133

6.1.-Entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$	133
6.1.1.-Entrada de calcio inducida por despolarización con KCl	133
6.1.2.-Entrada de calcio inducida por AlF_4^-	134
6.2.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$	134
6.2.1.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en condiciones normales	134
6.2.2.-Salida de calcio inducida por noradrenalina	135
6.3.-Resultados	135
6.3.1.-Entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$	136
6.3.1.1.-Influencia de los factores experimentales en la captación de calcio	136
6.3.1.2.-Efecto de las benzodiazepinas y PK 11195 en la entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en conducto deferente de rata	144
6.3.1.3.-Entrada de calcio inducida por AlF_4^-	146
6.3.2.1.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ basal	148
6.3.2.2.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ inducida por noradrenalina	148
7.-Hidrólisis de fosfatidilinositoles en conducto deferente de rata	152
7.1.-Protocolo experimental	152
7.2.-Resultados	154
B.-EXPERIENCIAS EN DUODENO AISLADO DE RATA	157
1.-Obtención y montaje del duodeno aislado de rata	157
2.-Curvas dosis-respuesta al carbacol	158
2.1.-Caracterización de la respuesta al carbacol en presencia de benzodiazepinas y PK 11195	158
2.1.1.-Experiencias en presencia de AlF_4^-	158
2.1.2.-Experiencias en presencia de toxina pertussis y toxina colera	159
2.2.-Resultados	160
2.2.1.-Curvas dosis-respuesta al carbacol	160
2.2.2.-Caracterización de la respuesta al carbacol en presencia de benzodiazepinas y PK 11195. Influencia del calcio extracelular	169
2.2.2.1.-Experiencias en presencia de AlF_4^-	170
2.2.2.2.-Experiencias en presencia de toxina pertussis y toxina colera	179

C.-EFECTO DE LAS BENZODIACEPINAS Y DEL PK 11195 SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA	183
1.1.-Protocolo experimental	183
1.2.-Resultados	185
FARMACOS Y REACTIVOS	187
III.-DISCUSION	
Discusión.....	190
IV.-CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	204
V.-BIBLIOGRAFIA	
Bibliografía.....	207

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Durante los últimos 20 años las benzodicepinas se han convertido en uno de los grupos de fármacos más utilizados en diversas áreas terapéuticas, incluyéndose el tratamiento de la ansiedad, el insomnio y la epilepsia. Asimismo son utilizados de forma habitual como relajantes musculares en algunas afecciones específicas como los espasmos musculares y como premedicación en anestesia.

La popularidad de las benzodicepinas como ansiolíticos ha aumentado de forma espectacular desde que se introdujeron en terapéutica. La primera benzodicepina introducida en clínica fue el clordiazepóxido en 1960; durante un período de más de 10 años se sintetizaron y comercializaron un gran número de estos compuestos con efectos terapéuticos diferenciados, se ha logrado así una cierta selectividad de acción y, por tanto, de indicación terapéutica. De este modo, el flunitrazepam y el temazepam al producir una sedación intensa, suelen usarse como fármacos de elección en el tratamiento del insomnio, mientras que el clonazepam, se utiliza preferentemente como anticonvulsivo.

El mecanismo de acción que media estas acciones es ampliamente conocido y está relacionado, a nivel del sistema nervioso central, con la interacción de estos fármacos con un receptor específico de alta afinidad que forma parte del complejo-receptor GABA-ionoforo del cloro. El ácido gamma-aminobutírico es un neurotransmisor con actividad inhibidora en el sistema nervioso central. Así, la activación del sistema gabaérgico lleva consigo la inhibición de la actividad otras células, como pueden ser, por ejemplo, las noradrenérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas. Estudios electrofisiológicos demuestran que las benzodicepinas ejercen su acción a través de la potenciación de la actividad del GABA (Costa y col., 1979).

A partir de 1980 se abre un nuevo campo de investigación para estos compuestos al identificarse un segundo tipo de sitios de unión. LeFur y col. (1983a; 1983b) demostraron que las benzodicepinas, no sólo interactúan con su receptor a nivel de sistema nervioso central, sino que son capaces de

unirse a otros sitios específicos en tejidos periféricos, que no están relacionados ni con el GABA ni con el ionoforo de cloro.

Tanto la especificidad como la afinidad de estos compuestos por estos lugares de unión es distinta de la que se observa para los receptores benzodiazepínicos centrales y se les ha denominado receptores benzodiazepínicos periféricos. Existen ligandos específicos que reconocen con alta afinidad el receptor benzodiazepínico periférico, como son el Ro 5-4864 y el PK 11195, que han facilitado el estudio de este receptor. Gracias a ello, se ha podido demostrar la presencia de este tipo de sitio de unión, no sólo a nivel de tejidos periféricos sino también a nivel de sistema nervioso central (Benavides y col., 1984), aunque su distribución en éste es completamente diferente de la de los receptores benzodiazepínicos centrales, como han demostrado los estudios autorradiográficos en cerebro de rata (Anholt y col., 1984; Benavides y col., 1983).

El papel de este sitio de unión a nivel fisiológico está aún por determinar, a pesar del conocimiento extensivo de su localización, tanto anatómica como celular. En un principio se han sugerido funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular (Anholt y col., 1986); el Ro 5-4864 ha sido descrito como un compuesto convulsivante y ansiogénico tanto en roedores como en humanos (Pellow y col., 1984). Sin embargo, los últimos trabajos apuntan hacia un posible efecto estimulador de la esteroidogénesis a través de la interacción de las benzodiazepinas con su receptor a nivel periférico (Yanagibashi y col., 1989).

Existen diversos estudios que sugieren que el receptor benzodiazepínico periférico podría estar relacionado con los canales de calcio voltaje-dependientes (Mestre y col., 1985; Taft y col., 1984; Bender y col., 1985). Si esta relación se confirmara, la terapia de la ansiedad con benzodiazepinas podría afectar los procesos mediados a través de los canales de calcio voltaje-dependientes y debería tenerse en cuenta su posible interacción con otros tratamientos en los que se utilizaran los antagonistas del calcio, como es el caso de la angina de pecho o la hipertensión. Sin embargo, las elevadas concentraciones que se precisan para la modulación de

estos canales de calcio cuestionan que exista una relación directa entre los canales de calcio voltaje-dependientes y los receptores benzodiazepínicos periféricos.

Por otra parte, se ha citado (Clanachan y col., 1979; 1980) que el diazepam potencia la respuesta de la adenosina en tejidos periféricos y se ha relacionado este compuesto con el mecanismo de recaptación de la adenosina. Esta potenciación se produce pues por un mecanismo de acción que no implica a los receptores benzodiazepínicos periféricos. La adenosina y sus derivados fosfatados son responsables del control y modificación de un gran número de procesos fisiológicos, tanto a nivel periférico como a nivel del sistema nervioso central. Por una parte afectan la actividad de la adenilato ciclasa y a, por lo menos, dos tipos de corrientes iónicas (K^+ y Ca^{+2}) (Fredholm y col., 1988). Por otra parte se ha observado que los niveles extracelulares de adenosina aumentan tras períodos de isquemia, hipoxia e hipercapnia, así como tras las crisis epilépticas, por lo cual se considera a la adenosina como un anticonvulsivante endógeno, ya que inhibe la liberación de neurotransmisores excitadores, pero no la de neurotransmisores inhibidores (tipo GABA) (Dragunow y col., 1988). La potenciación por benzodiazepinas de la acción adenosínica, por inhibición de la recaptación de esta sustancia, se sumaría a su acción facilitadora del sistema gabaérgico.

El OBJETIVO de la presente Tesis ha sido la caracterización del mecanismo de acción de estos compuestos a nivel de algunos tejidos periféricos, utilizando para ello el agonista específico de los receptores benzodiazepínicos periféricos, el Ro 5-4864, el antagonista PK 11195, un agonista mixto de los receptores benzodiazepínicos centrales y periféricos, el diazepam, y un agonista específico de los receptores benzodiazepínicos centrales, el clonazepam. El hecho de que estos compuestos hayan presentado una actividad moduladora de diferentes procesos de contracción del músculo liso, hace que sea interesante determinar el mecanismo concreto de acción a este nivel.

Se han utilizado fármacos específicos del receptor gabaérgico para determinar la posible implicación del sistema gabaérgico en las acciones de las benzodiazepinas a nivel de tejidos periféricos.

Asimismo, para dilucidar la posible relación de estos compuestos con los canales de calcio voltaje-dependientes se han realizado estudios comparativos con antagonistas de los canales de calcio voltaje-dependientes, para determinar la implicación de estos compuestos en la movilización del calcio a nivel de la membrana celular. También se ha estudiado la influencia de estos compuestos en la movilización del calcio a nivel de sus almacenes intracelulares y a través de su regulación por el sistema de segundos mensajeros de los fosfatidilinositoles.

Por otra parte, la demostrada capacidad que presentan las benzodiazepinas de inhibir la recaptación de la adenosina, relaciona estos compuestos con otros de acción similar, como el dipiridamol. El dipiridamol es también capaz de inhibir la actividad de la fosfodiesterasa a nivel del sistema circulatorio, lo que explica su efecto inhibitor de la agregación plaquetaria. Teniendo en cuenta la relación existente entre los procesos de contracción-relajación muscular y la actividad de este enzima, se ha determinado también la acción de las benzodiazepinas sobre este enzima y la posible relación de éste con el mecanismo de acción de estos compuestos a nivel periférico.

I.-PARTE TEORICA

1.-BENZODIACEPINAS

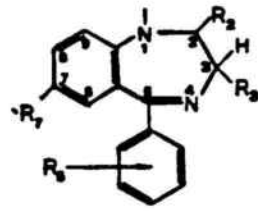
1.1.-Introducción.

Las benzodiazepinas se introdujeron en la terapia de la ansiedad a principios de los años sesenta. Además se utilizaron en el tratamiento del insomnio, epilepsia y como relajantes musculares. Realmente no aportaron acciones nuevas, ya que las actividades más relevantes, como la ansiolítica, hipnótica, miorrelajante, anticonvulsivante y antiepiléptica eran inducidas por otros fármacos ya conocidos y utilizados como los barbituratos y el meprobamato; sin embargo su ventaja radica en su relación positiva beneficio-riesgo. Una propiedad común a las benzodiazepinas y barbituratos es que provocan sedación, pero en el caso de las benzodiazepinas la depresión del Sistema Nervioso Central no es predominante y puede conseguirse una acción sedante ligera, facilitando su uso mantenido con menos riesgo de tolerancia y farmacodependencia. Asimismo, se ha logrado ejercer una acción anticonvulsivante, evitando el peligro de una depresión profunda, coma y parada respiratoria (Flórez, J., 1989; Flórez y col., 1987).

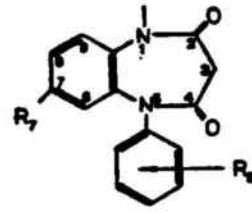
A pesar de su amplia utilización, el mecanismo de acción permaneció desconocido hasta que se descubrió que estos fármacos potenciaban la acción inhibitoria del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA). Desde entonces, la interacción entre benzodiazepinas y GABA, así como su implicación en la farmacología humana han sido objeto de numerosos estudios.

1.2.-Características químicas.

El núcleo común es el anillo benzodiazepínico (Fig. 1). La mayoría posee los N del anillo diazepina en posiciones 1 y 4, pero algunos los tienen en posición 1 y 5 (p. ej., clobazam). Todos ellos incluyen un radical en posición 9, generalmente Cl o NO₂; con frecuencia, en las benzodiazepinas recientemente sintetizadas se incorpora un grupo carbonilo



1,4-benzodiazepina



1,5-benzodiazepina

	N ₁	R ₂	R ₃	Posic. 4	R ₄	R ₅
<u>1,4-benzodiazepinas</u>						
Bromacepam	N—H	=O	—H			—Br
Cloracepato dipotásico	N—H		—COOK		—C ₆ H ₅	—Cl
Clordiazepóxido	N—H		—H	N—O	—C ₆ H ₅	—Cl
Diazepam	N—CH ₃	=O	—H		—C ₆ H ₅	—Cl
Flunitracepam	N—CH ₃	=O	—H			—NO ₂
Fluracepam	N—CH ₂ —CH ₂ —N(C ₂ H ₅) ₂	=O	—H			—Cl
Loracepam	N—H	=O	—OH			—Cl
Medacepam	N—CH ₃		—H		—C ₆ H ₅	—Cl
Nitracepam	N—H	=O	—H		—C ₆ H ₅	—NO ₂
Oxacepam	N—H	=O	—OH		—C ₆ H ₅	—Cl
Pracepam	N—CH ₂ —	=O	—H		—C ₆ H ₅	—Cl
Temacepam	N—CH ₃	=O	—OH		—C ₆ H ₅	—Cl
Triazolam			—H			—Cl
<u>1,5-benzodiazepinas</u>						
Clobazam	N—CH ₃	=O	—H	C=O	—C ₆ H ₅	—Cl

Figura 1: Estructura química de las principales benzodiazepinas.

en posición 2 ya que de esta forma se consigue incrementar notablemente su actividad. Por otra parte, gracias a la introducción de anillos adicionales se han obtenido series derivadas como las triazolobenzodiazepinas (p. ej., alprazolam) y tienodiazepinas (p. ej., bentracepam).

Las diversas sustituciones provocan cambios importantes en:

a.- Los efectos farmacológicos centrales, ansiolíticos, sedación, acción antiepiléptica, miorelajación central.

b.- La potencia farmacológica.

c.- Las propiedades farmacocinéticas, que influyen de manera decisiva en la distribución del producto y en la duración de su acción. La mayoría tienen propiedades equivalentes. Además muchas benzodiazepinas presentan metabolitos biológicamente activos.

1.3.-Mecanismos moleculares de acción de las benzodiazepinas a nivel central.

1.3.1.- Acción sobre la neurotransmisión.

De todos los sistemas de neurotransmisión conocidos hasta ahora, el que es más directamente afectado por las benzodiazepinas es el sistema del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Costa y col., 1979). El GABA es uno de los neurotransmisores conocidos con mayor acción inhibitoria. En múltiples estudios realizados, tanto a nivel de respuesta de un órgano como a nivel de respuesta bioeléctrica celular, se ha podido comprobar que las benzodiazepinas y los barbituratos mimetizan o incrementan la actividad inhibitoria del GABA (Tallman y col., 1978; 1980).

Gracias a estos estudios se puede concluir que las benzodiazepinas modulan los procesos sinápticos de transmisión gabérgica. Ahora bien, por sí solas no incrementan los niveles de GABA, no alteran su recaptación, ni inhiben su metabolismo y tampoco facilitan su liberación; en consecuencia, estos fármacos no actúan a nivel de la neurona presináptica. Por otra parte, su acción GABA-mimética se aprecia si existe transmisión gabérgica fisiológica o facilitada por la aplicación exógena del aminoácido. Pero no

son fármacos agonistas propiamente dichos de los receptores gabaérgicos. Por tanto, aunque su sitio anatómico de acción sea a nivel postsináptico, deben actuar sobre el receptor GABA de manera indirecta mediante la facilitación específica de la activación de dicho receptor. Esto significa que la benzodiazepina ha de reconocer un locus específico próximo al locus del GABA y activarlo, por ejemplo, por incremento de la afinidad entre GABA y su propio receptor, lo que inducirá posteriormente la apertura del canal de cloro acoplado al receptor gabaérgico, con la correspondiente inhibición de la neurotransmisión.

En definitiva, este mecanismo requiere que existan en la membrana neuronal elementos específicos de reconocimiento para las benzodiazepinas, es decir, receptores benzodiazepínicos específicos (Skolnick y col., 1988).

1.3.2.- El receptor benzodiazepínico central.

En ensayos "in vitro" mediante estudios de fijación de ligandos marcados, se ha podido comprobar la existencia en las membranas neuronales de lugares que poseen una elevada afinidad por las benzodiazepinas. Esta fijación es estereoespecífica, saturable y desplazable por las benzodiazepinas entre sí, caracteres todos ellos que señalan con evidencia que dichos lugares poseen las cualidades de un receptor específico para las benzodiazepinas (Braestrup y col., 1977a; 1977b; 1978; Davies y col., 1978). Además, se observa una buena correlación entre los valores que indican la afinidad de cada benzodiazepina por el sitio receptor y la correspondiente potencia farmacológica observada (Squires y col., 1977; Möhler y col., 1977). Ello confirma la idea de que existen receptores específicos para las benzodiazepinas en el sistema nervioso central, cuya activación es responsable de algunas de sus acciones farmacológicas. La distribución de estos receptores en el cerebro es amplia aunque no homogénea, como se comprueba en estudios de cuantificación bioquímica de receptores (Braestrup y col. 1977a; Möhler y col., 1978), así como en estudios autoradiográficos (Young y col., 1979; 1980), observándose que se

encuentra asociado física y funcionalmente al subgrupo de receptores GABA_A.

Aunque parece que todos los receptores benzodiazepínicos centrales forman parte de los receptores GABA_A, no se puede afirmar que todos los receptores gabaérgicos de este tipo estén asociados a receptores benzodiazepínicos. Asimismo, estudios realizados por Olsen y colaboradores (1982) demostraron una compleja interacción alostérica entre los receptores benzodiazepínicos y los GABA_A, con el denominado receptor picrotoxina/barbiturato, que se creía localizado en el ionóforo del cloro (Leeb-Lunderg y col., 1982). Esta interacción se comprobó con la utilización del [³²S] t-butil-biciclofosforotionato (TBSP), compuesto que se une al canal del cloro de forma aún más específica que la picrotoxina (Squires y col., 1983). Esta, junto con barbituratos y pirazolopiridinas, inhiben la unión del TBSP al ionóforo, y potencian la unión de las benzodiazepinas y el GABA in vitro (Ticku y col., 1986). El hecho que concentraciones suficientes de TBSP sean capaces de eliminar la potenciación de la picrotoxina sobre las benzodiazepinas, además de estudios adicionales electrofisiológicos (MacDonald y col., 1978; Mathers y col., 1980; Barnes y col., 1983), supone que podemos restringir la acción de picrotoxina, barbituratos y sustancias análogas al canal del cloro.

1.3.3.- Organización del complejo supramolecular.

La necesidad de elucidar la intrincada relación entre los receptores del GABA y el benzodiazepínico se ha visto satisfecha gracias a la utilización de técnicas de solubilización y purificación con detergentes, así como de técnicas autorradiográficas y de visualización inmunocitoquímica de receptores benzodiazepínicos en el sistema nervioso central.

Utilizando diferentes detergentes, se han conseguido purificar los receptores gabaérgico y benzodiazepínico (Sigel y col., 1984; Olsen y col., 1984) conservándose su capacidad interactiva. Recientemente se ha demostrado la presencia de un tercer componente en el complejo receptor

GABA_A-benzodiazepinas, reconocido como el lugar de unión para el TBSP (Stephenson y col.,1982).

El peso molecular de este complejo supramolecular está comprendido entre 220.000 y 355.000 (Stephenson y col., 1982). Estudios de unión con flunitrazepam tritiado (Sieghart y col.,1980, 1983) y muscimol marcado (Asano y col., 1983; Deng y col., 1986) han permitido establecer los pesos moleculares de las proteínas integrantes y que están comprendidos entre 50.000- 60.000. Este peso molecular estimado para las subunidades del receptor benzodiazepínico (α) y del gabaérgico (β), están en concordancia con los obtenidos (48.800-51.400) a través de la expresión de DNAs complementarios que codifican estas subunidades (Deng y col.,1986). Asimismo, la co-expresión a partir de RNAs de estas subunidades en oocitos de *Xenopus* (Schofield y col.,1987), conduce a la obtención de canales cloro GABA-dependientes, sensibles a la acción de las benzodiazepinas, de los barbitúricos y de la picrotoxina.

Estos resultados sugieren que el complejo receptor formado por el receptor benzodiazepínico acoplado al gabaérgico y el canal de cloro se forma por agrupamiento de las subunidades α y β . Se ha propuesto una configuración tetramérica para este complejo supramolecular formado por el receptor del GABA y el ionóforo del cloro, que se configuraría como $\alpha_2\beta_2$ (Fig. 2) (Schofield y col.,1987) que estaría de acuerdo con los datos obtenidos a nivel del peso molecular determinado.

La visualización, por técnicas autorradiográficas, de la unión de las benzodiazepinas a su receptor muestra una estrecha relación entre la localización de estos receptores y los receptores gabaérgicos en la mayoría de tejidos cerebrales estudiados (Unnerstall y col.,1981; Polc, 1988).

Los estudios más recientes se han llevado a cabo, mediante técnicas que implican la participación de anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos no sólo inmunoprecipitan el complejo macromolecular con los tres lugares de unión acoplados alostéricamente (GABA_A, benzodiazepinas y TBSP), sino que muestran su amplia localización en el SNC, como ocurre

en las técnicas autorradiográficas (Schoch y col., 1985). Un análisis detallado muestra una mayor localización de este complejo en los cuerpos neuronales y en zonas del SNC donde las neuronas gabérgicas muestran una mayor densidad.

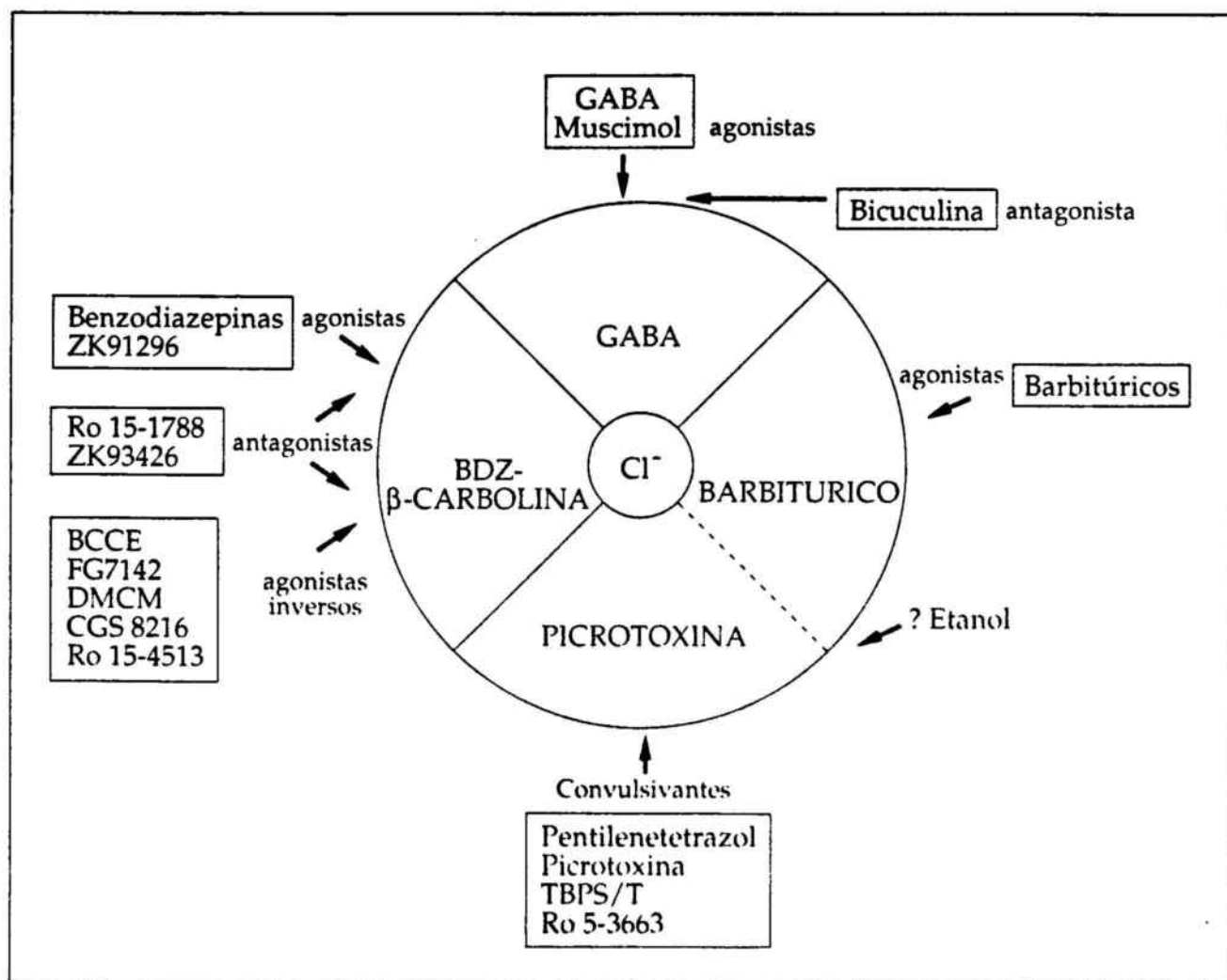


Figura 2: El complejo GABA/benzodiazepina/ionóforo del cloro. En la figura se muestran los diferentes sitios receptores dentro del complejo, y se señalan algunos ejemplos de los ligandos que interactúan con ellos como agonistas, antagonistas y agonistas inversos. De Lister y Nutt, 1987.

1.3.4.- Relación funcional entre el receptor gabaérgico y el benzodiazepínico.

El mecanismo de acción de las benzodiazepinas es la inducción de cambios conformacionales de los receptores que integran el complejo supramolecular. Este cambio conformacional, que tan sólo se da cuando el fármaco se une al receptor, es el que determinará la eficacia de dicho fármaco. Estos cambios conformacionales únicamente pueden explicarse a nivel molecular si se acepta que el fármaco se une a distintos estados del receptor y con distinta afinidad. El estado de reposo y el activado representarían los estados de cierre y apertura, respectivamente, del canal de cloro. La presencia de dos clases de sitios de unión en el complejo receptor implica necesariamente el tener en cuenta los fenómenos de cooperatividad. Cualquier combinación de dos fármacos que se unen a distintos sitios de unión y que pueden acceder a estados activados o de reposo desarrollará la cooperatividad. Esta combinación es de tipo heterotrópico puesto que la interacción supone la unión a distintos sitios (el receptor gabaérgico y el benzodiazepínico) (Pellow y File, 1984).

El funcionalismo molecular del complejo supone que la unión del GABA a su receptor provoca la apertura del canal del cloro, manteniéndose abierto mientras dure esa unión y permitiendo en consecuencia el flujo de iones cloro a través del ionóforo (Braestrup y col., 1977; Hunkeler y col., 1981).

Varios estudios han demostrado que la aplicación de GABA, o de sustancias gabaérgicas (por ejemplo el muscimol), incrementa la afinidad de las benzodiazepinas por su receptor específico, mientras que la bicuculina, un inhibidor competitivo del receptor $GABA_A$, reduce dicha afinidad (Karobath y col., 1979; Briley y col., 1978; Tallman y col., 1978; Regan y col., 1980).

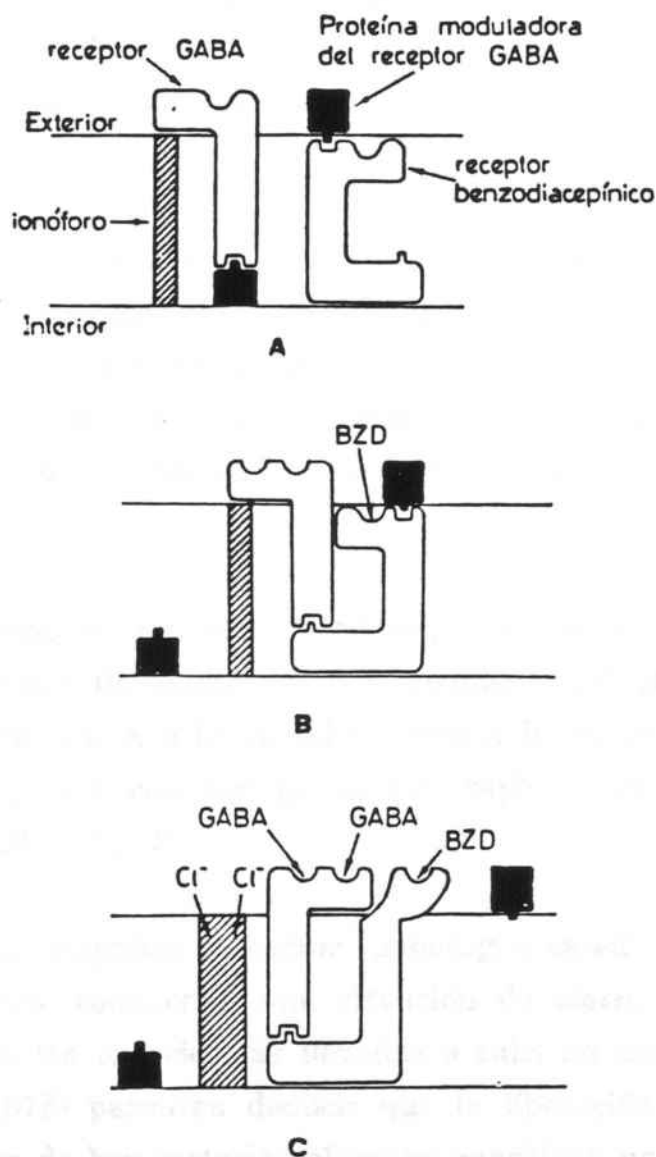


Figura 3: Modelo de la acción de las benzodiazepinas sobre la unidad reguladora del receptor del GABA. De Costa y Guidotti (1979).

En sentido inverso cabe citar también que la presencia de benzodiazepinas incrementa la fijación del GABA a su receptor correspondiente. Efecto que es dosis-dependiente y estereoespecífico (Guidotti y col., 1978).

Esta mutua acción facilitadora, por la que GABA y benzodiazepinas incrementan sus afinidades de forma recíproca por sus

respectivos receptores, puede explicarse por la presencia de un tercer elemento, una proteína próxima a ese complejo, llamada GABA-modulina, por la cual tienen afinidad tanto el GABA como las benzodiazepinas (Costa y col., 1979).

El papel de la GABA-modulina, por su capacidad de fijar GABA, sería el de inhibir o modular la presencia de GABA a nivel de su receptor. Dado que el GABA y las benzodiazepinas se fijan indistintamente a la GABA-modulina, la presencia de benzodiazepinas incrementaría el número de moléculas libres de GABA que se pueden fijar a sus receptores, y viceversa.

Ello explicaría por qué las benzodiazepinas actúan incrementando o facilitando los efectos fisiológicos de la transmisión gabérgica. Por otra parte, la fijación del GABA a la modulina, podría ir seguida de cambios alostéricos en el propio receptor gabaérgico capaces de modificar su afinidad por el GABA (Fig. 3).

Aunque el complejo receptor gabaérgico-canal de cloro en condiciones normales, conduce a una situación de cierre del canal en ausencia de GABA, las experiencias llevadas a cabo en animal "in vivo" (Guidotti y col., 1978) permiten deducir que la liberación endógena de GABA, en situación de homeostasis gabérgica, mantiene un cierto estado de apertura del canal del cloro.

1.4.- Agonistas, antagonistas y agonistas inversos.

Los agonistas benzodiazepínicos son fármacos que, interaccionando con el dominio B, facilitan la interacción entre las áreas G y C y abren el canal de cloro.

Los antagonistas, por su parte, se fijan al receptor y, o bien no lo modifican, o la modificación es insuficiente para facilitar la acción gabérgica; pero con su presencia dificultan o inhiben la fijación de un agonista. El más conocido es el Ro 15-1788, etil-8-fluoro-5,6-dihidro-5-metil-

6-oxo-4H-imidazo 1,5a[1,4]benzodiazepina-3-carboxilato, (Flumazenil), que en los primeros estudios resultó ser inactivo farmacológicamente *per se*, pero se observó que bloqueaba la unión de los agonistas al receptor benzodiazepínico central (Hunkeler y col., 1981). Posteriormente ha mostrado efectos proconvulsivantes (Nutt y col., 1983; Jensen y col., 1986).

Los agonistas inversos son sustancias que se fijan específicamente al receptor benzodiazepínico pero, en lugar de facilitar la acción gabaérgica sobre el canal, la inhiben o reducen, con lo cual disminuye la inhibición funcional del complejo sobre la transmisión sináptica. El hallazgo, en orina humana, de las β -carbolinas (ésteres del ácido β -carbolin-3-carboxílico), compuestos que se unen al receptor benzodiazepínico (Braestrup y col., 1983), representó el inicio del campo de los agonistas inversos, siendo los principales sus ésteres y amidas. En numerosos estudios de tipo bioquímico, electrofisiológico y de conducta las β -carbolinas producían efectos opuestos a las benzodiazepinas (Oakley y col., 1980; Cowen y col., 1981; Jones y col., 1981; Polc y col., 1981; Braestrup y col., 1983). Uno de los hechos más relevantes fue la inhibición por GABA de la unión de estos compuestos al receptor benzodiazepínico, lo cual sugirió que estos compuestos convulsivantes podrían actuar disminuyendo la inhibición del sistema gabaérgico (Braestrup y col., 1981b).

Teniendo en cuenta los efectos de las benzodiazepinas y las β -carbolinas son antagonizados por el flumazenil, se asumió que los cambios conformacionales que producían los agonistas y agonistas inversos sobre el receptor benzodiazepínico central eran opuestos a los que producían los antagonistas, en el primer caso se producía una potenciación del sistema gabaérgico, y en el segundo se evitaba esta potenciación, porque el receptor era ocupado por una molécula conformacionalmente inerte.

1.5.-Ligando endógeno

Aunque la existencia de un sitio específico de fijación para un ligando exógeno no es razón indiscutible para que exista un ligando endógeno fisiológico, sí es razón suficiente para su búsqueda. La inosina,

uno de los posibles ligandos endógenos, se fija al receptor con afinidad baja. Otro compuesto, la tribulina, está presente en la orina de ratas sometidas a estrés o de personas en situación de síndrome de abstinencia a benzodiazepinas y se fija asimismo, al receptor benzodiazepínico.

Guidotti y col.(1983), han extraído y purificado del cerebro de rata un polipéptido denominado DBI (inhibidor de la unión del Diazepam), el cual muestra una elevada afinidad por los sitios centrales de unión a las benzodiazepinas. Este péptido produce unos efectos similares a los de las β -carbolinas. Un fragmento de este péptido (18 aminoácidos), denominado ODN, produce los mismos efectos que el péptido DBI precursor y se une asimismo a los sitios específicos para las benzodiazepinas (Costa y col., 1985). El que el ODN o el DBI representen o sean parte del ligando endógeno para el receptor benzodiazepínico a nivel central es algo que todavía es prematuro establecer. Sin duda, el descubrir el ligando endógeno que a nivel cerebral modula la acción del GABA y de las benzodiazepinas contribuirá a esclarecer las bases moleculares de la ansiedad y de sus trastornos asociados (Flórez y col., 1987).

2.-EL RECEPTOR BENZODIAZEPINICO PERIFERICO.

2.1.-Características diferenciales con el receptor benzodiazepínico central.

Las benzodiazepinas son fármacos usualmente reconocidos por su acción sobre el sistema nervioso central. Son, como se ha mencionado anteriormente, fármacos efectivos como ansiolíticos, anticonvulsivantes, hipnóticos y relajantes musculares. Estas acciones farmacológicas están mediadas por la interacción de las benzodiazepinas con un receptor localizado en el sistema nervioso central y estrechamente relacionado con el complejo receptor del GABA y el ionóforo del cloro (Braestrup y col., 1977; Tallman y col., 1980).

Poco tiempo después de descubrirse el receptor benzodiazepínico localizado en el sistema nervioso central, se observó que el diazepam se unía de modo específico y con afinidad nanomolar, a órganos periféricos como riñón, hígado, pulmón, músculo esquelético, etc. A estos lugares de unión localizados fuera del sistema nervioso central se les denominó receptores benzodiazepínicos periféricos.

La diferenciación del receptor benzodiazepínico central del periférico se ha podido llevar a cabo gracias a la distinta afinidad que presentan un grupo de compuestos de estructura benzodiazepínica. Así, por ejemplo, el clonazepam, benzodiazepina farmacológicamente activa, presenta una elevada afinidad por el receptor benzodiazepínico central ($CI_{50} = 5$ nM) y baja afinidad por el receptor benzodiazepínico periférico ($CI_{50} = 2900-7900$ nM). Por el contrario, el Ro 5-4864 presenta una baja afinidad por el receptor central, con una $CI_{50} = 163$ nM, tiene una elevada afinidad por el receptor benzodiazepínico periférico, con una $CI_{50} = 41$ nM, y muestra ser 30.000 veces más potente al desplazar al [3 H] Diazepam unido a riñón que en el unido a cerebro (Braestrup y col., 1977).

Gracias a todo ello, podemos diferenciar entre receptor benzodiazepínico central y periférico utilizando clonazepam, diazepam y Ro 5-4864, siendo el orden de afinidad Ro 5-4864 > diazepam > clonazepam para el receptor periférico, y opuesto al encontrado por Le Fur y col. (1983a, 1983b) para el receptor benzodiazepínico central (Fig. 4).

Por otra parte, ligandos que se unen al receptor benzodiazepínico central como barbituratos, picrotoxina, aniones tipo Cl^- y otros ligandos endógenos (purinas y β -carbolinas), no afectan a la unión del [3 H] Ro 5-4864 al receptor periférico (Marangos y col., 1982; Shoemaker y col., 1983). Además los receptores benzodiazepínicos periféricos no están ni asociados con el receptor del GABA ni con el canal de cloro.

El lugar de unión periférico no sólo es reconocido por las N-alquilbenzodiazepinas, sino también por varios derivados de tipo

isoquinoleínico, de los cuales el prototipo ha sido el PK 11195, 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinoleíncarboxamida, el cual se une selectivamente al receptor benzodiazepínico periférico, como se ha demostrado en experiencias tanto "in vitro" (Le Fur y col.,1983a) como "in vivo" (Le Fur y col., 1983c). Este compuesto es un potente antagonista del Ro 5-4864 y no afecta al Ro 15-1788, ligando específico del receptor benzodiazepínico central (Mestre y col.,1984).

Asimismo, estudios tanto bioquímicos (Le Fur y col.,1983b) como farmacológicos (Mestre y col., 1984; Weismann y col.,1985; Mizoule y col., 1985) o termodinámicos (Cantor y col., 1984) han sugerido que Ro 5-4864 y PK 11195 deben considerarse como agonista y antagonista, respectivamente, del receptor benzodiazepínico periférico (Doble y col.,1987).

La ausencia de correlación entre las propiedades terapéuticas y la afinidad por sus lugares de unión al receptor periférico ha abierto un amplio campo de investigación que en los últimos años ha sido ocupado por diferentes teorías acerca de la función fisiológica de estos lugares de unión, relacionándolos con el metabolismo intermediario y la diferenciación celular (Anholt y col., 1986), y con una posible regulación del sistema endocrino (Verma y col.,1989). Incluso se ha llegado a considerar estos lugares como "aceptores" y no como receptores, es decir que están desprovistos de acción fisiológica (Richards y col., 1982; Pellow y col.,1984).

Además de la diversificación farmacológica entre los receptores benzodiazepínicos centrales y periféricos se diferencian también filogenética y ontogénicamente. El receptor benzodiazepínico periférico aparece más tarde evolutivamente, pero es anterior ontogénicamente hablando. Mientras que el receptor benzodiazepínico central se ha encontrado en aves, reptiles y anfibios, así como, en peces, los receptores periféricos sólo han sido detectados en mamíferos (Bolger y col., 1985).

Estudios de unión con Ro 5-4864 tritiado en rata, han demostrado que el receptor benzodiazepínico periférico aparece en el período perinatal

a nivel del cerebro, y aumenta su densidad durante las primeras semanas de vida (Anholt y col., 1985; Braestrup y col., 1977).

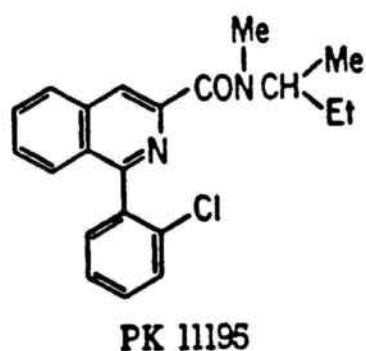
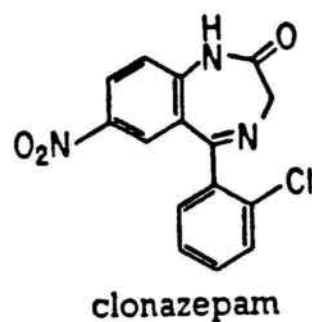
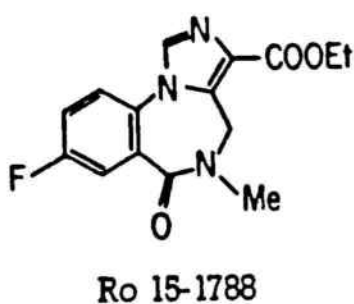
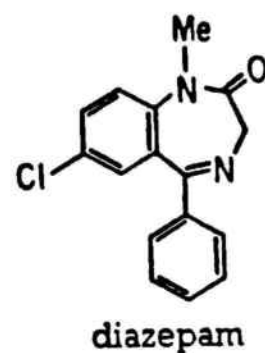
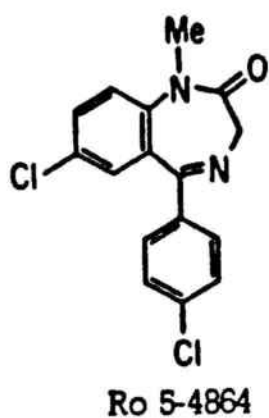


Figura 4: Estructuras químicas de benzodiazepinas que actúan a nivel de receptores benzodiazepínicos centrales o periféricos.

2.2.- Localización del receptor benzodiazepínico periférico.

2.2.1.-Distribución tisular.

2.2.1.1.-Localización y regulación en tejidos periféricos.

En estudios iniciales realizados con [^3H]-diazepam, como control respecto a los lugares de unión a nivel del sistema nervioso central, se encontró una gran densidad de lugares de unión en muchos tejidos periféricos con una afinidad nanomolar, al igual que en sistema nervioso central.

Análisis bioquímicos en diferentes tejidos de rata, han revelado que la mayor densidad de estos receptores se concentran a nivel de la glándula adrenal, así como también se han descubierto niveles altos en otros tejidos glandulares como testículos, ovarios y glándulas salivares; sin embargo en otros tejidos glandulares, como páncreas y pituitaria, presentan una densidad mucho más baja de receptores a las benzodiazepinas. Por otro lado tejidos no glandulares como epitelio nasal, riñones, pulmones, bazo, presentan una densidad considerable de este tipo de receptores, a diferencia del encéfalo.

Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, esta elevada densidad de receptores en algunos tejidos no se traduce en funciones fisiológicas bien definidas.

Estudios autorradiográficos de estos receptores en varios órganos, han mostrado que la médula adrenal es pobre en receptores, pero en la corteza se localizan un número importante de éstos en todas sus capas, con una alta densidad en la zona glomerular exterior, donde se realiza la mayor producción de aldosterona (DeSouza y col., 1985).

A nivel de los testículos se ha localizado una mayor concentración de receptores benzodiazepínicos periféricos dentro del tejido intersticial, donde las células de Leydig producen testosterona.

Estudios autorradiográficos utilizando [^3H] PK 11195 han demostrado la existencia de receptores benzodiazepínicos periféricos en la membrana tecal y tejidos esteroideogénicos, así como en epitelio y glándulas del útero, pero con una baja proporción en tejido muscular de estas estructuras (Verma y col., 1987). Analizando lo anteriormente descrito se puede deducir una relación entre los receptores benzodiazepínicos periféricos con funciones de tipo endocrino.

En el riñón también se han localizado receptores periféricos a las benzodiazepinas mediante técnicas autorradiográficas, sugiriéndose un papel regulador sobre la homeostasis electrolítica de los receptores periféricos (Verma y col., 1989).

2.2.1.2.-Localización y regulación en el sistema nervioso central.

Aunque la denominación de receptor benzodiazepínico periférico, vino dada por la ausencia relativa de estos lugares de unión a nivel central, cuando se dispuso de ligandos de alta afinidad hacia estos lugares, como [^3H] Ro 5-4864 y [^3H] PK 11195, se pudo demostrar la existencia de estos receptores también a nivel central, con una distribución diferente a los receptores benzodiazepínicos centrales típicos (Marangos y col., 1982; Benavides y col., 1983).

Se han llevado a cabo estudios en cerebro de rata (Benavides y col., 1983), gato (Anholt y col., 1984), cobaya (Weismann y col., 1984) y en cerebro humano (Shoemaker y col., 1981; Marangos y col., 1982) que han demostrado la existencia, tanto de diferencias farmacológicas como bioquímicas del receptor periférico con respecto al central.

Aunque, como se ha indicado, el cerebro de rata y también el de ratón, muestran un bajo porcentaje de receptores periféricos a las benzodiazepinas, se produce un aumento del 400% o más después de la inyección intraestriatal (Benavides y col., 1987) o sistémica de endotoxinas neuronales (Kish y col., 1983) o inducción de isquemia cerebral.

También el tratamiento crónico con etanol produce un aumento del 40%-90% de los receptores periféricos, en el cerebro de ratón, pero no un aumento de los centrales. Este rápido aumento de receptores periféricos al producirse daño en el sistema nervioso central, puede reflejar una respuesta metabólica del tejido cerebral, semejante a la inducción de enzimas detoxificantes por el hígado. Asimismo, se ha demostrado una elevada densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en tumores cerebrales de la glía. Este aumento se traduce en un proceso de destrucción neuronal y gliosis (Shoemaker y col., 1982).

2.2.2.-Distribución subcelular.

Estudios en fracciones subcelulares de cerebro de rata indican una asociación entre el lugar de unión para el Ro 5-4864 con la mitocondria y el núcleo (Marangos y col., 1982; Shoemaker y col., 1983). Asimismo, estudios de distribución subcelular del receptor benzodiazepínico periférico realizados por Hirsch (1984) en tejido adiposo, localizan a éste en la fracción mitocondrial. Por otra parte estudios autoradiográficos en fetos de rata apoyan la relación antes mencionada de estos receptores con la fracción mitocondrial (Anholt y col., 1985). Se han asociado niveles altos de receptores periféricos con tejidos que obtienen energía principalmente de la fosforilación oxidativa, mientras que aquellos tejidos que utilizan como principal fuente de energía la glucogenolisis presentan un nivel mucho más bajo de estos receptores.

Se han realizado estudios de fraccionamiento de forma exhaustiva en glándula adrenal, por ser este el tejido con mayor densidad de receptores periféricos. Se ensayó la unión del PK 11195 en fracciones

solubles, nucleares, mitocondriales y microsomales, junto con enzimas marcadores para varios compartimentos. La recuperación y enriquecimiento de receptores periféricos en estas fracciones está estrechamente relacionada con la actividad citocromo-oxidasa, indicando, una vez más, que están localizados en la mitocondria (Anholt y col., 1986).

La separación de las dos membranas mitocondriales, interna y externa, mediante digitonina en glándula adrenal, han demostrado que el lugar de unión para el PK 11195 se libera conjuntamente con la monoaminoxidasa, enzima marcador de la membrana externa, pero no con la citocromooxidasa, la cual se localiza a nivel de la membrana interna. Esta correlación aparece en una amplia variedad de tejidos, además de glándula adrenal, como riñón e hígado (Verma y col., 1989) lo cual indica que los receptores benzodiazepínicos periféricos están asociados con la membrana mitocondrial externa.

2.3.- Características moleculares.

La caracterización de los receptores periféricos puede ayudar a clarificar su función. En experiencias previas, se observó que después de la solubilización de los receptores, éstos tendían a perder su habilidad de unir irreversiblemente sus ligandos específicos (Anholt y col., 1986). Por ello, en un principio, se utilizaron ligandos que se unían covalentemente al receptor, como el flunitrazepam. La mayor desventaja de utilizar este ligando es que éste se unía con una alta afinidad a los receptores centrales, pero ésta disminuía un 50% cuando se trataba de los periféricos. Triffletti y col., (1986) marcaron los receptores periféricos con [³H]-flunitrazepam, y el análisis posterior, con electroforesis en SDS, del complejo fármaco-receptor marcado procedente de membrana mitocondrial, reveló la existencia de dos bandas de 35 y 30 kD, que coincidían con valores obtenidos por irradiación de estos mismos receptores por Paul y col. (1981). Más tarde Doble (1987) y Skowronsky (1988), utilizaron PK 14105, derivado nitrofenílico del PK 11195 y obtuvieron como resultado la existencia de una sola proteína de peso molecular 15-18 kD.

Las diferentes propiedades de unión de las benzodiazepinas y de las isoquinoleínas al receptor sugieren que éstas interactúan con lugares, o quizás, subpoblaciones diferentes del receptor. Así, la afinidad de las isoquinoleíncarboxamidas es la misma en diferentes tejidos y especies, mientras que para las benzodiazepinas son realmente diferentes (Anholt y col., 1986). De esta forma, se podrían explicar los diferentes pesos moleculares de las proteínas marcadas con flunitrazepam y con PK 14105, que se asumirían a varias subunidades o diferentes receptores.

La membrana mitocondrial externa contiene relativamente pocas proteínas, una de éstas, el canal aniónico voltaje dependiente (VDCA) podría ser la que reconoce el [³H] flunitrazepam. El VDCA, también denominado porina, es utilizado por la célula para transportar metabolitos entre la mitocondria y el citoplasma, y puede ser marcado selectivamente con [¹⁴C] DCCD(N,N'-diciclo hexilcarboxidiimida). Se ha determinado mediante estudios de binding con flunitrazepam y DCCD, que tanto el receptor benzodiazepínico periférico como el VDCA muestran un comportamiento similar frente a geles de fosfato de calcio y muestran un peso molecular idéntico cuando se analiza éste con geles de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)) (Snyder y col., 1987; Trifflelli y col., 1986).

Hay pocas proteínas de la membrana mitocondrial que presenten un peso molecular de 15 kD, correspondiente a la proteína que se aísla utilizando PK 14105 marcado. Una de éstas es un isoenzima de la fosfolipasa A₂, el cual presenta una actividad predominante sobre la fosfatidiletanolamina (Lenting y col., 1987). Se ha determinado que este fosfolípido es un potente inhibidor de la unión al receptor periférico en riñón de rata (Beaumont y col., 1988).

La posible relación entre la fosfolipasa A₂ y el receptor benzodiazepínico periférico está apoyada por el hecho de que la fosfolipasa A₂ está situada en la membrana externa de la mitocondria (DeWinter y col., 1982; Benavides y col., 1984). Este compuesto induce un descenso en la unión del [³H] PK 11195 de forma rápida, irreversible, pero únicamente

parcial (60%), que refleja una pérdida de lugares de unión, pero no de afinidad de los agonistas o de los antagonistas. En ambos estudios se ha determinado que la unión del Ro 5-4864 al receptor periférico no es alterada por el dietilpirocarbonato, por tanto, parece ser que el Ro 5-4864 no se une al receptor a través del resto histidina de dicho receptor (Doble y col.,1987).

Se ha observado que a pH 5, el derivado isocianato del Ro 5-4864, reacciona en menor grado con el receptor. Ello hace pensar que existe un grupo nucleófilo en el receptor que forma un enlace covalente con el grupo isocianato de los ligandos irreversibles. Este grupo nucleófilo correspondería a un grupo amino, que pertenece probablemente a un resto histidina (Newman y col.,1987). Este resto histidina puede protonarse a pH 5, en un grado tal que disminuiría su capacidad nucleófila y , consecuentemente, su capacidad para formar enlaces covalentes con la función isocianato de los ligandos irreversibles.

Asimismo, se ha establecido que el ácido araquidónico, uno de los productos de la fosfolipasa A₂, es un modulador del receptor periférico a nivel de la mitocondria de riñón en rata. Se ha observado que dicho ácido disminuye significativamente la afinidad del Ro 5-4864 y del diazepam por los receptores periféricos mientras que no afecta a la potencia de desplazamiento del PK 11195 sobre el [³H] PK 11195. Ello apoya la hipótesis anteriormente citada del comportamiento antagonista y agonista del PK 11195 y Ro 5-4864 respectivamente, al unirse a distintas conformaciones del receptor, como proponían Le Fur y col.(1983c), Mestre y col.(1984b) y Doble y col.(1985).

Otra proteína de 15 kD localizada en la membrana externa de la mitocondria es la glutathion-S-transferasa, que al igual que el receptor benzodiazepínico periférico tiene una afinidad nanomolar por las protoforfirina IX (Ohlendieck y col., 1986; Kraume y col., 1988).

Se han realizado estudios sobre la relación entre la membrana externa e interna de la mitocondria, y éstos han sugerido que existe un

punto de fusión entre las dos membranas donde se localizarían el VDAC y la glutathion-S-transferasa (Ohlendieck y col., 1986; Krause y col., 1988).

La capacidad de la fosfolipasa A_2 de agregar moléculas de VDAC (Mannella y col., 1984) es una característica que apoya lo anteriormente citado, y hace posible pensar que estas moléculas se encuentran asociadas a un complejo molecular en la membrana mitocondrial externa. Tanto la membrana mitocondrial externa como la interna colaboran en el transporte de sustancias entre la mitocondria y el citoplasma celular (Schwaiger y col., 1987). Gracias a la unión entre el VDAC de la membrana externa y el transportador de nucleótidos de adenosina, de la interna, se puede producir el intercambio ADP/ATP entre la mitocondria y el citoplasma celular, mediado por la unión de una kinasa y el carrier de adenosina (Fiek y col., 1982). Esta asociación consigue facilitar la respiración mitocondrial a través de este suministro.

Este mecanismo de control puede ser importante en el metabolismo de tumores. Se ha observado que la activación de receptores periféricos a las benzodiazepinas por ligandos específicos se refleja en una disminución de la respiración mitocondrial probablemente debida un bloqueo del paso de ADP por este carrier (Hirsch y col., 1988; Nelson y col., 1986).

2.4.-Ligandos endógenos potenciales para los receptores periféricos.

La adjudicación de una posible función fisiológica para el receptor periférico estaría mucho más clara si se conociera la identidad del ligando endógeno para este lugar de unión a las benzodiazepinas.

Se ha aislado un proteína de 10-15 kD, denominada inhibidora de la acción del diazepam o endozepina (DBI), con afinidad micromolar tanto por los receptores centrales como por los periféricos (Guidotti y col., 1983), y cuyo cDNA ha sido clonado (Gray y col., 1986; Shoyab y col., 1986); esta

DBI es capaz de provocar cambios de comportamiento al ser inyectada en cerebro.

Otra proteína de 16 kD, identificada como la fosfolipasa A₂, es capaz de inhibir la unión del Ro 5-4864 al receptor periférico, en un rango de dosis micromolar (Mantione y col., 1988). Este isoenzima es capaz de interactuar directamente con un componente del receptor benzodiazepínico o de generar ácidos grasos libres que compiten por la unión a éste. De hecho, ciertos fosfolípidos y ácidos grasos insaturados inhiben la unión del Ro 5-4864 al receptor benzodiazepínico periférico a concentraciones micromolares (Beaumont y col., 1988). Por otra parte se intentó identificar el ligando endógeno en sangre, y se observó que lisados eritrocitarios inhibían la unión de ligandos específicos del receptor periférico, como [³H] Ro 5-4864 y [³H] PK 11195, en mitocondria renal de rata (Verma y col., 1987). Posteriores análisis indicaron que la sustancia activa contenida en los lisados eritrocitarios coincidía con las características del grupo hemo (Verma y col., 1987). Se demostró que las porfirinas inhibían la unión de las benzodiazepinas a los receptores periféricos. La porfirina responsable de esta acción inhibidora varía según sea el tejido de que se trate, destacando la porfirina IX, en la mayoría de los tejidos estudiados.

Las porfirinas son más potentes en su acción inhibidora que los anteriores posibles ligandos endógenos citados. Por ejemplo la protoporfirina IX presenta una K_i para el receptor benzodiazepínico periférico de, aproximadamente, 15 nM, unas mil veces superior que para la DBI o endozepina. La mesoporfirina IX, deuteroporfirina IX y el grupo hemo son algo menos potentes, como se muestra en la siguiente Tabla (pag. 30).

La identificación de la porfirinas como ligandos endógenos y la asociación del receptor benzodiazepínico periférico con la membrana mitocondrial sugieren una posible relación fisiológica entre ambos. En primer lugar tanto la fase inicial como final de la biosíntesis de las porfirinas se realiza en el interior de la mitocondria y por tanto los precursores porfirínicos de las protoporfirinas IX y grupo hemo deben

cruzar la membrana mitocondrial, probablemente a través de una porina, que se identifica como un canal aniónico voltaje dependiente; este canal es relativamente poco selectivo y admite el paso de moléculas menores de 1000 daltons (DePinto y col., 1985).

Compuesto	K_i (nM)
Protoporfirina IX	14.5 ± 10.7
Mesoporfirina IX	23.1 ± 8.2
Deuteroporfirina IX	31.3 ± 2
Hemo	40.6 ± 13.7
Hematoporfirina IX	500 ± 151
Coproporfirina III	1511 ± 636
Biliverdina	4111 ± 1343

De Snyder y col., 1987.

También productos precursores de las porfirina, como la uroporfirina y la coproporfirina, así como productos de degradación de las porfirinas, como la bilirrubina o biliverdina presentan una menor actividad (Snyder y col., 1987).

Por otro lado, los citocromos c presentan en su estructura un grupo porfirínico y están localizados en la membrana mitocondrial externa e interna; otras proteínas citoplasmáticas, como hemoglobina, mioglobina, catalasa, triptófano pirrolasa, peroxidasa y otros enzimas relacionados con la esteroidogénesis, también presentan en su configuración grupos hemo, lo que indica que debe haber un transportador de este grupo a través de la membrana mitocondrial. Estos hechos establecen la base para explicar la elevada densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos en corteza adrenal, testículos, ovarios, donde los citocromos y enzimas específicos están estrechamente involucrados en la biosíntesis de esteroides adrenales y gonadales, respectivamente.

2.5.- Relevancia fisiológica de los lugares de unión periféricos.

La investigación del papel fisiológico que tiene el receptor benzodiazepínico periférico, ha sido un trabajo de difícil interpretación, debido a la gran variedad de efectos que es capaz de producir y las diferentes concentraciones a las que aparecen éstos. Ya se han indicado las diferentes acciones sobre el sistema endocrino de estos fármacos, que se correlacionan con su elevada densidad de receptores en estos tejidos.

Los diversos efectos fisiológicos observados han sido ensayados sobre una gran variedad de sistemas biológicos. Algunos de ellos requieren una relativamente alta concentración "in vitro" o altas dosis "in vivo", y esto ha sugerido que en estos casos podemos hablar más de "aceptor" que de receptor (File y col., 1983).

Esta clasificación se basa en el hecho de que el Ro 5-4864 es una benzodiazepina con poca afinidad por los receptores benzodiazepínicos centrales. La especificidad de dichos receptores se confirma por la relación estructura-actividad de las benzodiazepinas y hay claras diferencias entre los mecanismos de acción de las mismas y otros agentes tranquilizantes tales como, por ejemplo, el meprobamato y los barbituratos.

Por el contrario, los lugares de unión benzodiazepínicos, tanto a nivel central como periférico, sensibles al Ro 5-4864, pero insensibles al Ro 15-1788 (Hunkeler y col., 1981), no juegan un papel como mediadores de los efectos farmacodinámicos de las benzodiazepinas.

En 1984 Mestre y col., demostraron que en el músculo papilar del cobaya, los lugares de unión a las benzodiazepinas periféricas son verdaderos receptores farmacológicos. El Ro 5-4864, ligando específico de estos lugares, produce un incremento dosis-dependiente en la velocidad de repolarización del potencial de acción (duración), y una disminución de la

contractibilidad de este tejido "in vitro". El diazepam produce un efecto similar pero a dosis elevadas, mientras que clonazepam es inactivo de acuerdo a sus respectivas actividades en estos sitios de unión. Estos efectos no se modifican por la acción del GABA, ni del Ro 15-1788. Por el contrario, dichos efectos pueden ser revertidos por el antagonista periférico PK 11195, cuya unión se ha definido como específica, saturable, de alta afinidad y GABA-independiente (Le Fur y col.,1983c).

Anholt en 1986, cita una serie de trabajos en cultivos celulares que sugieren una función fisiológica para los lugares de unión periféricos en el crecimiento y diferenciación celular. Aumentan la melanogénesis celular (Matthew y col.,1981), inhiben la proliferación de células del timo en ratón (Wang y col.,1984), estimulan la metilación en C-6 de los fosfolípidos en astrocitos (Strittmatter y col.,1979), y modulan la inhibición inducida por GABA y apomorfina sobre la cesión de prolactina en células de la pituitaria de rata (Grandison 1981). Asimismo, intervienen en la inducción de la síntesis de hemoglobina en células eritroleucemicas (Wang y col.,1984), facilitan la quimiotaxis en monocitos (Ruff y col.,1985; Regan y col.,1981).

Hay que señalar que estos efectos de las benzodiazepinas a nivel periférico sobre el crecimiento y la diferenciación celular tan sólo se observan a concentraciones micromolares, mientras que la unión a los lugares periféricos de estas mismas células presenta una afinidad nanomolar. Debe destacarse el hecho de que estos estudios de unión se han realizado a 0°C, mientras que la medida de los efectos farmacológicos mencionados se realiza a 35-37°C. Sin embargo, según R. Anholt (1986), estos efectos no pueden considerarse como efectos tóxicos inespecíficos, sino verdaderos efectos farmacológicos, ya que el orden de potencia con el que estos fármacos se unen al lugar de unión periférico es paralelo al orden de potencia de sus efectos, lo cual sugiere que las respuestas son mediadas por un receptor farmacológico. Aún no está claro en qué grado tienen acceso estos compuestos a su sitio de acción intracelular, seguramente a nivel de la membrana externa mitocondrial, ni cuál es el porcentaje de ocupación de dichos sitios para dar lugar a la respuesta.

También se observan efectos sobre el sistema nervioso central, como por ejemplo las convulsiones que produce la administración de altas dosis Ro 5-4864 en rata. Por otra parte el PK 11195 es capaz de bloquear el efecto proconvulsivante del Ro 5-4864 (Mestre y col., 1984).

Los efectos proconvulsivantes de insecticidas del tipo piretroide (deltametrin y permetrin) son bloqueados por PK 11195, aunque no afecta a las convulsiones por pentilentetrazol (Devaud y col., 1986). Estos piretroides se unen al receptor benzodiazepínico periférico a concentraciones nanomolares (Devaud y col., 1987). Por tanto, estos insecticidas podrían actuar por medio de estos receptores a nivel del receptor benzodiazepínico periférico.

El ácido araquidónico produce la formación de aniones superóxido en una línea celular con propiedades similares a los macrófagos, porque estimula el metabolismo oxidativo. Concentraciones nanomolares de Ro 5-4864 potencian este efecto y esta potenciación es bloqueada por el PK 11195 (Zavala y col., 1987). Sin embargo, el metabolismo oxidativo en estas células no se altera en presencia única de benzodiazepinas periféricas. El aumento de metabolismo oxidativo de los macrófagos por el ácido araquidónico, parece estar mediado por productos de la lipooxigenasa. De acuerdo con esto, las benzodiazepinas podrían actuar donde se generan los metabolitos del ácido araquidónico o donde tiene sus efectos. Uno de estos puntos de acción podría ser la glutation-S-transferasa, como ya se ha mencionado. La considerable potencia y selectividad de la benzodiazepinas periféricas en la oxidación de los macrófagos, se amplía también a linfocitos (Ruff y col., 1985) y monocitos (Laird y col., 1987). En estos ejemplos parece vislumbrarse, más que un efecto directo de las benzodiazepinas, un efecto modulador por parte de éstas de otros agentes. Este fenómeno modulador puede ser análogo a lo que ocurre con el receptor central en el cual las benzodiazepinas actúan de moduladores de la acción del GABA. A pesar de los efectos dispares de las benzodiazepinas periféricas, la interacción con su receptor podría implicar un mecanismo de acción común, que se podría relacionar con las porfirinas, los metabolitos del ácido araquidónico o la movilización de calcio.

3.-NEUROTRANSMISION CATECOLAMINERGICA.

La noradrenalina se libera de las neuronas postganglionares conjuntamente con otros neurotransmisores, como el ATP, desde los almacenes intracelulares (vesículas). Esta exocitosis es debida a la acción del calcio, que activa diferentes proteínas intracelulares que facilitan la emigración de las vesículas, su fusión con la membrana y el vaciamiento de su contenido. El proceso de liberación de la terminación simpática está regulado por varios mecanismos, uno de los cuales es la propia noradrenalina liberada que actúa sobre los receptores α_2 presinápticos y, como consecuencia, inhibe la liberación de noradrenalina, mecanismo denominado de retroalimentación negativa. Existen también procesos metabólicos de degradación de la noradrenalina, mediante las monoaminoxidasa y la catecol-O-metiltransferasa, y fenómenos de recaptación neuronal y extraneuronal del neurotransmisor.

Los mecanismos moleculares en respuesta a la activación de los receptores adrenérgicos, depende del tipo de receptor activado. En el caso de los α_1 , la respuesta molecular se caracteriza principalmente por el aumento y la movilización de calcio intracelular; esta variación en la concentración intracelular de calcio se debe principalmente a la liberación de calcio asociado a estructuras membranosas intracelulares o al aumento de la entrada de calcio a través de los canales de calcio, probablemente receptor-dependientes.

El mecanismo por el cual se asocia la activación del receptor α con la movilización intracelular de calcio, parece ser debida a la relación de esta activación con la producción y recambio de los fosfatidilinositoles de la membrana celular. En cuanto a los receptores α_2 , su activación produce la inhibición de la adenilatociclasa, mediante la intervención de una proteína G (Ver sección 4), y por tanto reducción del AMPc. La activación de los receptores β sigue el mismo mecanismo que los α_2 , pero de signo contrario.

3.1.-Inositolfosfatos como segundos mensajeros.

La estimulación inducida por ciertos neurotransmisores, entre ellos la noradrenalina, hormonas y otros mediadores endógenos, provoca la activación de varios sistemas enzimáticos que generan segundos mensajeros. Los receptores actúan a modo de "antenas" moleculares en la superficie de la célula, detectando la información externa (en forma de hormonas, neurotransmisores, etc.) que se traducen y amplifican mediante mensajeros secundarios, que controlan numerosos procesos celulares como metabolismo, secreción, contracción, fototransducción y crecimiento celular.

El mensajero intracelular más conocido hasta ahora era el AMPc, descubierto por Sutherland y Rall en 1958. Hasta ahora no se conocía la existencia de otros mensajeros secundarios. La hipótesis de que ciertos fosfolípidos de membrana eran precursores de mensajeros secundarios surgió en 1953, cuando Hokin y Hokin descubrieron que la acetilcolina estimulaba la incorporación de fósforo radiactivo a los fosfatidilinositoles de la membrana celular. Esta estimulación de la síntesis lipídica era un reflejo de la previa hidrólisis del lípido inducida por el agonista.

Estudios posteriores revelaron que numerosas señales externas (neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento) eran mediadas por este tipo de transmisión, a través de la hidrólisis de fosfolípidos, pero aún no se conocía su importancia dentro de la estimulación celular (Durell y col., 1969). Michell, en 1975, propuso que la hidrólisis de fosfatidilinositoles dependiente de un agonista podía estar relacionada con la movilización del calcio. La movilización interna de calcio es una de las respuestas de la célula ante el estímulo de un agonista. El problema que se presentaba era descubrir cómo la información era transmitida desde los receptores activados en la membrana celular al almacén de calcio intracelular. Este hecho se resolvió con el descubrimiento de inositol 1,4,5-trifosfato, que actuaba como un segundo mensajero, capaz de movilizar el calcio intracelular (Berridge y col., 1983; 1984).

Es particularmente interesante el hecho que este compuesto es una parte de un sistema de señal celular doble, que engloba también al diacilglicerol (Nishizuka y col., 1984, 1988). Durante la activación del receptor, las moléculas de fosfatidilinositol se rompen, por acción de la fosfolipasa C, en sus dos constituyentes: la parte soluble en agua, el inositoltrifosfato, que difunde por el citosol y libera calcio, mientras que la parte liposoluble, el diacilglicerol, permanece ligado a la membrana, y activa un enzima, la proteinkinasa C. Este doble mecanismo de transmisión de la señal juega un importante papel en el control de numerosos procesos celulares (Fig 5).

3.2.-Lípidos precursores de segundos mensajeros.

El fosfatidilinositol es un fosfolípido abundante en la membrana celular. Se localiza en la membrana interna y se diferencia de otros fosfolípidos por su capacidad de ser fosforilado. El grupo inositol, es la cabeza hidrófila, y tiene cinco hidroxilos libres, pudiendo todos ellos aceptar, teóricamente, un grupo fosfato. En la práctica, sin embargo, sólo ciertas posiciones se fosforilan, y esta especificidad viene marcada por kinasas lipídicas, las cuales se están caracterizando actualmente. La secuencia de fosforilación mejor conocida para los fosfatidilinositales es la que lleva a cabo la fosfatidilinositol 4-kinasa, que forma el fosfatidilinositol 4-fosfato, el cual se fosforila a fosfatidilinositol 4,5-difosfato, y a partir de éste se generan los mensajeros secundarios, inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol. Los agonistas, al unirse a su receptor, provocan un cambio conformacional en éste, que afecta a la membrana de forma suficiente para que el fosfatidilinositol 4,5-difosfato sea accesible a la fosfolipasa C (Irvine y col., 1984). Se ha detectado otra kinasa, la fosfatidilinositol 3-kinasa, que da lugar al fosfatidilinositol 3-fosfato (Whitmann y col., 1988; Stephens y col., 1989). Esta kinasa también puede formar el isómero 4-fosfato y 4,5-difosfato, para producir fosfatidilinositol 3,4-difosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Auger y col., 1989). La función de esos nuevos lípidos no está aún clara, pero podrían estar relacionados con la proliferación celular (Coughlin y col., 1989).

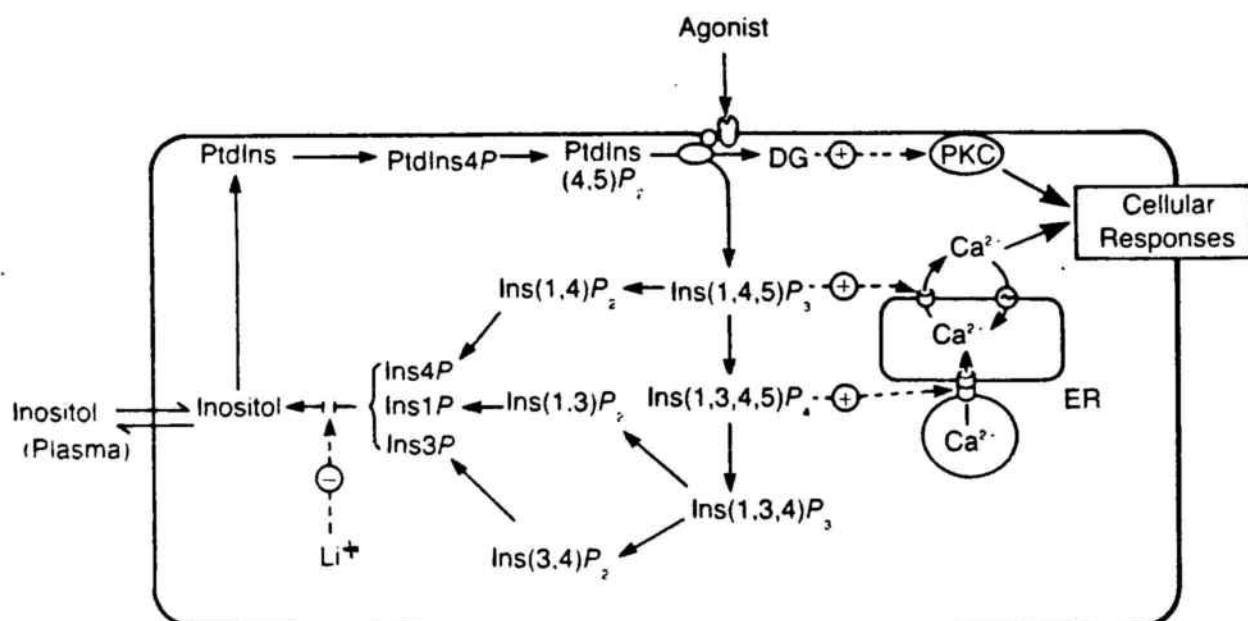


Figura 5: Representación esquemática de la hidrólisis de fosfatidilinositoles de membrana (PtdIns). Principales vías de acción de inositolfosfatos (InsP) y diacilglicerol (DG). PKC indica la proteinkinasa C y ER el retículo endoplásmico. De Berridge y col., 1989.

3.3.-Metabolismo de los inositolfosfatos.

Una vez el inositol 1,4,5-trifosfato ha sido liberado de la membrana, aumentan sus niveles en el citosol, y puede actuar como mensajero secundario movilizándolo el calcio intracelular. La duración de esta acción está limitada por enzimas, que lo metabolizan por medio de complicadas reacciones que culminan con la formación de inositol libre. Hay dos enzimas capaces de metabolizar el inositol 1,4,5-trifosfato. Puede, por una parte, ser defosforilado por una 5-fosfatasa para dar inositol 1,4-difosfato, el cual es de nuevo defosforilado a inositol 4-fosfato y por último a inositol.

El otro mecanismo de inactivación posible viene dado por la acción de una kinasa que fosforila el inositol 1,4,5-trifosfato a inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (Irvine y col., 1986). Este enzima, la inositol 1,4,5-trifosfatokinasa, es una proteína reguladora de gran importancia porque es sensible al calcio, de forma que este ión es capaz de controlar una de las vías de metabolismo de los inositoltrifosfato (Fig. 6). Hay diversas evidencias que sostienen que el inositol 1,3,4,5-tetrafosfato, resultante de la interacción del inositoltrifosfato y la kinasa, es también capaz de movilizar calcio de sus almacenes intracelulares, actuando también como mensajero secundario (Irvine y col., 1988; 1989), aunque su mecanismo de acción es aún poco conocido, debido a la semivida extremadamente corta de este metabolito. Este posible mensajero secundario es secuencialmente desfosforilado a inositol libre, de forma que se van generando sucesivamente los diferentes inositolfosfatos.

Las funciones como mensajero secundario del inositol 1,4,5-trifosfato pueden ampliarse, ya que parece ser que también juega un papel importante en la regulación de la entrada de calcio del medio extracelular a través de canales iónicos, tal como propuso Putney en 1986.

Debido a la complejidad del metabolismo del inositol 1,4,5-trifosfato el mecanismo completo permanece aún oscuro. Sin embargo, es un hecho comprobado que el inositol que se libera del proceso metabólico es reutilizado por la célula e incorporado de nuevo a la membrana como fosfatidilinositol (Fig. 6).

En síntesis pues, el inositol está unido a un lípido de membrana, que después de ser fosforilado a fosfatidilinositol 4,5-difosfato es el precursor utilizado por una amplia gama de receptores para generar diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato. Finalmente éste sufre un complicado proceso de metabolismo que regenera el inositol libre necesario para completar el ciclo, resintetizándose el fosfatidilinositol de membrana.

3.4.-Acciones de los segundos mensajeros derivados de los fosfatidilinositoles.

3.4.1.- Inositol 1,4,5-trifosfato y liberación de calcio.

Diversos autores han postulado que este metabolito sería capaz de liberar calcio de sus depósitos intracelulares (Michell y col., 1975; Berridge y col., 1983). La primera evidencia que confirmaba esta hipótesis fue obtenida utilizando células pancreáticas permeabilizadas (Streb y col., 1983). En ellas se producía liberación de calcio del retículo endoplásmico al adicionar al medio inositol 1,4,5-trifosfato. Esta liberación de calcio se producía en una cantidad y con una secuencia temporal semejante a la obtenida con la activación del receptor. Así en células hepáticas permeabilizadas, cuando se aplica inositol 1,4,5-trifosfato purificado, se produce liberación de calcio radiactivo, y ésta es similar a la cantidad y proporción de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ liberado al aplicar adrenalina a hepatocitos no permeabilizados (Burgess y col., 1984). Se han utilizado otros inositolfosfato fosforilados en posición 4 y 5, y se ha visto que también son capaces de liberar calcio (Burgess y col., 1984; Irvine y col., 1984).

Actualmente, la investigación se centra en caracterizar tanto el lugar como en el mecanismo de acción del inositoltrifosfato. Las células contienen una gran variedad de orgánulos capaces de secuestrar calcio (retículo endoplásmico, mitocondria, calciosomas, y vesículas de secreción), pero el candidato más probable como lugar de acción del inositoltrifosfato es el retículo endoplásmico.

En cuanto al mecanismo de acción, se acepta el hecho de que el inositol 1,4,5-trifosfato se une a un receptor, el cual abre un canal de calcio que permite la salida de calcio al citosol (Fig. 5). Vesículas membranales, aisladas del retículo endoplásmico de músculo liso han sido incorporadas a bicapas lipídicas, donde han mostrado flujos de calcio sensibles a inositoltrifosfato, con conductancias de 10 pS (Elhrich y col., 1988). Los antagonistas clásicos del calcio, como el nitrendipino y verapamilo, no son capaces de antagonizar este flujo de calcio (Seiler y

col., 1987; Shah y col., 1988), inducido por inositolfosfatos. Esta corriente de calcio también es insensible a omega-conotoxina, rojo de rutenio, ryanodina, clorpromazina y trifluoroperazina, pero es sensible a la acción de cinarizina y flunarizina (Seiler y col., 1987).

Se han descrito lugares de alta afinidad para el inositol 1,4,5-trifosfato en diferentes tejidos. El receptor reconoce con mayor afinidad el isómero D que el L (Strupish y col., 1988; Taylor y col., 1988). Se ha aislado este receptor utilizando heparina, sustancia que presenta una alta afinidad por este receptor. De este modo se ha obtenido una proteína de 260 kD (Supattapone y col., 1988), que si se purifica y se reconstituye en una bicapa lipídica puede actuar como un canal de calcio (Berridge, 1989), lo cual indica que esta proteína es responsable a la vez de la unión del inositolfosfato y de la salida de calcio al citosol. Estudios inmunocitoquímicos, utilizando anticuerpos específicos, han mostrado que el receptor al inositol 1,4,5-trifosfato se localiza en el retículo endoplásmico y también en la membrana nuclear (Ross y col., 1989).

3.4.2.-Diacilglicerol y proteinkinasa C.

El 1,2-diacilglicerol es el otro producto de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles por la fosfolipasa C. Este glicerol inicia la activación de una kinasa específica, la proteinkinasa C, reduciendo su requerimiento de calcio (Nishizuka, 1984). La activación de esta proteína se traduce en una gran variedad de señales intracelulares, entre las que destaca la regulación de numerosos procesos calcio-dependientes.

La proteinkinasa C se aísla principalmente de la fracción soluble de diferentes tejidos, como el cerebro (Kikkaba y col., 1982), en su forma inactiva; es decir en condiciones basales se encuentra en el citosol inactiva y cuando se incorpora a la membrana se activa (Kraft y col., 1983). Estudios recientes muestran que la distribución de esta proteína es variable según el tipo de célula, pero parece estar siempre ausente de la membrana nuclear.

La proteinkinasa, para estar en forma activa requiere la presencia de calcio y unirse a fosfolípidos, en especial fosfatidilserina (Nishizuka y col., 1983); la estimulación celular induce la interacción de la kinasa con la fosfatidilserina de la membrana, situación física en la que el enzima es activo. El diacilglicerol que se libera en un determinado tipo de estimulación celular, por ejemplo a través de receptores α , aumenta de forma drástica la afinidad de este enzima por el calcio y provoca la activación del enzima sin que se aumente la concentración neta de calcio (Kaibuchi y col., 1981) por lo que su activación es independiente de la acción del inositoltrifosfato. El enzima es un polipéptido donde podemos diferenciar dos dominios diferentes, uno hidrófobo unido a membranas, y otro hidrófilo con el centro catalítico (Kishimoto y col., 1983). La función de este enzima es fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas endógenas aunque la naturaleza de sus sustratos fisiológicos es aún bastante desconocida. Entre otras la proteinkinasa C es capaz de fosforilar la cadena de la miosina (Ikebe y col., 1985) y el adrenoceptor α_2 (Sibley y col., 1984).

Como en el caso del inositoltrifosfato, la acción del 1,2-diacilglicerol está limitada por la rapidez con que se metaboliza. El proceso de metabolización del diacilglicerol se realiza mediante la intervención de una lipasa que lo transforma en 2-monoacilglicerol y posteriormente a glicerol y araquidónico o bien es fosforilado por una diacilglicerolkinasa a ácido fosfatídico, el cual es reutilizado por la célula en la síntesis de fosfoinositoles.

3.5.-Activación de la fosfolipasa C por una proteína G.

El mecanismo por el cual la unión de un agonista a su receptor provoca la activación de la fosfolipasa C, no está aún bien descrito; pero, al igual que en el caso de la activación de la adenilatociclasa, parece más que probable que exista una proteína G reguladora de esta activación (Minnemann y col., 1988) (Fig. 6).

En el caso de los receptores alfa, la primera evidencia de esta relación, surgió a raíz del estudio de las constantes de afinidad en estudios con radioligandos específicos. Está bien establecido que la afinidad de los agonistas por receptores ligados a adenilatociclasas, que se hallan reguladas por proteínas G, se ve afectada por el GTP y sus análogos (Limbird y col., 1981). Esto es debido a la formación de un complejo ternario estable (agonista/receptor/ proteína G) que es desestabilizado por GTP, lo cual se traduce en una disminución de la afinidad del agonista por su receptor. Partiendo de estas premisas, Goodhart y col. (1982) y Snavely y Insel (1982) descubrieron que los nucleótidos de guanina también modulaban la unión de los agonistas alfa a sus receptores. Esta observación ha sido confirmada por otros autores (Boyer y col., 1984; Colucci y col., 1985; Lynch y col., 1984).

Análogos estables del GTP producen la hidrólisis del fosfatidilinositol en células pancreáticas permeabilizadas (Merrit y col., 1986) y en neutrófilos (Bradford y col., 1986), y también en preparaciones de membranas de neutrófilos (Cockford y col., 1985), hígado (Wallace y col., 1985), cerebro (Gonzalez y col., 1985) y otros tejidos (Litosh y col., 1986). Todos estos resultados apoyan la teoría de una regulación de la fosfolipasa C por proteínas G. Por otra parte, también se observa hidrólisis de fosfolípidos como respuesta a la activación de otros receptores, como los serotoninérgicos (Limbird y col., 1981), muscarínicos (Hepler y col., 1986), receptores a la vasopresina y angiotensina (Uhing y col., 1986). Como era de esperar esta activación es dependiente de nucleótidos de guanina. La identidad y propiedades de la proteína(s) G implicadas no está clara.

La toxina pertussis, que inactiva la G_i , bloquea la activación de la hidrólisis de fosfatidilinositoles por determinados tipos de receptores (Nakamura y col., 1985; Pfeilschifter y col., 1986) y bloquea algunos de los efectos mediados por receptores α_1 en miocitos cardíacos (Steinberg y col., 1985).

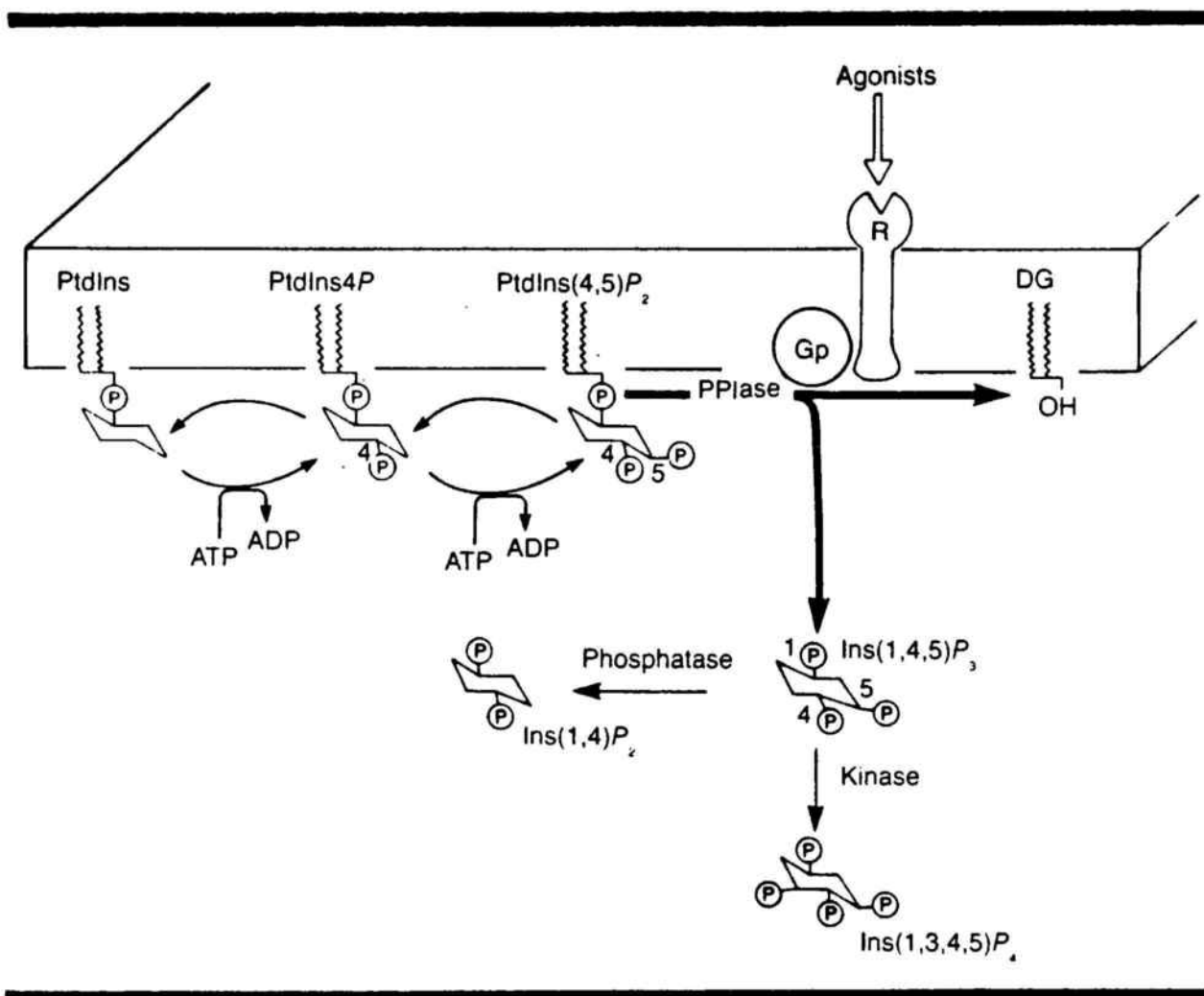


Figura 6: Metabolismo de los fosfatidilinositoles por activación de un agonista. De Berridge y col., 1989.

Ya que la toxina pertussis, actúa ribosilando la proteína G_i y, por tanto, inhibiendo la adenilatociclasa (Gilman y col., 1984), la proteína(s) G implicadas en la hidrólisis de los fosfatidilinositoles es similar a ésta. Sin embargo, en muchos sistemas, el pretratamiento con toxina pertussis no tiene efecto sobre el metabolismo de estos lípidos. La explicación más probable para esta discrepancia, es que existan dos proteínas G implicadas en la activación de la fosfolipasa C ligada a receptores diferentes.

El calcio citosólico libre también afecta a la actividad de la fosfolipasa C , ya que la activación de la hidrólisis del fosfatidilinositoldifosfato es bloqueada si se elimina el calcio del medio, sugiriendo que la activación del enzima es dependiente, por lo menos en cierto grado, de la concentración de calcio intracelular (Minnemann, 1988).

4.-NEUROTRANSMISION COLINERGICA.

Cuando un potencial de acción llega a una terminación colinérgica provoca la apertura rápida y transitoria de los canales de calcio de la membrana presináptica, favoreciendo de esta forma la penetración calcio en el interior de la célula. Al aumentar la concentración intracelular de este ión se desencadena la movilización de la acetilcolina, tanto de su forma libre, como de las vesículas que la contienen y se produce su liberación al espacio sináptico. La acetilcolina liberada interactúa con sus receptores y, posteriormente, es metabolizada por enzimas específicos, las acetilcolinesterasas.

Los receptores colinérgicos se pueden dividir en nicotínicos y muscarínicos, según su respuesta diferencial a agonistas y antagonistas y también por los diferentes mecanismos moleculares a los que están asociados. Los receptores nicotínicos están asociados directa y permanentemente a canales de sodio y los muscarínicos están asociados a otros canales iónicos de forma pasajera, en determinados tejidos (corazón), y también a la inhibición de la adenilatociclasa, a través de una proteína inhibidora GTP-dependiente (musculatura lisa, glandular y neuronal).

4.1.-Proteínas G.

En la última década se ha incrementado el conocimiento del papel de las proteínas G como mediadoras entre la activación de los receptores y el efector. La proteína G, una vez activada por el receptor es capaz de modificar la actividad de uno o varios enzimas tan diversos como la adenilatociclasa, la fosfolipasa C o la A₂ o fosfodiesterasa activadas por GMP_s, así como el funcionamiento de ciertos canales iónicos.

Hasta hace poco, se conocían tres tipos de proteínas G: G_s, G_i, responsables del acoplamiento positivo y negativo, respectivamente, de ciertos receptores con la adenilatociclasa, y la G_t, o transducina, que aseguraba el acoplamiento entre la rodopsina y la fosfodiesterasa dependiente de GMP_c de los bastoncillos y conos, a nivel de la retina ocular (Neer y col., 1988). Sin embargo, el reciente descubrimiento de otras proteínas G, como la G_o, inhibidora de la corriente de calcio y localizada en células nerviosas y otras células excitables (Homburger y col., 1987; Brabet y col., 1988), G_p, activadora de la fosfolipasa C, G_{ins}, relacionada con el receptor de la insulina, y el hecho de que existan diferentes subtipos de éstas (tres para la G_i, dos para la G_o, cuatro para la G_s) ha hecho pensar en el importante papel que deben desarrollar en los mecanismos de transducción de señales intercelulares y, por tanto, se perfilan como el mecanismo común implicado en la regulación de un gran número de procesos de transducción, no sólo entre el exterior y el interior celular, sino también entre los diferentes compartimientos de la célula (Bourne y col., 1988).

Así, por ejemplo, en los últimos cinco años, se ha puesto de manifiesto la implicación de proteínas G en la regulación de canales iónicos dependientes de neurotransmisores y hormonas (Pfaffinger y col., 1985; Breitwieser y col., 1985).

4.1.1.-Estructura de las proteínas G.

Las proteínas G están formadas por tres subunidades; la subunidad α (39-52 kD), la β (35 y 36 kDa) y la gamma (5-8 kDa). La subunidad α constituye el componente específico de cada proteína G y es donde se localiza el lugar de unión del GTP. Sólo existen dos tipos de subunidad β , y en cuanto a la subunidad gamma, sólo la que forma parte de la proteína G, ha sido purificada y su DNA clonado. Las subunidades β y gamma se presentan estrechamente asociadas y, probablemente, *in vivo* nunca se encuentren disociadas, pero sólo la subunidad gamma es una proteína de membrana, ya que es la única hidrófoba, mientras que, tanto la subunidad α y β son proteínas hidrófilas. A pesar de ello, la subunidad α puede adherirse a la membrana celular una vez se ha producido la disociación del dímero β -gamma, hecho que ocurre cuando se produce la activación de la proteína G por el receptor.

4.1.2.-Mecanismo de activación y acción de las proteínas G.

El modelo de activación de las proteínas G se basa, en su mayor parte, en el conocimiento de la activación de la proteína G_i . Antes de la activación de la proteína por el receptor, ésta se encuentra en forma de un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$. El lugar de unión de los guanilnucleótidos en la subunidad α está ocupado por un GDP. Cuando se produce la activación del receptor por un agonista éste provoca un cambio conformacional del receptor que interactúa con la proteína G_i , actuando de catalizador y estimulando el intercambio GDP-GTP. La formación de una molécula de GTP en la subunidad α conlleva la disociación del trímero en ésta y el dímero β -gamma (Fig. 7).

El complejo α -GTP es el que se encarga de activar la adenilatociclasa, y esta activación cesa cuando se produce la hidrólisis, por una GTPasa, de GTP a GDP obteniéndose de nuevo el complejo α -GDP,

capaz de reasociarse con el dímero β -gamma, para formar, de nuevo, la proteína G desactivada. La hidrólisis del GTP a GDP y liberación de magnesio se efectúa, como hemos dicho por una GTPasa, que sólo puede actuar cuando el receptor se desacopla de la proteína G. El tiempo medio de la ocupación de un receptor por el agonista permite a éste activar varias proteínas G, asegurando un mecanismo de amplificación de la señal.

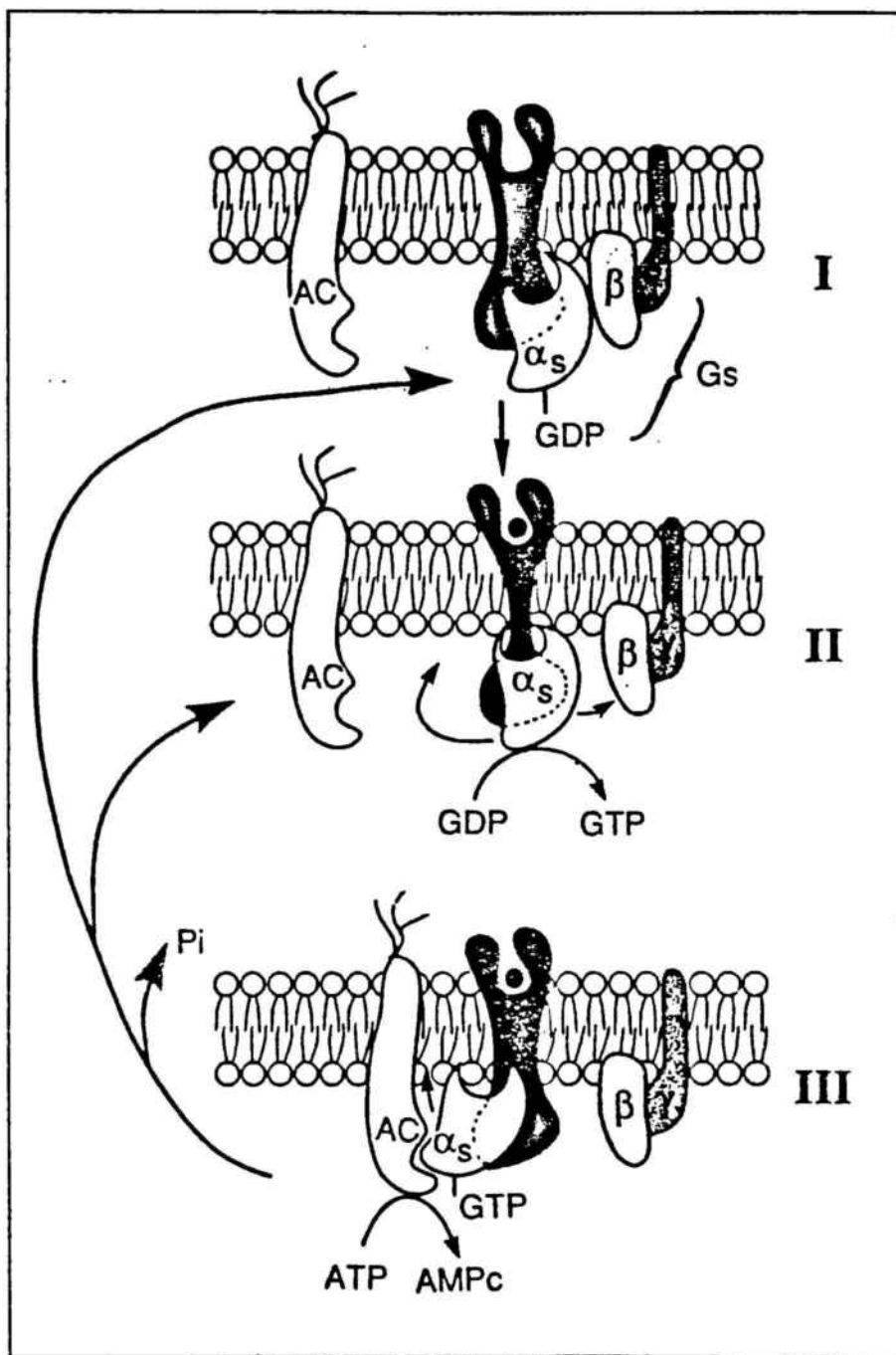


Figura 7: Mecanismo de activación de la adenilato ciclasa (AC) por una proteína G, asociada a un receptor. De Bockaert, 1989.

Se han clonado veinticuatro receptores acoplados a proteínas G, pero es posible contabilizar por lo menos 86 receptores diferentes (Birnbaumer y col., 1990) que están acoplados a un amplio número de efectores por proteínas G. Algunos de estos efectores han sido también identificados y clonados, e incluyen dos de las tres fosfodiesterasas localizadas en la retina (Ovchinnikov y col., 1986, 1987), adenilato- y guanilatociclasas (Smigel y col. 1986; Kuprinski y col. 1989), canales de calcio sensibles a proteínas G (Tanabe y col., 1986; Yatani y col., 1988) y fosfolipasas reguladas por proteínas G (Selinger y col. 1988; Bloomquist y col. 1988).

4.1.3.-Proteínas G; su identificación por toxinas.

La toxinas bacterianas del *Vibrio cholerae* (TC) y de *Bordetella pertussis* (TP) pueden modificar de forma covalente las subunidades α de las proteínas G. Estas toxinas son enzimas de la familia de las ADP-ribosiltransferasas, que catalizan la transferencia del ADP-ribosa del NAD^+ a la subunidad α de la proteína G.

Utilizando estas dos toxinas podemos diferenciar cuatro grupos de proteínas G:

- 1.-Proteínas G sensibles únicamente a la toxina colera, incluyéndose aquí las proteínas G_s .
- 2.-Proteínas G sensibles únicamente a la toxina pertussis, es el caso de la proteínas G_i y G_o .
- 3.-Proteínas G sensibles a ambas, proteína G_s .
- 4.-Proteínas G que no son sensibles a ninguna de las dos.

La TC activa la G_s , mientras que la TP inhibe la G_s , ambas actúan por ADP-ribosilación de la subunidad α , evitando el acoplamiento entre las proteínas G y su receptor; la TP y la TC son, pues, unas herramientas muy útiles para determinar si un receptor está acoplado a una G_i o una G_s . Por ejemplo, el tratamiento durante varias horas con TP previene la movilización de calcio, inducida por un agonista en neuronas

de ganglios dorsales (Shangold y col., 1988), células GH₃ (Rosenthal y col., 1988), etc.

4.2.-Proteínas G y canales iónicos.

Hasta hace pocos años no se podía asegurar con certeza la relación entre las proteínas G y los canales iónicos, sin embargo en los últimos años se han realizado numerosos avances en el estudio de esta interrelación, estableciéndose que hay una interacción entre las proteínas G y los diferentes canales iónicos de los que dispone la membrana celular. Se ha constatado la presencia de dos tipos de control de estos canales por parte de las proteínas G: un control indirecto y otro de tipo directo.

4.2.1- Control indirecto de los canales iónicos por las proteínas G.

Los canales iónicos han sido clasificados clásicamente en dos categorías. Dentro de la primera el canal iónico y el receptor al neurotransmisor forman parte de una misma estructura molecular, por lo que se denominan canales iónicos receptor-dependientes. Aquí podríamos incluir los receptores nicotínicos de la acetilcolina, los receptores A del GABA y los receptores a la glicina. La interacción del neurotransmisor con su receptor conlleva un cambio estructural de éste que hace que los iones pueden circular por el canal iónico.

En la segunda categoría de los canales iónicos voltaje-dependientes, el canal está situado sobre una molécula distinta a la que reconoce el neurotransmisor. En este caso pueden existir dos tipos de acoplamiento. Puede ocurrir que el receptor, una vez activado, interactúe con una proteína G y que ésta active un enzima que genere un mensajero secundario. Las proteínas G relacionadas con este tipo de mecanismo son las G_s (que, como ya se ha indicado estimulan adenilatociclase) y G_p (las cuales estimulan la fosfolipasa C) produciéndose, así como mensajeros secundarios, bien AMPc o inositoltrifosfato/diacilglicerol. Entre otros mensajeros

secundarios implicados en el control de los canales iónicos podemos citar al GMPc y el ácido araquidónico y sus derivados.

El mecanismo por el cual los segundos mensajeros controlan los canales iónicos es más controvertido y existen diferentes mecanismos aceptados. Se postula que el segundo mensajero activa una proteinkinasa que fosforila directamente el canal iónico. Este mecanismo es al que se debe al cambio de actividad de los canales de calcio voltaje-dependientes a nivel cardíaco por la noradrenalina (Deterre y col., 1982).

Otro de los mecanismos propuestos por el cual un segundo mensajero puede controlar los canales iónicos fue descubierto recientemente por Fesenko (1985). Se debe a una interacción directa del mensajero con el canal. Fesenko y sus colaboradores pudieron poner de manifiesto el efecto directo del GMPc en la actividad del canal de sodio en los bastoncillos retinianos. Asimismo, los canales iónicos de la mucosa nasal son activados directamente por AMPc y GMPc (Gold y col., 1987). Por otra parte hay también la evidencia de la regulación de los canales de calcio por inositolfosfatos (Ver apartado 3).

4.2.2-Control directo de los canales iónicos por proteínas G.

Este tipo de control ha sido descubierto recientemente. La proteína G una vez activada por el receptor, interactúa directamente con el canal iónico, bien para cerrarlo o bien para abrirlo. Por ejemplo, la unión de la acetilcolina al receptor muscarínico cardíaco, activa el canal de K^+ , denominado canal de rectificación, que inhibe el marcapasos cardíaco por hiperpolarización. Cuando se mide la actividad de los canales de potasio de estas células mediante técnicas de "patch-clamp", se observa que la aplicación de acetilcolina, sólo activa los canales de K^+ próximos al receptor, y no cualquier canal de K^+ celular, como sería de esperar si la activación fuera mediada por mensajeros secundarios. Ello sugiere, pues, que este receptor colinérgico es un receptor-canal. La incubación de las células cardíacas con la TP inhibe el efecto de la acetilcolina (Pfaffinger y

col., 1985). Por tanto, una proteína G sensible a esta toxina, está implicada en el acoplamiento del receptor muscarínico y el canal de K^+ del corazón, sin que sea necesario la producción de un segundo mensajero.

En resumen, hemos visto que las proteínas G pueden controlar dos efectores diferentes, un enzima y un canal iónico. Por otra parte, se ha observado en estudios preliminares que la proteína G_0 puede incluso controlar dos tipos de canales. Por un lado inhibe la actividad de los canales de calcio voltaje dependientes (Harris-Warric y col., 1988; Van Dongen y col., 1988) y por otro activa también los canales de K^+ de las neuronas del hipocampo (canales de potasio diferentes de los de las células cardíacas) (Hescheler y col., 1987).

5.-IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL CALCIO.

El calcio cumple un papel esencial como segundo mensajero y su paso al interior de la célula a través de la membrana se relaciona con un gran número de funciones celulares, como la respuesta contráctil, el metabolismo, y la liberación de neurotransmisores y hormonas.

La concentración de calcio intracelular es del orden de 100 nM, mientras que la extracelular se mantiene dentro del rango micromolar. Estos niveles de calcio no son estáticos, sino que sufren constantes oscilaciones durante los distintos procesos celulares. Tras estimular la célula, la concentración citosólica de este ión puede alcanzar valores de hasta 10 μ M.

Intracelularmente, el ión calcio actúa a través de la activación de diversos tipos de enzimas, para lo cual se une previamente a proteínas fijadoras de Ca^{+2} por las que presenta una gran afinidad. Entre ellas cabe destacar la calmodulina (presente en múltiples células), la troponina C (en músculo estriado) y el fosfolambano (en retículo endoplásmico de miocardio) (Flórez y col., 1987).

Las variaciones de la concentración de calcio intracelular pueden producirse por movilización del calcio de sus almacenes intracelulares o por un incremento de la permeabilidad de la membrana a este ión (Fig. 8).

5.1.-Movilización de calcio intracelular.

5.1.1-Almacenes intracelulares de calcio.

a.-Retículo endoplásmico.

La rápida liberación y la subsiguiente reacumulación de calcio por el retículo endoplásmico son las responsables de la contracción y relajación de los miofilamentos. Ambas se producen gracias a dos sistemas de transporte de calcio:

- Canal de calcio: la excitación de las células musculares, por ejemplo por despolarización de la membrana plasmática durante el potencial de acción (Huxley, 1971), causa la apertura de los canales y una salida masiva del calcio almacenado al espacio citoplasmático (Winegard y col., 1970) y, por consiguiente, la contracción de los miofilamentos .

- Bomba de Ca^{+2} - Mg^{+2} ATasa-dependiente activada por fosforilación, que introduce calcio dentro del retículo endoplásmico (Jorgensen y col., 1982). Esta bomba es regulada mediante la fosforilación del fosfolambano, que depende a su vez de los niveles de AMPc (Eggermont y col., 1988; Raeymaekers y col., 1986). El GMPc también puede regular esta bomba a nivel del músculo liso (Twort y col., 1988).

Los calciosomas son otros almacenes intracelulares, similares al retículo endoplásmico, han sido descritos recientemente (Volpe y col., 1988).

b.-Mitocondria

La mitocondria también es un almacén intracelular de calcio (Hasselbach y col., 1961). Aunque su papel no es tan claro como en el caso

anterior, está demostrado que a nivel de la membrana mitocondrial existen diferentes mecanismos de transporte de calcio, entre los que se encuentran: un transportador de Ca^{2+} , capaz de movilizar calcio a través de la membrana interna hacia la matriz mitocondrial (Carafoli y col., 1976; Cropmton y col., 1985; Nichols y col., 1982)); un transportador $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$, localizado en la membrana interna, inhibido específicamente por algunos antagonistas del calcio (diltiazem) y por lantánidos (Carafoli y col. 1974).

Como ya se ha mencionado, la entrada-salida de calcio a nivel mitocondrial no tiene aún una explicación concreta, aunque se postula que esta movilización del ión calcio está relacionada con la regulación de las deshidrogenasas calcio-dependientes intramitocondriales (Denton y col., 1986).

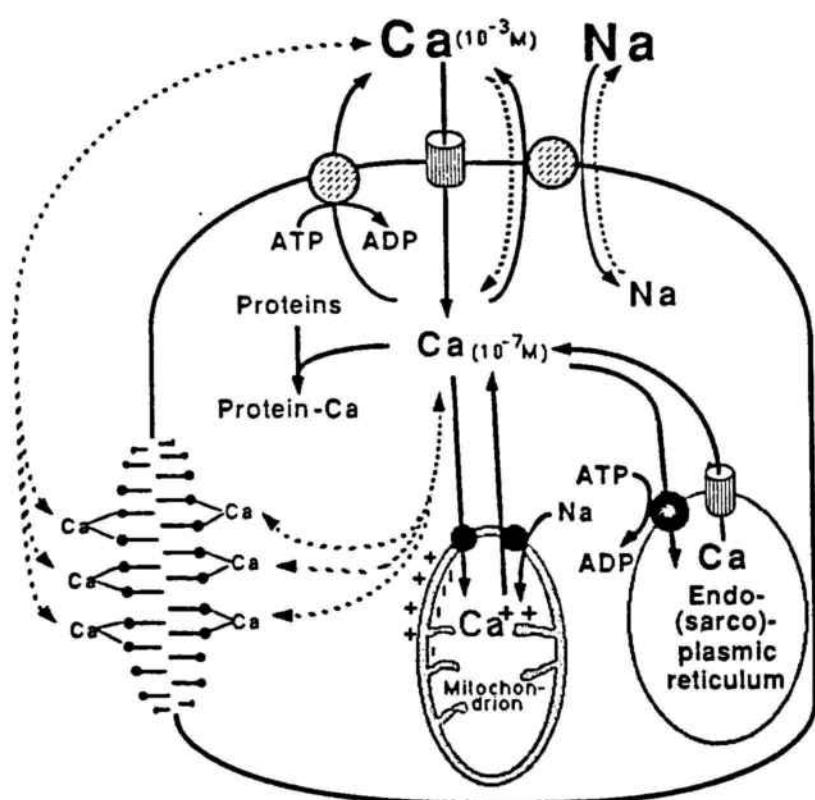


Figura 8: Sistemas de control de calcio en células eucariotas. El esquema muestra las proteínas solubles fijadoras de calcio y las proteínas de transporte asociadas a la membrana, tanto desde el exterior celular al interior como la entrada de calcio a los almacenes intracelulares. De Carafoli y col., 1990.

5.1.2.-Liberación de calcio inducida por calcio (CICR).

La entrada de pequeñas cantidades de calcio durante la estimulación de la célula puede promover la liberación de una gran cantidad de calcio del retículo endoplásmico (Van Breemen, 1965). La liberación de calcio del almacén intracelular se debe a la activación de canales de calcio; estos canales se activan a concentraciones μM de calcio, mM de ATP, AMPc, cafeína y, parcialmente, por ryanodina (Smith y col., 1985; Saida y col., 1984). La procaína bloquea estos canales (Saida y col., 1984).

5.1.3.-Liberación de calcio inducida por inositoltrifosfato.

Como ya se ha mencionado en el apartado 3, el 1,4,5-inositoltrifosfato induce la liberación de calcio de sus almacenes intracelulares (retículo endoplásmico). La liberación de calcio inducida por inositoltrifosfato ($1 \mu\text{M}$) es suficiente para provocar la respuesta contráctil de las células musculares (Suematsu y col., 1984; Yamamoto y col., 1985). La interacción de los inositoltrifosfatos con su receptor específico (Baukal y col., 1985) abre los canales catiónicos y como consecuencia se libera calcio de los almacenes intracelulares. Parece ser que la apertura de este canal receptor dependiente está regulado por nucleótidos de guanina (Dawson y col., 1985, 1987; Gill y col., 1986). Sin embargo, la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) no requiere GTP y es insensible a la toxina pertussis. Asimismo, la procaína afecta fundamentalmente la CICR más que la inducida por inositoltrifosfato (Van Breemen y col., 1988). Todo ello parece indicar que existen dos tipos de canales de calcio en estos almacenes intracelulares: unos activados por calcio y otros activados por inositoltrifosfato.

5.2.-Movilización de calcio en la membrana plasmática.

Son varios los mecanismos que permiten una corriente de calcio hacia el interior de la célula. Una forma de incrementar rápidamente la concentración a nivel intracelular, es su paso a través de los canales de calcio situados en la membrana y que se pueden dividir en canales voltaje-dependientes y receptor-dependientes. Los primeros se activan por despolarización de la membrana celular, bien sea, incrementando la concentración de potasio extracelular o por medio de estímulos eléctricos. La activación de estos receptores (adrenérgicos, serotoninérgicos...) puede modular la acción de los canales de calcio voltaje-dependientes a través de mecanismos de fosforilación dependientes de AMPc.

La entrada del calcio a través de los canales de calcio receptor-dependientes se produce tras la interacción de moléculas endógenas o fármacos agonistas con receptores de membrana ligados a este tipo de canal de calcio. Entre éstos distinguimos aquellos que en principio son utilizados por otros iones (por ejemplo por el sodio) y sólo en ausencia de éstos, y con menos eficiencia, los empleará el calcio y aquellos utilizados primariamente y con gran eficiencia por el calcio.

Paralelamente, el flujo de calcio hacia el exterior se puede producir a través de una bomba ATPasa calcio-sodio dependiente o por un sistema ATPasa dependiente de calcio y magnesio descrita anteriormente (Fig. 8).

5.2.1.-Canales de calcio voltaje dependientes.

Estudios recientes realizados por Carbone y col. (1984) y por Nowycky y col. (1985), demuestran que pueden existir diferentes tipos de canales de calcio en diferentes tejidos de las mismas especies, e incluso en diferentes partes de la misma célula. Los canales de calcio voltaje-dependientes pueden distinguirse por distintas propiedades biofísicas y por su sensibilidad a la inhibición por iones inorgánicos (Co^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} , La^{+3} , etc...), por bloqueantes y toxinas.

Se diferencian tres tipos de canales de calcio: canales T, N y L. El canal L es el único sensible a los antagonistas clásicos del calcio. En este canal existen, al menos, cuatro lugares de unión distintos para los fármacos, y dicha unión es dependiente del estado en el que se encuentre el canal, del potencial de membrana y de la frecuencia de apertura de este canal (Speeding y col., 1987).

a.- Canal T: La conductancia al calcio a su través es pequeña. Se activa a potenciales de membrana más negativos que el canal L; es insensible a los antagonistas clásicos.

b.- Canal N: A su través se produce un gran intercambio de corriente de calcio. Sólo se ha caracterizado en ciertas neuronas. La activación de los canales de calcio voltaje-dependientes en el cerebro es la responsable de la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas presinápticas, así como de los fenómenos de vaciamiento neuronal.

La omega-Conotoxina es una toxina aislada de *Conus geographus*, que posee actividad bloqueante de los canales de calcio presinápticos tipo N y L, en distintas preparaciones neuronales (Kerr y Yoshikami, 1984), e inhibe la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ voltaje-dependiente por los sinaptosomas (Rivier y col., 1987). Por el contrario, otros antagonistas de los canales de calcio, como las dihidropiridinas y el verapamilo, no bloquean la liberación de neurotransmisores en condiciones normales. Estos datos están de acuerdo con la teoría de que los canales de calcio de tipo N, que son bloqueados por omega-Conotoxina, son de localización presináptica y responsables de la liberación de los neurotransmisores (Kerr y col., 1988). Esta teoría se ve confirmada por el notable efecto depresor que ejerce la adenosina sobre la neurotransmisión, compuesto este que posee una actividad inhibidora sobre el canal N (Tsien y col., 1987).

c.- Canal L: Únicamente se activa por despolarización de la membrana. Es el lugar de acción de los antagonistas clásicos del calcio:

dihidropiridinas, verapamilo, diltiazem y derivados. Se encuentran localizados predominantemente en el soma neuronal (Speeding y col., 1987). Este canal y el canal T, son muy importantes en la activación del músculo liso vascular.

El estudio de la composición estructural del canal de calcio tipo L indica que está formado por una serie de subunidades: α_1 , α_2 , β y δ . Estas subunidades dan lugar a un conjunto glicoproteico de características hidrofóbicas.

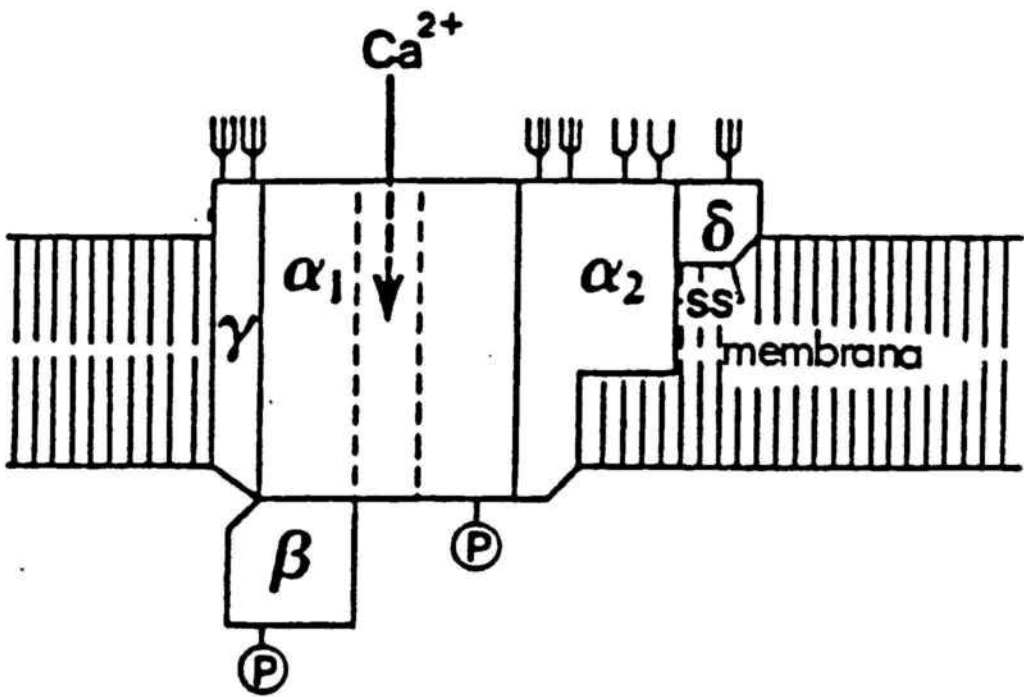


Figura 9: Representación estructural de los canales L de calcio voltaje-dependientes. De Takahashi y col., 1987.

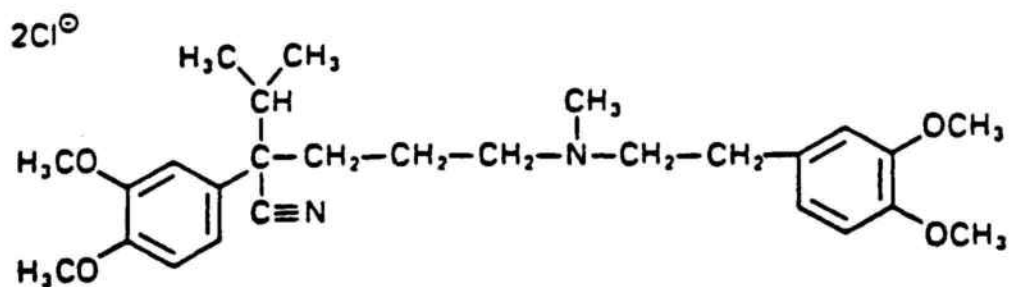
La subunidad más conocida es la subunidad α_1 , considerada como el sitio de unión de las 1,4-dihidropiridinas y de las fenilalquilaminas; además, es el sitio de fosforilación de la proteinkinasa AMPc-dependiente. Se compone de varios segmentos, uno de los cuales es un sensor de voltaje presente también en otros canales iónicos. La función del resto de las subunidades no se conoce, pero se sabe que estabilizan el canal en una conformación de alta afinidad (Glossman y col., 1988).

5.2.1.1.- Antagonistas del calcio.

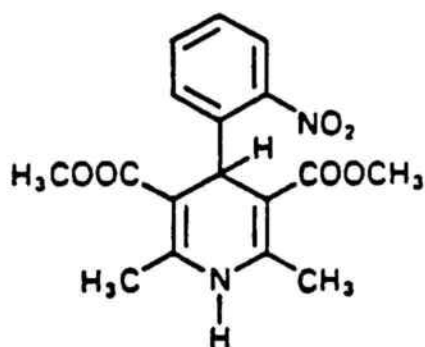
Se distinguen tres tipos de antagonistas del calcio: 1,4-dihidropiridinas, como el nifedipino; fenilalquilaminas, como el verapamilo; y benzotiazepinas, como el diltiazem (Fleckenstein y col., 1983a, 1983b, 1987, 1986; Weiss y col., 1978, 1981; Janis y Triggle, 1983; Schwartz y col., 1983; Godfraind y col., 1985; Opie y col., 1984; Flaim y Zelis, 1982; Rahwan y col., 1982) (Fig. 10).

Estos compuestos han sido definidos bioquímica, electrofisiológica y farmacológicamente como antagonistas de los canales de calcio voltaje-dependientes. Se trata de un grupo heterogéneo desde el punto de vista químico y farmacológico, ampliamente empleados en clínica para tratar desórdenes cardiovasculares, tales como las arritmias supraventriculares, la angina de pecho y la hipertensión (Fleckenstein y col., 1983a y b; Kaplan y col., 1988).

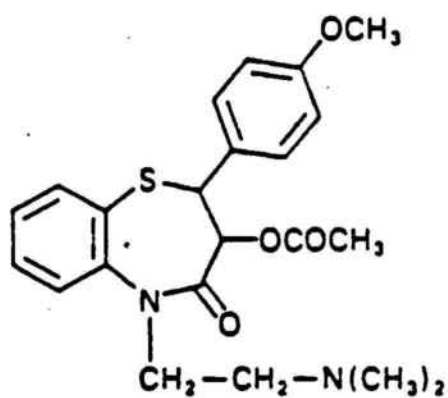
Los antagonistas del calcio bloquean primordialmente el canal de calcio voltaje-dependiente tipo L. Aún no se conoce de forma exacta cómo se produce este bloqueo, pero no es por simple taponamiento del canal. La afinidad de los ligandos por los canales puede variar en gran medida dependiendo de que el estado del canal sea de reposo, abierto o inactivado, de acuerdo con los estímulos de frecuencia y potencial de membrana (Hondegheem y col., 1977, 1984). Las diferencias en las características de bloqueo explican las distintas propiedades farmacológicas.



VERAPAMILO



NIFEDIPINO



DILTIAZEM

Figura 10: Estructuras químicas de verapamilo, nifedipino y diltiazem, representantes de las tres familias de antagonistas del calcio.

Para el verapamilo, diltiazem y análogos, se ha descrito un aumento en su actividad inhibidora al producirse un aumento en la frecuencia de estimulación, reflejando de esta manera una interacción preferencial de estos ligandos con el estado activado o inactivado del canal. Ello explica su eficacia en el tratamiento de las arritmias cardíacas. En cambio, la potencia de bloqueo de las dihidropiridinas depende del potencial de membrana.

Las dihidropiridinas se han mostrado 1.000 veces más potentes, como bloqueantes de los canales de calcio voltaje-dependientes en músculo cardíaco, a potenciales despolarizantes que a potenciales hiperpolarizantes (Sanguinetti y col., 1984). De este modo, es posible que la selectividad de las dihidropiridinas por el músculo liso vascular sea debida a que el potencial de reposo del músculo liso es menos negativo que el del músculo cardíaco (Kamp y col., 1987). Por esta razón las dihidropiridinas presentan una afinidad elevada por el estado inactivado del canal que es el promovido por la despolarización prolongada de la membrana (Godfraind y col. 1988).

Los canales de calcio voltaje-dependientes se modulan por un cierto número de neurotransmisores y neuropéptidos, entre los que se incluyen: catecolaminas, acetilcolina, histamina, serotonina, adenosina, somatostatina y opioides (Tsien y col., 1983; Reuter y col., 1983).

Actualmente se dispone de activadores de los canales de calcio como lo son el Bay K 8644 y PN 202-791 (Fig. 11) (Wei y col., 1986; Wei y Triggle, 1987). La existencia de agonistas y antagonistas del canal de calcio, plantea la posible hipótesis de un mecanismo de control endógeno (Gross y col., 1985) por moléculas que se unirían al canal de calcio regulando su actividad.

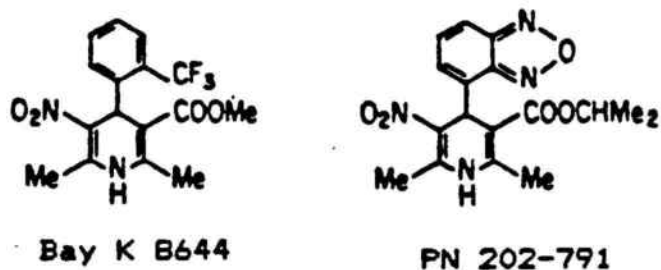


Figura 11: Estructura química de los activadores del canal de calcio voltaje-dependiente.

Como reguladores endógenos se han propuesto la palmitoilcarnitina, metabolito lipídico que posee una acción similar al Bay K 8644, y la sustancia P que aumenta la unión de los antagonistas de calcio a nivel cerebral, y la captación del calcio en la despolarización provocada por potasio. Ello parece indicar una relación entre la sustancia P y los canales de calcio (Spedding, 1987).

5.2.2.-Canales de calcio receptor-dependientes.

Benham y col. (1987) demostraron mediante técnicas de "patch clamp" la existencia de corrientes de calcio a través de canales cuando se aplicaba ATP en células de músculo arterial. Estos canales eran de conductancia baja, insensibles al voltaje y al nifedipino y se desensibilizaban rápidamente en presencia de ATP. Ya que estos canales no eran activados cuando el ATP se aplicaba fuera de la pipeta de "patch clamp", se concluyó que se trataba de canales de calcio acoplados a un receptor. En este tipo de receptores se produce una modificación del estado molecular del canal que permite el paso de iones a su través en una dirección determinada por gradiente de concentraciones y de cargas eléctricas a ambos lados de la membrana. Varios trabajos publicados sugieren que otros agonistas como la histamina, noradrenalina, vasopresina, y angiotensina, abren indirectamente estos canales de calcio ligados a receptores (Kistler y col., 1982; Van Breemen y col., 1989).

También bradikinina y trombina activan canales calcio insensibles al voltaje (Logde y col., 1988; Johns y col., 1987); por ello se postula la existencia de una serie de canales de calcio que estarían acoplados a diferentes tipos de receptores a través de un sistema de segundos mensajeros. La naturaleza del segundo mensajero implicado, aún está por dilucidar, aunque existen evidencias de que podrían ser el 1,4,5-inositoltrifosfato (Kuno y col., 1987), 1,3,4,5-inositoltetrafosfato (Irvine y col., 1986) o la subunidad α del GTP (Brown y col., 1988). Por último un posible regulador de algunos de estos canales podría ser el calcio citoplasmático (Von Tschärner y col., 1986). La Figura 12 muestra las diferentes posibilidades de regulación de los canales de calcio receptor-dependientes.

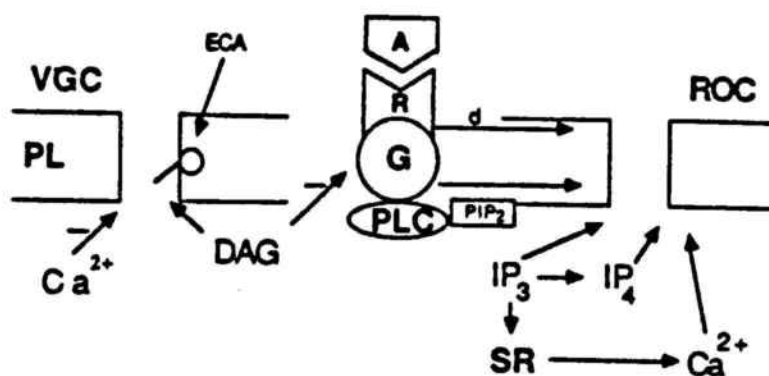


Figura 12: Representación esquemática de los canales de calcio voltaje-dependientes (VGC) y receptor-dependientes (ROC). La unión de un agonista a su receptor puede abrir directamente el ROC o bien indirectamente a través de mensajeros secundarios como las proteínas G, los inositolfosfatos (IP) o calcio. Los canales de calcio voltaje-dependientes pueden activarse por acción directa de un agonista (Bay K 8644 etc.) o bien indirectamente por medio de la activación de la proteinkinasa C por el diacilglicerol (DAG). De Van Breemen y col., 1989.

5.3.-El ión calcio en la contracción.

El proceso contráctil en el músculo liso tiene lugar por la interacción de los filamentos de actina y miosina. El calcio juega un papel esencial en la interacción entre actina y miosina responsable de la contracción muscular.

El proceso se inicia con la unión del Ca^{+2} a la calmodulina, lo que induce un cambio conformacional de esta proteína (Klee y col., 1982). El complejo se une posteriormente a la kinasa de la cadena ligera de la miosina. De este modo el complejo cataliza la fosforilación de la subunidad reguladora de la cadena ligera de la miosina. Esta activación resulta de la unión de una calmodulina con la subunidad catalítica de la kinasa (Blumenthal y col., 1980). La kinasa activada fosforila la cadena ligera de la miosina y esta fosforilación permite a la miosina incrementar la actividad de la ATPasa-magnesio-dependiente de cadena de miosina, necesaria para provocar la hidrólisis de ATP y la interacción con los filamentos de actina, desarrollándose la contracción. Este es el proceso mayoritario por el cual se produce la contracción. Sin embargo, es necesario destacar un segundo procedimiento de tipo regulador que depende también de calcio. El calcio puede regular la interacción actina-miosina a través de los componentes de filamentos finos, que tienen afinidad por dicho ión sin necesidad de fosforilar previamente la cadena ligera de la miosina (Stull y col., 1988). Estos filamentos activan, dependiendo de la concentración de calcio, la ATPasa- Mg^{+2} de la miosina (Fig. 13). El aumento de calcio libre en el citoplasma puede ser debido tanto a la entrada de calcio extracelular como a la liberación de éste de sus almacenes intracelulares.

Al igual que el proceso de contracción, el proceso de relajación requiere la presencia de una fosfatasa que defosforile la cadena ligera de miosina activada (Pato y col., 1985) y la movilización de calcio, pero en este caso disminuyendo la concentración de este ión libre en el citoplasma.

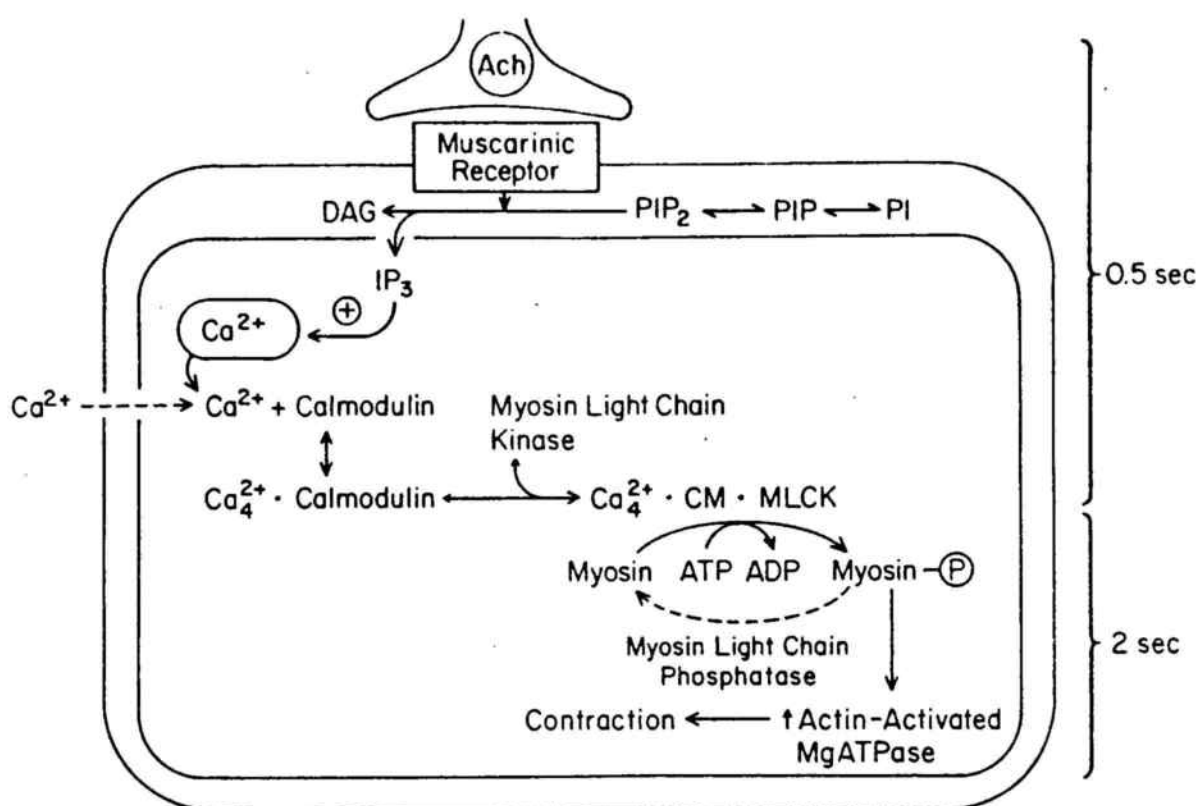


Figura 13: Esquema general de la regulación de la contracción en el músculo liso. De Stull y col., 1988.

Esta disminución puede deberse a la recaptación de calcio por los almacenes intracelulares, a la inactivación de los canales de la membrana plasmática y al aumento de la cantidad de calcio que sale de la célula. Ambos procesos están regulados por mensajeros secundarios (Stull y col., 1988) e implican al AMPc y probablemente el sistema de proteínas G, ya que el ión F⁻ inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (Karaki y col., 1988).

Compuestos que inducen la relajación muscular (β -adrenoreceptores) actúan activando la adenilatociclasa y aumentando el AMPc intracelular. Asimismo, compuestos que inhiben la fosfodiesterasa inactivadora del AMPc, y que por tanto, incrementan el AMPc, relajan también la musculatura lisa. El AMPc activa la proteinkinasa AMPc-dependiente, la cual fosforila e inactiva la kinasa de la calmodulina, y por tanto el proceso contráctil queda interrumpido. Sin embargo, ya que aunque no se fosforile la cadena ligera de la miosina, el calcio es capaz,

parcialmente, de provocar la contracción, se puede deducir que la defosforilación de la cadena ligera de la miosina no es esencial en el proceso de relajación, y que existen otros mecanismos de relajación. La proteinkinasa activada por el AMPc puede estimular también la ATPasa- Na^+/K^+ de membrana, favoreciendo así la activación de la bomba Na^+/K^+ , lo que provoca la entrada de potasio y salida de sodio y favorece la salida de calcio fuera de la célula y por tanto la relajación muscular.

El incremento de GMPc es otro de los mecanismos propuestos para explicar la relajación del músculo liso (Schulz y col., 1991). El GMPc, sus análogos sintéticos y los inhibidores de la fosfodiesterasa que evitan su degradación presentan propiedades vasodilatadoras. El mecanismo por el cual este nucleótido actúa está por estudiar.

5.4.-Benzodiazepinas y canales de calcio.

5.4.1.- Relación de las benzodiazepinas centrales con el canal de calcio.

Diversos estudios demuestran que el diazepam presenta propiedades inotrope y cronotrope negativas. Estos hechos sugieren la participación de las benzodiazepinas, a concentraciones micromolares, en la función del canal de calcio (Bender y col., 1985; Mestre y col., 1985).

Los efectos antagonistas del calcio de las benzodiazepinas centrales no están limitados al sistema cardiovascular. Diversos estudios (Ferrendelli y col., 1982; Taft y De Lorenzo, 1984) muestran, que a concentraciones micromolares inhiben la captación de calcio en los sinaptosomas inducido por despolarización, siendo este proceso estereoespecífico. Asimismo, la duración del potencial de acción dependiente de calcio es reducido por diazepam y Ro 5-4864 a concentraciones de 0.5 μM y 50 μM respectivamente (Mestre y col., 1984a; 1985). Las benzodiazepinas también facilitan la despolarización inducida por la liberación de dopamina, con una actividad dependiente en parte, de la presencia de un sustituyente en N-1 (Mitchell y Martin, 1979).

5.4.2.- Relación de las benzodiazepinas periféricas con el canal de calcio.

Los receptores benzodiazepínicos periféricos también parecen estar asociados a los canales de calcio voltaje-dependientes, como demuestra la competencia existente entre el Ro 5-4864, el nitrendipino y el diazepam (Bender y col., 1985).

El Ro 5-4864 disminuye la duración del potencial de acción a concentraciones del rango $3 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$, efecto que es bloqueado por PK 11195. Este último compuesto es capaz de bloquear los efectos de los antagonistas del calcio (nitrendipino, verapamilo y diltiazem) y de los activadores del canal de calcio como Bay K 8644 (Mestre y col., 1985).

Sin embargo, no todas las evidencias obtenidas apuntan a una asociación entre canal de calcio y los sitios de unión benzodiazepínicos periféricos. Los procesos de inhibición del canal de calcio no se correlacionan con las afinidades de las benzodiazepinas periféricas a sus receptores. Así como tampoco existe una relación estrecha entre las concentraciones a las que las benzodiazepinas bloquean los canales de calcio, del orden micromolar, y las concentraciones a las que se unen al receptor benzodiazepínico periférico, del orden nanomolar (Rampe y Triggle, 1986).

Los derivados de las 1,4-dihidropiridinas, nifedipino y nitrendipino, poseen una afinidad en el rango subnanomolar por el canal de calcio y desplazan al Ro 5-4864 de su unión a los receptores benzodiazepínicos periféricos sólo a concentraciones micromolares.

Es posible que esta discrepancia refleje una capacidad de las benzodiazepinas de estabilizar un estado del canal, mientras que las dihidropiridinas estabilizan otro estado (Cantor y col., 1984).

5.4.3.- Especificidad de acción de las benzodiazepinas en los canales de calcio.

La elevada concentración de benzodiazepinas necesaria para la modulación de los canales de calcio cuestiona su especificidad. Las acciones de las benzodiazepinas sobre las propiedades eléctricas neuronales incluyen efectos en la conductancia al sodio y al potasio, así como efectos no específicos en las propiedades eléctricas. Altas concentraciones de benzodiazepinas bloquean en las neuronas la conductancia al calcio pero sin efecto aparente sobre los canales de sodio. A pesar de que son necesarias dichas concentraciones, éstas se encuentran dentro del rango en el que se emplean para el control de las convulsiones inducidas por electroshock en los animales de experimentación y de las convulsiones epilépticas en clínica humana (Rampe y col., 1987).

II.-PARTE EXPERIMENTAL

A.-EXPERIENCIAS EN CONDUCTO DEFERENTE AISLADO DE RATA.

1.- Obtención y montaje en baño de órganos del conducto deferente de rata.

Para llevar a cabo las siguientes experiencias se utilizaron ratas Sprague-Dawley, de peso 300-350 g, procedentes del estabulario de esta Facultad. Los animales permanecieron en nuestro laboratorio bajo condiciones standard de temperatura (22 ± 0.5 °C), y mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (8 a.m.- 8 p.m.), con libre acceso al pienso (Letica IPM-R20) y al agua de bebida.

Las ratas se sacrificaron por traumatismo craneal y posterior exsanguinación por arteriotomía carotídea. Seguidamente, el animal se dispuso en decúbito supino sobre una tabla quirúrgica, y se practicó una laparatomía media, a fin de poner al descubierto el paquete intestinal. Para facilitar la resección de los conductos deferentes, se desplazaron los testículos desde su posición escrotal a la cavidad abdominal.

Los conductos deferentes de rata son unas finas estructuras blancas, que parten del epidídimo, cerca de los testículos, hasta la vesícula seminal. Los conductos deferentes deben ser extraídos en su totalidad, evitando cualquier lesión que se pueda producir en el órgano. Una vez diseccionados, se colocaron en una placa de Petri que contenía una solución de Krebs-Henseleit (adecuada para cada tipo de experiencia) aireada convenientemente y de forma regular con carbógeno (95 % O_2 , 5% CO_2). A continuación, se separó cuidadosamente el tejido conectivo y vasos sanguíneos adheridos al órgano. También se extrajo el semen que pudiera haber en el interior del conducto. A continuación se procedió al montaje del órgano atándose éste, por su extremo epididimal, a la barra soporte del baño; se toma una longitud constante de 2 cm y finalmente, se transfiere a la copa del baño, de 20 ml de capacidad. El extremo libre se liga a un transductor de tensión isométrico (TRI 010 Letica), acoplado a un amplificador (ISO 505 Letica) y éste a un registrador multicanal

(PolyGraph 4000 Letica). Los conductos deferentes, una vez montados en la copa del baño, se sometieron a un período de estabilización de 30 min, a una tensión 0.4 g y a una temperatura constante de 37 °C. A lo largo de toda la experiencia se aplicó una aireación con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) de forma continua y homogénea, a través de una placa porosa de vidrio situada en la base del baño.

2.-Protocolo experimental de la estimulación del conducto deferente con noradrenalina exógena.

La solución fisiológica nutritiva utilizada cuando se estimuló el conducto deferente con noradrenalina exógena es Krebs-Henseleit, desprovista de magnesio, cuya composición, en mM, fue como sigue: NaCl, 86.2; KCl, 4.7; Na₂SO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.19; CaCl₂, 1.9; NaHCO₃, 25; glucosa, 11.7.

En las experiencias en que se modificó la cantidad de calcio en la solución fisiológica nutritiva, se disminuyó equimolecularmente el contenido de NaCl con el fin de no variar la composición iónica del medio.

Las contracciones producidas por noradrenalina exógena se obtuvieron por adición a la copa del baño de una solución acuosa de bitartrato ácido de noradrenalina, a una concentración en el medio de 12 µM. Esta concentración es la que producía la respuesta máxima del órgano. Las diferentes respuestas control a la noradrenalina se obtuvieron dejando períodos de recuperación de 10 a 15 min entre cada una de ellas.

Los fármacos se mantuvieron en contacto con el conducto deferente durante 10 min antes de registrar nuevamente la respuesta a la noradrenalina. La solución madre de noradrenalina se preparó con una solución acuosa de ácido ascórbico al 0.1%, para evitar la oxidación de la noradrenalina.

2.1.-Resultados.

En el conducto deferente de rata, las benzodiazepinas ensayadas, Ro 5-4864, diazepam y clonazepam, provocaron la inhibición de las contracciones inducidas por noradrenalina exógena, en el rango de concentraciones ensayadas (0.002 μM - 12 μM) (Fig. 14).

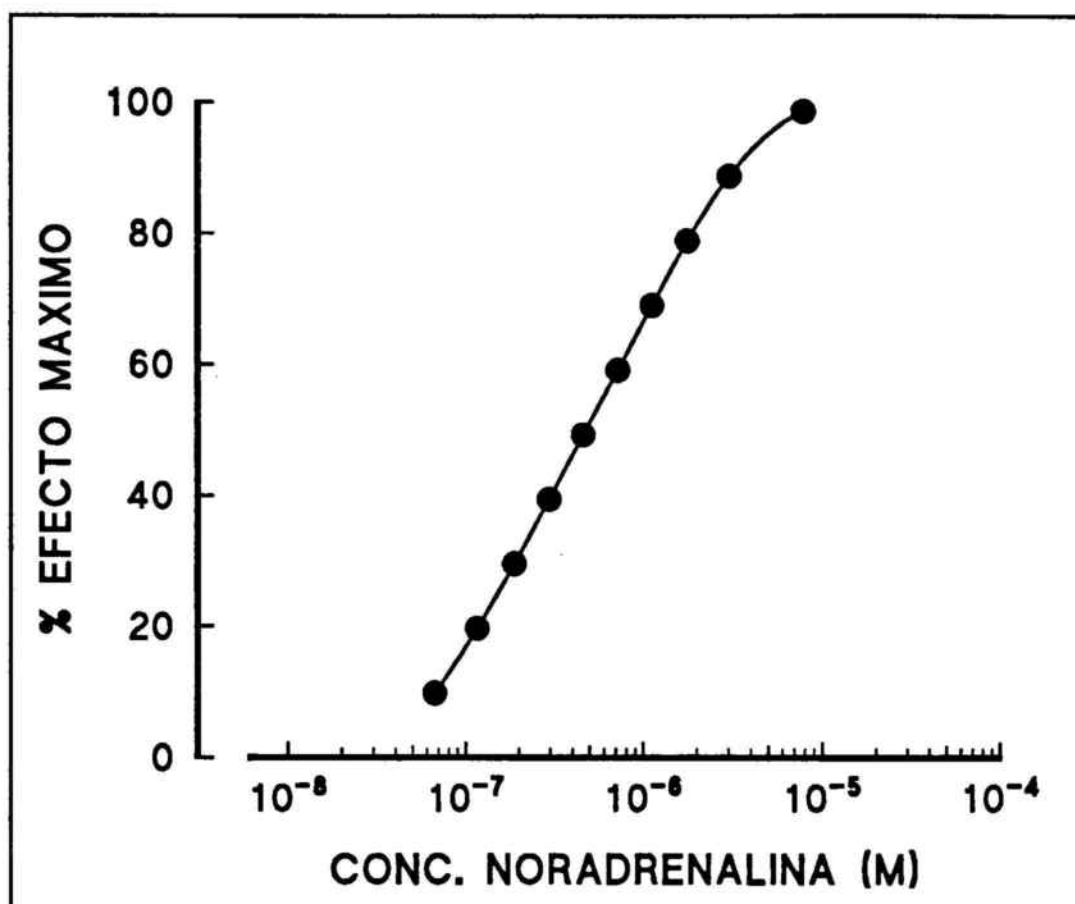


Figura 14: Curva dosis-respuesta a la noradrenalina exógena en conducto deferente de rata.

En los tres casos se observa que el antagonismo es de tipo no competitivo, ya que la presencia en el medio de estos compuestos provoca un desplazamiento de la curva dosis respuesta a la noradrenalina hacia la derecha y disminuye, al mismo tiempo, la respuesta máxima. En consecuencia para valorar dicho antagonismo se procedió a calcular los pD_2' correspondientes.

Para el Ro 5-4864, se ensayaron concentraciones comprendidas entre 4 y 30 μM (Tabla 1). El pD_2' calculado fue de 5.00 (Tabla 5).

Tabla 1: Efecto del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas por noradrenalina.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} NA (g)</u>	<u>INHIBICION(%)**</u>
0	8	1.52	0
4.00	2	1.18	22.18 \pm 3.39
4.90	6	1.15	24.26 \pm 7.71
6.20	6	1.01	33.34 \pm 9.68
9.20	6	0.66	55.99 \pm 9.68
31.20	5	0.27	81.59 \pm 5.92

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

En el caso del diazepam, se ensayaron concentraciones de 20 a 80 μ M (Tabla 2), y el pD_2 ' resultante fue de 4.20 (Tabla 5).

Tabla 2: Efecto del diazepam en la contracciones inducidas por noradrenalina.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} NA (g)</u>	<u>INHIBICION(%)**</u>
0	8	1.39	0
20.80	6	1.24	10.91 \pm 4.23
31.30	6	1.17	15.83 \pm 2.38
41.60	5	0.76	45.25 \pm 5.34
83.10	6	0.57	59.25 \pm 7.97

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Del mismo modo para el clonazepam el rango de concentraciones fue de 10 a 50 μM (Tabla 3), y el pD_2' estimado de 4.22 (Tabla 5).

Tabla 3: Efecto del clonazepam en las contracciones inducidas por noradrenalina.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} NA (g)</u>	<u>INHIBICION(%)**</u>
0	8	1.21	0
5.70	8	0.77	36.67 \pm 6.54
11.40	7	0.65	46.39 \pm 8.81
22.70	7	0.37	69.24 \pm 9.18
45.30	7	0.37	85.17 \pm 5.17

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

En ensayos paralelos, se utilizó el PK 11195, antagonista específico del receptor benzodiazepínico periférico, para determinar si la acción inhibitoria de los anteriormente mencionados compuestos estaba mediada por este tipo de receptores a las benzodiazepinas.

Contrariamente a lo que cabía esperar, este compuesto no sólo no antagonizaba la acción de las benzodiazepinas en este tipo de experiencia, sino que él mismo inhibía las contracciones inducidas por noradrenalina exógena en conducto deferente de rata. Para el PK 11195 se ensayaron dosis comprendidas entre 5.5 y 45 μM (Tabla 4), y ya que el antagonismo era también de tipo no competitivo se calculó el pD_2' correspondiente siendo el valor de 4.95 (Tabla 5).

Tabla 4: Efecto del PK 11195 en las contracciones inducidas por noradrenalina.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} NA (g)</u>	<u>INHIBICION(%)**</u>
0	8	1.21	0
5.70	8	0.77	36.77 \pm 6.54
11.40	7	0.65	46.39 \pm 8.81
22.70	7	0.37	69.24 \pm 9.18
45.30	7	0.18	85.17 \pm 5.17

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Tabla 5: Valores de pD_2' obtenidos para cada compuesto frente a las contracciones inducidas por noradrenalina en conducto deferente de rata.

<u>COMPUESTO</u>	<u>n*</u>	<u>pD_2'</u>
Ro 5-4864	5	5.00 \pm 0.11
Diazepam	4	4.20 \pm 0.29
Clonazepam	4	4.22 \pm 1.13
PK 11195	4	4.98 \pm 0.19

* Número de observaciones.

Los valores de pD_2' y de la pendiente se expresan como la media \pm DS.

El orden de potencia en la inhibición de las contracciones por noradrenalina fue Ro 5-4864 > PK 11195 > diazepam > clonazepam (Fig. 15).

Con el fin de descartar la participación de receptores benzodiazepínicos centrales en este efecto inhibitor, se realizó la misma experiencia utilizando GABA, en un rango de concentraciones de 1.3 a

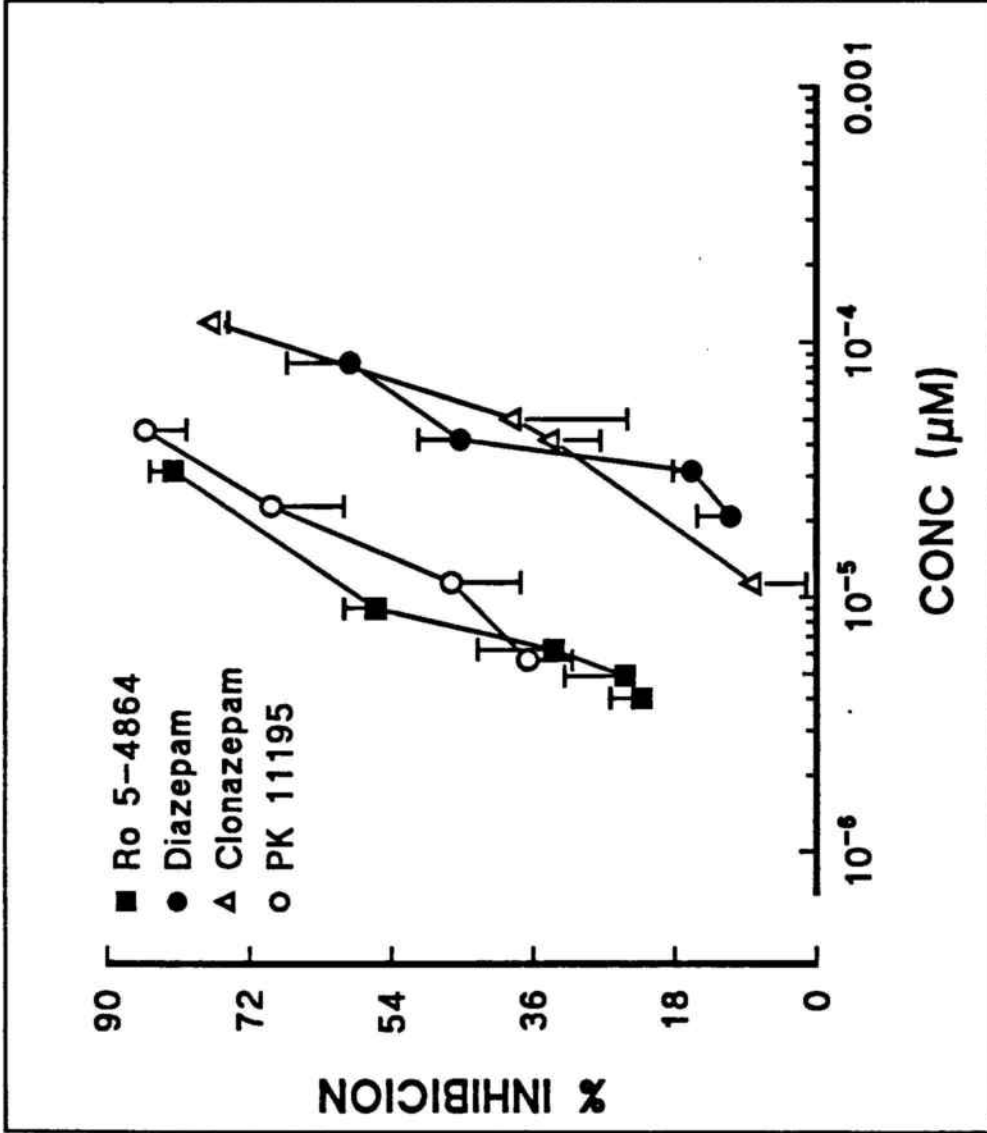


Figura 15: Curvas dosis-respuesta de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas por noradrenalina en conducto deferente de rata.

190 μM , observándose que este compuesto no presentaba efecto *per se* a este nivel y tampoco modificaba la respuesta a la noradrenalina exógena o a las benzodiazepinas.

Asimismo, se ensayó un antagonista específico de los receptores benzodiazepínicos centrales, el Ro 15-1788, para descartar la intervención de este tipo de receptores a nivel de conducto deferente de rata. Como era de esperar, este compuesto no fue capaz de modificar el efecto de la noradrenalina exógena a este nivel ni de revertir el efecto de las otras benzodiazepinas ensayadas, lo que corrobora el hecho de que el antagonismo de las benzodiazepinas a este nivel no está relacionado con los receptores benzodiazepínicos centrales.

2.2.-Influencia de la concentración de calcio en la solución fisiológica nutritiva sobre las contracciones inducidas por noradrenalina exógena.

A raíz de los resultados anteriores, y teniendo en cuenta la posible relación entre los canales de calcio voltaje-dependientes, ya mencionados por otros autores (Mestre y col., 1985), y la acción de las benzodiazepinas a nivel periférico, se valoró la reversión del efecto antagonista de estos compuestos y del PK 11195 frente a la noradrenalina exógena, variando la concentración de calcio del medio.

En primer lugar se duplicó la concentración de calcio de la solución Krebs-Henseleit (concentración final obtenida 3.8 mM), observándose que se revertía el efecto inhibitor de las benzodiazepinas en un 20% (Tabla 6). El análisis estadístico indicó una significación de $p < 0.005$ para el Ro 5-4864, $p < 0.01$, para el diazepam y $p < 0.001$ en el caso del clonazepam. Sin embargo cuando la concentración de calcio se aumentó hasta 5.7 mM, no se apreciaron diferencias significativas respecto a los resultados obtenidos con una concentración de calcio de 3.8 mM (Fig. 16).

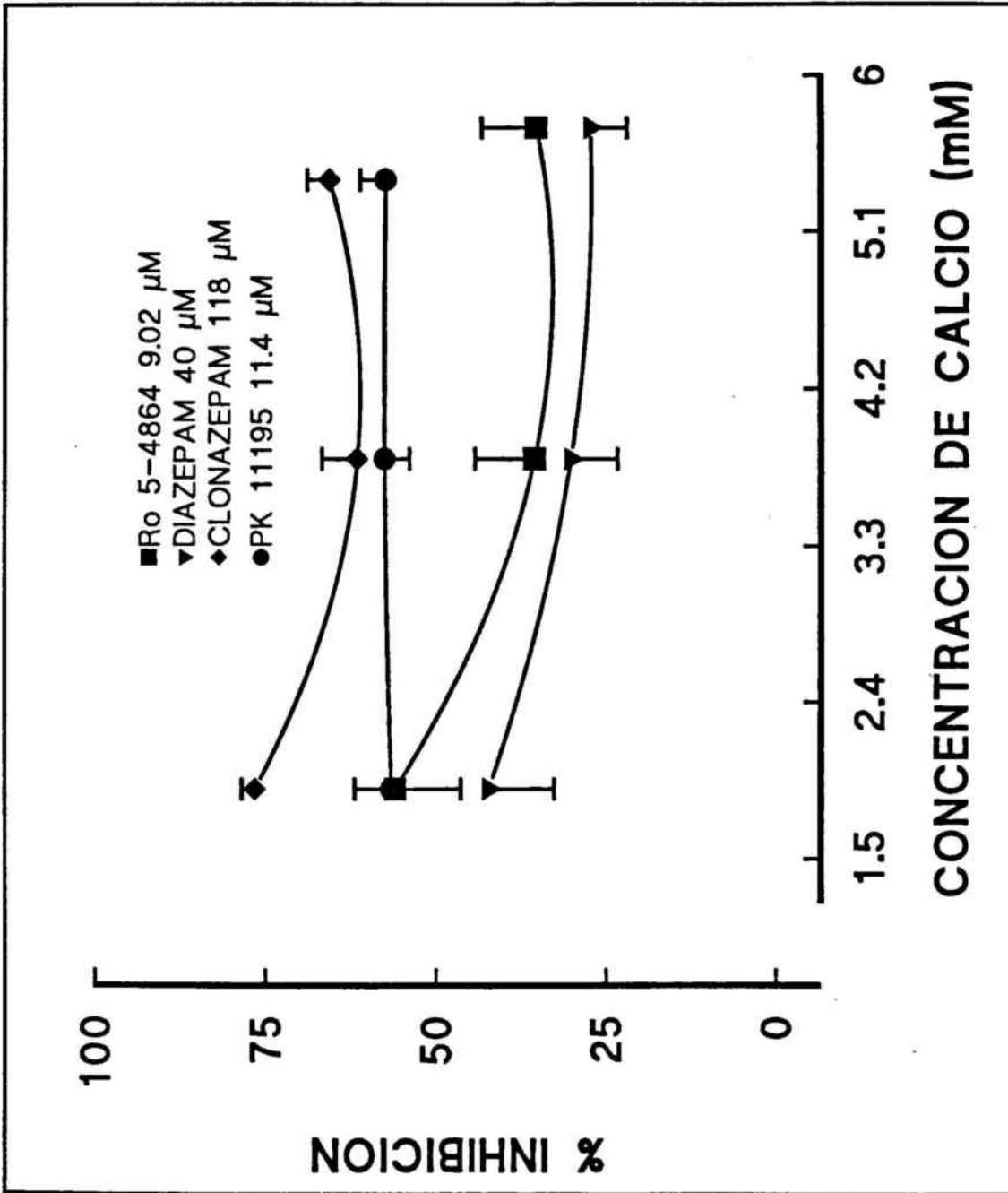
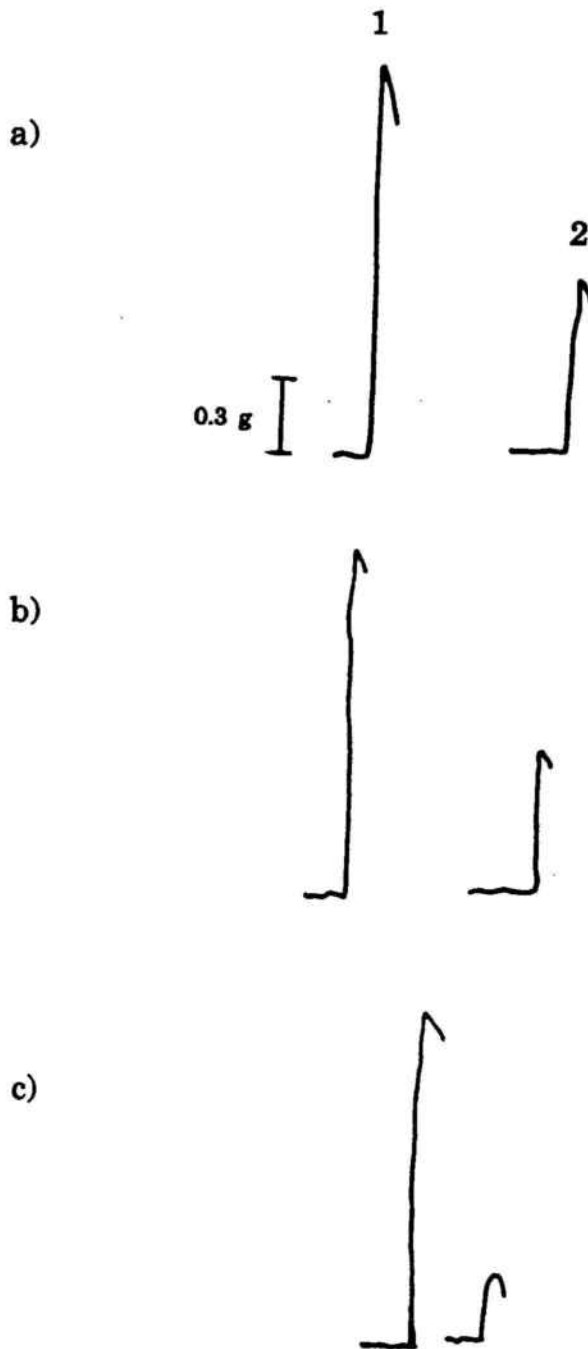
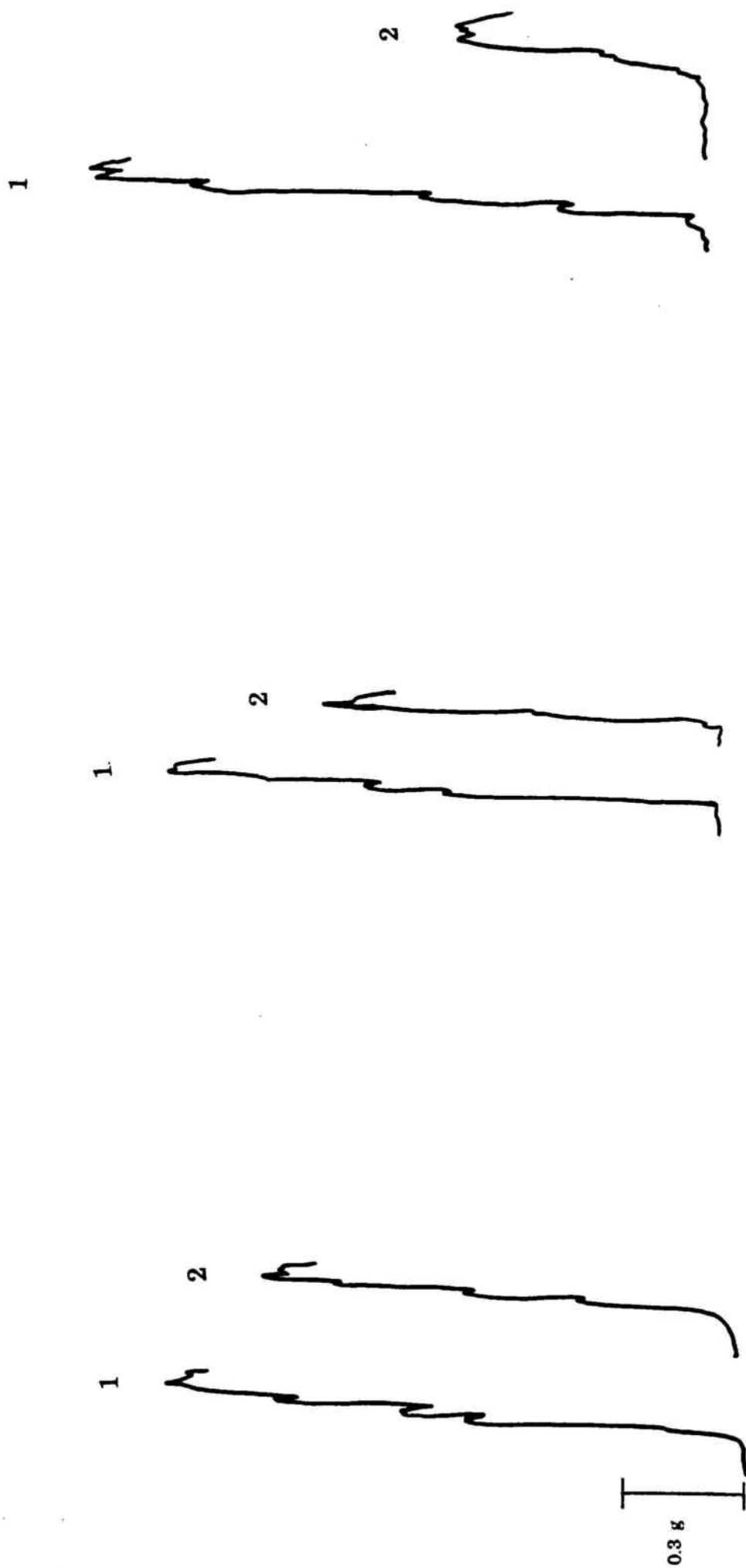


Figura 16: Influencia de la concentración de calcio de medio en el efecto inhibidor de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas por noradrenalina en conducto deferente de rata.



Ejemplo de las contracciones inducidas por noradrenalina (12 μM) en conducto deferente de rata en ausencia (1) y presencia (2) de:

- a) Ro 5-4864 (9.02 μM).
- b) Diazepam (10.6 μM).
- c) Clonazepam (31.6 μM).



a) $[Ca^{+2}]_0$: 1.9 mM.

b) $[Ca^{+2}]_0$: 3.8 mM.

c) $[Ca^{+2}]_0$: 5.7 mM.

Influencia de la concentración de calcio del medio en las curvas dosis-respuesta a la noradrenalina en ausencia (1) y presencia (2) de diazepam (40 μM).

Tabla 5: Inhibición (%) de las contracciones inducidas por noradrenalina a diferentes concentraciones de calcio por diferentes compuestos.

COMPUESTO	CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO					
	Ca 1.9mM	<u>n</u>	Ca 3.8 mM	<u>n</u>	Ca 5.7 mM	<u>n</u>
Ro 5 4864 (9.02 μ M)	55.97 \pm 9.63	6	35.45 \pm 8.78**	6	35.17 \pm 8.05**	6
Diazepam (40 μ M)	42.25 \pm 9.63	5	30.11 \pm 6.83*	8	27.25 \pm 5.35**	6
Clonazepam (118 μ M)	76.54 \pm 1.91	7	61.51 \pm 5.15***	4	62.59 \pm 3.29***	8
PK 11195 (11.4 μ M)	46.39 \pm 8.81	7	42.49 \pm 3.64	7	43.65 \pm 3.75	4

Resultados expresados como media \pm DS, siendo "n" el número de observaciones.

ANOVA y test de Scheffé: * $p < 0.01$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ vs Ca 1.9 mM.

3.-Protocolo experimental de la estimulación con calcio.

Con el fin de poner de manifiesto la posible relación entre los canales de calcio voltaje-dependientes y la acción de las benzodiazepinas a nivel periférico se ensayó el efecto de éstas sobre las contracciones inducidas por calcio exógeno en una preparación despolarizada que provoca en las células musculares la apertura de los canales de calcio y por tanto el libre paso de calcio extracelular al interior de la célula. Si añadimos a una preparación de este tipo una solución de calcio concentrada se produce una contracción de la musculatura lisa por la entrada masiva de calcio al citoplasma. Para ello se utilizó una solución fisiológica nutritiva cuya composición fue la siguiente (en mM): NaCl, 80; KCl, 48; NaHCO₃, 25; MgCl₂, 1.2; Glucosa, 14.

Las contracciones inducidas por calcio, en estas condiciones, se produjeron adicionando al baño una solución acuosa de CaCl₂, alcanzándose

una concentración final de 2.5 mM. Al igual que en las contracciones inducidas por noradrenalina, el período de recuperación varió entre 10 y 15 min; asimismo, el tiempo de contacto del órgano con el compuesto a ensayar fue de 10 min, antes de obtener una nueva respuesta contráctil al calcio.

3.1.-Resultados.

Todos los compuestos ensayados produjeron una inhibición dosis-dependiente de las contracciones inducidas por calcio en el conducto deferente de rata (Fig. 17).

Los resultados obtenidos, para el caso del Ro 5-4864, ensayado a concentraciones comprendidas entre 10 y 20 μM se muestran en la tabla 7, y el pD_2' calculado fue de 4.78 (Tabla 11).

Tabla 7: Efecto del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas por calcio.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>Emax Ca (g)</u>	<u>INHIBICION(%)**</u>
0	8	1.42	0
10.40	4	1.21	14.42 \pm 4.43
12.50	8	0.98	32.91 \pm 5.81
15.60	6	0.82	42.54 \pm 5.49
20.80	6	0.45	65.63 \pm 5.49

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Para el diazepam el rango de concentraciones fue de 8 a 80 μM (Tabla 8), con un pD_2' de 4.71 (Tabla 11). En el caso del clonazepam concentraciones ensayadas fueron de 20 a 30 μM (Tabla 9), siendo el pD_2' de 4.57 (Tabla 11).

Del mismo modo, en este caso el PK 11195 también mostró efecto inhibitor de este tipo de contracciones, a concentraciones comprendidas entre 15 y 30 μM (Tabla 10), y el pD_2' calculado fue de 4.66 (Tabla 11).

Tabla 8: Efecto del diazepam en las contracciones inducidas por calcio.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} Ca (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	8	1.33	0
7.95	5	0.94	30.81 \pm 9.61
18.50	5	0.80	40.61 \pm 12.51
27.80	4	0.62	54.17 \pm 9.20
39.60	4	0.36	73.58 \pm 6.19
83.40	3	0.21	84.64 \pm 9.15

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Tabla 9: Efecto del clonazepam en las contracciones inducidas por calcio.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} Ca (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	8	1.040	0
19.80	4	0.77	25.70 \pm 6.18
25.00	6	0.58	44.24 \pm 7.08
31.60	5	0.39	62.69 \pm 4.91

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS .

Tabla 10: Efecto del PK 11195 en las contracciones inducidas por calcio.

<u>CONC.(μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} Ca (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	8	0.56	0
18.10	4	0.32	35.31 \pm 7.54
22.30	4	0.25	51.63 \pm 3.31
27.80	4	0.18	64.37 \pm 5.34
30.10	4	0.12	76.39 \pm 2.11

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Tabla 11: Valores de pD_2' obtenidos para cada compuesto frente a las contracciones inducidas por calcio en conducto deferente de rata.

<u>COMPUESTO</u>	<u>n*</u>	<u>pD_2'</u>
Ro 5-4864	4	4.78 \pm 0.06
Diazepam	5	4.71 \pm 0.17
Clonazepam	5	4.64 \pm 0.42
PK 11195	4	4.66 \pm 0.05

* Número de observaciones

Los valores de pD_2' y de la pendiente se expresan como la media \pm DS.

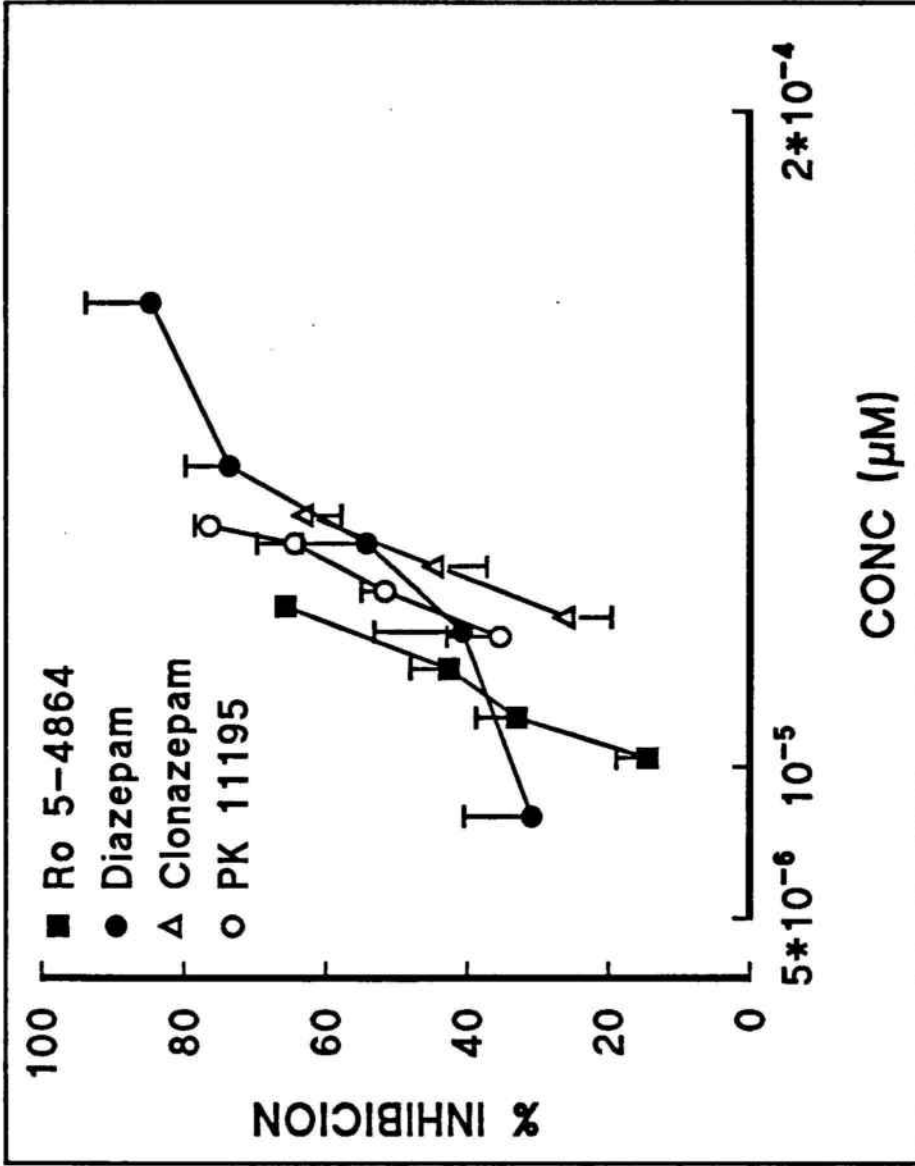
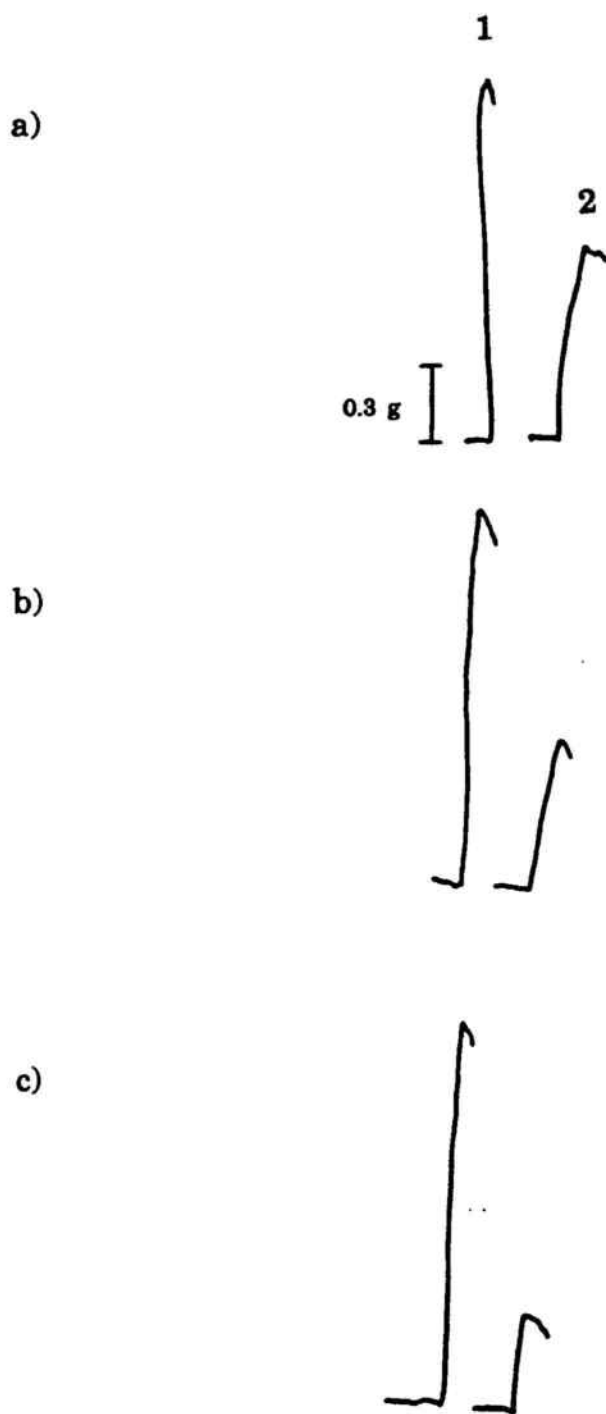


Figura 17: Curvas dosis-respuesta de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas por calcio en conducto deferente de rata.



Ejemplos de las contracciones inducidas por calcio en conducto deferente de rata en ausencia (1) y presencia (2) de:

- a) Ro 5-4864 ($9.02 \mu\text{M}$).
- b) Diazepam ($10.6 \mu\text{M}$)
- c) Clonazepam ($31.6 \mu\text{M}$)

4.-Protocolo experimental de la despolarización inducida por KCl.

La solución fisiológica nutritiva utilizada en este tipo de estimulación fue Krebs-Henseleit, cuya composición fue la siguiente (mM): NaCl 119; KCl 4.6; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2.5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 7H₂O y Glucosa 11.1.

Los conductos deferentes montados según se indicó en el apartado 1.-, se estabilizaron en el baño durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se indujo una fuerte despolarización de las células del conducto deferente por la adición de una solución concentrada de KCl (160 mM). La contracción producida se registró durante un período de tiempo de 20 minutos.

Tras un período de recuperación de 40 minutos, se añadió el fármaco motivo del estudio al baño. Se mantuvo en contacto con el órgano durante un tiempo de 15 minutos, y se provocó una nueva contracción por adición de la solución de KCl (160 mM). De esta forma se puede observar y cuantificar el efecto inhibitor del fármaco tanto a nivel de la contracción fásica como de la tónica.

Para cada uno de los fármacos ensayados, se obtuvieron las correspondientes curvas dosis-respuesta, observándose que todos ellos producían una inhibición de la contracción inducida por KCl en el conducto deferente aislado de rata. Asimismo, pudo observarse el patrón de respuesta diferenciado para las benzodiazepinas y los clásicos antagonistas del calcio.

4.1.- Resultados.

Los resultados han sido expresados como % de inhibición que producen los compuestos sobre la fase fásica o rápida, así como sobre la fase tónica o lenta de la respuesta contráctil inducida por una solución concentrada de KCl (160 mM) en el conducto deferente aislado de rata.

Las benzodiazepinas ensayadas fueron: Ro 5-4864, diazepam y clonazepam. Se elaboraron las correspondientes curvas dosis-respuesta para cada una de ellas, observándose que todas ellas reducían ambas fases de la respuesta contráctil. Dicha reducción fue dosis-dependiente, y se revirtió después del lavado con la solución nutritiva fisiológica de Krebs-Henseleit.

En el caso del Ro 5-4864, las dosis estudiadas se encuentran dentro del rango: 4 y 80 μM (Tabla 12; Fig. 18). Las CI_{50} (concentración inhibidora 50) fueron de: 11.46 μM para la fase fásica y de 70.77 μM para la fase tónica de la respuesta (Tabla 18; Fig. 24 y 25).

Las dosis ensayadas para diazepam fueron 9-100 μM (Tabla 13; Fig. 19). Las CI_{50} obtenidas fueron de: 18.65 μM y de 58.86 μM para la fase fásica y tónica respectivamente (Tabla 18; Fig. 24 y 25).

La tercera benzodiazepina estudiada fue el clonazepam. Se ensayaron dosis comprendidas entre 40 y 250 μM (Tabla 14; Fig. 20). Las CI_{50} obtenidas para la fase fásica fue de 64.21 μM , mientras que para la fase tónica de 236.99 μM (Tabla 18; Fig. 24 y 25).

Las tres benzodiazepinas se mostraron más selectivas por la fase fásica que por la fase tónica, de modo que mientras que la fase fásica pudo ser prácticamente anulada a altas concentraciones, la fase tónica presentó un componente resistente a la acción de estos fármacos que impedía su total anulación.

Tabla 12: Inhibición por Ro 5-4864 de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DE LA		n*
	CONTRACCION FASICA (%)	CONTRACCION TONICA (%)	
3.92	22.07 \pm 3.34	1.21 \pm 3.20	7
11.30	39.27 \pm 5.46	4.71 \pm 6.30	8
17.00	58.17 \pm 8.19	12.19 \pm 9.60	15
22.70	70.16 \pm 5.70	28.50 \pm 5.41	7
28.50	78.63 \pm 3.78	26.97 \pm 2.87	4
34.20	75.44 \pm 5.88	25.62 \pm 9.02	6
78.30	98.08 \pm 0.15	60.46 \pm 18.3	4

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

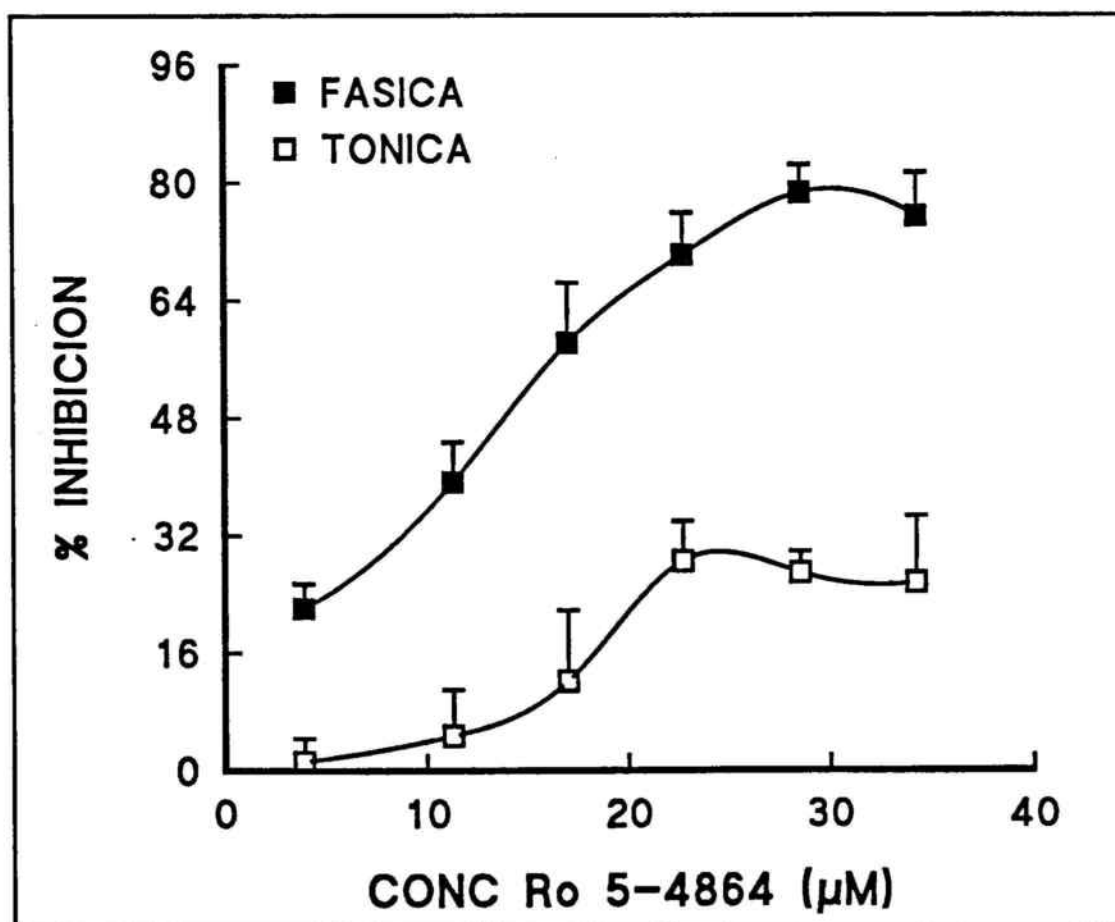


Figura 18: Curvas dosis-respuesta del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas por KCl.

Tabla 13: Inhibición por diazepam de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DE LA CONTRACCION FASICA (%)	INHIBICION DE LA CONTRACCION TONICA (%)	n*
9.57	26.37 \pm 6.03	2.54 \pm 3.45	6
11.90	39.56 \pm 4.64	20.61 \pm 6.46	8
26.30	62.85 \pm 4.74	32.89 \pm 5.22	7
52.60	71.70 \pm 4.12	42.16 \pm 5.79	7
105.0	92.00 \pm 4.50	71.39 \pm 4.23	7

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

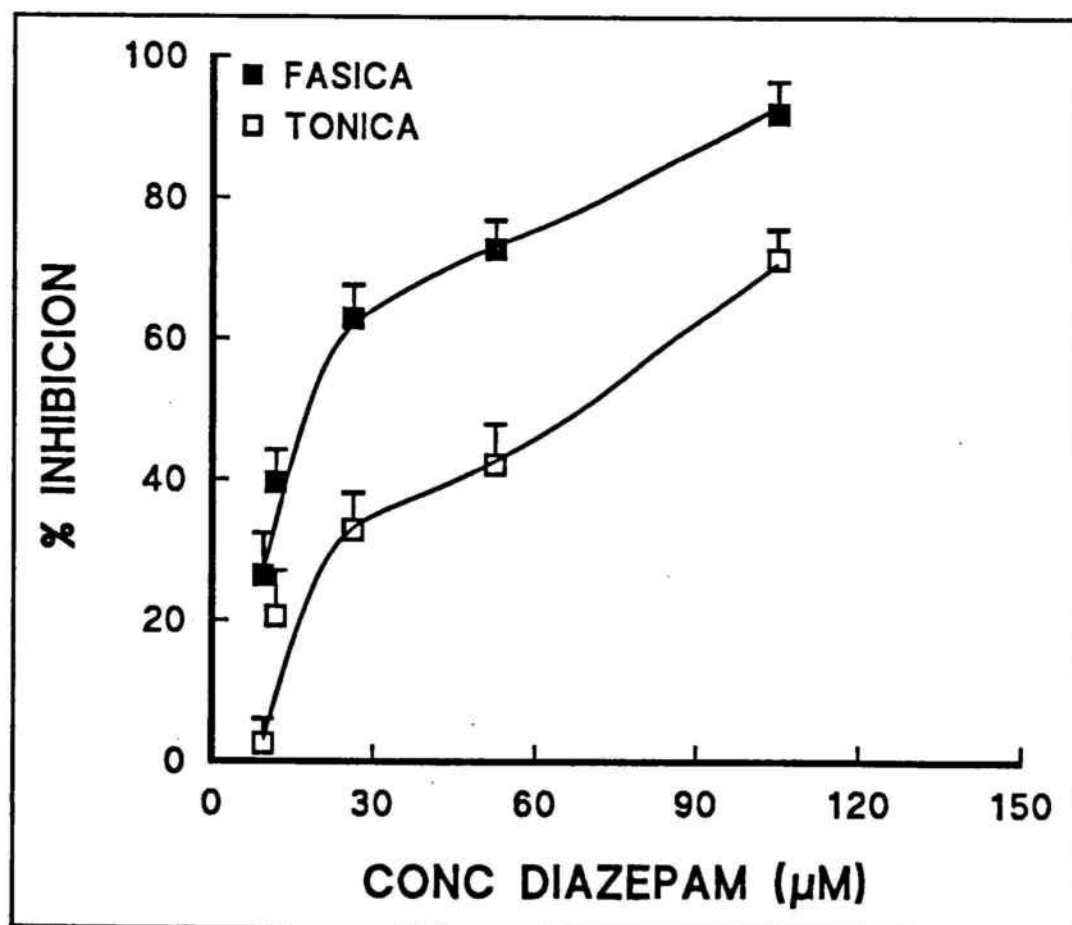


Figura 19: Curvas dosis-respuesta del diazepam en las contracciones inducidas por KCl.

Tabla 14: Inhibición por clonazepam de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DE LA CONTRACCION FASICA (%)	INHIBICION DE LA CONTRACCION TONICA (%)	n*
19.80	5.91 \pm 6.91	1.85 \pm 2.62	8
39.50	32.15 \pm 5.25	5.81 \pm 5.61	8
49.50	45.81 \pm 6.06	12.21 \pm 9.11	12
58.10	50.70 \pm 7.38	26.67 \pm 6.59	7
71.30	52.51 \pm 6.16	34.20 \pm 3.80	8
131.0	73.81 \pm 6.20	34.20 \pm 3.80	8
264.0	91.92 \pm 6.49	60.06 \pm 27.96	8

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

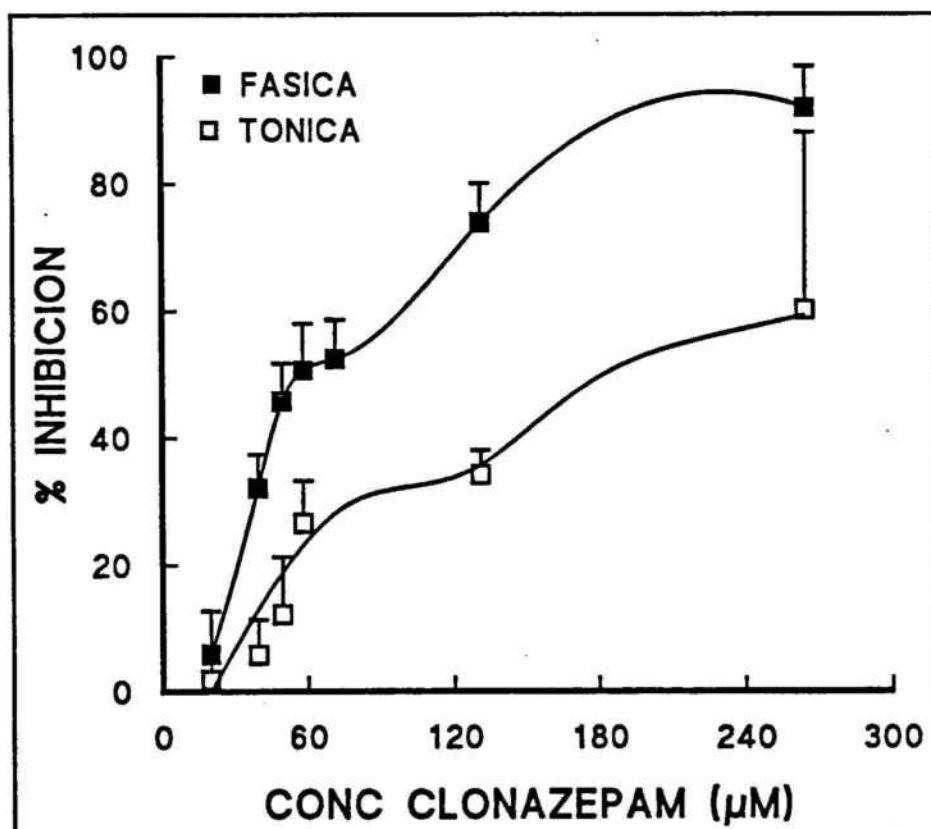


Figura 20: Curvas dosis-respuesta del clonazepam en las contracciones inducidas por KCl.

A nivel de la fase fásica la potencia relativa que presentaron estos fármacos fue: Ro 5-4864 > diazepam > clonazepam. En cambio a nivel de la fase tónica el diazepam se mostró más potente que el Ro 5-4864. Estos resultados, a nivel de la fase fásica, concuerdan con el orden de afinidad nanomolar que presentan las dichas benzodiazepinas por los lugares de unión periféricos (Le Fur y col., 1983a; Anholt, 1986).

El PK 11195, un antagonista del receptor benzodiazepínico periférico, no solamente no antagonizó las acciones de las benzodiazepinas, sino que también inhibió ambas fases de la respuesta contráctil inducida por KCl. Las dosis estudiadas fueron entre 2.15 y 62.5 μM (Tabla 15). Las CI_{50} obtenidas han sido de: 9.81 y 61.36 μM respectivamente para la fase fásica y tónica de la respuesta (Tabla 18; Fig 24 y 25).

Este compuesto presentó un patrón de respuesta muy similar al de las benzodiazepinas (Fig. 21), ya que mostró mayor selectividad para la fase fásica, llegando a anularla a altas dosis, que para la fase tónica, la cual presentó un componente resistente al fármaco. Además los valores de CI_{50} indican que este compuesto es más potente que las tres benzodiazepinas en el antagonismo de las contracciones inducidas por KCl.

Los antagonistas del calcio, nifedipino y diltiazem, provocaron una mayor inhibición de ambas fases de la respuesta que los fármacos anteriormente citados. En el caso del nifedipino se estudiaron las dosis comprendidas entre 0.001 y 2 μM (Tabla 16; Fig. 22) y en el caso de diltiazem las comprendidas entre 0.3 y 100 μM (Tabla 17; Fig. 23).

Las CI_{50} obtenidas para la fase fásica y para la fase tónica fueron respectivamente de: 0.05 y 0.02 μM en el caso de nifedipino, y de 3.76 y 2.84 μM para el diltiazem (Tabla 18; Fig. 24 y 25).

Tabla 15: Inhibición por PK 11195 de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DE LA CONTRACCION FASICA (%)	INHIBICION DE LA CONTRACCION TONICA (%)	n*
2.15	6.08 \pm 4.44	1.47 \pm 2.94	4
3.90	34.50 \pm 3.04	6.52 \pm 3.25	8
7.80	48.64 \pm 4.68	9.58 \pm 6.76	8
15.60	58.06 \pm 5.67	21.51 \pm 5.12	7
31.20	70.61 \pm 4.13	30.38 \pm 9.50	7
62.50	86.31 \pm 6.76	53.44 \pm 11.95	7

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

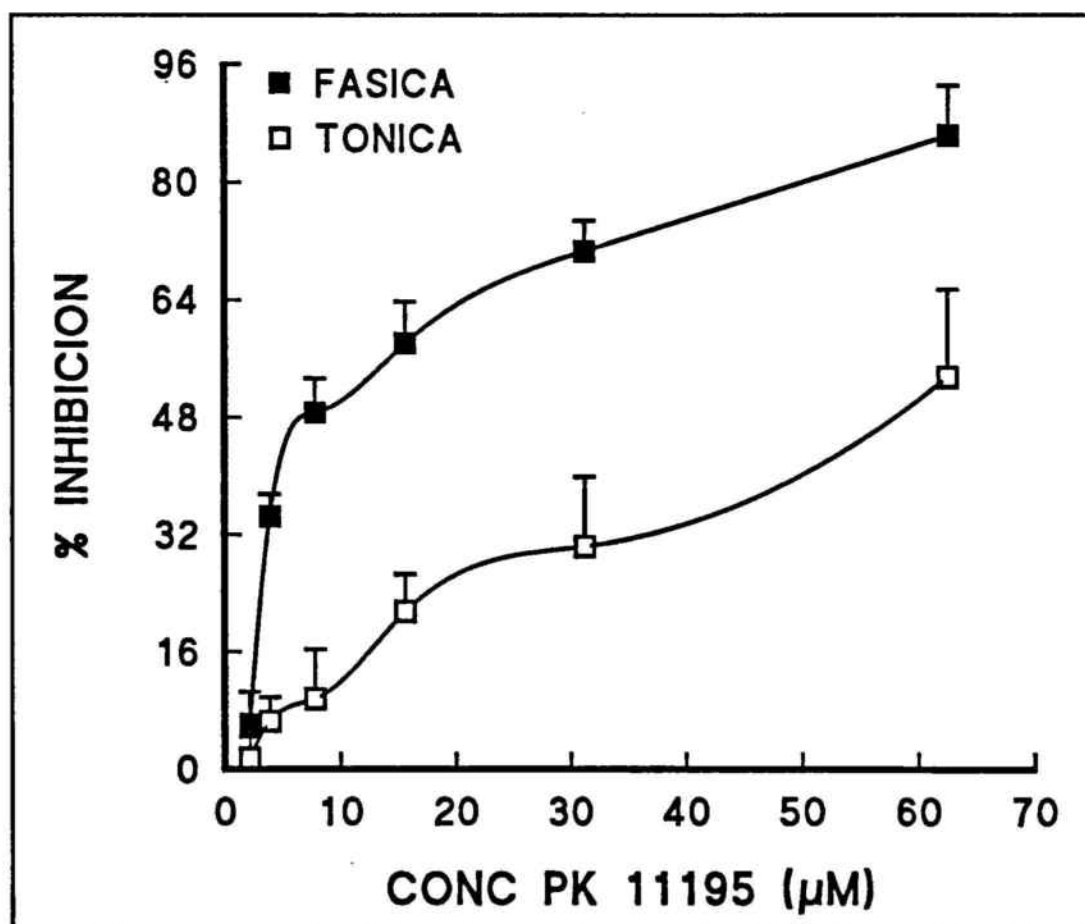


Figura 21: Curvas dosis-respuesta del PK 11195 en las contracciones inducidas por KCl.

Tabla 16: Inhibición por nifedipino de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

<u>CONCENTRACION (μM)</u>	<u>INHIBICION DE LA CONTRACCION FASICA (%)</u>	<u>INHIBICION DE LA CONTRACCION TONICA (%)</u>	<u>n*</u>
5×10^{-4}	4.13 ± 5.14	2.76 ± 4.04	6
1×10^{-3}	4.81 ± 3.55	14.08 ± 3.42	6
5×10^{-3}	8.79 ± 4.17	32.47 ± 7.28	4
1×10^{-2}	19.50 ± 5.76	37.98 ± 8.60	7
2×10^{-2}	33.44 ± 9.61	54.01 ± 7.99	6
5×10^{-2}	52.51 ± 5.56	62.72 ± 8.07	6
1.01	71.81 ± 8.25	75.27 ± 6.83	6
2	80.36 ± 6.86	79.00 ± 1.14	4

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

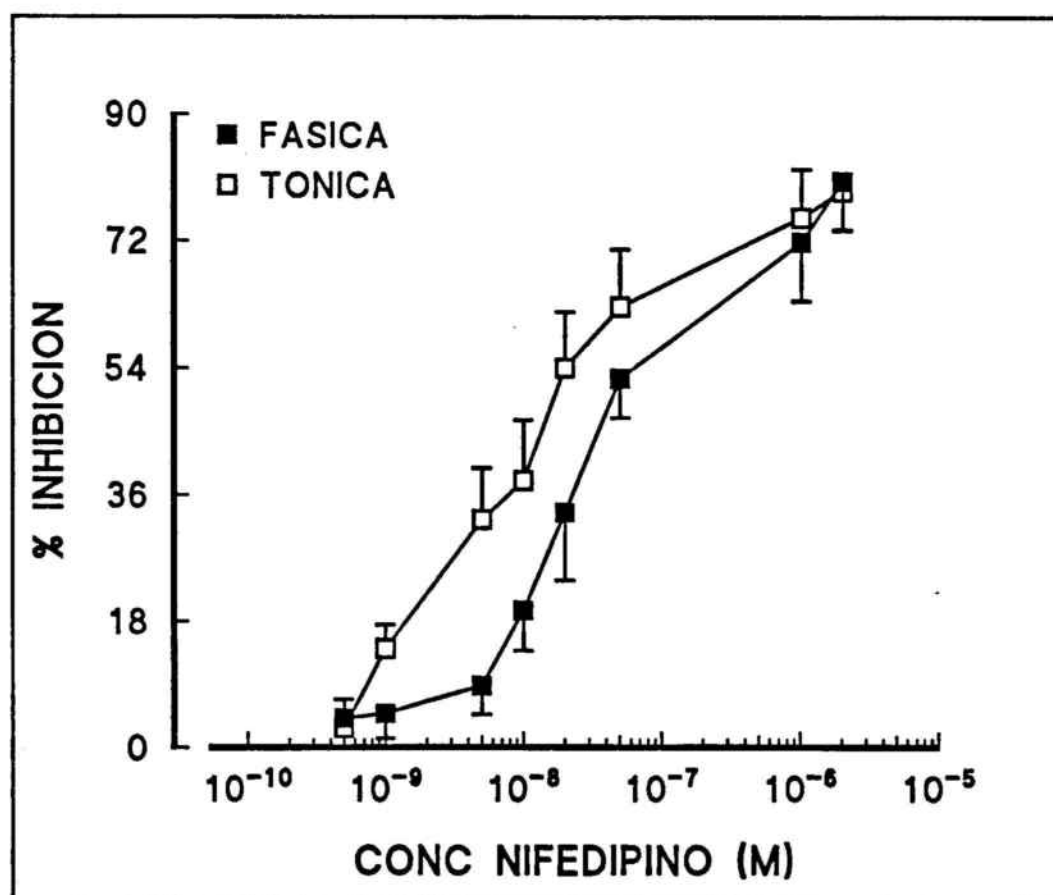


Figura 22: Curvas dosis-respuesta del nifedipino en las contracciones inducidas por KCL.

Tabla 17: Inhibición por diltiazem de las contracciones inducidas por despolarización con KCl en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DE LA CONTRACCION FASICA (%)	INHIBICION DE LA CONTRACCION TONICA (%)	n*
0.30	17.21 \pm 4.07	19.28 \pm 7.81	7
1.00	34.71 \pm 5.61	41.52 \pm 10.04	7
5.00	56.20 \pm 4.62	55.10 \pm 6.42	8
10.00	70.57 \pm 4.84	76.80 \pm 6.50	4
20.00	76.73 \pm 9.65	81.65 \pm 9.70	4
30.00	78.16 \pm 1.70	81.73 \pm 6.25	4
100.00	88.71 \pm 5.72	83.33 \pm 4.48	4

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

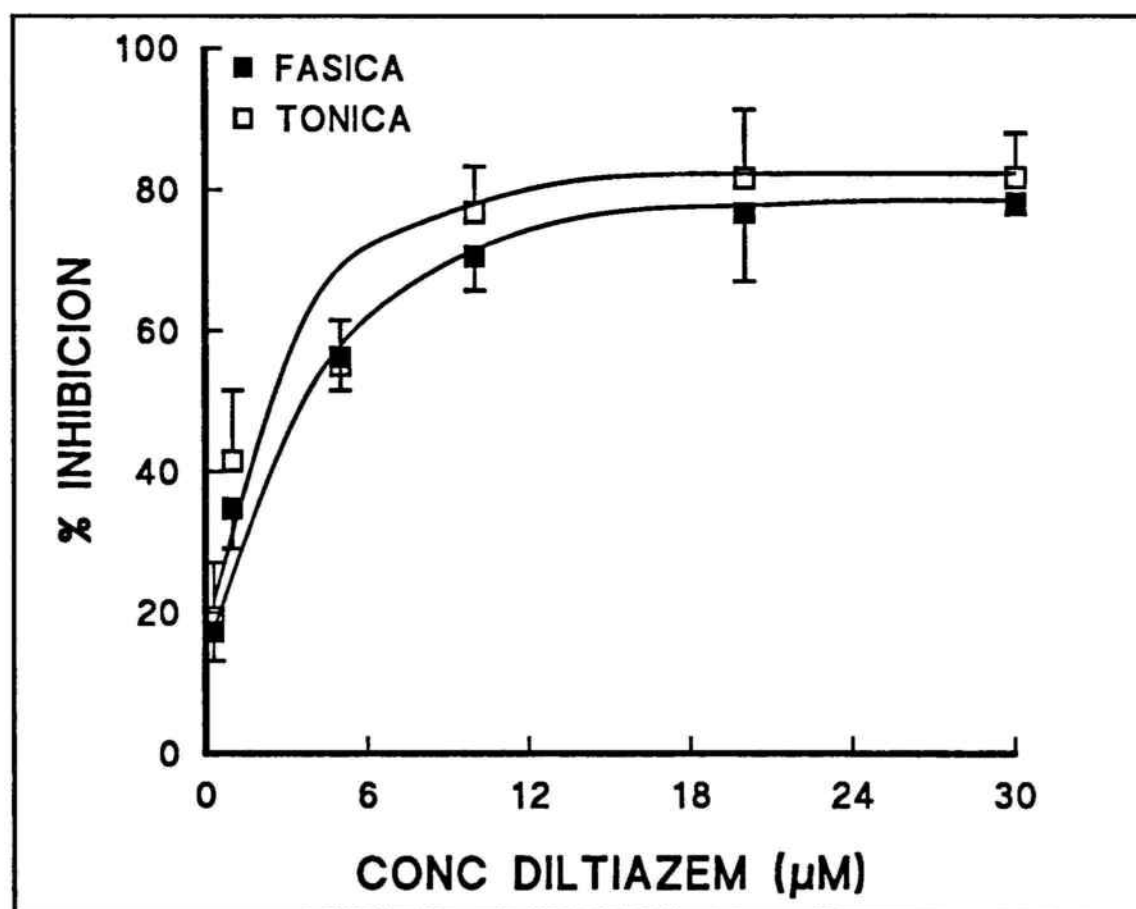


Figura 23: Curvas dosis-respuesta del diltiazem en las contracciones inducidas por KCl.

Tabla 18: Valores de CI_{50} obtenidos para cada compuesto en las contracciones inducidas por KCl en conducto deferente de rata.

<u>COMPUESTO</u>	<u>n*</u>	FASE FASICA	FASE TONICA
		<u>CI_{50} (μM)</u>	<u>CI_{50} (μM)</u>
Ro 5-4864	7	11.46 \pm 1.51	70.77 \pm 11.44
Diazepam	5	18.65 \pm 2.27	58.86 \pm 10.06
Clonazepam	7	64.21 \pm 10.33	236.99 \pm 32.72
PK 11195	7	9.81 \pm 1.33	61.36 \pm 3.74
Nifedipino	8	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.005
Diltiazem	7	3.76 \pm 0.87	2.84 \pm 0.74

* Número de observaciones

El valor de la CI_{50} se expresa como la media \pm DS.

Se puede observar que el patrón de respuesta de los antagonistas del calcio es diferente al de las benzodiazepinas y del PK 11195, ya que presentan mayor selectividad por la fase tónica que por la fase fásica de la respuesta contráctil. En el caso de diltiazem ambas fases se redujeron progresivamente al incrementarse la dosis hasta que prácticamente llegaron a anularse. Sin embargo, el nifedipino presentó una selectividad por la fase tónica a bajas dosis, mientras que a altas dosis la inhibición dosis-dependiente nunca llegó a ser completa, quedando un 20% insensible de ambas fases de la respuesta. Estos resultados confirman los obtenidos por Hay y Wadsworth (1982).

También se ensayó el baclofeno (100 μ M) y el muscimol (79 μ M), fármacos agonistas específicos del sistema gabaérgico, con el fin de poner de manifiesto si las acciones de las benzodiazepinas sobre la respuesta contráctil inducida por KCl (160 mM) está mediada por receptores benzodiazepínicos relacionados con el receptor gabaérgico.

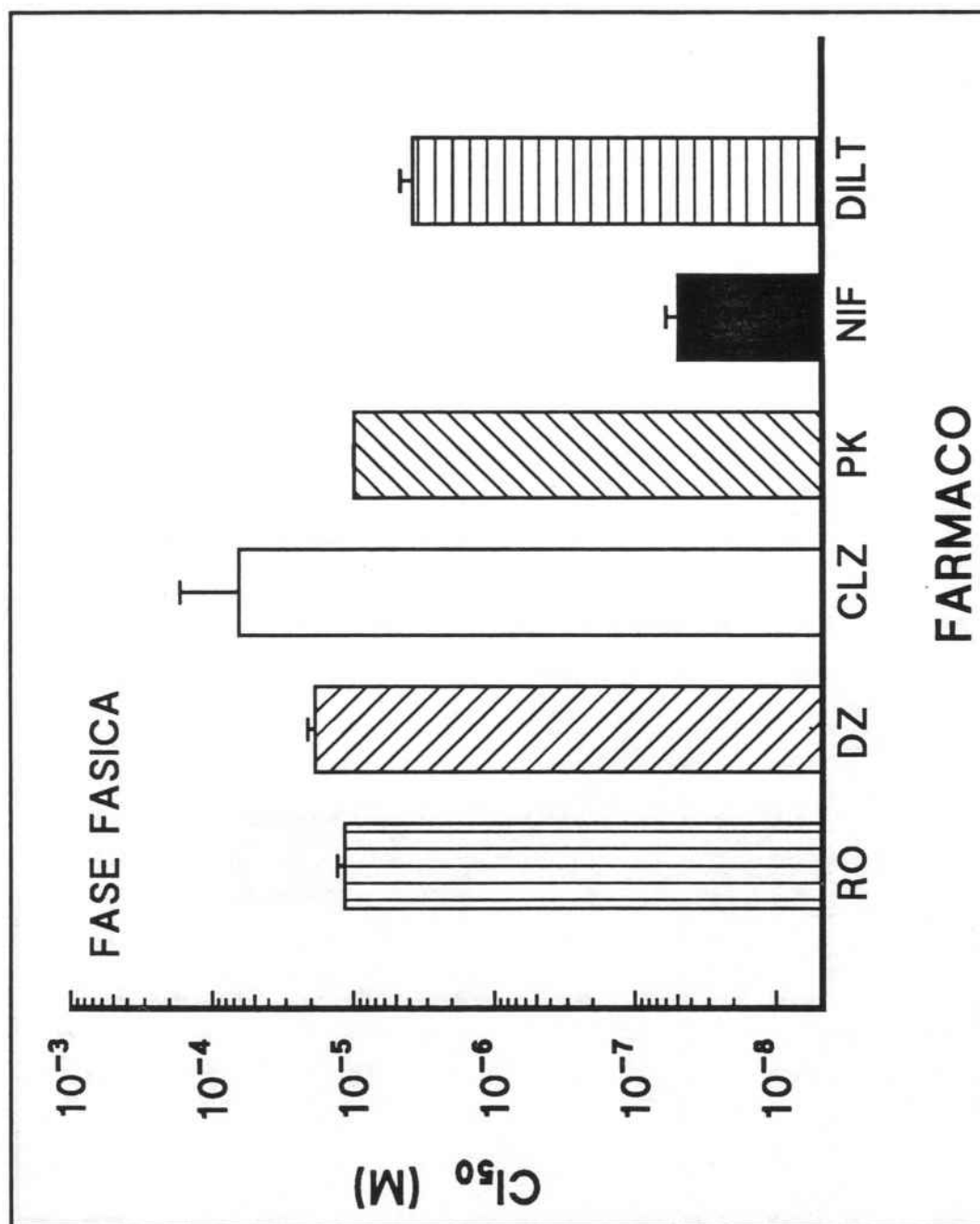


Figura 24: Cl_{50} de diferentes compuestos para la fase física de las contracciones inducidas por KCl en conducto deferente de rata.

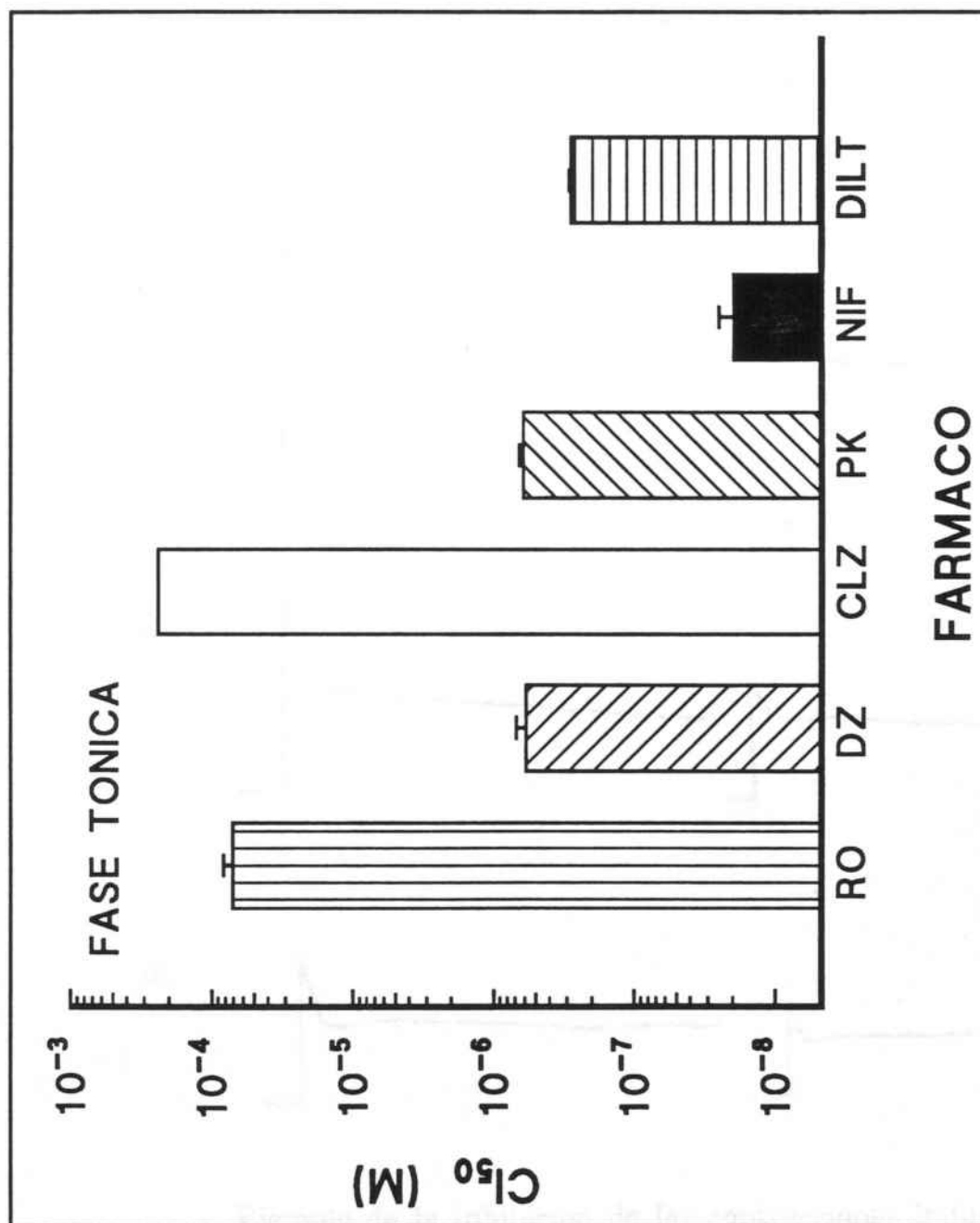
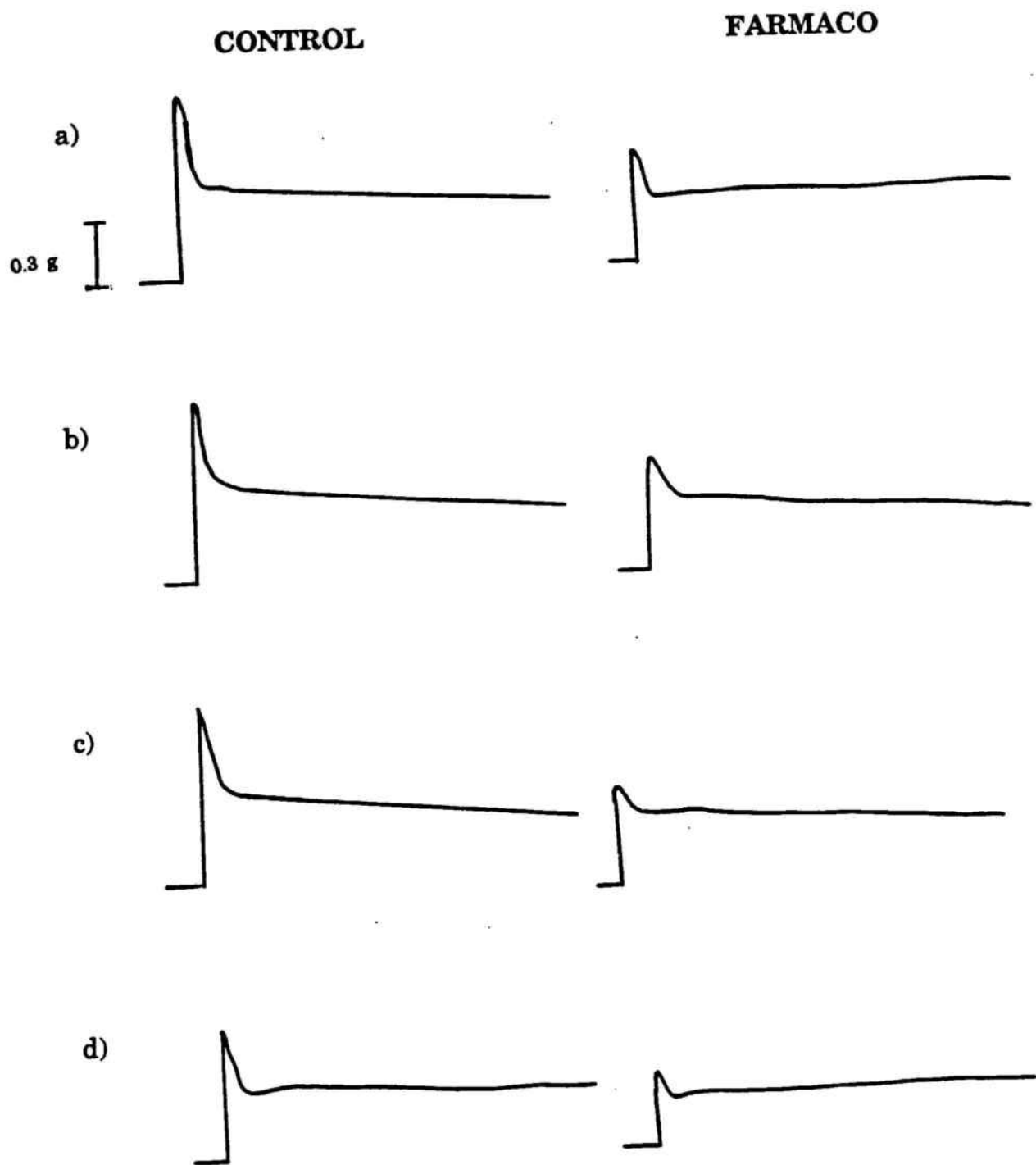
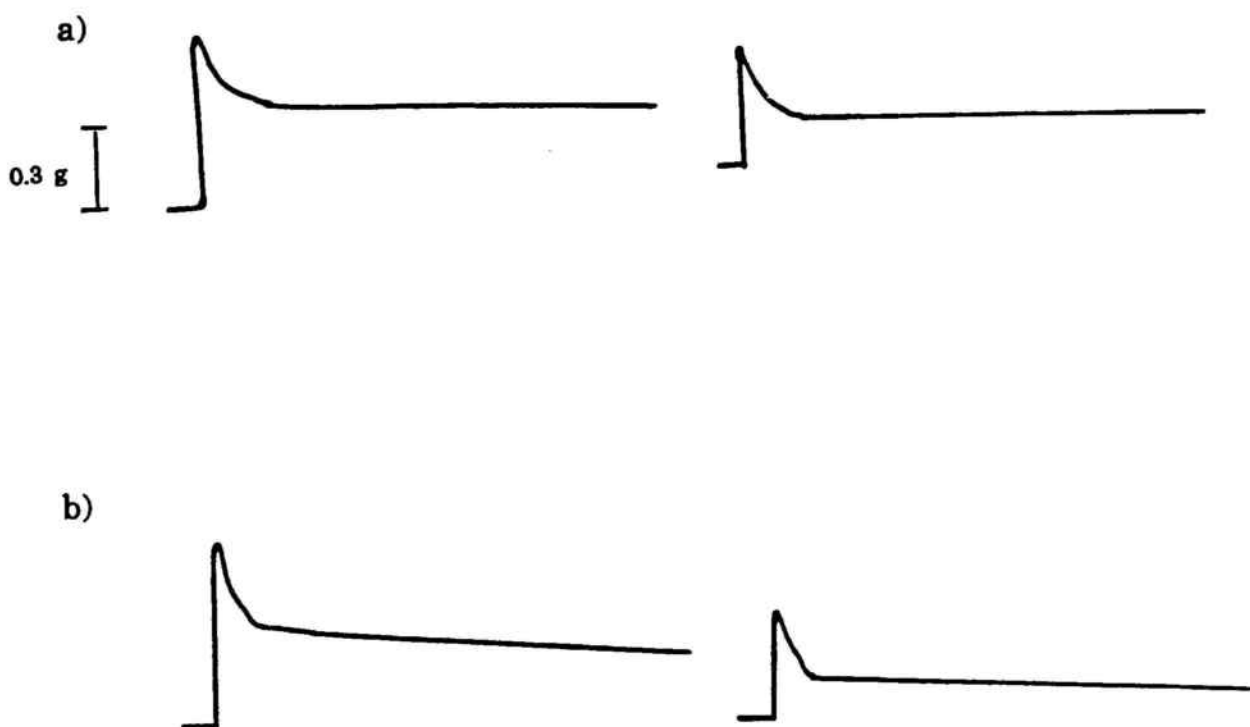


Figura 25: CI₅₀ de diferentes compuestos para la fase tónica de las contracciones inducidas por KCl en conducto deferente de rata.



Ejemplo de la inhibición de las contracciones inducidas por despolarización con potasio en conducto deferente de rata en presencia de:

- a) Ro 5-4864 (8.6 μ M).
- b) Diazepam (19.1 μ M).
- c) Clonazepam (71.2 μ M).
- d) PK 11195 (7.8 μ M).

CONTROL**FARMACO**

Ejemplo de la inhibición de las contracciones inducidas por despolarización con potasio en conducto deferente de rata en presencia de:

a) Nifedipina ($0.02 \mu\text{M}$).

b) Diltiazem ($1 \mu\text{M}$).

Los resultados obtenidos muestran que ni el baclofeno, ni el muscimol inhibieron las contracciones inducidas por KCl, y por tanto, podemos corroborar que este tipo de receptores no median la inhibición de la respuesta contráctil inducida por KCl.

Tanto en el caso del Ro 5-4864, del diazepam así como del clonazepam, el antagonismo observado fue de tipo no competitivo, ya que el desplazamiento de la curva dosis-respuesta fue de forma no paralela y se redujo el efecto máximo.

4.2.-Influencia de la concentración de calcio en la solución fisiológica nutritiva en las contracciones inducidas por KCl.

Al igual que en caso de las contracciones inducidas por noradrenalina exógena se valoró la reversión del efecto antagonista de estos compuestos y del PK 11195 cuando variaba la concentración de calcio del medio.

Cuando se duplicó la concentración de calcio de la solución Krebs-Henseleit (concentración final 3.8 mM), no se observó reversión alguna del efecto inhibitor de las benzodiazepinas ni del PK 11195. Tampoco se observó ninguna modificación del efecto antagonista cuando la concentración de calcio aumentó hasta 5.7 mM (Tabla 19).

Cabe suponer pues, que la acción inhibitora de las benzodiazepinas y PK 11195 en las contracciones inducidas por KCl en conducto deferente no es debido a una inhibición directa de la entrada de calcio a la célula, ya que si fuera así, la acción inhibitora se revertiría al aumentar la concentración de calcio del medio.

Tabla 19: Inhibición (%) de las contracciones inducidas por KCl a diferentes concentraciones de calcio por diferentes compuestos.

FASE FASICA

<u>COMPUESTO</u>	<u>CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO</u>	
	<u>Ca 1.9 mM n</u>	<u>Ca 5.7 mM n</u>
Ro 5-4864 (22.8 μ M)	77.90 \pm 9.426	74.74 \pm 7.946
Diazepam (52.6 μ M)	72.33 \pm 3.885	76.71 \pm 3.505
Clonazepam (132 μ M)	73.81 \pm 3.915	73.32 \pm 9.828
PK 11195 (31.2 μ M)	70.61 \pm 5.816	71.13 \pm 10.74

FASE TONICA

<u>COMPUESTO</u>	<u>CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO</u>	
	<u>Ca 1.9 mM n</u>	<u>Ca 5.7 mM n</u>
Ro 5-4864 (22.8 μ M)	25.89 \pm 9.796	26.17 \pm 7.066
Diazepam (52.6 μ M)	34.21 \pm 4.545	37.84 \pm 1.545
Clonazepam (132 μ M)	34.20 \pm 3.215	35.09 \pm 7.818
PK 11195 (31.2 μ M)	30.38 \pm 4.716	23.72 \pm 6.424

Resultados expresados como media \pm DS, siendo "n" el número de observaciones.

5.- Protocolo experimental de las contracciones inducidas eléctricamente.

La estimulación de forma repetida del conducto deferente de rata mediante trenes de pulsos eléctricos da lugar a una respuesta contráctil tetánica en la que pueden diferenciarse dos componentes.

En primer lugar, se produce una contracción inmediata y rápida del tejido (primer componente), a la que sigue una contracción lenta y sostenida (segundo componente). En 1971, Sweddin propuso que la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas es la

responsable de los dos componentes de la contracción, atribuyéndose la diferencia en la respuesta, a la localización de los receptores postsinápticos.

Ambache y Zar (1971), fueron los primeros en sugerir que la noradrenalina no es el único neurotransmisor en este tejido, idea que confirmaron Euler y Hedqvist (1975). En 1980, Hirst y Neil, sugirieron que la respuesta no adrenérgica puede ser debida a la acción de la noradrenalina sobre una clase de adrenoreceptores, gamma-adrenoreceptores, que no son bloqueados por los antagonistas α -adrenérgicos clásicos. Más recientemente, Gillespie y Macrae (1983) sugirieron que la noradrenalina es la responsable del primer componente de la respuesta, mientras que el segundo componente se debe a un segundo neurotransmisor (Mottram, 1988). Los trabajos de Meldrum y Bunstock (1983) y Sneddon y Westfall (1984) en conducto deferente aislado de cobaya, parecen confirmar que es el ATP el neurotransmisor responsable del primer componente tetánico, mientras que la noradrenalina lo sería del segundo.

Sin embargo, las experiencias realizadas en conducto deferente aislado de rata (Amobi y Smith 1987a), han demostrado que no se puede realizar una distinción tan clara sobre la naturaleza de ambos componentes de la respuesta contráctil, ya que la importancia relativa del ATP y de la noradrenalina como mediadores de las diferentes partes de la respuesta tetánica varía en las distintas especies animales.

La estimulación eléctrica del conducto deferente aislado de rata mediante pulsos únicos da lugar a una respuesta contráctil en la que pueden distinguirse una fase rápida, sensible a nifedipino, y una fase lenta, sensible a verapamilo (Amobi y Smith, 1986).

En cambio, la estimulación eléctrica mediante trenes de pulsos a una frecuencia de 1-5 Hz, muestra un primer pico después del cual se observa una marcada depresión, y por último una recuperación de la respuesta. Se sugirió la existencia de una compleja participación e interacción de receptores y neurotransmisores tanto de naturaleza

adrenérgica, como de naturaleza no-adrenérgica en ambos componentes de la respuesta tetánica, pero presentando cada una orígenes distintos (Amobi y Smith 1987b).

En el primer componente, la participación no-adrenérgica es debida a la suma de la fase rápida de los primeros pulsos, lo cual da lugar al primer pico observado. La participación adrenérgica se debe a la acción directa de la noradrenalina liberada sobre los adrenoreceptores α_1 . La contribución de este receptor en la respuesta del primer componente se estimó en un 40 % (Amobi y Smith 1987b).

La depresión entre ambos componentes puede deberse a la depresión de la fase lenta en los sucesivos pulsos, y a la inhibición presináptica por la cesión de noradrenalina durante los primeros pulsos.

El segundo componente, que es el mayoritario en la respuesta contráctil de la parte epididimal del conducto deferente aislado de rata, requiere para su desarrollo tanto de receptores purinérgicos postsinápticos P_2 , como de adrenoreceptores α_1 . La activación de los adrenoreceptores α_1 , provoca una potenciación de la fase rápida no adrenérgica de las respuestas. Esta interacción no-adrenérgica, puede ser el resultado de la modulación del influjo de calcio a través de los canales de calcio sensibles a nifedipino/verapamilo.

Estas conclusiones se han basado en una serie de observaciones:

1.- La desensibilización de los purinoreceptores P_2 con α,β -metilenATP, da lugar a una disminución de la respuesta del primer componente, y anula la respuesta del segundo componente.

2.- El bloqueo del adrenoreceptor α_1 con prazosín, provoca una reducción o anulación de ambos componentes de la respuesta.

3.- La noradrenalina exógena potencia la fase rápida de las respuestas de forma similar a como ocurre en el segundo componente.

4.-El segundo componente es sensible a nifedipino y a verapamilo, mientras que el primer componente es relativamente resistente a estos fármacos. De este modo, es probable que el primer componente requiera de la movilización de calcio intracelular, mientras que el segundo dependa del influjo de calcio a través de diferentes canales, o quizás de diferentes estados del mismo canal (Amobi y Smith 1987b).

Recientemente, David R. Mottram (1988) citan la existencia de distintos mecanismos de control presináptico con el fin de regular la liberación de neurotransmisores responsables de los dos componentes de la respuesta contráctil tetánica. Mottram llegó a la conclusión de que existen dos poblaciones de adrenoreceptores α_2 responsables de cada fase de la contracción: los adrenoreceptores α_2 sensibles a imidazolinas, que presentan un papel más importante en la liberación de neurotransmisores responsables del primer componente; y los adrenoreceptores α_2 sensibles a β -feniletilaminas, que están asociados a la activación de los adrenoreceptores α_1 que dan lugar al segundo componente de la respuesta.

5.1.- Efecto de las benzodiazepinas, PK 11195 y algunos antagonistas del calcio en las contracciones inducidas eléctricamente.

Una vez obtenidos los conductos deferente como se indica en el apartado 1, éstos se mantuvieron en las condiciones de temperatura, aireación con carbógeno y solución fisiológica nutritiva idénticas a las utilizadas en las experiencias de despolarización con KCl.

Los conductos deferentes, montados según se ha indicado anteriormente, se estabilizaron durante un período de 45 minutos a 1 hora a una tensión de 0.5 g.

La estimulación intramural se llevó a cabo mediante electrodos conectados a un estimulador LI 12100 LETICA, produciendo trenes de pulsos de 5 segundos de duración a intervalos de 100 segundos. Se aplicó

una frecuencia de 2 Hz y un voltaje supramaximal (30 voltios). La duración de cada pulso fue de 0.1 ms y el intervalo entre pulsos de 499 ms.

Estas condiciones de estimulación se eligieron después de una investigación previa que aseguró una reproductibilidad de las contracciones provocadas en el conducto deferente aislado de rata.

Los fármacos motivo del estudio fueron: Ro 5-4864, diazepam, clonazepam, PK 11195, nifedipino y diltiazem. Cada fármaco se mantuvo en contacto con el órgano durante un tiempo de 10 minutos, intervalo de tiempo que comprende 6 trenes de pulsos, y se elaboraron las correspondientes curvas dosis respuesta para cada uno de ellos.

En las experiencias en que se modificó la concentración de calcio de la solución fisiológica nutritiva, se disminuyó equimolecularmente el contenido de NaCl a fin de no variar la composición iónica del medio.

5.1.1.- Resultados.

Los dos componentes de la respuesta contráctil están constituidos en nuestro caso por: un primer componente formado por los tres primeros pulsos del tren, y un segundo componente constituido por los ocho pulsos restantes de dicho tren.

Los resultados se han expresado como % de inhibición que provocan los fármacos motivo del estudio en el último pulso del tren correspondiente a los tres minutos (2º tren) y a los diez minutos (6º tren) de contacto con los órganos.

Las benzodiacepinas, Ro 5-4864, diazepam y clonazepam provocaron una inhibición dosis-dependiente del segundo componente de la respuesta contráctil tetánica inducida por estimulación eléctrica en los conductos deferentes aislados de rata. El efecto inhibitor fue anulado después del lavado con la solución nutritiva fisiológica de Krebs-Henseleit.

En primer lugar se ensayaron las concentraciones de Ro 5-4864 comprendidas entre 6.27 y 46.9 μM (Tabla 20; Fig. 26). Las CI_{50} obtenidas a los tres minutos y a los diez minutos de contacto fueron de: 39.12 y 26.58 μM respectivamente (Tabla 26; Fig 32 y 33).

En el caso de diazepam, las concentraciones estudiadas se incluyen en el rango que va desde 2.92 a 175 μM (Tabla 21; Fig 27). Las CI_{50} obtenidas han sido de: 87.11 μM a los tres minutos de contacto y de 46.87 μM a los diez minutos de contacto (Tabla 26; Fig 32 y 33).

La última benzodiazepina estudiada, el clonazepam, en el rango de concentraciones comprendidas entre 40 y 180 μM (Tabla 22; Fig 28), presentó una CI_{50} a los tres minutos de contacto de 29.41 μM y a los diez minutos de contacto de 92.21 μM (Tabla 26; Fig 32 y 33).

De estos resultados se desprende que la potencia relativa entre las benzodiazepinas estudiadas fue: Ro 5-4864 > diazepam > clonazepam, tanto a los tres como a los diez minutos de contacto. Dicho orden de potencia relativa coincide con el que se obtuvo en la contracción rápida en las experiencias de despolarización con KCl, y con el orden de afinidad nanomolar que presentan en su unión al receptor benzodiazepínico periférico (Le Fur y col., 1983c; Anholt y col., 1986).

Tabla 20: Inhibición por Ro 5-4864 de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DEL 2º	INHIBICION DEL 6º	n*
	TREN DE PULSOS (%)	TREN DE PULSOS (%)	
6.27	13.78 \pm 1.48	21.60 \pm 2.06	4
15.60	28.36 \pm 3.15	33.84 \pm 2.35	5
31.30	39.50 \pm 3.14	47.74 \pm 2.05	4
46.90	59.57 \pm 6.17	72.13 \pm 5.12	8

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

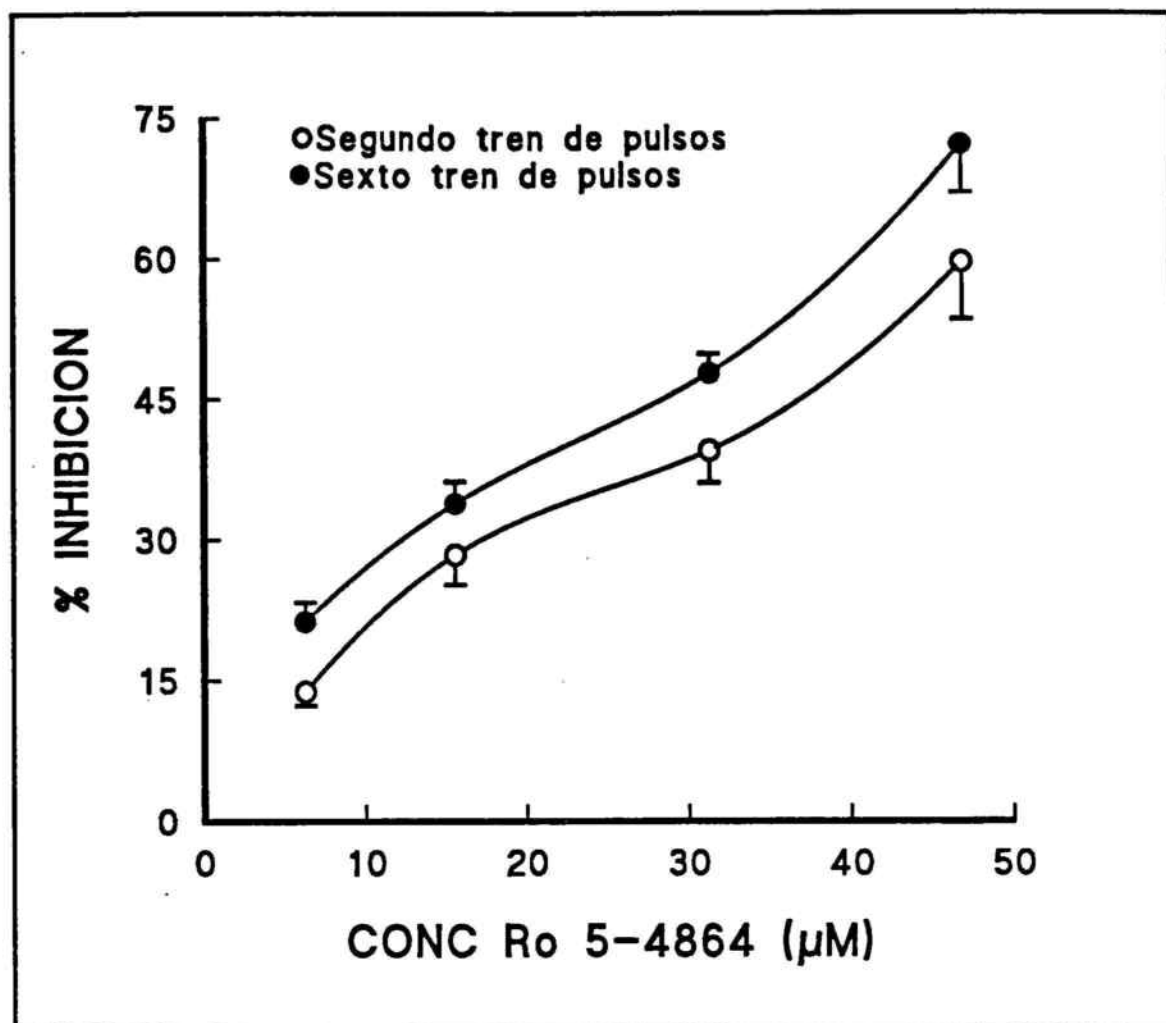


Figura 26: Curvas dosis-respuesta del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas eléctricamente.

Tabla 21: Inhibición por diazepam de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

<u>CONCENTRACION (μM)</u>	<u>INHIBICION DEL 2º TREN DE PULSOS (%)</u>	<u>INHIBICION DEL 6º TREN DE PULSOS (%)</u>	<u>n*</u>
2.92	13.08 \pm 2.59	18.38 \pm 3.93	6
29.20	24.58 \pm 3.71	30.01 \pm 5.72	6
87.70	47.04 \pm 6.44	64.55 \pm 2.45	6
175.00	68.71 \pm 7.19	88.03 \pm 4.34	5

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

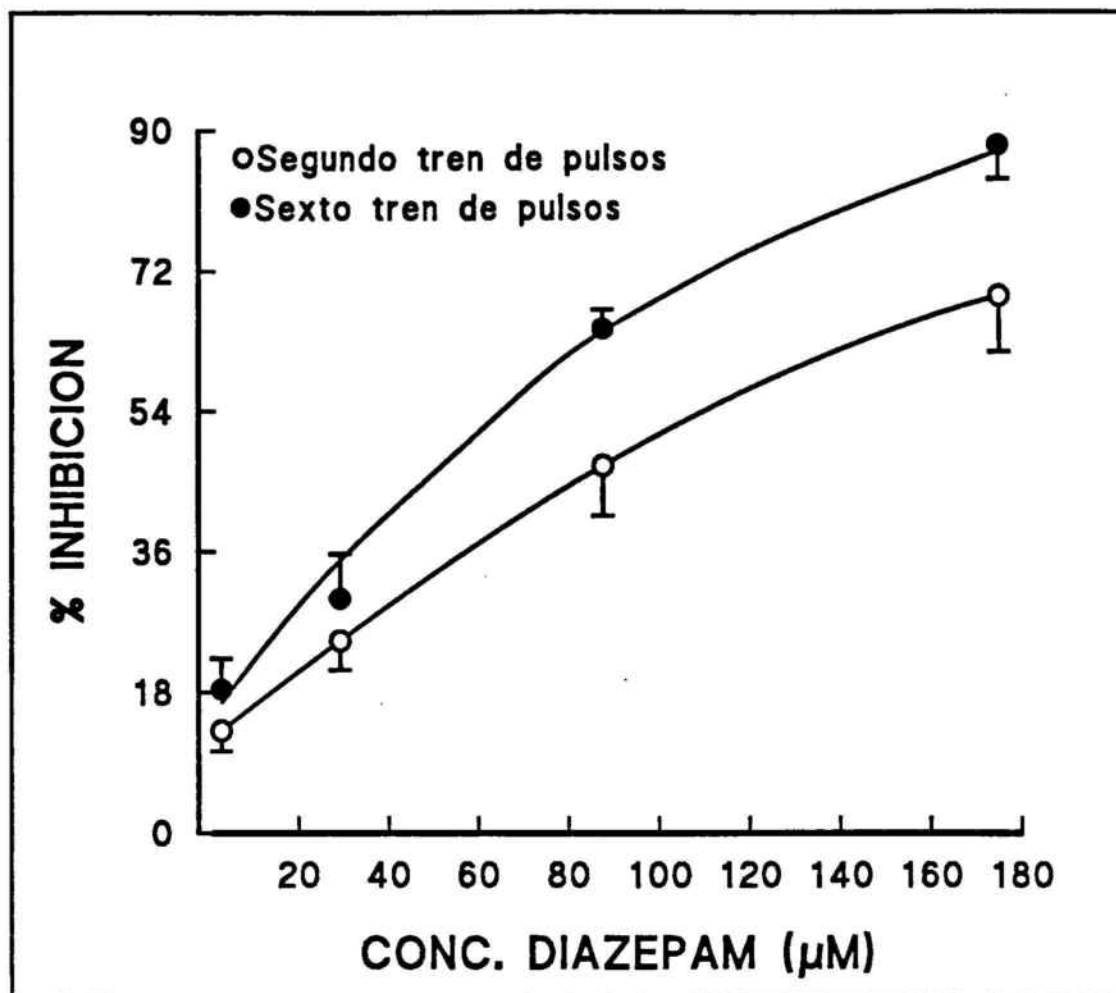


Figura 27: Curvas dosis-respuesta del diazepam en las contracciones inducidas eléctricamente.

Tabla 22: Inhibición por clonazepam de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

<u>CONCENTRACION (μM)</u>	<u>INHIBICION DEL 2° TREN DE PULSOS (%)</u>	<u>INHIBICION DEL 6° TREN DE PULSOS (%)</u>	<u>n*</u>
44.46	7.10 \pm 2.21	14.95 \pm 2.46	4
47.50	21.43 \pm 1.63	28.57 \pm 2.55	5
95.00	43.17 \pm 4.04	50.87 \pm 4.34	4
152.00	57.81 \pm 2.70	69.18 \pm 3.56	4
177.00	71.95 \pm 7.31	81.06 \pm 2.48	4

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

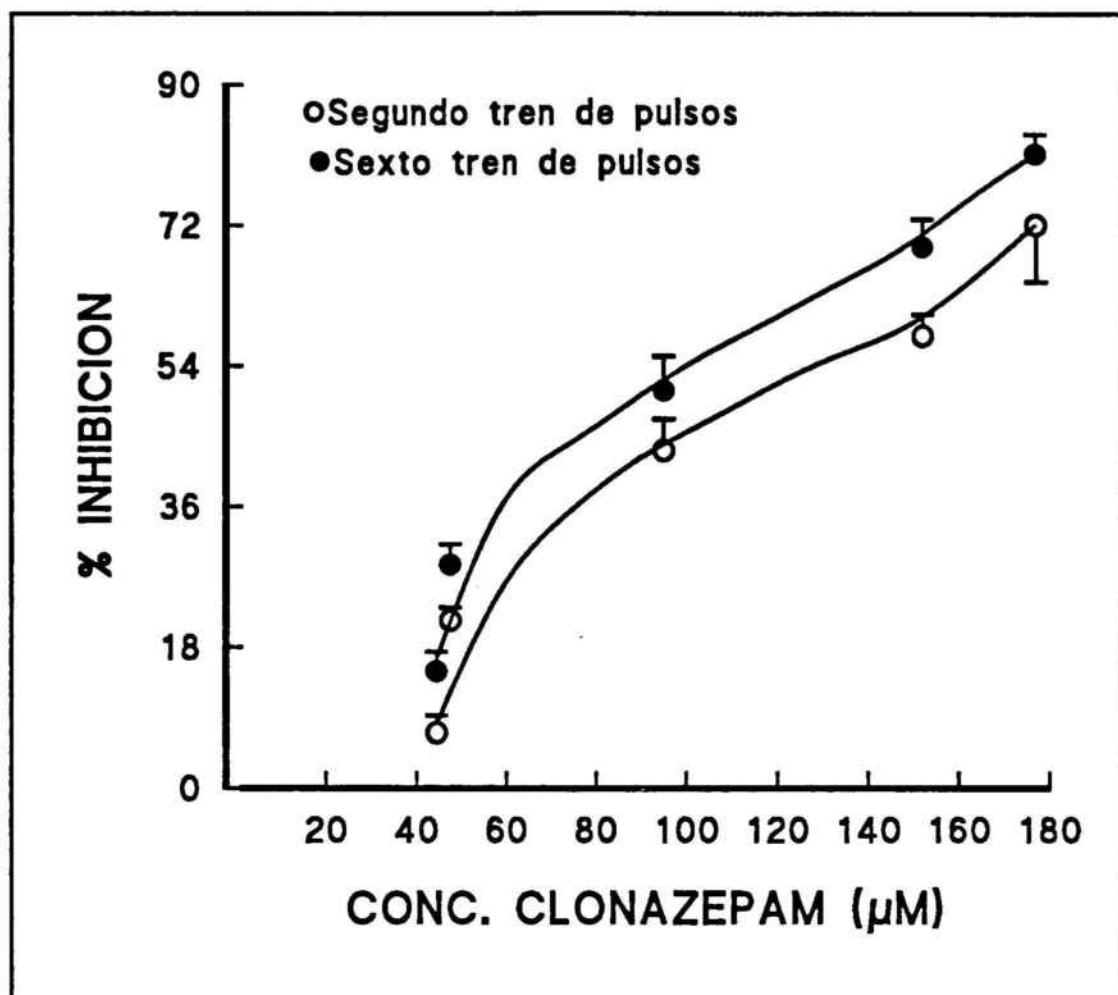


Figura 28: Curvas dosis-respuesta del clonazepam en las contracciones inducidas eléctricamente.

Paralelamente, se ensayó el PK 11195. Al igual que en todas las experiencias anteriores, este compuesto no sólo no antagonizó la acción de las benzodiazepinas, sino que él mismo inhibió de forma dosis-dependiente la respuesta contráctil inducida por la estimulación eléctrica. Su patrón de respuesta fue similar al de las benzodiazepinas.

Las concentraciones ensayadas en este caso fueron entre 30 y 70 μM (Tabla 23; Fig. 29). Las CI_{50} obtenidas a los tres y a los diez minutos de contacto fueron de: 60.56 y de 44.10 μM respectivamente (Tabla 26; Fig. 32 y 33).

Tabla 23: Inhibición por PK 11195 de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DEL 2 ^o TREN DE PULSOS (%)	INHIBICION DEL 6 ^o TREN DE PULSOS (%)	n*
34.00	19.87 \pm 5.41	20.44 \pm 5.61	4
37.80	31.08 \pm 6.31	34.01 \pm 7.14	5
56.70	48.44 \pm 7.85	61.13 \pm 6.18	5
62.40	56.86 \pm 7.70	67.47 \pm 6.63	9
73.70	61.60 \pm 6.16	85.36 \pm 4.25	7

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

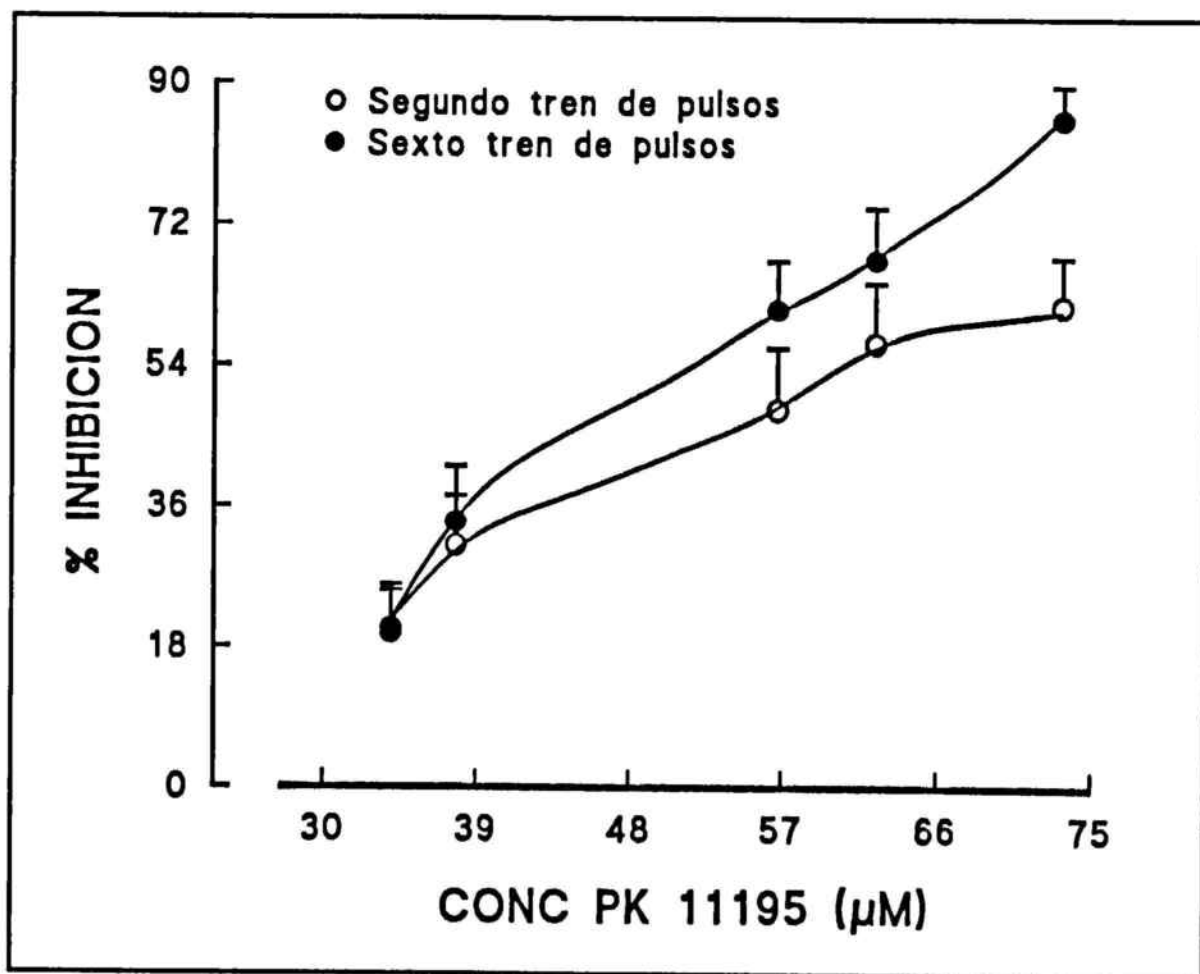


Figura 29: Curvas dosis-respuesta del PK 11195 en las contracciones inducidas eléctricamente.

Los antagonistas del calcio, nifedipino y diltiazem, se mostraron los inhibidores más potentes de la respuesta contráctil.

En el caso de nifedipino se ensayaron concentraciones comprendidas entre 1 y 96 nM (Tabla 24; Fig. 31), obteniéndose una CI_{50} a los tres minutos de 0.07 μ M y a los diez minutos de 0.03 μ M (Tabla 26; Fig 32 y 33).

Las concentraciones estudiadas para diltiazem estaban comprendidas entre 4 y 50 μ M (Tabla 25; fig. 32), obteniéndose unas CI_{50} a los tres y a los diez minutos de 18.77 y de 13.08 μ M (Tabla 26; Fig 32 y 33).

Los diagramas de barras (Fig. 32 y 33) muestran los valores de las CI_{50} para cada fármaco estudiado a nivel del último pulso del segundo y sexto tren.

El análisis estadístico, t-Student para datos apareados, de los resultados obtenidos con cada fármaco a los tres y a los diez minutos de contacto indicó en todos los casos, y siempre con una significación menor $p < 0.005$, que al aumentar el tiempo de contacto la inhibición era mayor, con la excepción del PK 11195 y del diltiazem, que a bajas concentraciones, no se apreciaron diferencias significativas entre los dos trenes de pulsos.

Tabla 24: Inhibición por nifedipino de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (nM)	INHIBICION DEL 2º	INHIBICION DEL 6º	n*
	TREN DE PULSOS (%)	TREN DE PULSOS (%)	
10.00	11.42 ± 0.88	17.93 ± 1.09	4
28.00	14.63 ± 2.51	23.45 ± 2.09	5
60.00	38.33 ± 3.63	55.62 ± 3.83	4
80.00	58.03 ± 3.16	74.99 ± 1.83	4
96.00	59.85 ± 1.97	80.00 ± 2.22	7

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media ± DS.

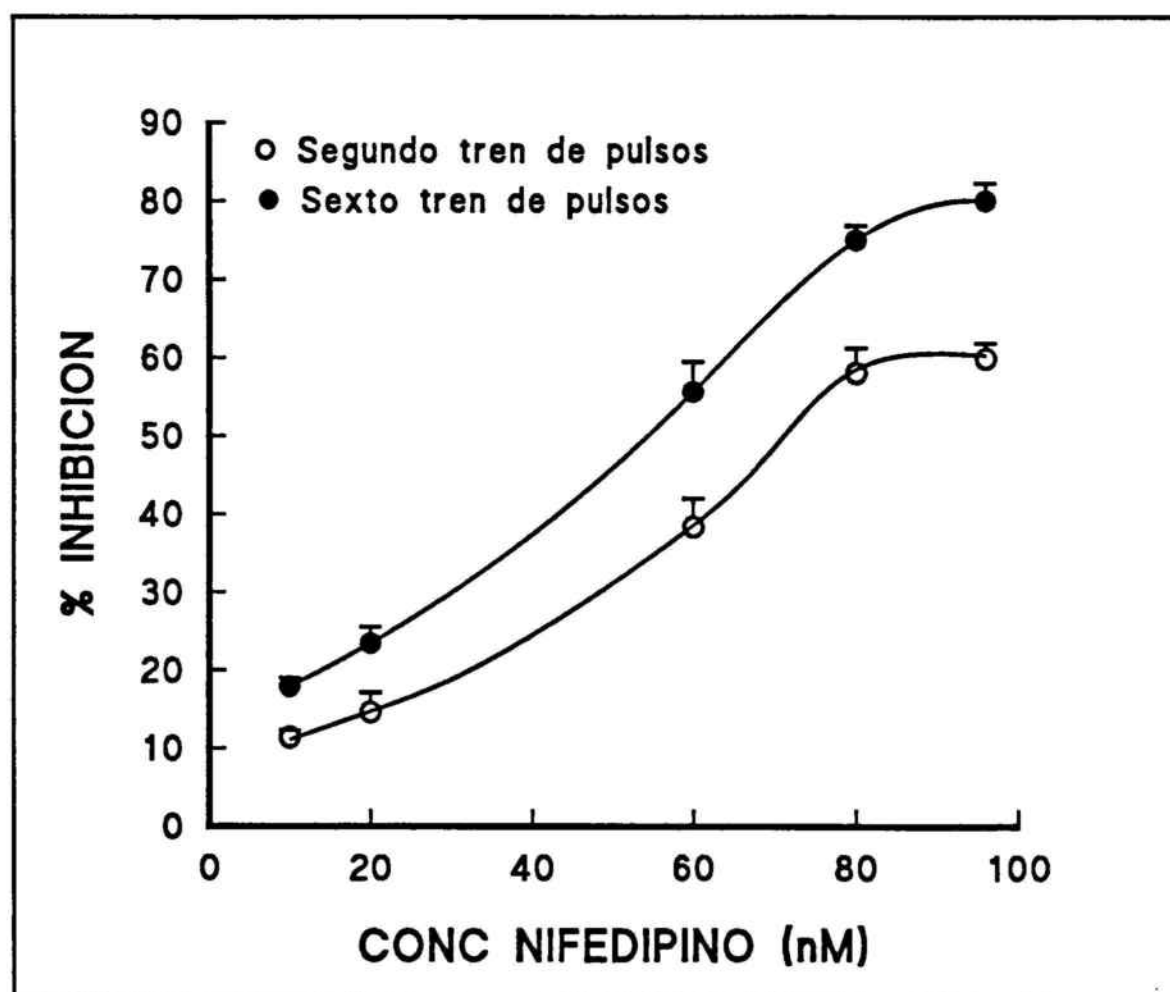


Figura 30: Curvas dosis-respuesta del nifedipino en las contracciones inducidas eléctricamente.

Tabla 25: Inhibición por diltiazem de las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

CONCENTRACION (μM)	INHIBICION DEL 2 ^o	INHIBICION DEL 6 ^o	n*
	TREN DE PULSOS (%)	TREN DE PULSOS (%)	
4.00	14.54 \pm 7.14	15.79 \pm 4.58	6
8.00	16.77 \pm 3.12	29.39 \pm 2.07	8
10.00	45.48 \pm 3.71	54.36 \pm 4.96	4
20.00	57.65 \pm 4.54	69.60 \pm 2.51	5
50.00	68.84 \pm 5.97	81.61 \pm 3.63	7

* Número de observaciones.

La inhibición se expresa como media \pm DS.

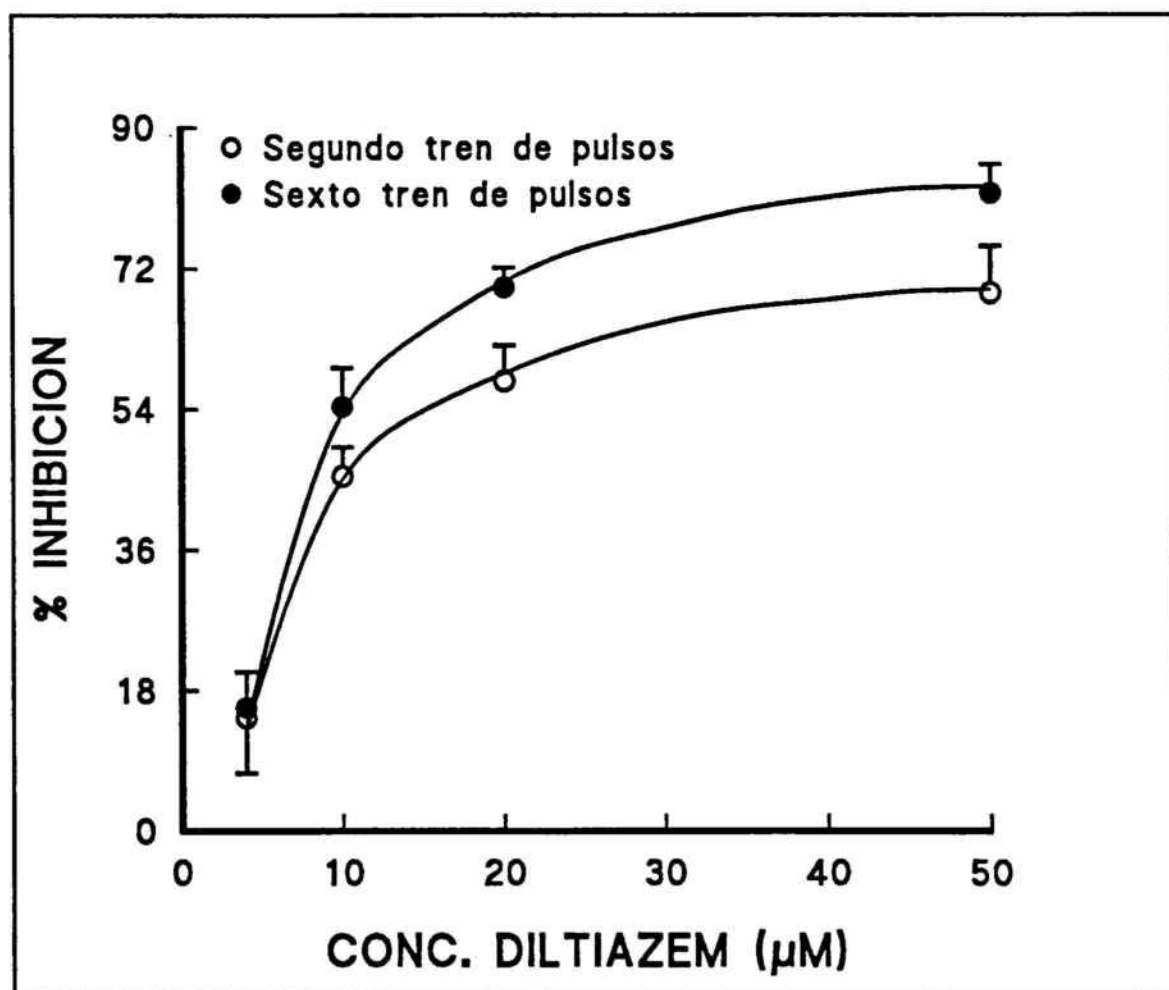


Figura 31: Curvas dosis-respuesta del diltiazem en las contracciones inducidas eléctricamente.

Tabla 26: Valores de CI_{50} obtenidos para cada compuesto en las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de rata.

<u>COMPUESTO</u>	<u>n*</u>	11 ^º pulso del 2 ^º tren	11 ^º pulso del 6 ^º tren
		<u>CI_{50} (μM)</u>	<u>CI_{50} (μM)</u>
Ro 5-4864	4	39.12 \pm 3.78	26.58 \pm 3.90
Diazepam	4	87.11 \pm 13.97	46.87 \pm 12.62
Clonazepam	5	129.41 \pm 31.02	92.21 \pm 22.36
PK 11195	5	60.56 \pm 13.62	44.10 \pm 14.62
Nifedipino	5	0.07 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
Diltiazem	5	18.77 \pm 3.75	13.08 \pm 2.49

* Número de observaciones

Los valores de CI_{50} y pD_2' se expresan como la media \pm DS.

También se estudiaron las características del primer componente de la respuesta en cada uno de los casos. De este estudio se desprende que las benzodiazepinas y el PK 11195 presentaron un patrón de respuesta muy similar al de nifedipino, y no como podría suponerse en un principio, al del diltiazem dada la semejanza estructural entre las benzodiazepinas y las benzotiazepinas.

El patrón de respuesta de nifedipino se caracteriza por mantener o disminuir, pero de forma no significativa, el primer y tercer pulso de la respuesta contráctil. En cambio, en el caso del diltiazem se observó una potenciación, no significativa, tanto del primer, como de tercer pulso de la respuesta.

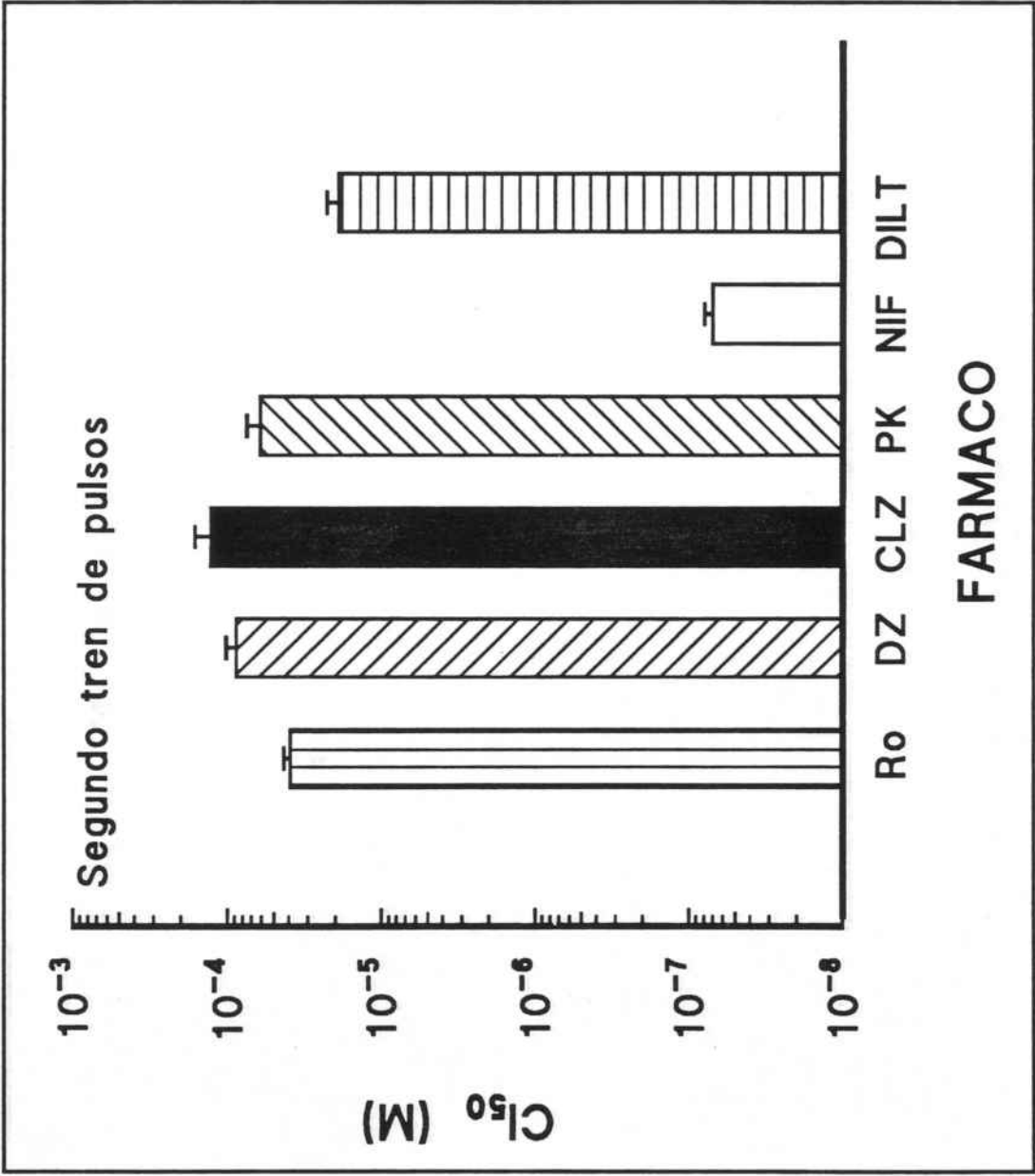


Figura 32: CI₅₀ de diferentes compuestos para el último pulso del segundo tren de las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata.

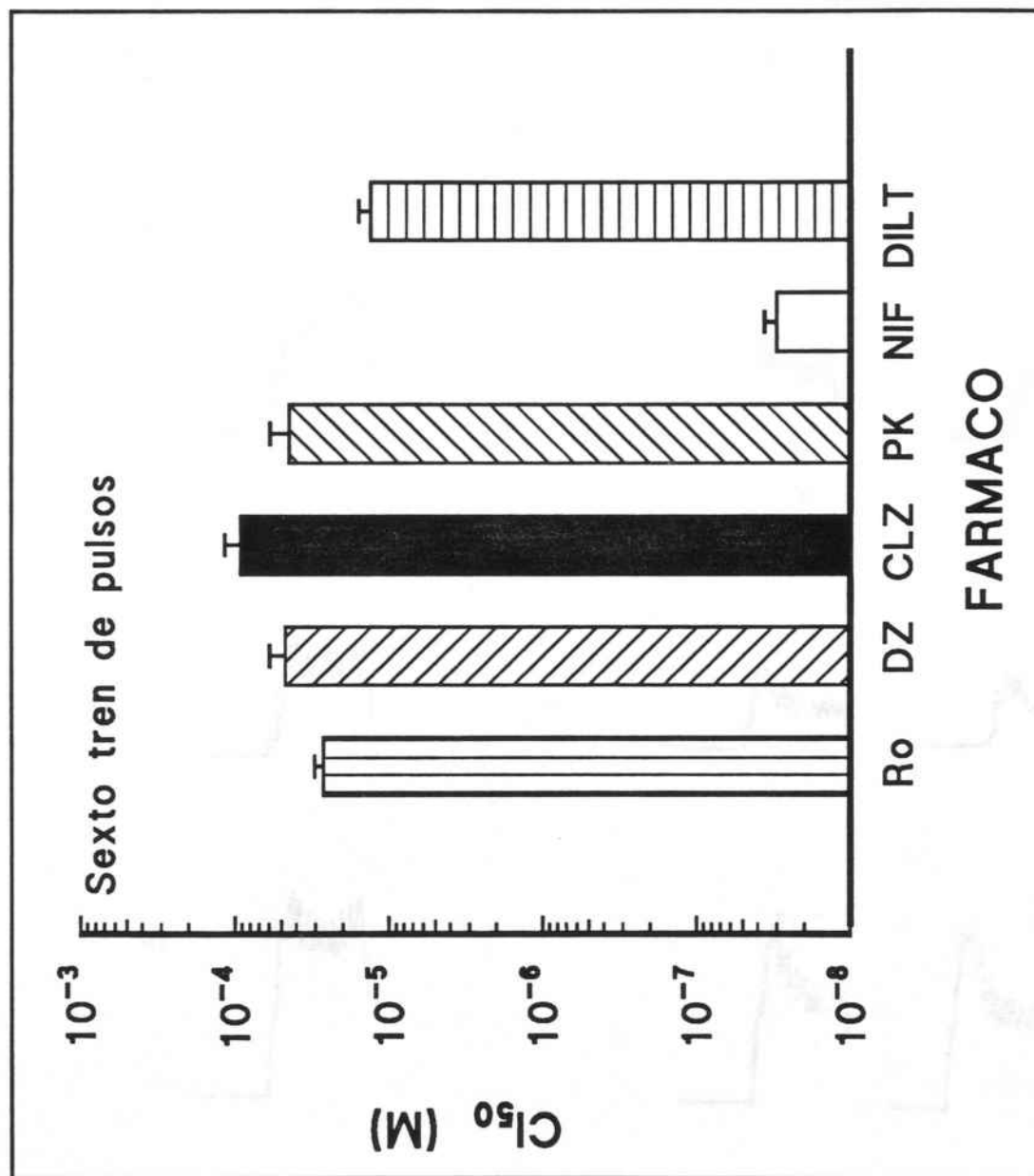
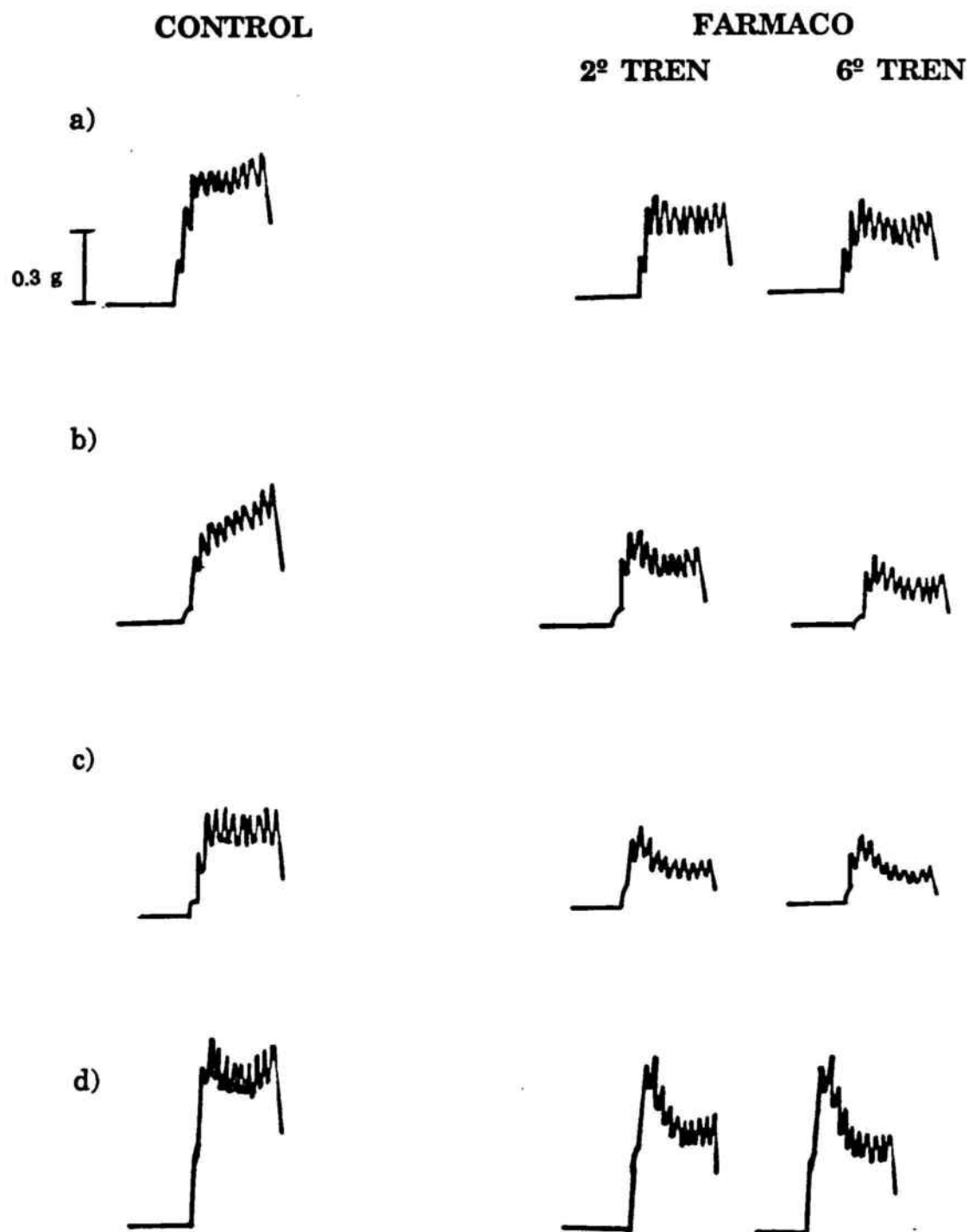
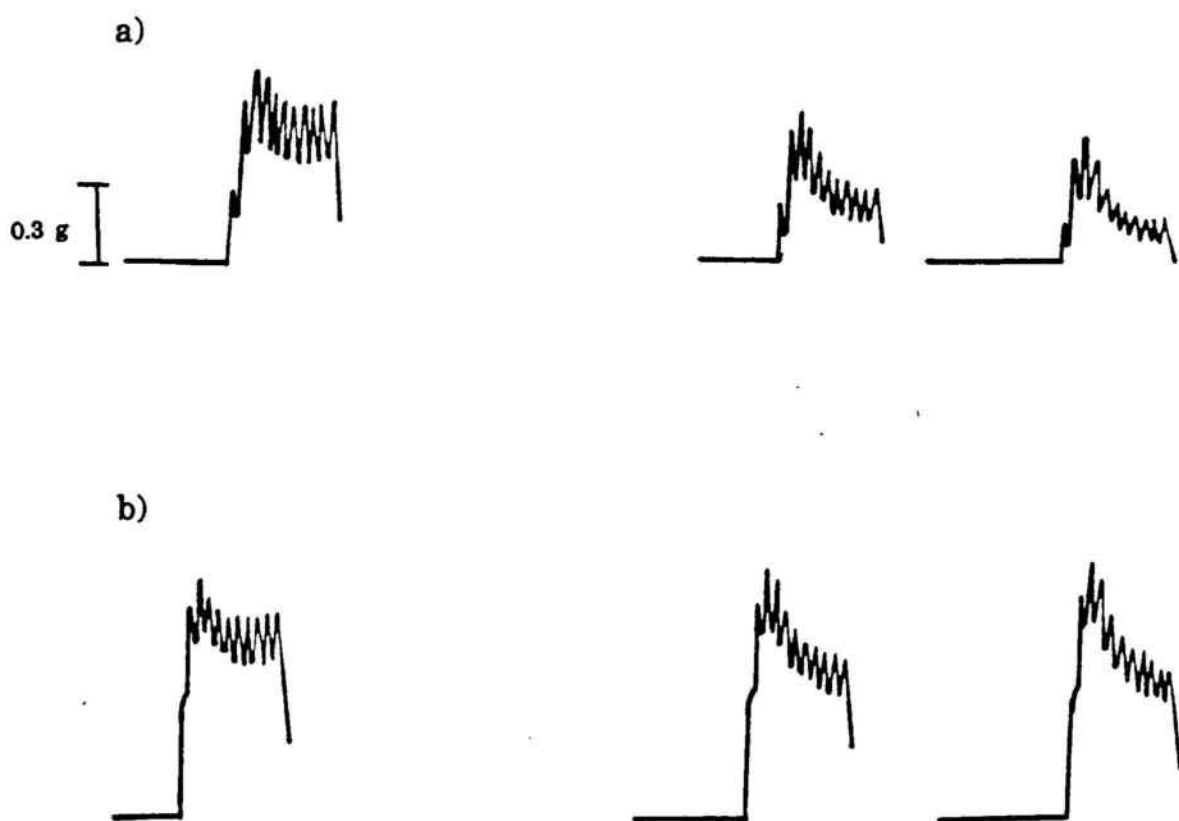


Figura 33: CI_{50} de diferentes compuestos para el último pulso del sexto tren de las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata.



Ejemplo de la inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata en presencia de:

- a) Ro 5-4864 (31.3 μ M).
- b) Diazepam (87.7 μ M).
- c) Clonazepam (152 μ M).
- d) PK 11195 (56.7 μ M).

CONTROL**FARMACO****2º TREN****6º TREN**

Ejemplo de la inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata en presencia de:

a) Nifedipina (0.08 μ M).

b) Diltiazem (10 μ M).

5.1.2.- Influencia de la concentración de calcio del medio en las contracciones inducidas eléctricamente.

En primer lugar, se realizaron experiencias en las cuales los órganos se mantuvieron en contacto con una solución fisiológica de Krebs-Henseleit libre de calcio. En estas condiciones experimentales no se obtuvo respuesta contráctil a la estimulación eléctrica de los conductos deferentes aislados de rata.

En segundo lugar, se valoró la reversión del efecto antagonista cuando se duplicó o triplicó la concentración de calcio extracelular.

El duplicar la concentración de calcio del medio supone una concentración final en la solución de Krebs-Henseleit de 5 mM. En estas condiciones experimentales, el análisis estadístico, ANOVA y contrastes "a posteriori" de Scheffé, demostraron que existe una reversión significativa del efecto antagonista de los fármacos estudiados, a excepción del clonazepam (Tablas 27 y 28; Fig. 34 y 35).

El Ro 5-4864 mostró un grado de significación de $p < 0.001$ a los tres minutos y de $p < 0.005$ a los diez minutos de contacto. En el caso del diazepam, no se observó una diferencia significativa a los tres minutos de contacto. En cambio, a los diez minutos el grado de significación fue de $p < 0.005$. El PK 11195, presentó un grado de significación de $p < 0.025$ y $p < 0.005$ respectivamente a los tres y a los diez minutos de contacto.

En el caso de los antagonistas del calcio, el nifedipino mostró un grado de significación de $p < 0.05$ a los tres minutos y de $p < 0.001$ a los diez minutos de contacto. El diltiazem presentó en ambos casos un grado de significación de $p < 0.001$.

Tabla 27: Inhibición del 2º tren (11º pulso) de las contracciones inducidas eléctricamente por diferentes compuestos.

<u>COMPUESTO</u>	<u>CONC. DE CALCIO DEL MEDIO</u>			
	<u>Ca 2.5 mM</u>	<u>n</u>	<u>Ca 5 mM</u>	<u>n</u>
Ro (31.3 μ M)	39.50 \pm 3.65	4	21.34 \pm 5.3***	8
DZ (87.70 μ M)	47.07 \pm 6.44	5	43.93 \pm 2.78	6
CZ (95 μ M)	43.17 \pm 4.04	4	41.66 \pm 5.94	6
PK (56.7 μ M)	48.47 \pm 7.85	5	33.27 \pm 8.85**	9
NIF (0.06 μ M)	38.33 \pm 3.63	4	28.10 \pm 5.60*	6
DILT (19 μ M)	45.48 \pm 3.71	4	20.81 \pm 8.06**	6

Resultados expresados como media \pm DS.

ANOVA y test de Scheffé: *p<0.05; **p<0.025; ***p<0.001 vs Ca 2.5 mM.

Tabla 28: Inhibición del 6º tren (11º pulso) de las contracciones inducidas eléctricamente por diferentes compuestos.

<u>COMPUESTO</u>	<u>CONC. DE CALCIO DEL MEDIO</u>			
	<u>Ca 2.5 mM</u>	<u>n</u>	<u>Ca 5 mM</u>	<u>n</u>
Ro (31.3 μ M)	47.74 \pm 2.05	8	29.98 \pm 6.09*	8
DZ (87.70 μ M)	64.55 \pm 2.45	6	54.49 \pm 3.31*	5
CZ (95 μ M)	50.87 \pm 4.34	4	44.58 \pm 2.79	6
PK (56.7 μ M)	61.13 \pm 6.18	5	36.15 \pm 10.2*	9
NIF (0.06 μ M)	55.62 \pm 3.83	4	38.82 \pm 5.87**	6
DILT (19 μ M)	54.36 \pm 4.96	4	28.05 \pm 7.03**	6

Resultados expresados como media \pm DS.

ANOVA y test de Scheffé: *p<0.005; **p<0.001 vs Ca 2.5 mM.

Cuando se triplicó la concentración de calcio del medio, la concentración final fue de 7.5 mM. En estas condiciones experimentales, se compararon los efectos respecto de los obtenidos con Krebs normal y Krebs doble en calcio. En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas con los resultados obtenidos con una concentración normal de calcio. Por el contrario, respecto a los resultados obtenidos con una concentración doble de calcio únicamente algunos fármacos mostraron diferencias significativas: el calcio revirtió el efecto del PK 11195 de forma significativa, a los tres minutos de contacto ($p < 0.01$). En el caso del nifedipino, tanto a los tres como a los diez minutos de contacto, el efecto es revertido con un grado de significación de $p < 0.001$. El diltiazem únicamente revierte su efecto de forma significativa a los tres minutos de contacto, siendo el grado de significación de $p < 0.001$.

5.2.- Modificación por benzodiazepinas y PK 11195 del efecto de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente.

El protocolo experimental seguido en este caso fue idéntico al expuesto en el apartado 5.1. La adenosina se añadió al baño y se mantuvo en contacto con los conductos deferentes aislados de rata durante el minuto anterior a la estimulación eléctrica. Después de un período de recuperación de 10 minutos, se añadieron al baño las concentraciones adecuadas de cada fármaco. Estos permanecieron en contacto con los órganos durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se registró la respuesta de los conductos deferentes a la estimulación eléctrica en presencia de adenosina y de fármaco. De esta forma, se elaboraron las curvas dosis-respuesta a la adenosina en ausencia o presencia de cada fármaco.

También se realizaron experiencias en presencia de hidroxinitrobenziltioguanosina (HNBTG), inhibidora irreversible de la recaptación de la adenosina; ésta se mantuvo en contacto con los órganos durante un tiempo de 30 minutos, tiempo suficiente para que bloquee de manera irreversiblemente dicha recaptación (Clanachan y col., 1979). Después de este período, se eliminó del baño mediante la renovación de la solución de

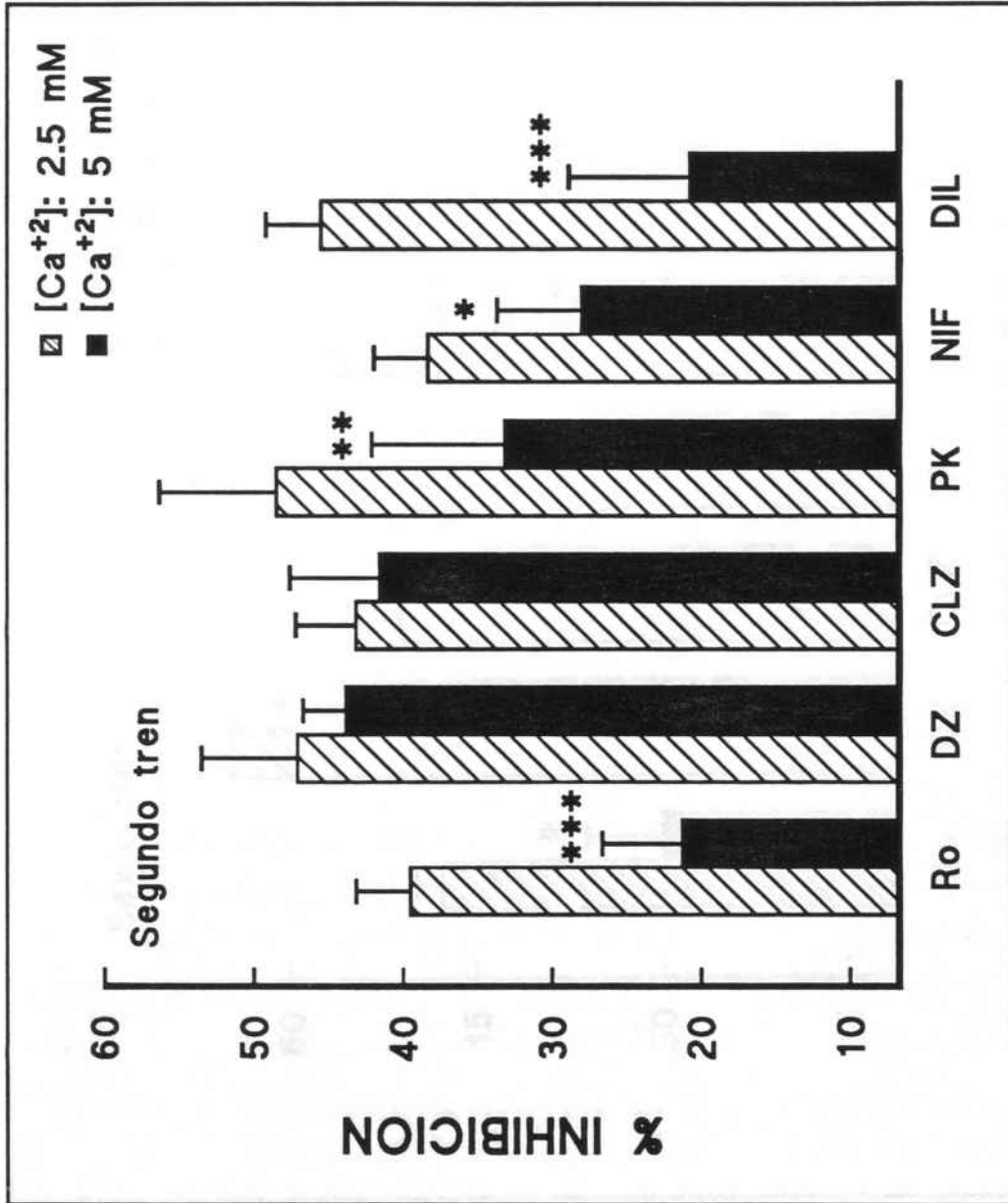


Figura 34: Influencia de la concentración de calcio de medio en el efecto inhibidor de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata. * $p < 0.05$; ** $p < 0.025$; *** $p < 0.001$ vs [Ca²⁺]: 2.5 mM.

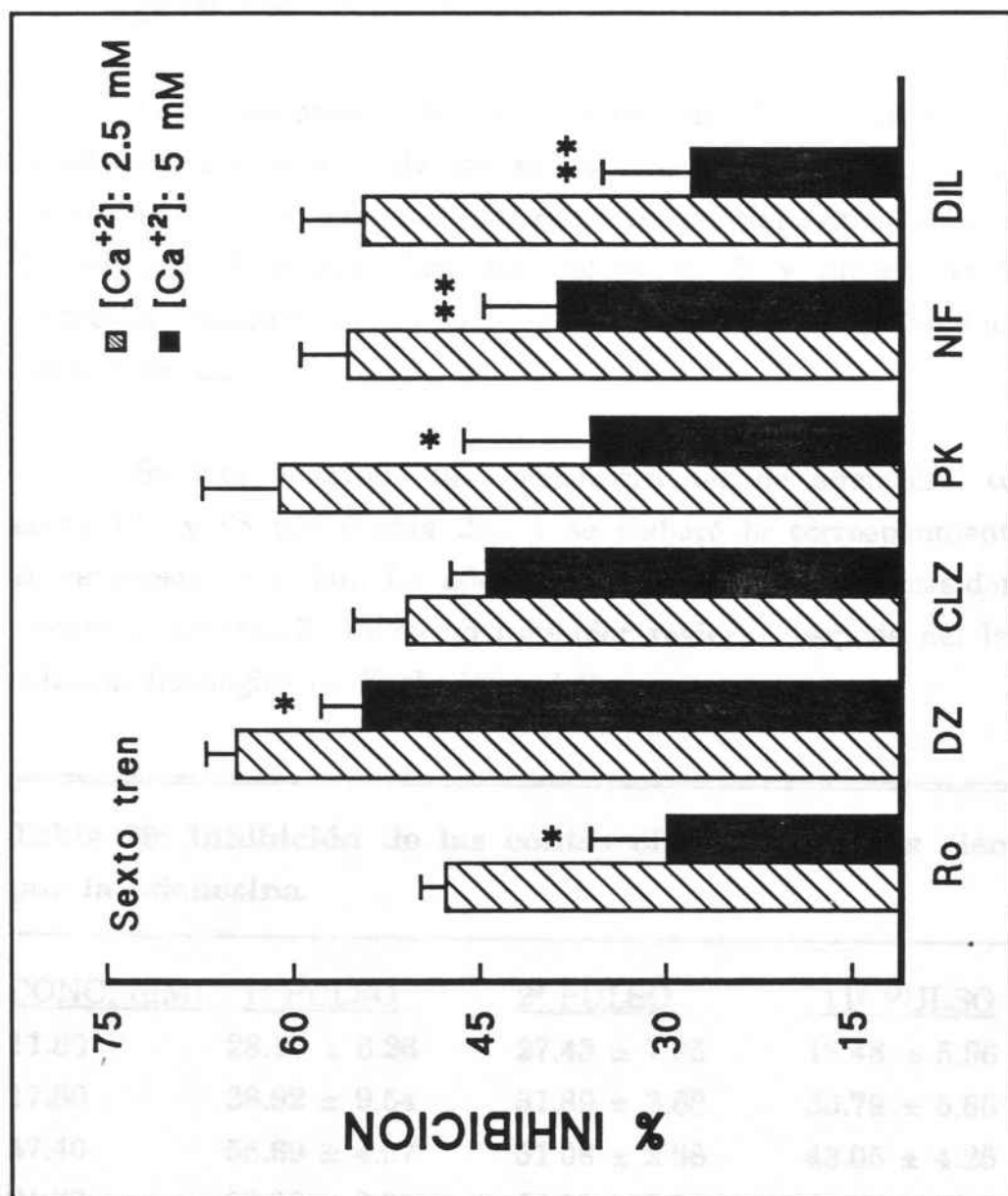


Figura 35: Influencia de la concentración de calcio de medio en el efecto inhibidor de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata. * $p < 0.005$; ** $p < 0.001$ vs [Ca⁺²]: 2.5 mM.

Krebs-Henseleit de las copas del baño de órganos. A continuación, se elaboraron las correspondientes curvas dosis-respuesta para la adenosina en presencia o ausencia de las benzodiazepinas y PK 11195.

5.2.1.- Resultados de la estimulación eléctrica en presencia de adenosina.

Los resultados se han expresado como % de inhibición que provoca la adenosina al minuto de contacto y como % de inhibición que provoca la adenosina en presencia de los fármacos motivo del estudio a los diez minutos de contacto, cuantificándose los pulsos 1º, 2º y último de la respuesta contráctil inducida por la estimulación eléctrica en el conducto deferente aislado de rata.

Se han ensayado las concentraciones de adenosina comprendidas entre 12 y 95 μM (Tabla 29), y se elaboró la correspondiente curva dosis-respuesta (Fig. 36). La adenosina inhibe de forma dosis-dependiente la respuesta contráctil. El efecto inhibitor reierte después del lavado con la solución fisiológica de Krebs-Henseleit.

Tabla 29: Inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente por la adenosina.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>1º PULSO</u>	<u>2º PULSO</u>	<u>11º PULSO</u>	<u>n</u>
11.80	28.17 \pm 6.26	27.43 \pm 7.05	19.48 \pm 5.96	5
17.80	38.92 \pm 9.54	31.89 \pm 3.68	30.79 \pm 5.86	5
47.40	55.69 \pm 4.97	51.08 \pm 2.98	43.05 \pm 4.25	5
94.80	62.98 \pm 9.21	64.29 \pm 5.60	62.83 \pm 9.97	5

* Número de observaciones.

Los resultados se expresan como media \pm DS.

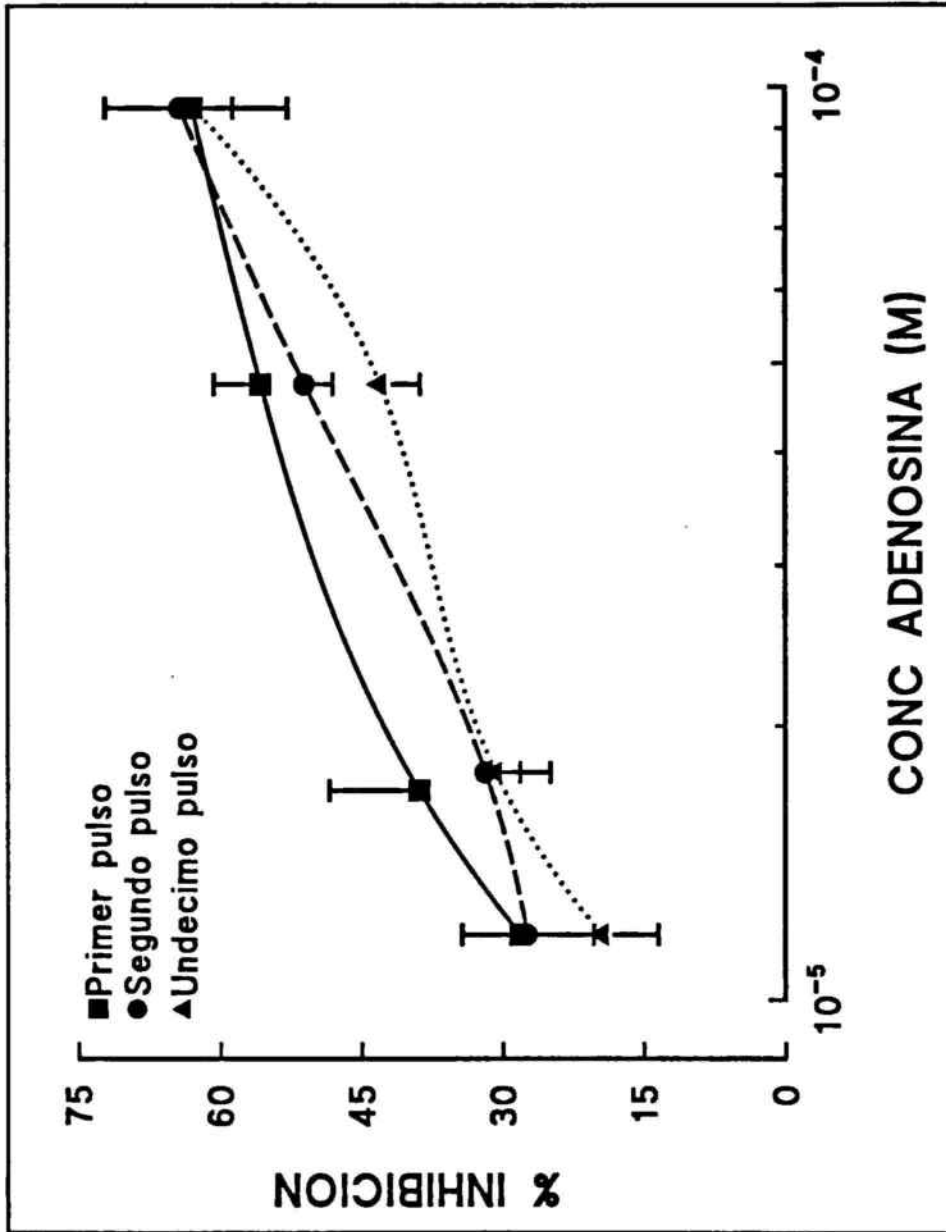


Figura 36: Curvas dosis-respuesta de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente.

Las CI_{50} (μM) obtenidas para el pulso 1º, 2º y último de la respuesta a la estimulación eléctrica en presencia de adenosina fueron respectivamente: 38.41, 43.39 y 53.57 (Tabla 33). Estos datos confirman los obtenidos por Clanachan y Paton (1977) y Clanachan y col. (1977). Esta inhibición es atribuida a un descenso en la liberación de transmisores simpáticos (Clanachan, 1979).

La acción inhibidora de la adenosina es más sensible a nivel del segundo componente de la respuesta contráctil que a nivel del primer componente.

Posteriormente, se elaboraron las curvas dosis-respuesta de la adenosina en presencia de los fármacos motivo de estudio: Ro 5-4864 (3.13 μM) (Tabla 30); diazepam (1.09 μM) (Tabla 31) y clonazepam (4.5 μM) (Tabla 32). Estas concentraciones no afectaron de forma significativa la tensión de reposo del conducto deferente aislado de rata ni modificaron la respuesta de éste a la estimulación eléctrica. Las CI_{50} obtenidas para la adenosina en presencia de estos fármacos se expresan en la Tabla 33. La figura 37 muestra las CI_{50} obtenidas para la adenosina en cada caso, a nivel del primer, segundo y último pulso de la respuesta.

El análisis estadístico de los resultados, ANOVA, muestra que el Ro 5-4864 (3.13 μM) y el diazepam (1.09 μM) potenciaron significativamente la acción inhibidora de la adenosina. Esta potenciación se produce a nivel del primer y último pulso de la respuesta (Fig. 37). En ambos casos el segundo pulso no se alteró de forma significativa. La tercera benzodiazepina estudiada, el clonazepam (4.5 μM), no potenció la respuesta de la adenosina.

Tabla 30: Inhibición por adenosina de las contracciones inducidas eléctricamente en presencia de Ro 5-4864 (3.13 μM).

<u>CONC. (μM)</u>	<u>1º PULSO</u>	<u>2º PULSO</u>	<u>11º PULSO</u>	<u>n*</u>
11.80	42.84 \pm 8.24	33.10 \pm 6.79	28.12 \pm 5.74	5
17.80	44.41 \pm 7.65	39.36 \pm 5.20	37.97 \pm 4.14	5
47.40	61.64 \pm 7.64	59.01 \pm 3.06	53.94 \pm 4.78	5
94.80	77.44 \pm 6.67	75.71 \pm 6.36	71.83 \pm 8.01	5

* Número de observaciones.

Los resultados se expresan como media \pm DS.

Tabla 31: Inhibición por adenosina de las contracciones inducidas eléctricamente en presencia de diazepam (1.09 μM).

<u>CONC. (μM)</u>	<u>1º PULSO</u>	<u>2º PULSO</u>	<u>11º PULSO</u>	<u>n*</u>
11.80	35.91 \pm 4.15	32.51 \pm 8.35	29.80 \pm 3.71	5
17.80	47.99 \pm 11.14	41.72 \pm 5.89	37.40 \pm 10.13	5
47.40	73.89 \pm 6.74	68.78 \pm 6.06	56.17 \pm 4.54	5
94.80	83.33 \pm 10.21	69.74 \pm 8.41	69.14 \pm 4.56	5

* Número de observaciones.

Los resultados se expresan como media \pm DS.

Tabla 32: Inhibición por adenosina de las contracciones inducidas eléctricamente en presencia de clonazepam (4.50 μ M).

<u>CONC. (μM)</u>	<u>1º PULSO</u>	<u>2º PULSO</u>	<u>11º PULSO</u>	<u>n*</u>
11.80	38.61 \pm 11.8	23.96 \pm 2.70	23.46 \pm 8.89	6
17.80	29.16 \pm 5.89	30.29 \pm 4.29	31.88 \pm 2.05	4
47.40	55.64 \pm 7.93	45.17 \pm 4.95	46.82 \pm 9.30	5
94.80	79.17 \pm 5.89	65.79 \pm 8.71	62.45 \pm 12.68	4

* Número de observaciones.

Los resultados se expresan como media \pm DS.

Tabla 33: Potenciación por benzodiazepinas del efecto inhibitor de la adenosina, en las contracciones inducidas eléctricamente.

	<u>CI₅₀ (μM)</u>	<u>CI₅₀ (μM)</u>	<u>CI₅₀ (μM)</u>	<u>n</u>
	<u>(1º PULSO)</u>	<u>(2º PULSO)</u>	<u>(11º PULSO)</u>	
ADENOSINA	38.41 \pm 4.26	43.39 \pm 2.26	53.57 \pm 5.56	4
ADE + Ro	22.41 \pm 3.28*	28.55 \pm 2.01	34.27 \pm 2.89*	4
ADE + DZ	19.18 \pm 0.93*	26.00 \pm 3.42	33.86 \pm 3.17*	4
ADE + CZ	29.65 \pm 6.36	47.99 \pm 4.58	48.01 \pm 5.12	4

n.- Número de observaciones.

Los resultados se expresan como CI₅₀ \pm DS.

*p<0.001.

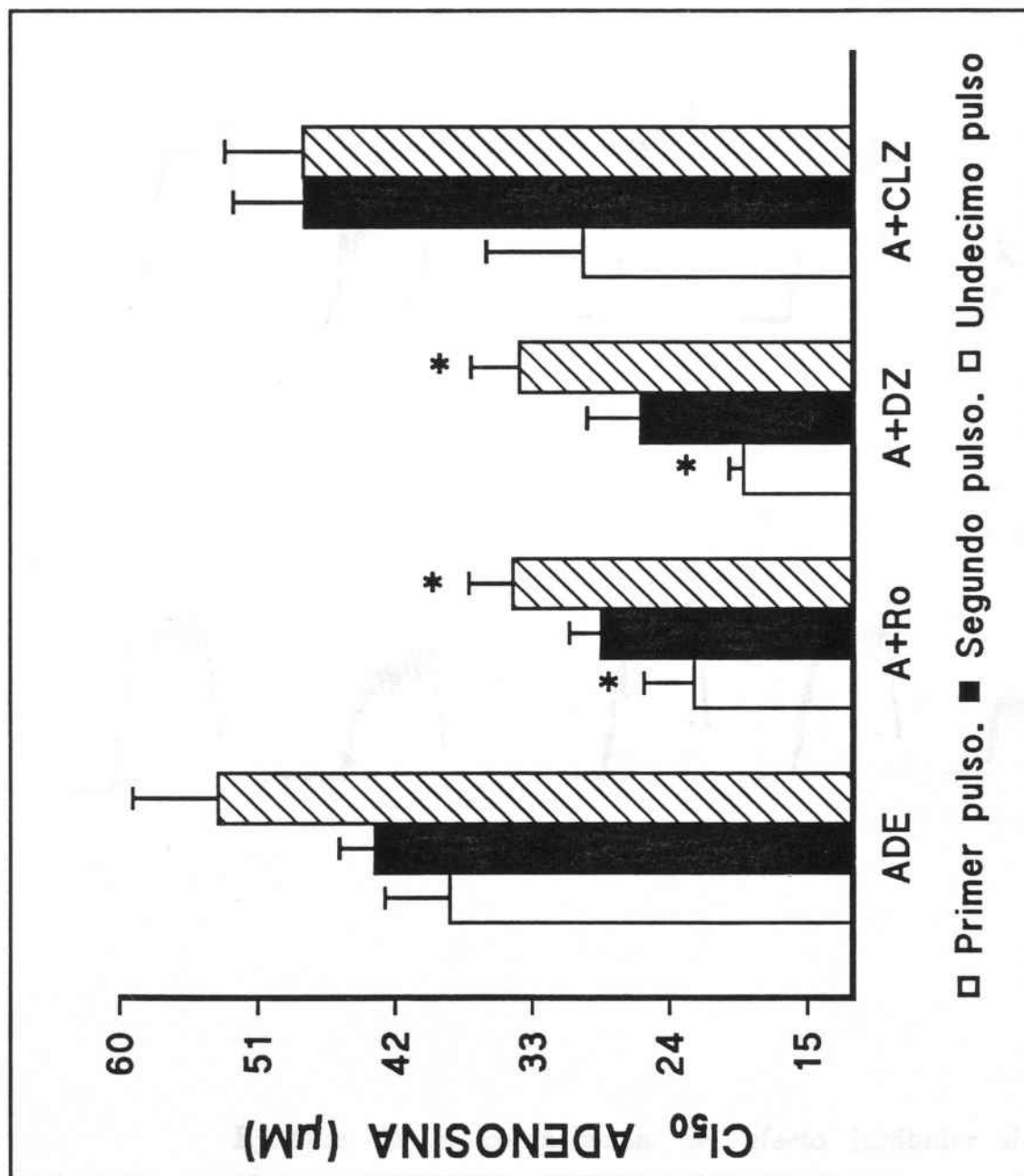
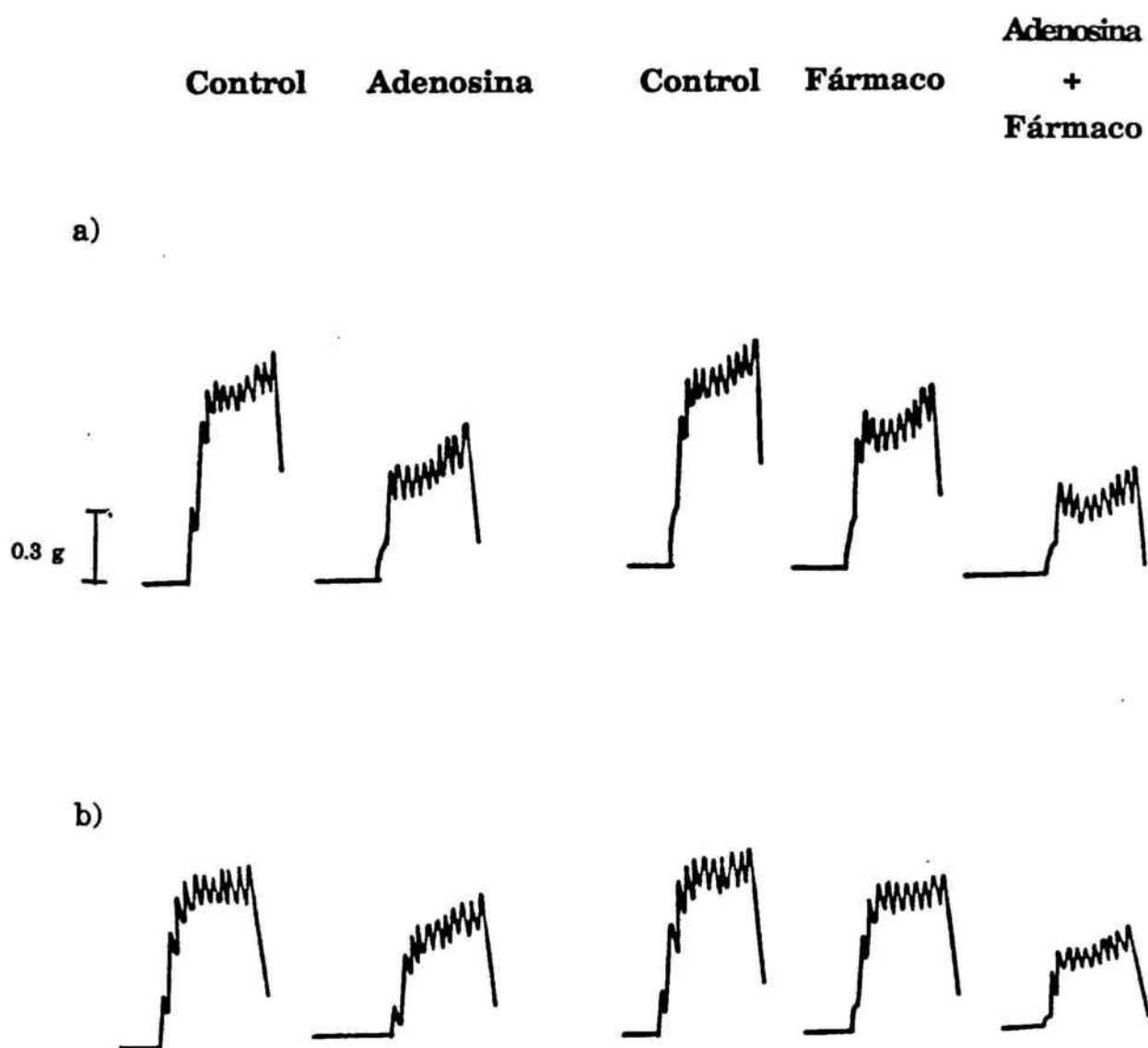


Figura 37: Influencia de las benzodiazepinas en el efecto inhibitor de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata.



Ejemplo de la potenciación del efecto inhibitor de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata.

a.- Ro 5-4864 ($3.13 \mu\text{M}$) potencia la acción de la adenosina a nivel del primer y último pulsos del tren.

b.- Diazepam ($1.09 \mu\text{M}$) potencia la acción de la adenosina a nivel del primer y último pulsos del tren.

El PK 11195 (10- 100 μM) no potenció la acción inhibitoria de la adenosina, ni afecta a la acción potenciadora de la adenosina por el Ro 5-4864. Se observó que cuando los órganos han estado previamente en contacto con la adenosina, la inhibición de la respuesta provocada por el PK 11195 se reduce o anula.

La 2-cloroadenosina (8.28 μM) inhibió la respuesta contráctil inducida por la estimulación eléctrica. Esta purina es más potente que la adenosina debido a que no es sustrato de la recaptación. La inhibición observada para la 2-cloroadenosina no se potenció, ni revirtió por el Ro 5-4864 ni por el diazepam.

El pretratamiento del conducto deferente aislado de rata con HNBTG (10 μM) durante 30 minutos, potenció significativamente los efectos de la adenosina. Las CI_{50} obtenidas para el primer, el segundo y el último pulso de la respuesta a la adenosina fueron respectivamente de: 6.75 , 11.23 y 24.53 μM (Fig. 38). Estos resultados confirman los obtenidos por Clanachan y Marshall (1980).

Inhibida la recaptación de la adenosina por la HNBTG, el efecto antagonista de la adenosina no fue potenciado ni por el Ro 5-4864, ni por el diazepam.

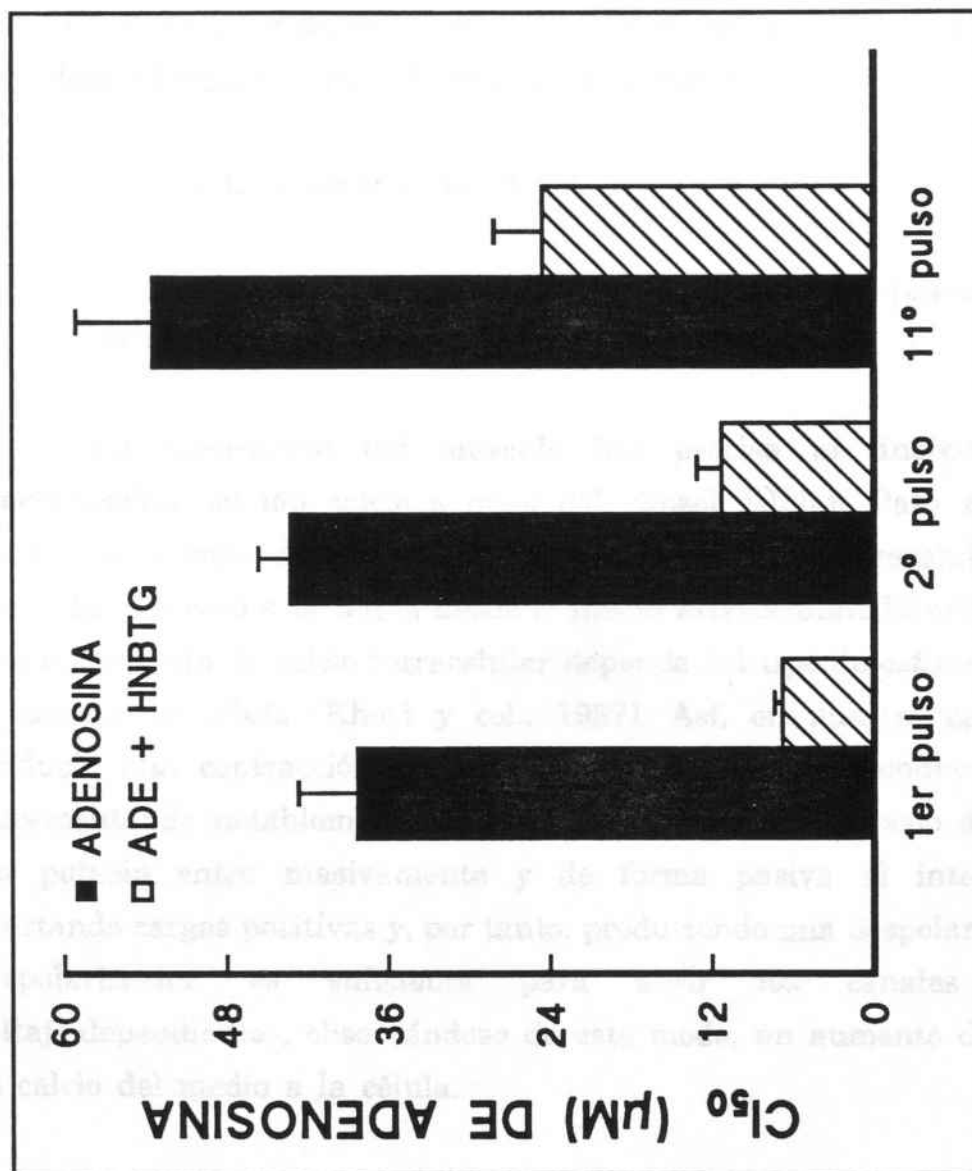


Figura 38: CI_{50} de la adenosina en ausencia y presencia de HNBGT.

6.-Estudio de la movilización de calcio.

Una vez obtenidos los conductos deferentes, éstos se transfirieron a una placa de Petri que contenía una solución Krebs de composición (en mM): NaCl, 130.77; KCl, 5.9; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 1.19; MOPS (ácido 3-(N-morfolinopropano- sulfónico)), 10; glucosa, 11; a pH 7.4 y aireada con oxígeno puro. En estas condiciones se procedió a separar los vasos y tejido conectivo adheridos al órgano, antes de iniciar cada experiencia.

6.1.- Entrada de ⁴⁵Ca²⁺.

6.1.1.-Entrada de calcio inducida por despolarización con KCl.

La contracción del músculo liso precisa un incremento de la concentración del ión calcio a nivel del citosol celular. Para ello, el calcio puede ser movilizado a partir de zonas de reserva intracelulares, o bien puede incorporarse a la célula desde el medio extracelular. El origen, pues, de este incremento de calcio intracelular depende del tipo de estimulación a que se someta la célula (Khoyi y col., 1987). Así, en nuestro caso, podemos producir una contracción de la musculatura lisa del conducto deferente, incrementando notablemente la concentración del ión potasio del medio. El ión potasio entra masivamente y de forma pasiva al interior celular, aportando cargas positivas y, por tanto, produciendo una despolarización. Esta despolarización es suficiente para abrir los canales de calcio voltaje-dependientes, observándose de este modo, un aumento de la entrada de calcio del medio a la célula.

Los tejidos se mantuvieron durante un período de estabilización de 75 min a 37 °C. Una vez transcurrido este período uno de los conductos deferentes de cada animal se mantuvo en contacto con los compuestos a ensayar durante 15 min, mientras que el otro permanecía como tejido control. Pasado este tiempo de contacto con los fármacos, ambos conductos deferentes se sumergieron, durante 4 min, en una solución de alto contenido en potasio cuya composición era (en mM): NaCl, 74.45; KCl, 120; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 1.19;

MOPS, 10; glucosa, 11 y aproximadamente 1 μCi de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ (actividad específica 16 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. New England Nuclear). Una vez transcurrido el tiempo de despolarización, se procedió a realizar una serie sucesiva de lavados a distintos tiempos (5, 10, 15 y 30 minutos) con una solución libre de calcio y que contenía LaCl_3 (10 mM), pH 7.4, a fin de eliminar el calcio radiactivo que permanecía en el espacio extracelular.

Posteriormente se secaron los conductos deferentes entre dos hojas de papel de filtro, se trocearon (fragmentos de 1-2 mm) y se determinó su peso una vez introducidos en viales de centelleo. A cada vial se añadió 3 ml de una solución de EDTA 5 mM. Después de 15-18 horas de contacto con esta solución, se añadió a cada vial 10 ml de cocktail de centelleo (Cocktail F-1, Normascint Co-136, Scharlau) y se procedió a la lectura de la radiactividad remanente en cada conducto deferente en un contador de centelleo (Beckman LS-1800).

6.1.2.-Entrada de calcio inducida por AlF_4^- .

En este caso el protocolo experimental seguido es idéntico al anteriormente expuesto en el apartado 6.1.1., pero la estimulación se produjo manteniendo los conductos deferentes durante un período de 30 min en una solución de Krebs normal (ver 6.1.) que contenía $^{45}\text{Ca}^{+2}$ (1 μCi) y NaF 10 mM/ AlCl_3 100 μM .

6.2.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

6.2.1.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en condiciones normales.

Para determinar la salida de calcio de las células en condiciones basales, se realizó en primer lugar una incubación de los conductos deferentes durante 2 h en una solución de Krebs normal (ver 6.1.) que contenía 4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de $^{45}\text{Ca}^{+2}$. Transcurrido este período, y después de un breve lavado (5 min) de los tejidos con una solución de Krebs normal que contenía EGTA 2 mM, se transfirieron los órganos cada 5 min a una serie de tubos sucesivos que contenían 2 ml de Krebs normal con EGTA 2 mM, durante 90 min. Este

período de lavado es suficiente para la determinación de la salida basal de calcio. El Ro 5-4864 (62.6 μM) y el PK (110 μM) se añadieron a los 8 últimos tubos de uno de los conductos deferentes de cada par. Se determinó la radiactividad de cada uno de los tubos de lavado añadiendo a cada uno de ellos 10 ml de cocktail de centelleo, mientras que la remanente en el tejido se determinó mediante el mismo procedimiento expuesto en el apartado 6.1.1.. Los datos obtenidos se han representado como curvas de desaturación que ilustran la disminución de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ contenido en tejido con el tiempo.

6.2.2.-Salida de calcio inducida por noradrenalina.

La salida de calcio estimulada por noradrenalina es un reflejo de la liberación de calcio de los almacenes intracelulares (Deth y Van Breemen, 1977). La liberación de calcio inducida por noradrenalina se determinó siguiendo el procedimiento de Godfraind (1976). Los conductos deferentes se incubaron durante 2 h en una solución de Krebs normal que contenía ^{45}Ca (2 $\mu\text{Ci/ml}$). Transcurrido este período se lavaron los tejidos durante 5 min en una solución sin calcio y que contenía EGTA 0.2 mM. Seguidamente se transfirieron durante 2 min a 4 ml de Krebs libre de calcio, con EGTA 0.2 mM y noradrenalina (25 μM), en presencia o ausencia de Ro 5.4864 (62.6 μM) o PK 11195 (110 μM). Posteriormente los tejidos se introdujeron en una solución de lavado con LiCl_3 (10 mM) durante 5 min y se determinó la radiactividad remanente en el tejido como se indica en el apartado 6.1.1.

6.3.-Resultados.

Los resultados obtenidos en la determinación de la movilización de calcio se expresaron como μmoles de calcio por Kg de tejido (Tularpaty y Altura, 1978; Schramm y col., 1985; Lodge y col., 1985) utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{moles } ^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg tejido} = \frac{\text{cpm (tejido)} : \frac{\text{cpm/litro de medio}}{\mu\text{mol calcio/litro de medio}}}{\text{peso de tejido (Kg)}}$$

6.3.1.-Entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

En trabajos anteriores ya se había sugerido la relación entre canales de calcio y benzodiazepinas. Varios de estos estudios indican que las benzodiazepinas, a concentraciones micromolares, inhiben las contracciones inducidas por la captación de calcio en sinaptosomas (Ferrendelli y col., 1982; Taft y De Lorenzo, 1984).

Este efecto, similar a la acción de los antagonistas del calcio, se evidenció tanto para las benzodiazepinas de acción central como las de acción periférica.

También se ha citado la posible interacción entre receptores benzodiazepínicos periféricos y los canales de calcio voltaje-dependientes (Mestre y col., 1984b).

6.3.1.1.-Influencia de los factores experimentales en la captación de calcio.

En el presente trabajo se llevó a cabo, en primer lugar, un estudio de las condiciones experimentales idóneas, calculando la influencia de diversos parámetros en la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$. En las Tablas 34, 35 y 36 se resumen los resultados de las experiencias en las que se ensayó la modificación de la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ según el tiempo de despolarización, la concentración de calcio de medio y la concentración de potasio de la solución nutritiva.

En primer lugar se procedió a establecer el tiempo adecuado de contacto con el radioisótopo y con la solución despolarizante. Para ello se establecieron como constantes la concentración de calcio extracelular (2.5 mM), una concentración de KCl de 80 mM, mientras que los lavados se realizaron con una solución libre de calcio que contenía 2 mM de EGTA. Se ensayaron dos protocolos experimentales, en el primero se sometía al tejido a un tiempo de contacto (5 min) con el isótopo antes de provocar la despolarización; por el contrario en el segundo se suprimió este tiempo de

Tabla 34: Influencia del tiempo de despolarización en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ estimulado por KCl en conducto deferente de rata.

1.- Sin tiempo previo de estabilización.

<u>TIEMPO (min)</u>	<u>COND. BASALES</u> n µmoles Ca/Kg tej.	<u>DESPOLARIZ.</u> n µmoles Ca/Kg tej.
8	128.04 ± 11.78 4	156.34 ± 43.92 4
4	60.09 ± 17.80 4	121.87 ± 15.18** 4
2	30.69 ± 4.99 4	40.75 ± 2.45 4

2.- Con 5 minutos previos de estabilización.

<u>TIEMPO (min)</u>	<u>COND. BASALES</u> n µmoles Ca/Kg tej.	<u>DESPOLARIZ.</u> n µmoles Ca/Kg tej.
10	164.38 ± 17.90 4	179.70 ± 8.96 4
8	163.31 ± 26.81 4	188.78 ± 19.47 4
5	105.27 ± 9.20 4	132.08 ± 8.91* 4
4	127.27 ± 19.25 4	179.70 ± 8.96 4

t de Student para datos apareados: *p< 0.05.

Condiciones experimentales : $[\text{Ca}^{+2}] = 2.5 \text{ mM.}$

$[\text{K}^+] = 80 \text{ mM.}$

Lavados con EGTA.

µmoles de calcio / Kg de tejido expresados como $x \pm \text{DS.}$

estabilización con el $^{45}\text{Ca}^{+2}$. En ambos casos se valoró el calcio incorporado a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de calcio al tejido depende del tiempo tanto en condiciones basales como de estimulación (Fig. 39 y 40).

El tiempo de estabilización del tejido con el radioisótopo no mejora la posterior incorporación de éste cuando se induce la despolarización con KCl (Tabla 34).

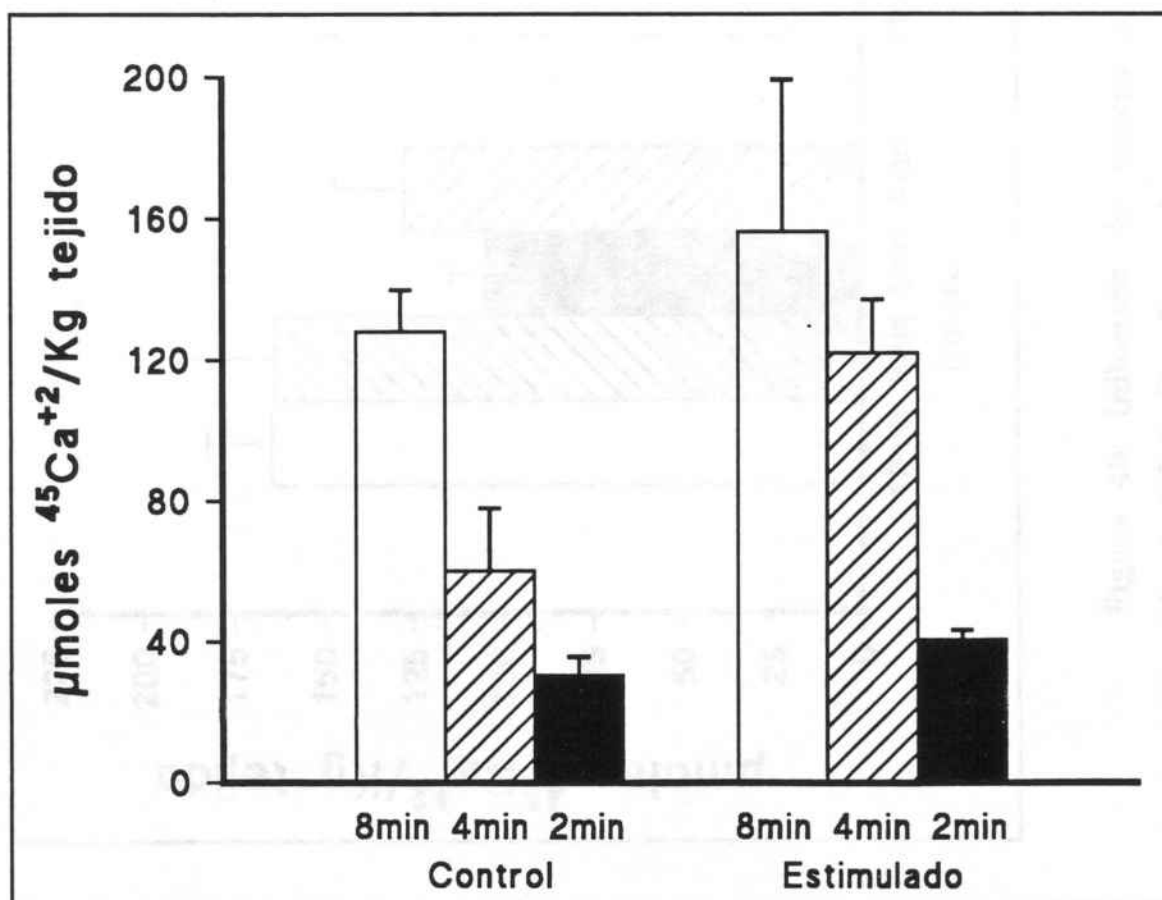


Figura 39: Influencia del tiempo de despolarización en la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$. Sin período previo de estabilización.

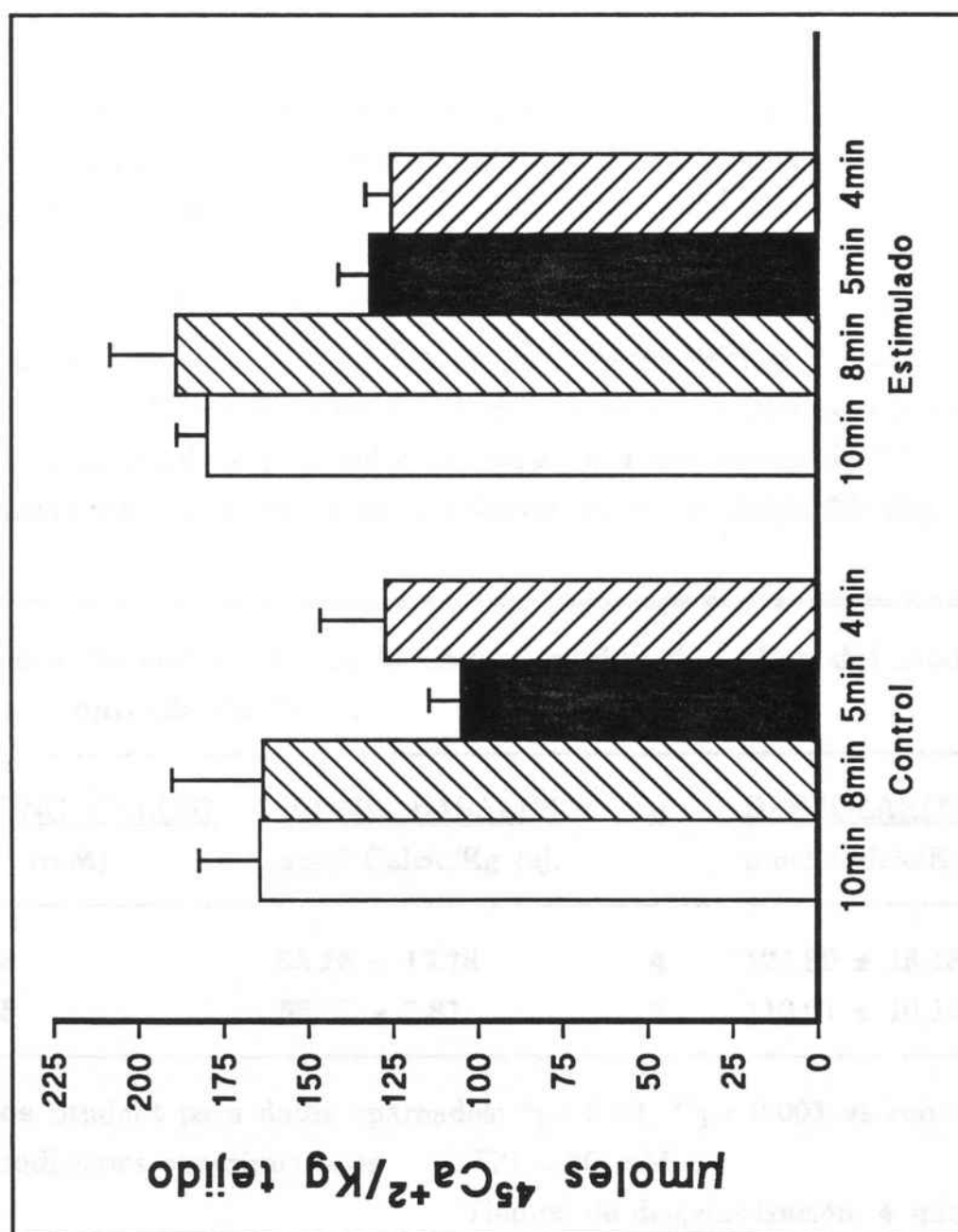


Figura 40: Influencia del tiempo de despolarización en la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$. Con 5 minutos previos de estabilización.

Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció que el tiempo de contacto con la solución de KCl fuera de 4 minutos, ya que el grado de significación entre las condiciones basales y de despolarización era más elevado; al mismo tiempo se eliminó el período previo de estabilización ya que no mejoraba significativamente la incorporación.

Asimismo, fue a este tiempo de contacto donde los valores obtenidos resultaron ser más homogéneos, permitiendo una mayor reproductibilidad de las experiencias.

Uno de los factores que influyen decisivamente en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ es la concentración de calcio en el medio (Weir y Weston, 1988; Khoyi y col., 1987; Hay y Wandsworth, 1984). Teniendo en cuenta la importancia de este parámetro, se procedió a comparar la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ a diversas concentraciones de calcio en la solución nutritiva (Tabla 35; Fig. 41).

Tabla 35: Influencia de la concentración de calcio del medio en la entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

<u>CONC. CALCIO</u> (mM)	<u>COND. BASALES</u> $\mu\text{mol Calcio/Kg tej.}$	<u>n</u>	<u>DESPOLARIZ.</u> $\mu\text{mol Calcio/Kg tej.}$	<u>n</u>
2.5	53.26 \pm 12.78	4	121.89 \pm 15.18**	4
0.5	59.73 \pm 7.81	4	110.01 \pm 10.16*	4

t de Student para datos apareados: *p < 0.02; **p < 0.001 vs cond. basales.

Condiciones experimentales: $[\text{K}^+] = 80 \text{ mM.}$

Tiempo de despolarización, 4 min.

Lavado con EGTA.

$\mu\text{moles de calcio / Kg de tejido expresados como } x \pm \text{DS.}$

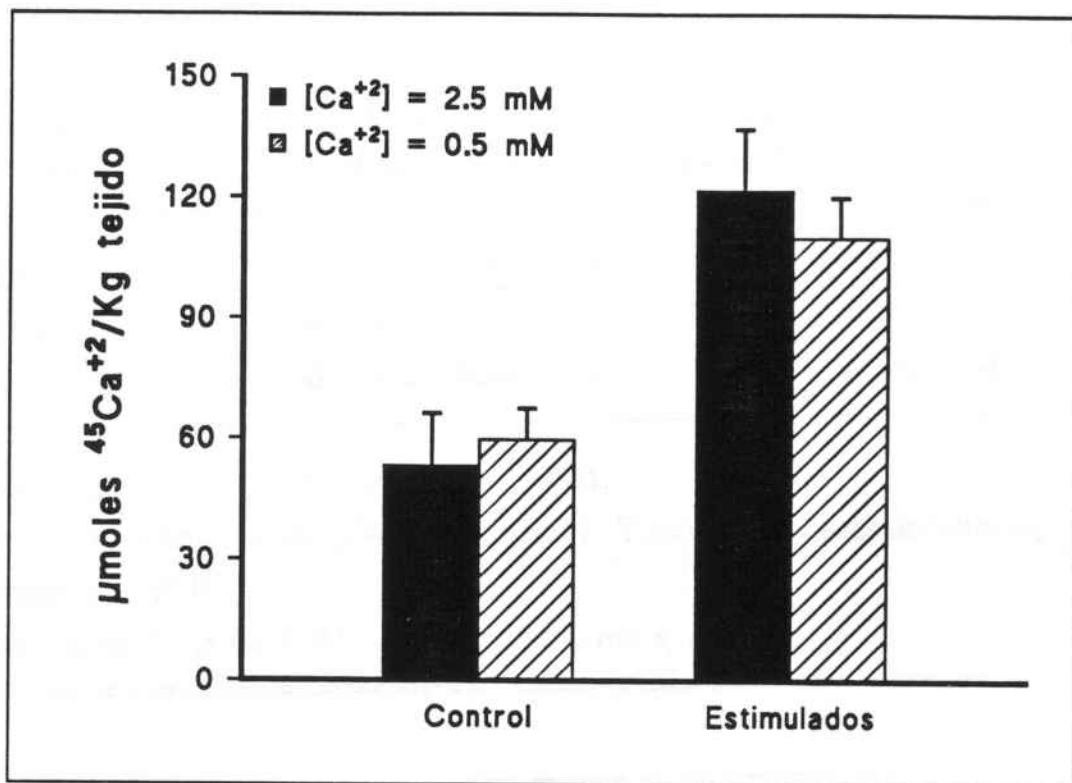


Figura 41: Influencia de la concentración de calcio del medio en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

Por último, se ensayaron diferentes concentraciones de KCl para inducir la despolarización manteniendo fijas el tiempo de despolarización (4 min) y la concentración de calcio del medio (0.5 mM). Los resultados se muestran en la figura 42.

Una vez fijadas las condiciones experimentales de estimulación, fue necesario valorar la influencia del tipo de lavado. Aunque Weir y Weston (1988) indican que el lavado con EGTA o con LaCl_3 no influye de manera decisiva en los resultados, en este caso la variación de éstos fue evidente, como se muestra en la Figura 43.

Tabla 36: Influencia de la concentración de KCl en la solución despolarizante en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

<u>CONC. DE POTASIO</u> (mM)	<u>COND. BASALES</u> n $\mu\text{mol Calcio/Kg tej.}$	<u>DESPOLARIZ.</u> n $\mu\text{mol Calcio/Kg tej.}$
80	59.73 \pm 7.81 4	110.01 \pm 10.20* 4
120	60.74 \pm 4.40 4	139.67 \pm 4.45* 4
160	61.89 \pm 5.86 4	117.66 \pm 16.44* 4

t de Student para datos apareados: * $p < 0.001$.

Condiciones experimentales: $[\text{Ca}^{+2}] = 0.5 \text{ mM}$. Tiempo de despolarización, 4 min. Lavado con EGTA.

$\mu\text{moles de calcio / Kg de tejido expresados como } x \pm \text{DS.}$

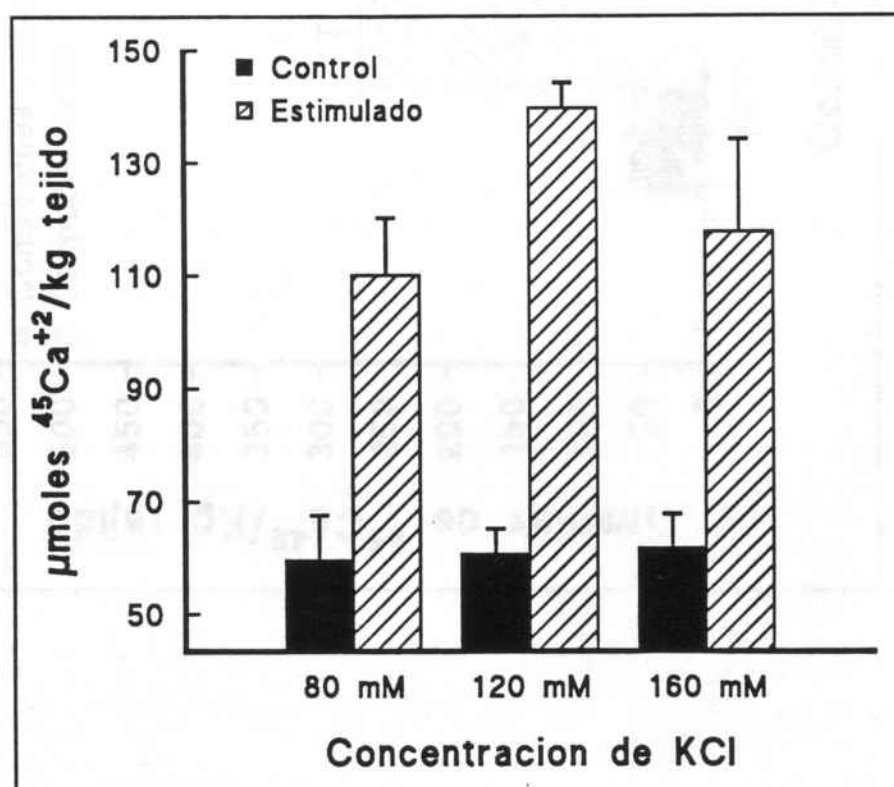


Figura 42: Influencia de la concentración de KCl en la solución despolarizante en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

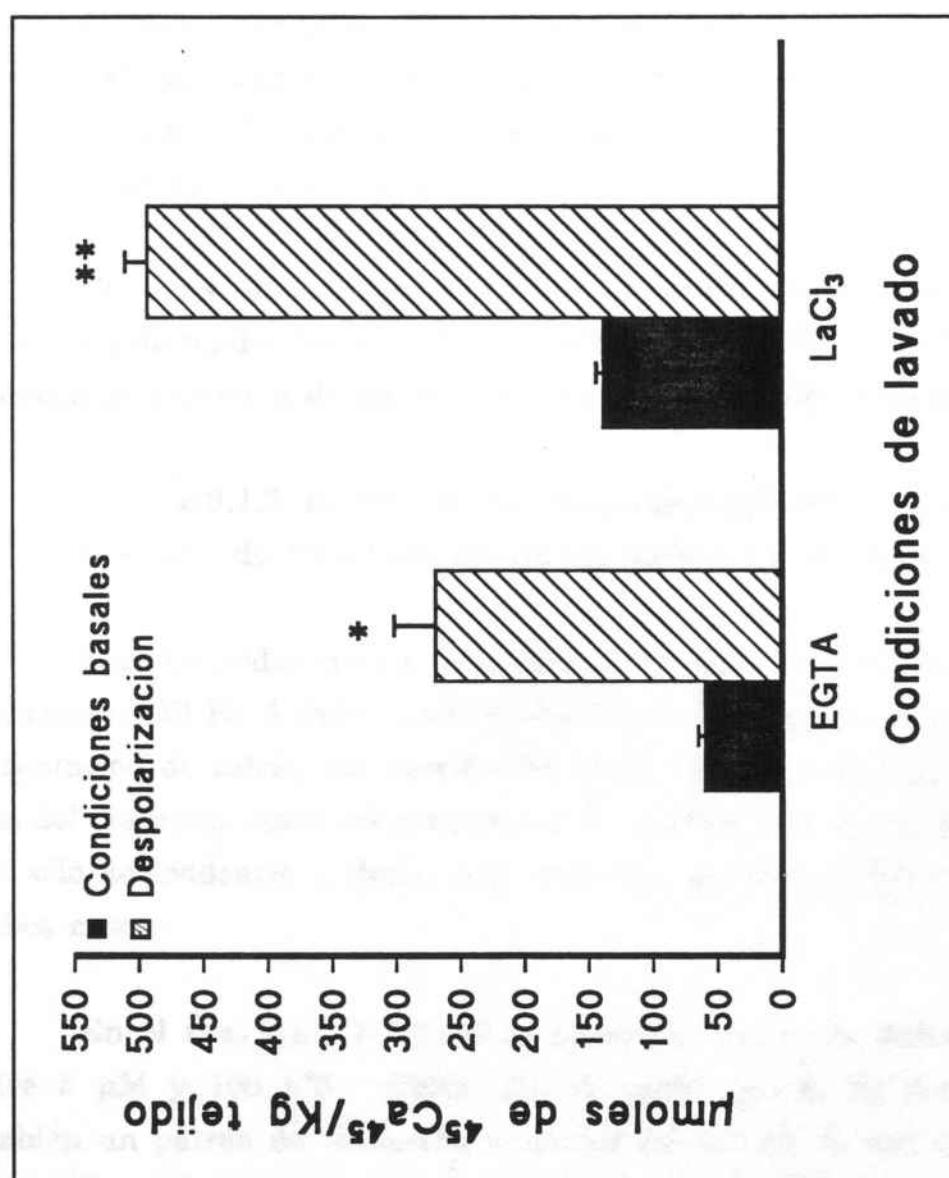


Figura 43: Influencia de las condiciones de lavado, con EGTA (2 mM) o LaCl_3 (10 mM), en la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en conducto deferente de rata.

Tras el análisis y valoración de todos los resultados se pudieron establecer las condiciones de trabajo adecuadas para el estudio de la acción de diversos fármacos en la captación de calcio del medio. Estas condiciones expuestas en la sección 6.1. son:

- Concentración de calcio en el medio: 0.5 mM.
- Concentración de potasio para la despolarización: 120 mM.
- Tiempo de despolarización: 4 minutos.
- Lavado con LaCl_3 , 10 mM.

En estas condiciones los valores obtenidos (expresados en μmoles de calcio / Kg de tejido) fueron: 269.15 ± 32.35 (n=6) y 493.11 ± 16.95 (n=11) en condiciones basales y de despolarización (KCl 120 mM) respectivamente.

6.3.1.2.-Efecto de las benzodiazepinas y PK 11195 en la entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en conducto deferente de rata.

Las benzodiazepinas estudiadas fueron Ro 5-4864, diazepam y clonazepam. El Ro 5-4864 (5 μM -6 μM , Tabla 37) produce una inhibición de la captación de calcio, que resultó ser dosis-dependiente (Fig. 44). Tanto en caso del diazepam como del clonazepam la inhibición de la captación de calcio tan sólo se evidenció a dosis muy elevadas, aproximadamente 100 μM en ambos casos.

En el caso del PK 11195 se ensayó el rango de dosis comprendido entre 5 μM y 100 μM (Tabla 38). Al igual que el Ro 5-4864 presentó también un patrón de respuesta inhibitor del influjo de calcio, dosis-dependiente (Fig. 44). A la vista de los resultados anteriores (dosis micromolares y no antagonismo Ro 5-4864 y PK 11195) podemos descartar que la inhibición de la entrada de calcio esté mediado por el receptor benzodiazepínico periférico.

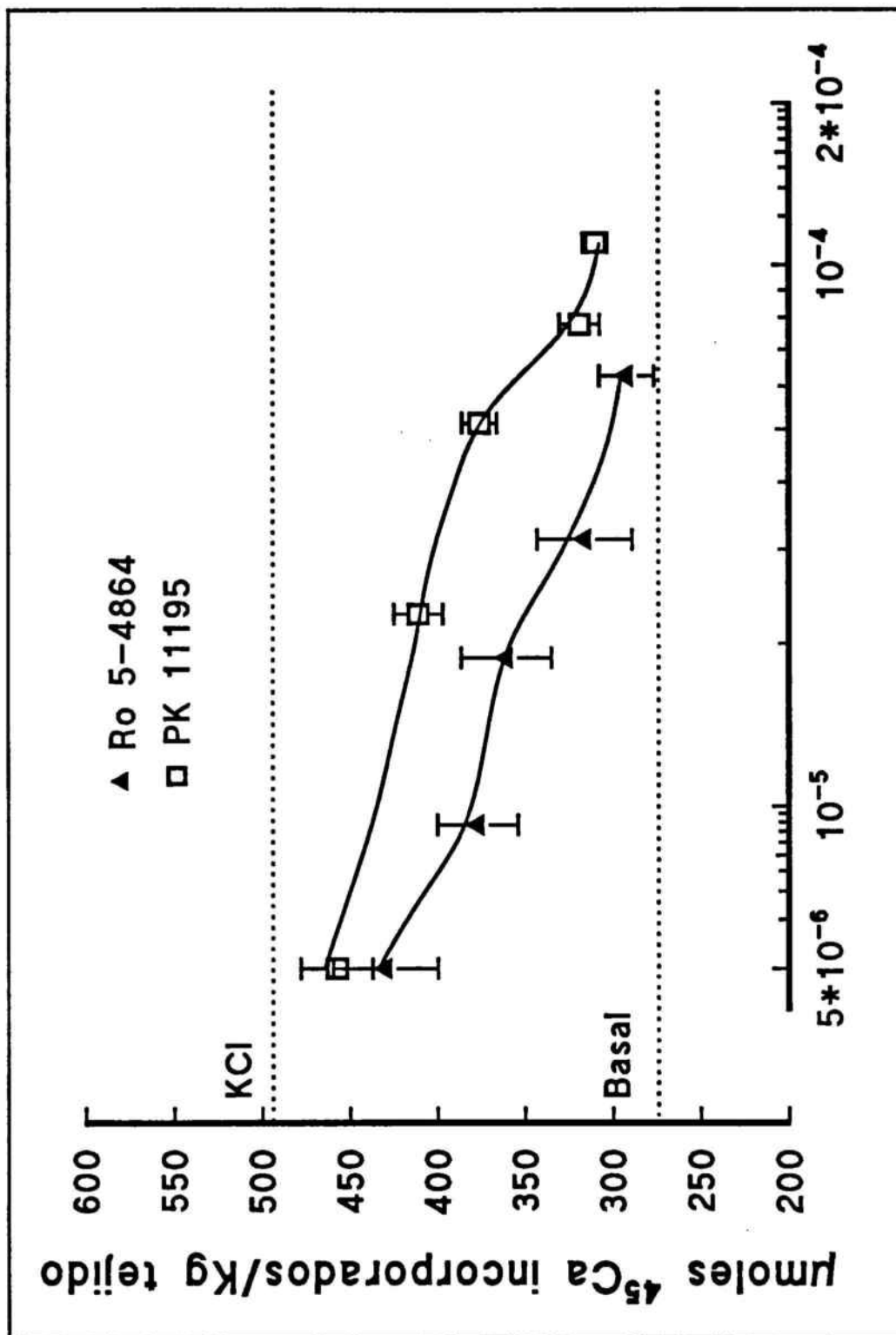


Figura 44: Efecto del Ro 5-4864 y del PK 11195 en la entrada de ⁴⁵Ca⁺² en conducto deferente de rata.

6.3.1.3.-Entrada de calcio inducida por AlF_4^- .

Como se ha mencionado en la sección teórica, ciertas proteínas G están acopladas a canales de calcio, de manera que son capaces de regular el tránsito de este ión a su través. Asimismo, la activación no selectiva de las proteínas G, incluye la activación de las G_p , que inducen la hidrólisis de fosfatidilinositoles y, por tanto, también una movilización de calcio mediada por inositoltrifosfatos (Rampe y col., 1981). Si se activan este tipo de proteínas G se observa un incremento de la entrada de calcio en la célula. Por todo lo anteriormente expuesto, hemos utilizado un activador inespecífico de las proteínas G, el ión AlF_4^- (Bigay y col., 1985), para aumentar la entrada de calcio a la célula y poner de manifiesto si los compuestos motivo de estudio modifican esta entrada inducida por activación de las proteínas G.

En primer lugar se realizó un estudio de la entrada de calcio inducida por AlF_4^- a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan en la tabla 39 y se muestran gráficamente en la figura 45.

Tabla 39: Captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en conducto deferente de rata estimulado por diferentes concentraciones de AlF_4^- .

<u>CONCENTRACION</u> <u>DE NaF/AlCl_3</u>	<u>BASAL</u> μg de $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$ tej.	<u>n</u>	<u>ESTIMULADO</u> μg de $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$ tej.	<u>n</u>
2mM/20 μM	414.77 \pm 68.91	4	349.95 \pm 65.00* ²	4
5mM/50 μM	337.73 \pm 32.32	4	471.61 \pm 41.46	4
10mM/100 μM	341.54 \pm 41.46	4	442.70 \pm 53.24* ¹	4

t de Student para datos apareados: *p < 0.05.

t = 2.8465 para 1. t = 2.7772 para 2

Condiciones experimentales: $[\text{Ca}^{+2}] = 0.5 \text{ mM}$.

Tiempo de estimulación: 30 min.

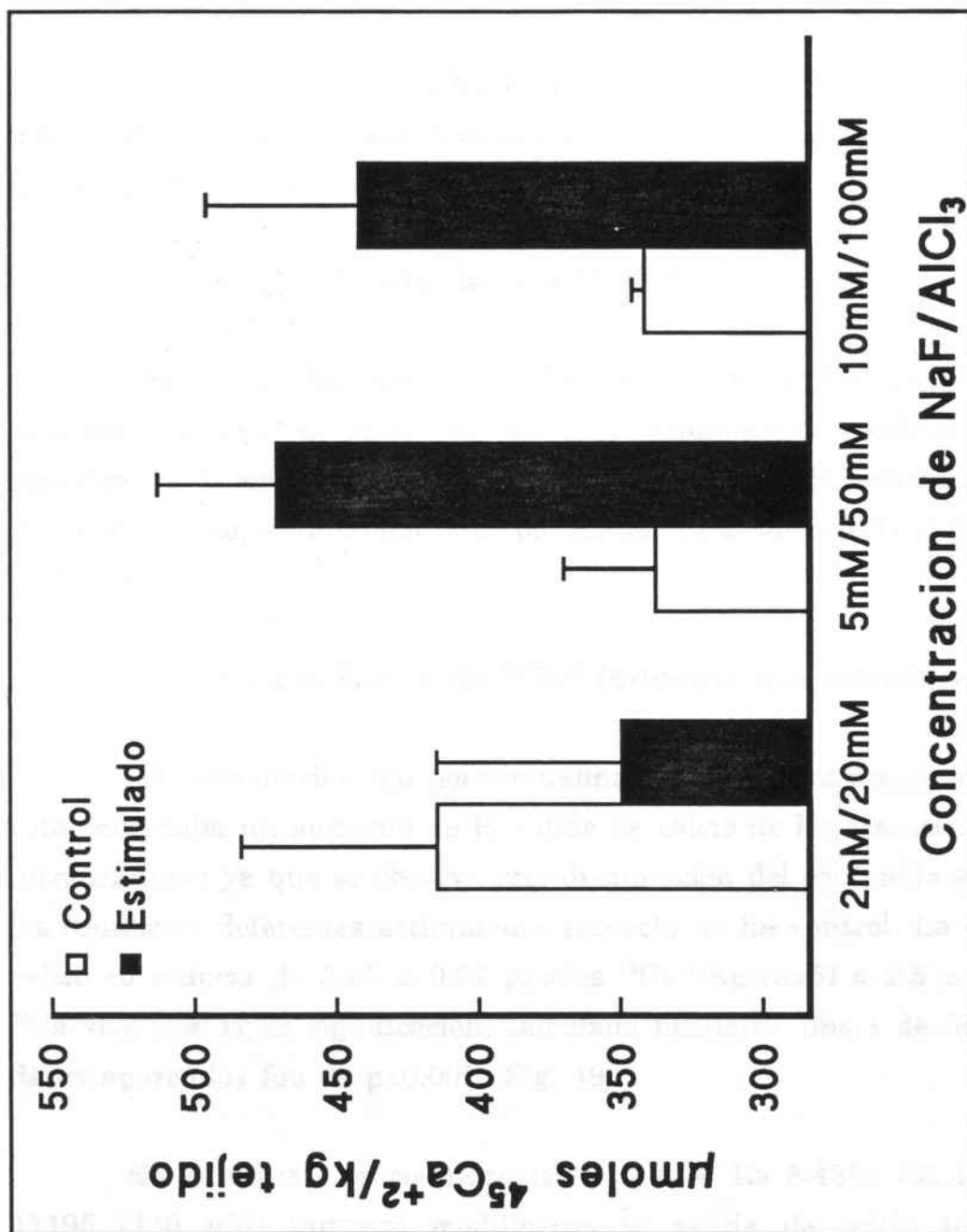


Figura 45: Influencia de la concentración de NaF/AI₃ en la incorporación de ⁴⁵Ca²⁺ en conducto deferente de rata.

Teniendo en cuenta estos resultados se utilizó la concentración de 10 mM/100 μ M. La estimulación con AlF_4^- de los conductos deferentes de rata produjo un aumento de la entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ de 341.54 ± 41.46 (n=4) a 442.70 ± 53.24 (n=4) μ moles $^{45}\text{Ca}/\text{kg}$. tejido, en condiciones basales y de estimulación, respectivamente, con valor de $p < 0.05$.

Ni Ro 5-4864 (62.6 μ M) ni PK 11195 (110 μ M) fueron capaces de modificar la entrada de calcio inducida por activación de proteínas G, hecho que apoya los resultados expuestos más adelante (sección 7).

6.3.2.1.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ basal.

Los resultados con Ro 5-4864 (62.4 μ M) y PK 11195 (110 μ M) demostraron que ninguno de los dos compuestos modificó de forma significativa la pendiente de las curvas de desaturación estudiadas (Fig. 46 y 47). Por tanto, estos compuestos parece que no modifican la salida de calcio de la célula.

6.3.2.2.-Salida de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ inducida por noradrenalina.

La estimulación con noradrenalina (25 μ M) del conducto deferente de rata provocaba un aumento de la salida de calcio de los almacenes de calcio intracelulares ya que se observó una disminución del contenido en $^{45}\text{Ca}^{+2}$ de los conductos deferentes estimulados respecto de los control. La cantidad de calcio se reducía de 3.25 ± 0.07 μ moles $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$ (n=5) a 2.5 ± 0.3 μ moles $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$ (n=11); la significación, calculada mediante una t de Student para datos apareados fue de $p < 0.001$ (Fig. 49).

En este caso los compuestos ensayados Ro 5-4864 (62.4 μ M) y PK 11195 (110 μ M) tampoco modificaron la salida de calcio inducida por noradrenalina (2.57 ± 0.21 μ moles $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$ y 2.64 ± 0.16 μ moles $^{45}\text{Ca}^{+2}/\text{Kg}$, n = 5, respectivamente).

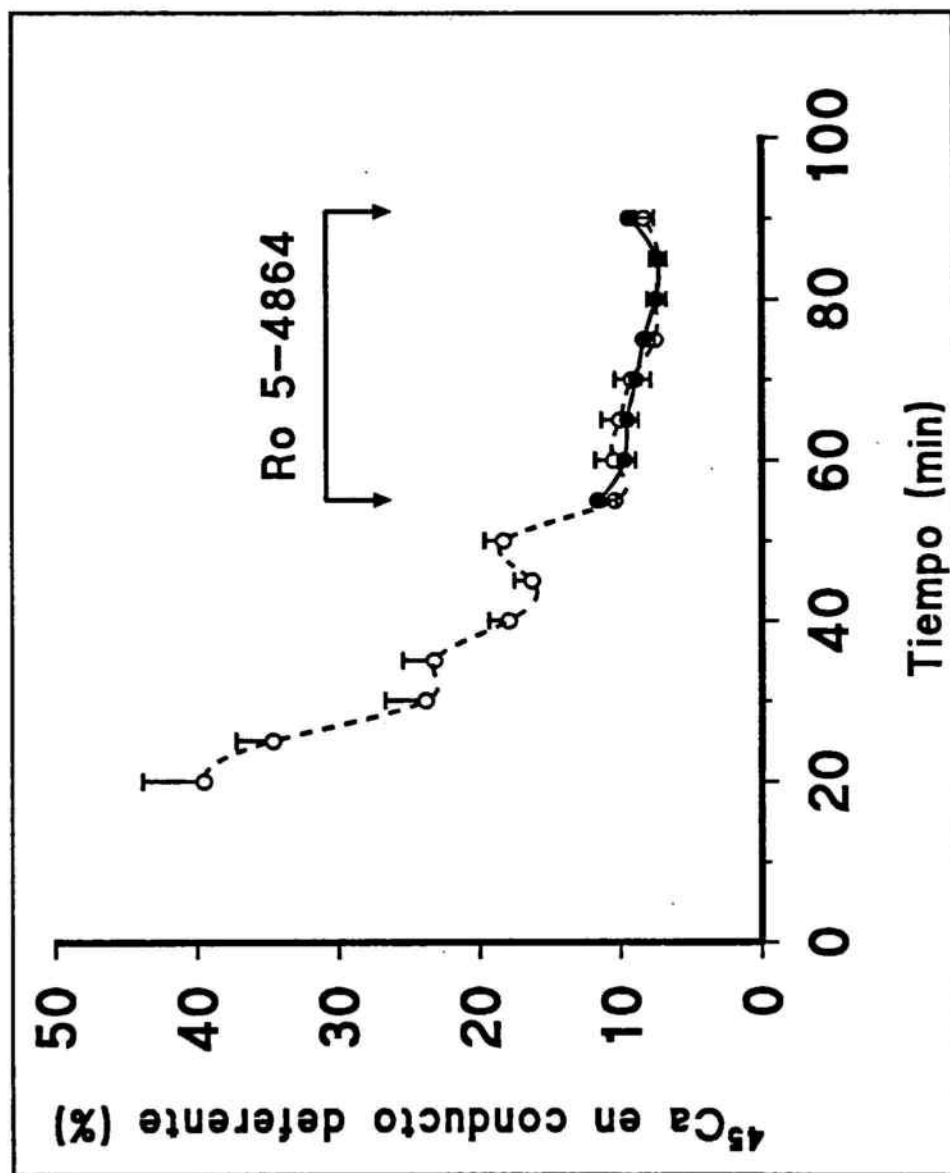


Figura 46: Curva de desaturación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en ausencia (○) o presencia (●) de Ro 5-4864 (62.6 μM) en conducto deferente de rata.

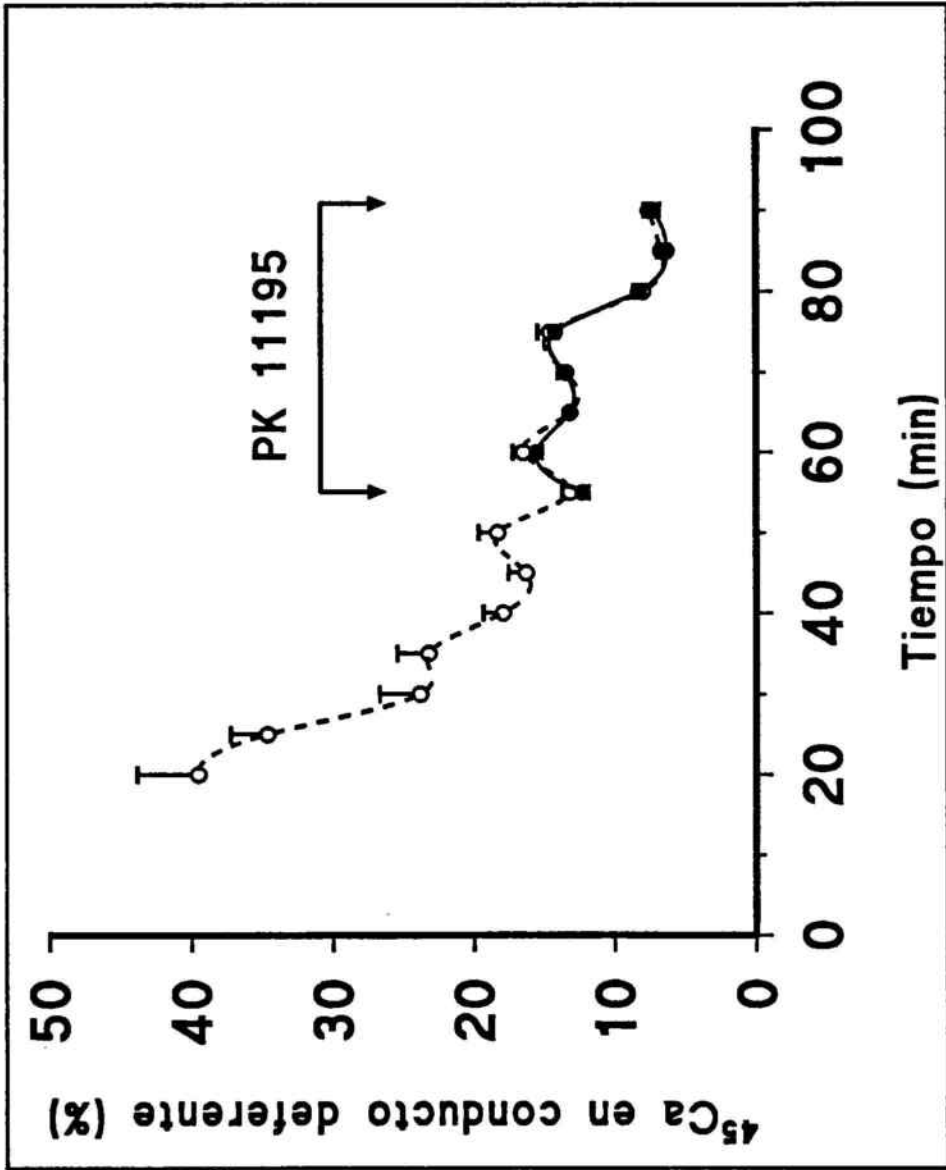


Figura 47: Curva de desaturación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en ausencia (○) o presencia (●) de PK 11195 (110 μM) en conducto deferente de rata.

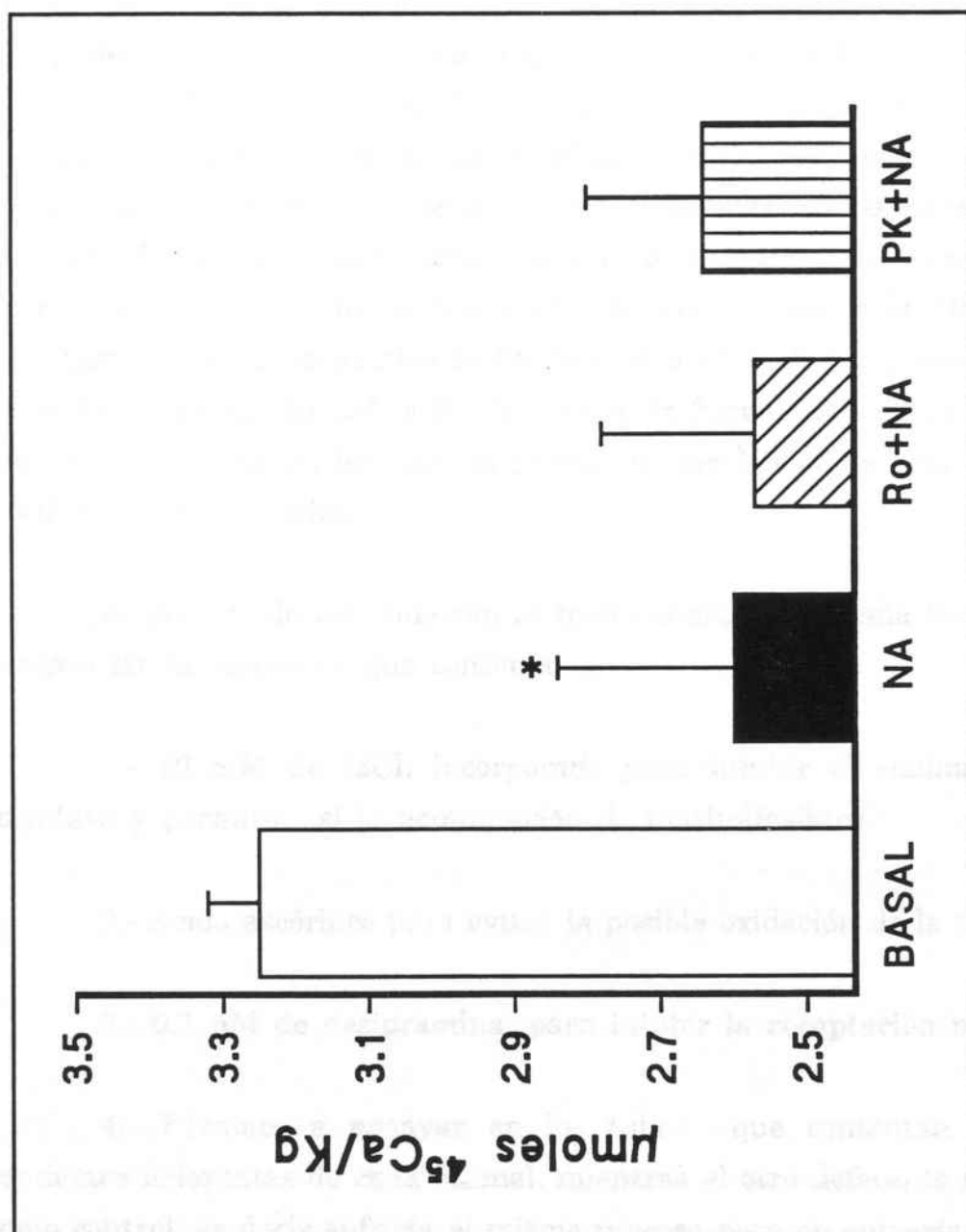


Figura 48: Efecto del Ro 5-4864 (62.4 μ M) y PK 11195 (110 μ M) en la salida de calcio estimulada por noradrenalina (25 μ M, NA) en conducto deferente de rata. * $p < 0.001$ vs basal.

7.-Hidrólisis de fosfatidilinositoles en conducto deferente de rata.

7.1.- Protocolo experimental.

Una vez obtenidos los conductos deferentes de rata como se indica en la Sección 1.1 se dividieron en pequeños trozos circulares (2-3 mm) y se transfirieron por parejas a una solución Krebs-Henseleit a 37 °C (en mM: NaCl,86.2, KCl, 4.7, Na₂SO₄, 1.2, KH₂PO₄, 1.19, CaCl₂, 1.9 NaHCO₃ , 25, glucosa, 11.7, aireada con carbógeno (O₂:CO₂, 20:1). Seguidamente se incubó el tejido a 37 °C durante 3 horas en 1 ml de solución Krebs-Henseleit con 10 µCi de [³H]myo-inositol (actividad específica 95.6 Ci/mmol), contenida en tubos de plástico con cierre hermético. Cada 30 min se renovó la atmósfera con carbógeno. Diez minutos antes de finalizar el período de incubación, se añadió al medio pargilina (50 µM) a fin de inhibir de forma irreversible la actividad monoaminoxidasa. Al finalizar el período de incubación se lavó el tejido con 1 ml de Krebs-Henseleit.

El período de estimulación se inició añadiendo a cada tubo 0.5 ml de tampón Krebs-Henseleit que contenía:

1.- 10 mM de LiCl, incorporado para inhibir el enzima inositol-1-fosfatasa y permitir así la acumulación de inositolfosfatos.

2.- Acido ascórbico para evitar la posible oxidación de la metoxamina.

3.- 0.1 µM de desipramina, para inhibir la recaptación neuronal.

4.- Fármaco a ensayar en los tubos que contenían uno de los conductos deferentes de cada animal, mientras el otro deferente se mantenía como control, es decir sufriría el mismo proceso pero no entraría en contacto con el fármaco.

Se gasearon todos los tubos con carbógeno y se taparon herméticamente, incubándose a 37 °C, con agitación suave durante 15 min,

en este momento se añadió la concentración adecuada de metoxamina (40 μM) en un volumen final de 0.6 ml, a fin de provocar la hidrólisis de los fosfatidilinositoles. Tras 60 min de estimulación, la reacción se paró con 2 ml de cloroformo/metanol (1:1, v/v) que contenía CaCl_2 (60 $\mu\text{moles/g}$ de tejido) para facilitar la extracción de los fosfoinositoles (Hauser y col., 1973) y se mantuvieron a 25 °C toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió a la homogenización del tejido durante 30 s, utilizándose un Polytron; seguidamente se añadió 1 ml de agua destilada, utilizándola para lavar el homogenizador y 1 ml de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 3000xg durante 5 min para separar las dos fases. A continuación se retiró la fase acuosa y se prosiguió la extracción de fosfoinositoles e inositolfosfatos por adición a cada tubo de 1.4 ml de una mezcla que contenía metanol y una solución de EGTA ,5 μM , (9:4/v:v). Los tubos se agitaron y se añadió la fase acuosa retirada anteriormente. Tras una vigorosa agitación se centrifugaron durante 5 min a 3000xg para separar las dos fases.

Los [^3H]inositolfosfatos presentes en la fase acuosa se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Se sembraron alícuotas de 2 ml de la fase acuosa sobre columnas de 0.5 ml de resina Dowex 1-X8 (forma formiato, 100-200 mesh). El [^3H]inositol se eluyó de las columnas con 4 ml de agua. El glicerofosfoinositol se eluyó mediante 4 ml de tetraborato sódico 5 mM/ formiato sódico 60 mM. El [^3H]inositolfosfato se eluyó con 4 ml de formiato amónico 1M/ ácido fórmico 0.1 M, según el protocolo de Berridge y col., 1982.

Tras la elución de los inositol fosfatos, las columnas se lavaron con 4 ml de ácido fórmico 1M, 10 ml de tampón Tris-formiato 10 mM, pH 7.4 y 2 ml de ácido fórmico 0.1 M, guardándose después a 4 °C y con ácido fórmico 0.1 M. Antes de la pasar una nueva muestra, las columnas se equilibran con 30 ml de Tris-formiato, pH 7.4. Este ciclo de lavado y regeneración de columnas descrito por Minneman y Johnson (1984) permite la utilización de las mismas durante por lo menos 4 veces sin que se afecte su eficacia.

La radiactividad contenida en las fracciones eluidas con formiato amónico 1M/ácido fórmico 0.1M se cuantificó por centelleo líquido mediante la incorporación a las muestras de 10 ml de cocktail de centelleo, Normascint F-1 (Scharlau), y lectura en un contador, LX-800 Beckman.

La cantidad de [^3H] inositol incorporada a cada conducto deferente se determinó evaporando 1ml de la fase clorofórmica obtenida después de la extracción de fosfoinositoles, y midiendo la radiactividad presente de forma análoga.

Los resultados se expresan como porcentaje de radiactividad de la fase acuosa respecto a la orgánica, corrigiéndose las variaciones de volumen de cada fase, ya que la radiactividad acumulada en la fase orgánica es proporcional a la cantidad de [^3H] inositol incorporada.

7.2.-Resultados.

La metoxamina indujo la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, aumentando ésta desde su nivel basal $3.00 \pm 1.07 \%$ a un valor de $67.26 \pm 22.4 \%$ (Fig. 49).

En primer lugar se ensayó el prazosín a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Este compuesto fue capaz de inhibir la hidrólisis inducida por metoxamina en las condiciones experimentales expuestas anteriormente (Fig. 49), obteniéndose un valor similar al de hidrólisis basal, $4.34 \pm 0.43 \%$ ($n=4$).

En este estudio se han ensayado Ro 5-4864 y PK 11195. En el caso del Ro 5-4864 la dosis estudiada fue de $62.6 \mu\text{M}$, pero aún a esta dosis elevada no se produjo inhibición de la acumulación de inositolfosfatos en conducto deferente de rata, obteniéndose un valor de hidrólisis de $74.62 \pm 17.14 \%$, como puede observarse en la figura 49. Por tanto, ya que a esta dosis elevada, a la cual el Ro 5-4864 presentó un efecto significativo en todas las demás experiencias realizadas, parece improbable que el mecanismo de acción de este fármaco esté relacionado con la hidrólisis de estos mensajeros secundarios.

En el caso del PK 11195, sólo a dosis superiores de 41.5 μ M fue capaz de producir una inhibición significativa de la hidrólisis de fosfatidilinositoles, disminuyendo ésta hasta un valor de $48.64 \pm 9.94 \%$ ($p < 0.05$); dosis inferiores no fueron efectivas en este ensayo.

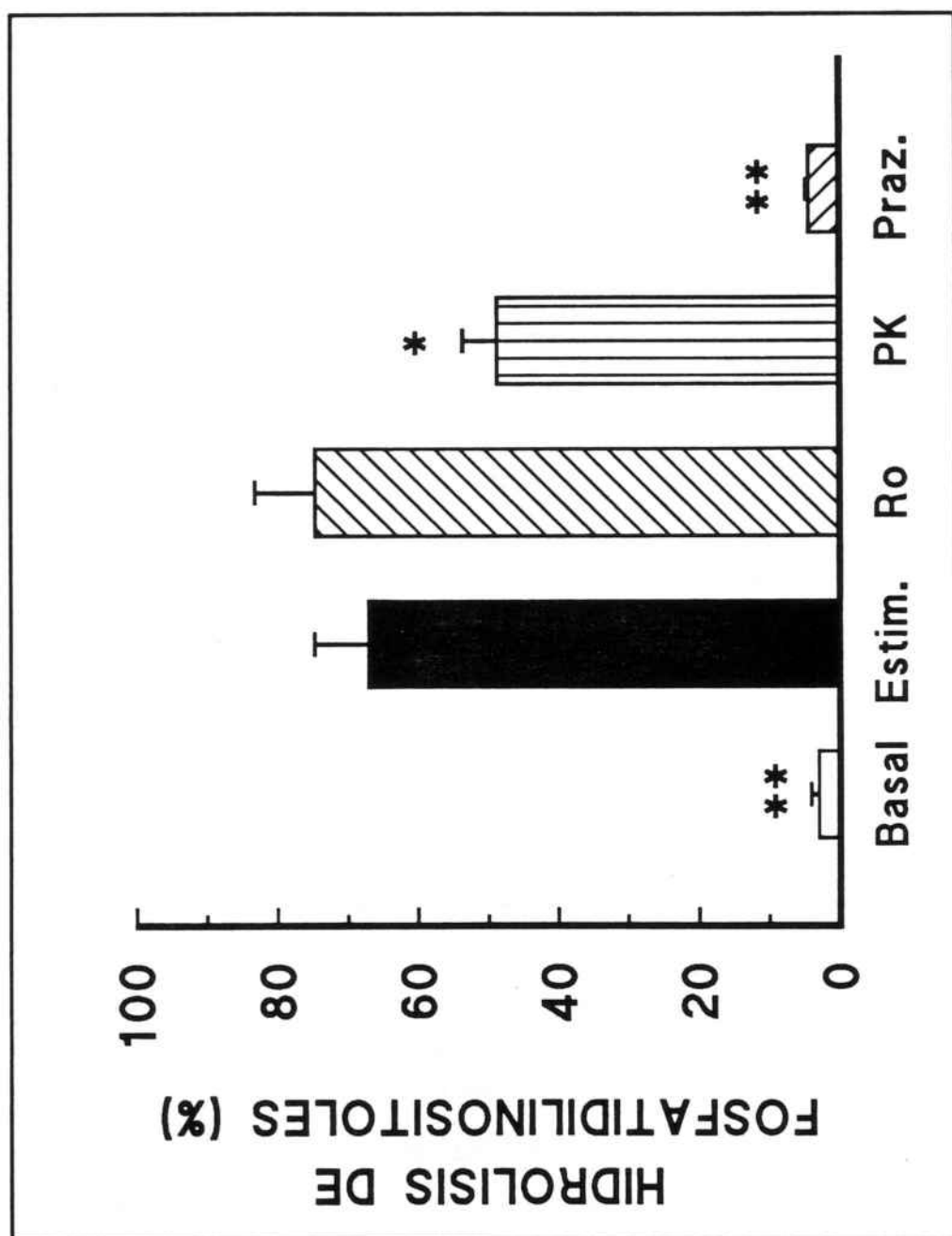


Figura 49: Hidrólisis de fosfatidilinositoles en condiciones basales y estimulada por metoxamina (40 μ M). Efecto del prazosín (10 μ M, Praz), del Ro 5-4864 (62.6 μ M, Ro) y del PK 11195 (41.5 μ M, PK) en la hidrólisis inducida por metoxamina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ vs estim.

B.-EXPERIENCIAS EN DUODENO AISLADO DE RATA.

1.-Obtención y montaje del duodeno aislado de rata.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley, machos (360 ± 30 g) procedentes del estabulario de la Facultad de Farmacia de Barcelona. Los animales permanecieron en nuestro laboratorio en condiciones standard de temperatura (22 ± 0.5 °C) y con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas, con libre acceso al pienso (Letica IPM-R20) y agua. Después de un ayuno de 24 h, los animales se sacrificaron por traumatismo craneal y posterior exsanguinación carotídea. A continuación, se colocaron en decúbito supino y se les practicó una incisión en el abdomen, poniendo al descubierto el paquete intestinal. Seguidamente se procedió a diseccionar unos 10-15 cm de intestino delgado a partir del píloro y se trasladaron a una cápsula de Petri con solución fisiológica suficientemente oxigenada. Se desecharon los 2 primeros cm y se procedió a la limpieza del tejido conectivo adherido al duodeno, evitando lesionar la pared muscular; se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm y se procedió a su montaje en el baño de órganos.

Los cambios de tensión se registraron en un transductor isométrico (TRI010 LETICA), acoplado a un amplificador (ISO505 LETICA) y éste a un registrador multicanal Poly-Graph 4000 LETICA.

La solución nutritiva fisiológica utilizada fue Tyrode-Ringer, cuya composición en mM es como sigue: NaCl, 137; KCl, 2.68; NaH_2PO_4 , 0.42; MgCl_2 , 0.86; CaCl_2 , 1.8; NaH_2CO_3 , 11.99; glucosa, 5.55. En las experiencias en que se modificó la cantidad de calcio en la solución Tyrode (0.5 o 5.4 mM), se ajustó, asimismo, la cantidad de NaCl equimolecularmente, de forma que se mantuvo inalterada la composición iónica del medio.

El duodeno se mantuvo a una tensión de 0.4 g y a 30 °C de temperatura, oxigenado con carbógeno. El período de estabilización fue de 30 min.

2.-Curvas dosis-respuesta al carbacol.

El rango de dosis utilizadas para la obtención de las curvas al carbacol estuvieron comprendidas entre 0.1-100 μM . Después de 10 min de recuperación del órgano, tras la obtención de la curva dosis-respuesta control, se añadió al baño la concentración de fármaco a estudiar y se mantuvo en contacto durante 10 min antes de proceder a realizar la curva dosis-respuesta en presencia de éste. Los resultados se han expresado como el % de efecto máximo a cada una de las dosis de carbacol, en ausencia o en presencia de dosis distintas de fármaco.

2.1.-Caracterización de la respuesta al Carbacol en presencia de benzodiazepinas y PK 11195.

2.1.1.-Experiencias en presencia de AlF_4^- :

Las siguientes experiencias se llevaron a cabo, para determinar si el mecanismo de acción de las benzodiazepinas y del PK 11195 estaba relacionado con la modificación de proteínas G implicadas en la respuesta del carbacol.

El FAl_4^- ha sido descrito como un activador de las proteínas G (Bigay y col., 1985) debido a que presenta una similitud estructural con el grupo PO_4^{3-} que es capaz de unirse al GDP ligado a la proteína G, formando así un análogo del GTP y por tanto activando la proteína G.

Se realizaron dos tipos de experiencias en duodeno aislado:

a.- Reversión del efecto de las benzodiazepinas por AlF_4^- en las contracciones producidas por carbacol y su modificación por calcio.

En este caso se utilizó una dosis única de carbacol (20 μM) para obtener la contracción máxima del órgano en presencia y en ausencia de fármaco.

El AlF_4^- se adicionó al baño en forma de soluciones acuosas, una de NaF (1 mM) y otra de AlCl_3 (10 μM), durante un período de 30 min. A los 20 min se adicionó la dosis de fármaco a ensayar y 10 min. después se provocó la contracción por carbacol. Tras un lavado del órgano y un período de recuperación se obtuvo la contracción de carbacol utilizada como control, ya que el AlF_4^- provoca una contracción *per se* del duodeno.

b.- Efecto de las benzodiazepinas en las contracciones por AlF_4^- .

En este caso la contracción por NaF/ AlCl_3 se provocó, al igual que en la experiencia anterior, adicionando al baño dos soluciones acuosas, una de NaF (1 mM) y otra de AlCl_3 (10 μM), durante un período de 30 min, tiempo suficiente para obtener la contracción máxima en forma de meseta. En el caso de las experiencias que se realizaron en presencia de fármaco, éste se adicionó 10 min antes de que finalizara el período de contracción por el AlF_4^- .

2.1.2.-Experiencias en presencia de Toxina pertussis y Toxina colera.

En ambos casos se siguieron las mismas condiciones experimentales reduciendo el volumen de las copas a 10 ml: una dosis única de carbacol (20 μM), y como compuestos ensayados el Ro 5-4864 (23.4 μM) y el PK 11195 (11.7 μM). En primer lugar se estableció la inhibición que provocaban ambos fármacos en estas condiciones sobre el duodeno de rata aislado y posteriormente se mantuvo el órgano en contacto con las toxinas durante 3 horas, a una concentración de 125 ng/ml para la pertussis y de 4 $\mu\text{g/ml}$ para la colera. 10 min antes de terminar el período de incubación se adicionó al baño el fármaco a ensayar, o bien se mantuvo como control, para determinar el efecto de las toxinas, *per se*, sobre la contracción inducida por carbacol.

2.2.-Resultados.

2.2.1.-Curvas dosis respuesta al Carbacol.

La DE_{50} calculada para el carbacol, en las condiciones experimentales antes descritas, fue de $0.52 \mu\text{M}$.

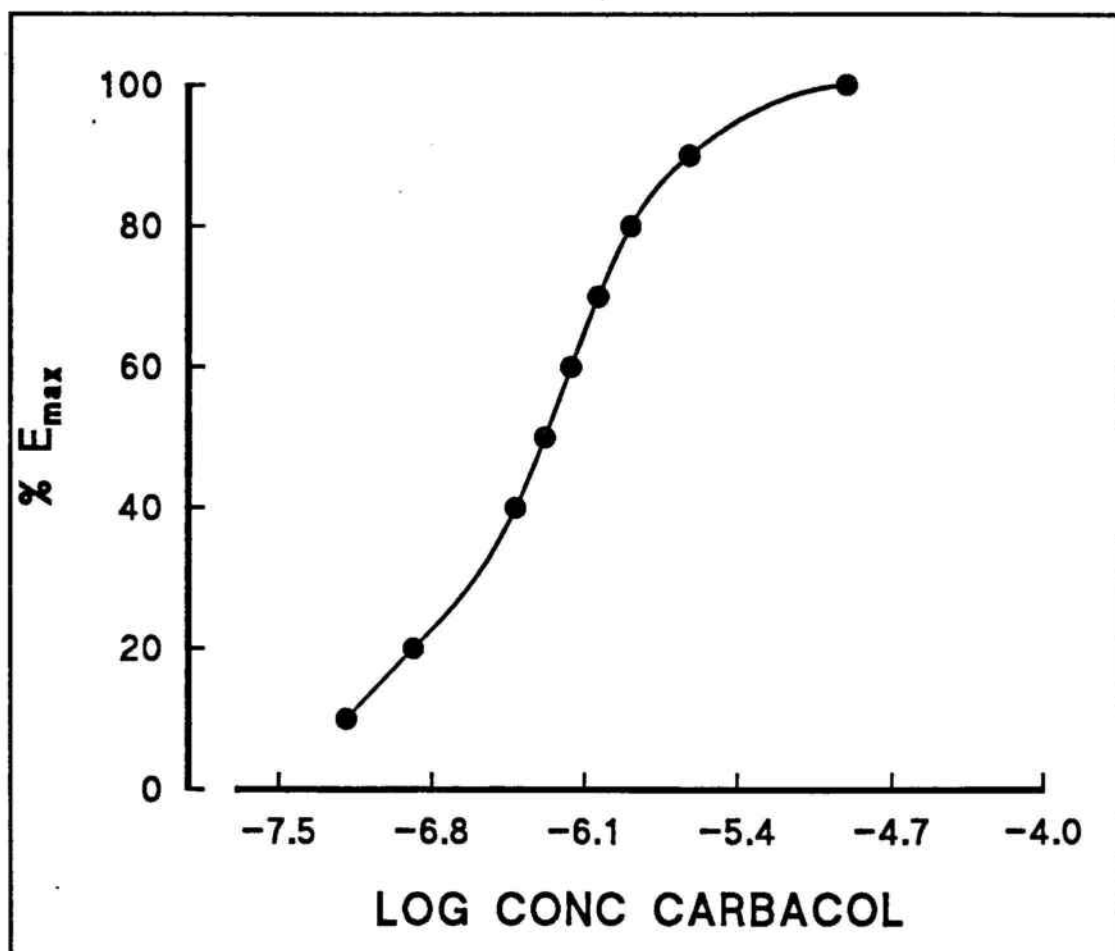


Figura 50: Curva dosis-respuesta al carbacol en duodeno aislado de rata.

Todos los fármacos ensayados mostraron su capacidad de inhibir las contracciones producidas por carbacol a las dosis ensayadas. El antagonismo se definió como no competitivo, ya que desplazaba la curva dosis respuesta a la derecha y disminuía el efecto máximo.

Este antagonismo era revertido después del lavado con la solución nutritiva y dosis dependiente, por ello se elaboraron las correspondientes curvas dosis respuesta para cada uno de los fármacos.

El rango de dosis ensayadas para el Ro 5-4864 fue de 6 a 30 μM (Tabla 40; Fig. 51) y la CI_{50} calculada 13.6 μM , con un PD_2' correspondiente a 4.87.

Tabla 40: Efecto del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas por carbacol en dudodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	6	1.84	0
6.27	4	1.37	25.75 \pm 4.03
11.70	4	1.34	49.60 \pm 2.72
19.60	6	0.83	55.15 \pm 4.81
23.50	6	0.61	66.93 \pm 3.60
31.30	7	0.42	77.21 \pm 4.12

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

En el caso del diazepam las dosis empleadas oscilaron entre 13 y 80 μM (Tabla 41; Fig. 52), y la CI_{50} obtenida fue de 41.5 μM , correspondiente a un PD_2' de 4.38.

Para el clonazepam el rango de dosis estuvo comprendido entre 30 y 95 μM (Tabla 42; Fig. 53), con una CI_{50} de 52.3 μM y un PD_2' de 4.28.

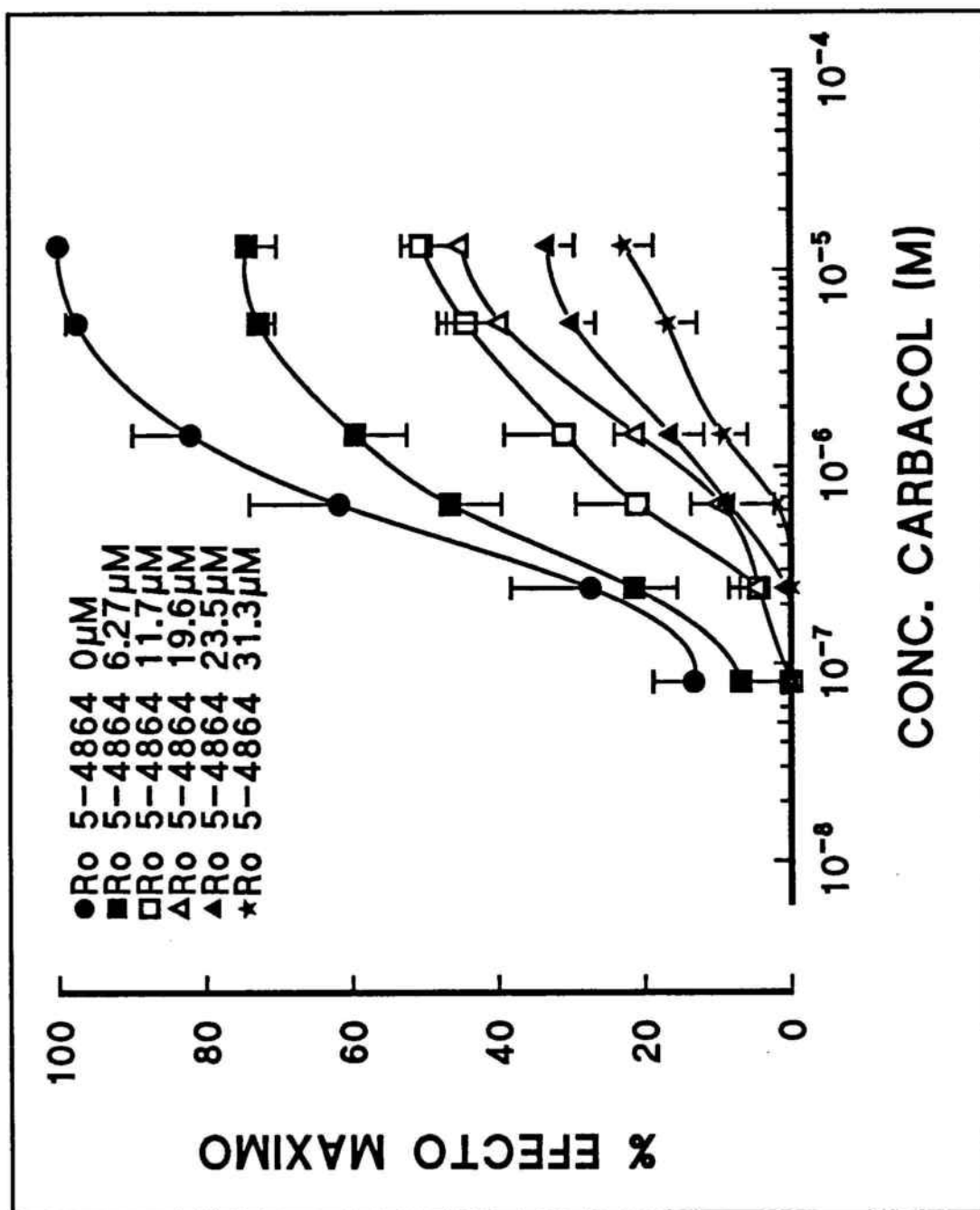


Figura 51: Curvas dosis-respuesta del carbacol en duodeno aislado de rata en presencia de varias dosis de Ro 5-4864.

Tabla 41: Efecto del diazepam en las contracciones inducidas por carbacol en dudodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	6	1.92	0
13.20	4	1.76	8.26 \pm 1.41
19.70	5	1.32	31.04 \pm 4.71
39.40	5	1.18	38.48 \pm 8.33
52.60	5	0.76	60.58 \pm 5.54
78.90	4	0.42	78.08 \pm 5.48

*Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Tabla 42: Efecto del clonazepam en las contracciones inducidas por carbacol en dudodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	6	1.73	0
31.60	4	1.43	17.62 \pm 4.40
47.40	5	1.03	40.38 \pm 5.59
63.20	4	0.72	57.89 \pm 4.79
79.00	5	0.41	76.47 \pm 5.34
94.80	7	0.19	89.26 \pm 1.76

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

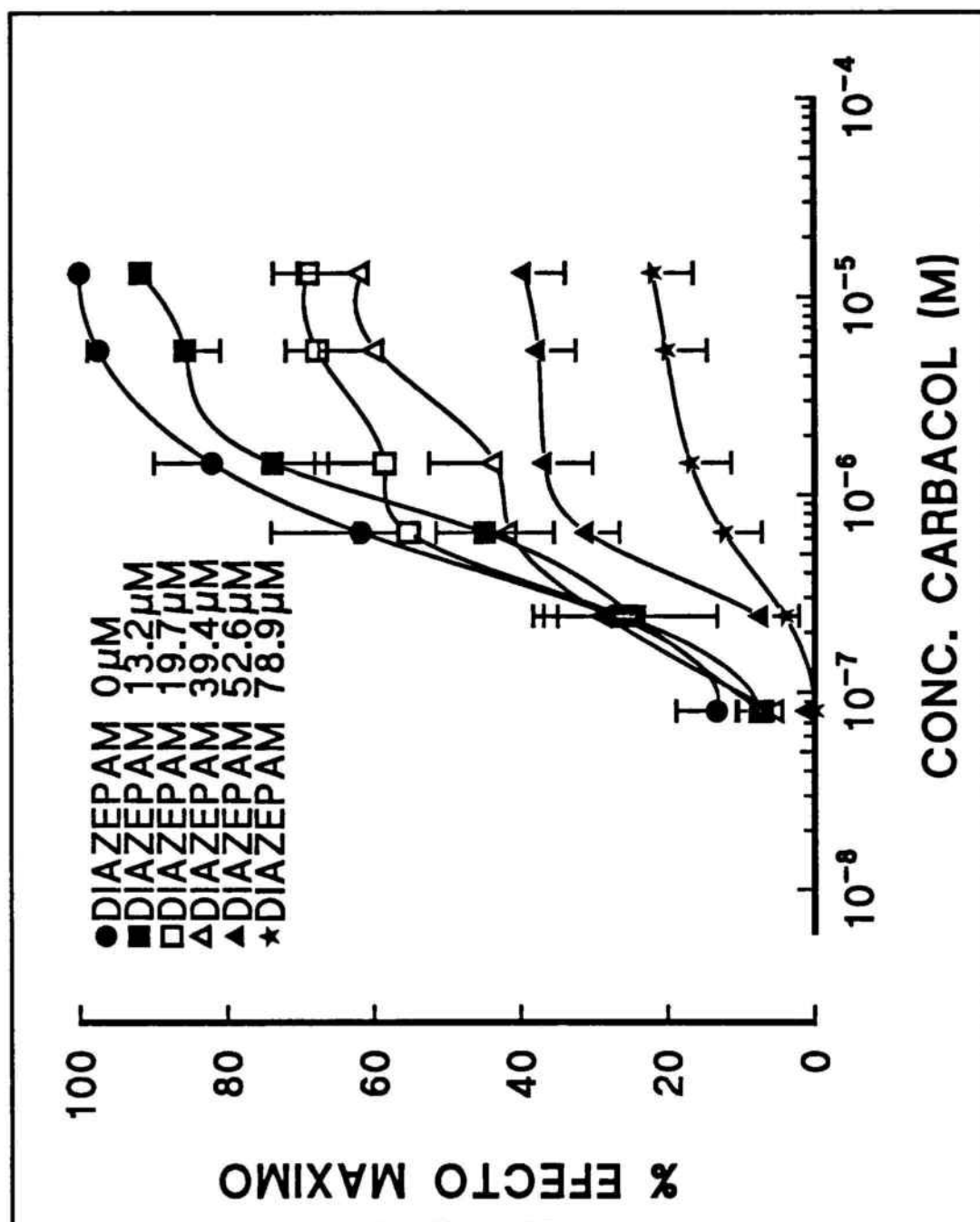


Figura 52: Curvas dosis-respuesta del carbaccol en duodeno aislado de rata en presencia de varias dosis de diazepam.

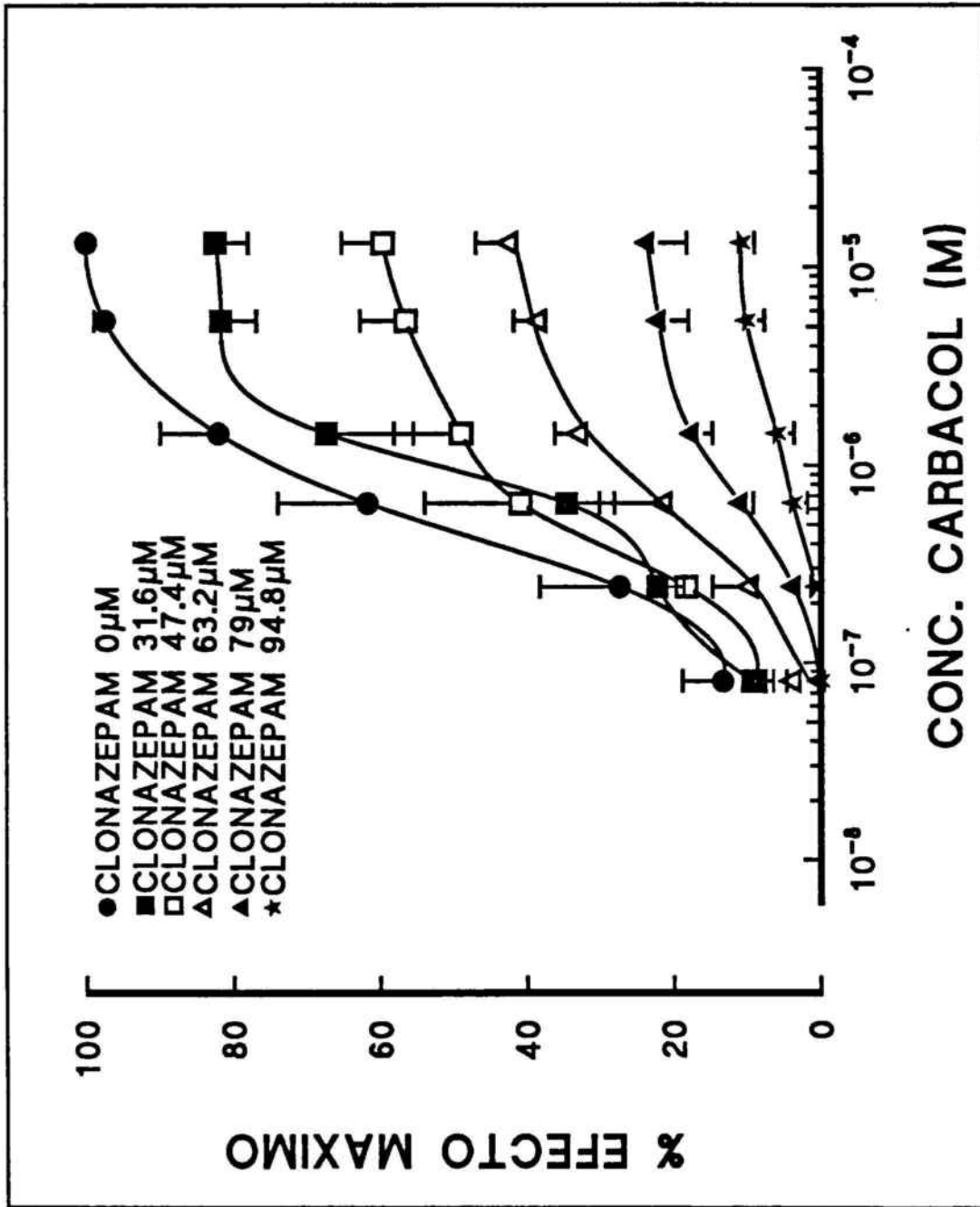


Figura 53: Curvas dosis-respuesta del carbachol en duodeno aislado de rata en presencia de varias dosis de clonazepam.

El PK 11195, de estructura no benzodiazepínica ha mostrado también efecto inhibitor, como en las restantes experiencias, y el rango de dosis empleadas fue de 47 y 30 μM (Tabla 43; Fig.54), mostrando una CI_{50} de 11.8 μM y subsiguientemente un PD_2' de 4.93.

Tabla 43: Efecto del PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol en dudodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>Emax (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	7	1.81	0
4.73	4	1.44	20.22 \pm 3.91
9.46	4	0.17	35.56 \pm 4.90
14.20	5	0.83	53.94 \pm 8.29
18.90	4	0.48	73.62 \pm 3.77
31.20	5	0.32	82.59 \pm 4.13

* Número de observaciones.

** Porcentaje de inhibición expresado como media \pm DS.

Como se observa del análisis de la Tabla 44 donde se resumen las CI_{50} y PD_2' de los fármacos ensayados. El que mostró más selectividad fue el Ro 5-4864 seguido por el PK 11195, y con una selectividad menos pronunciada diazepam y clonazepam.

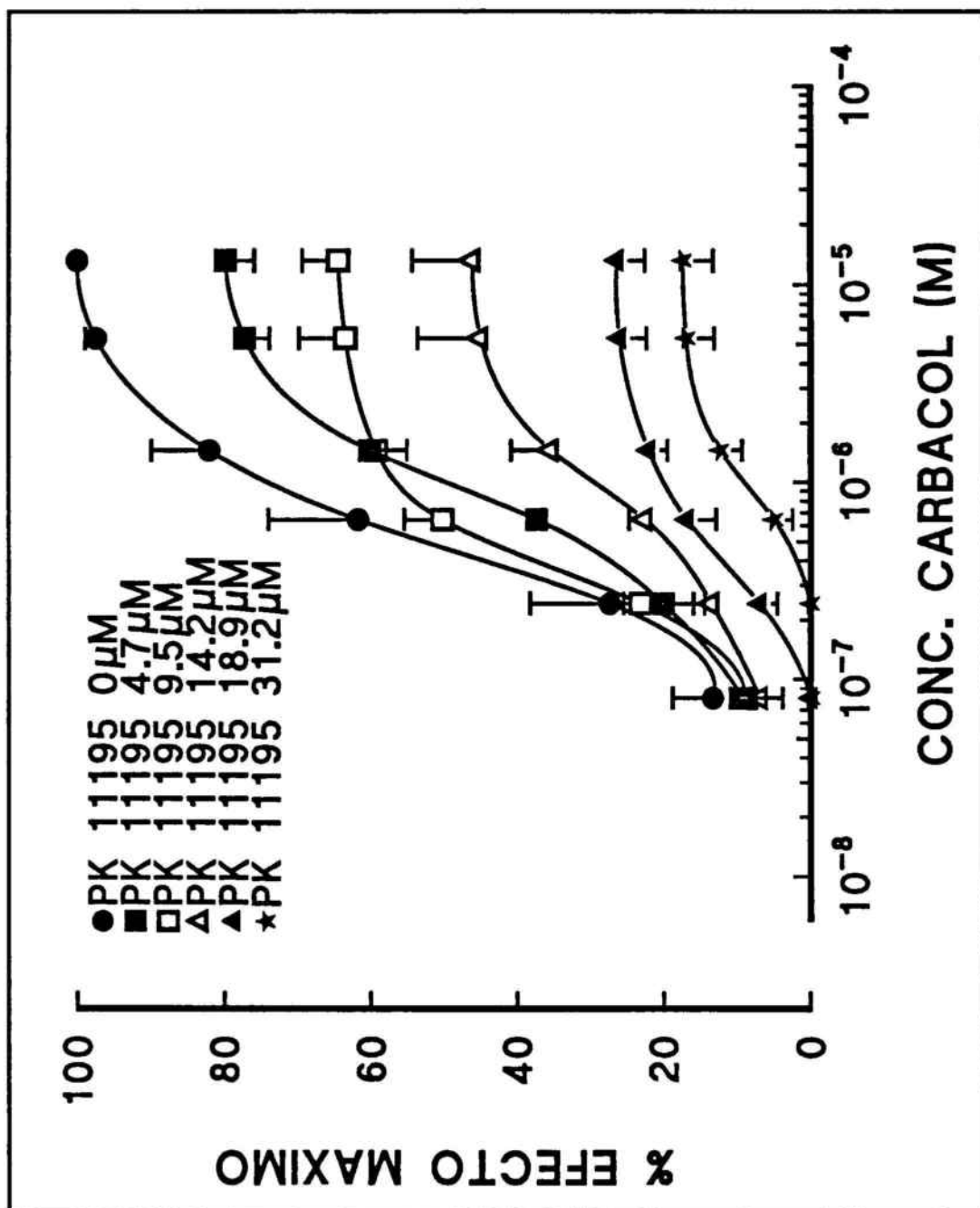
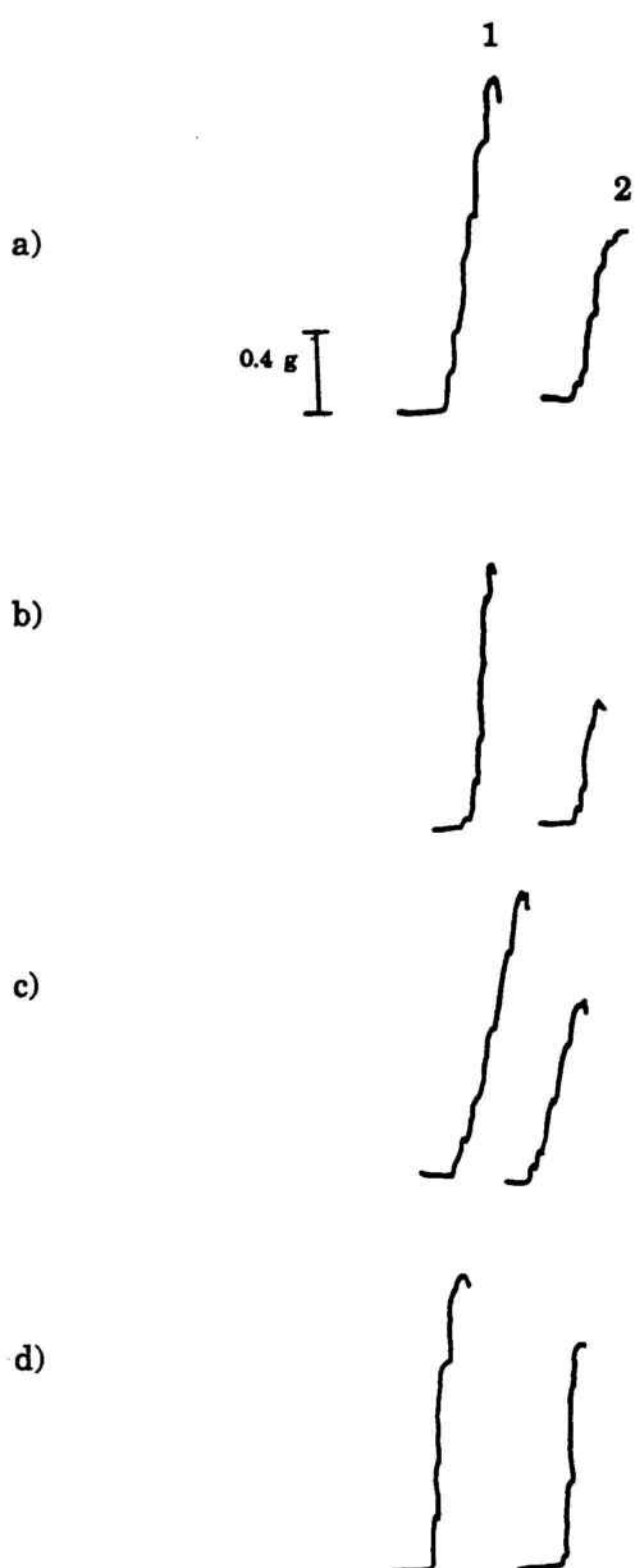


Figura 54: Curvas dosis-respuesta del carbaccol en duodeno
 aislado de rata en presencia de varias dosis de PK 11195.



Ejemplos de curvas dosis-respuesta al carbacol en duodeno de rata en ausencia (1) y presencia (2) de:

- a) Ro 5-4864 (31.3 μ M).
- b) Diazepam (52.6 μ M).
- c) Clonazepam (63.2 μ M).
- d) PK 11195 (47.3 μ M).

Tabla 44: Valores de pD_2' obtenidos para cada compuesto frente a las contracciones inducidas por carbacol en duodeno de rata.

<u>COMPUESTO</u>	<u>n*</u>	<u>CI₅₀ (μM)</u>	<u>pD₂'</u>
Ro 5-4864	5	13.6 ± 1.07	4.37 ± 0.03
Diazepam	5	41.9 ± 4.64	4.38 ± 0.05
Clonazepam	5	53.1 ± 1.69	4.27 ± 0.01
PK 11195	5	11.9 ± 0.75	4.92 ± 0.03

* Número de observaciones.

Los valores de CI₅₀ y pD₂' se expresan con el valor de la media ± DS.

2.2.2.-Caracterización de la respuesta al carbacol en presencia de benzodiazepinas y PK 11195. Influencia del calcio extracelular.

Para caracterizar el mecanismo de inhibición por benzodiazepinas y PK 11195 de las contracciones por carbacol en duodeno de rata, se modificó, en primer lugar, la concentración de calcio del medio.

Al disminuir el calcio extracelular de 1.8 mM a 0.5 mM se produce un aumento del grado de inhibición de todas las benzodiazepinas, pero no del PK 11195. Las experiencias se realizaron a dosis de fármaco próximas a su CI₅₀ y los resultados se muestran en la Tabla 45 y Figura 55.

El análisis estadístico realizado (ANOVA y posterior test de Scheffé) indica un grado de significación de $p < 0.001$, tanto para Ro 5-4864, como para diazepam y clonazepam.

Cuando la concentración de calcio del medio se incrementa a 5.4 mM, el efecto inhibitor de las benzodiazepinas se reduce con un grado de significación $p < 0.001$. Sin embargo, el efecto del PK 11195 tampoco se modifica al triplicarse la concentración de calcio del medio (Tabla 45).

Tabla 45: Inhibición (%) de las contracciones inducidas por carbacol a diferentes concentraciones de calcio por diferentes compuestos.

COMPUESTO	CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO					
	Ca 0.5 mM	n	Ca 1.8 mM	n	Ca 5.6 mM	n
Ro (23.4 μ M)	32.49 \pm 4.83**	5	65.71 \pm 2.27	5	13.92 \pm 3.14**	5
DZ (51.6 μ M)	42.25 \pm 9.63*	5	60.70 \pm 5.67	8	26.54 \pm 8.03**	5
CZ (63.2 μ M)	69.07 \pm 4.17**	7	57.89 \pm 4.79	4	27.85 \pm 7.06**	8
PK (14.2 μ M)	56.37 \pm 9.69	5	53.95 \pm 8.29	5	54.08 \pm 9.64	5

Resultados expresados como media \pm DS, siendo "n" el número de observaciones.

ANOVA y test de Scheffé: * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ vs Ca 1.8 mM.

2.2.2.1.-Experiencias en presencia de AlF_4^- .

En primer lugar se realizó un estudio comparativo de la contracción producida en las condiciones experimentales por diferentes dosis de NaF/ $AlCl_3$, y se observó que a las cuatro dosis (0.5 mM/5 μ M, 1 mM/10 μ M, 2 mM/20 μ M, 3 mM/30 μ M, de NaF y $AlCl_3$) estudiadas, la contracción del órgano no era significativamente diferente (Tabla 46).

Ante estos resultados todas las experiencias posteriores se llevaron a cabo, como ya se ha indicado anteriormente en presencia de 1 mM de NaF y 10 μ M de $AlCl_3$.

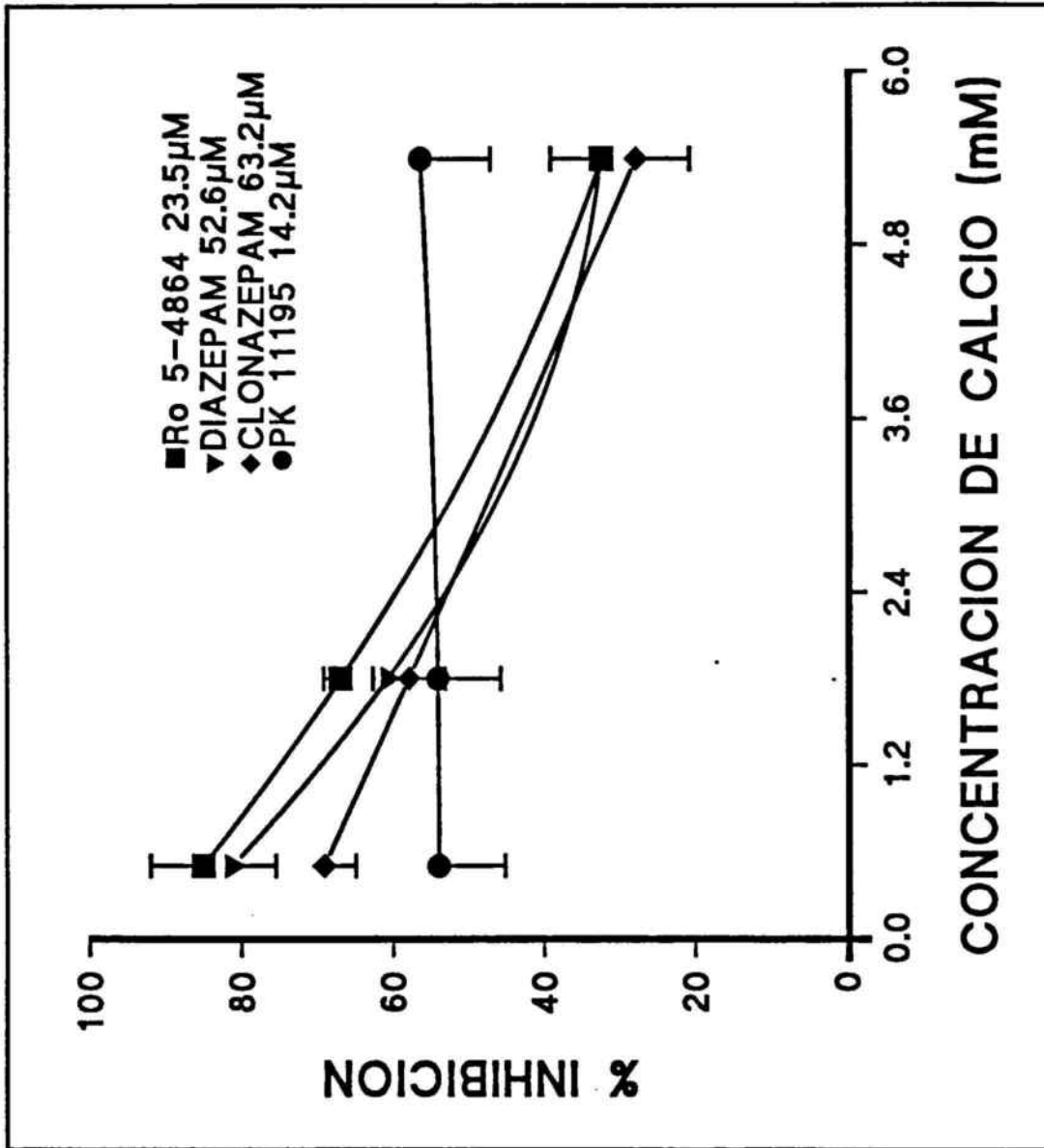


Figura 55: Influencia de la concentración de calcio de medio en el efecto inhibidor de las benzodiazepinas y el PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol en duodeno de rata.

Tabla 46: Influencia de la concentración de AlF_4^- en la contracción inducida en duodeno aislado de rata.

<u>CONCENTRACION</u>		<u>EFEECTO (g) *</u>	<u>n**</u>
<u>NaF (mM)</u>	<u>$AlCl_3$ (μM)</u>		
0.5	5	0.62 \pm 0.12	3
1	10	0.85 \pm 0.16	6
2	20	0.77 \pm 0.15	5
3	30	0.71 \pm 0.15	3

* Resultados expresados como media \pm DS.

** número de observaciones.

Asimismo, se realizó un estudio de la influencia del calcio en la contracción producida por $NaF/AlCl_3$ en duodeno aislado de rata. La concentración de calcio del medio influyó en la respuesta del órgano sólo en condiciones extremas; la respuesta sólo varió de forma significativa cuando se anuló totalmente el calcio de la solución nutritiva, o bien si ésta se triplica (Tabla 47; Fig. 56).

Tabla 47: Influencia del calcio del medio en las contracciones inducidas por AlF_4^- en duodeno de rata.

<u>CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO</u>	<u>EFEECTO (g)</u>	<u>n</u>
0 mM	0.34 \pm 0.10**	4
0.5 mM	0.88 \pm 0.18	6
1.8 mM	0.85 \pm 0.15	7
5.6 mM	0.99 \pm 0.14*	7

Resultados expresados como media \pm DS.

ANOVA y test de Scheffé: * $p < 0.01$. ** $p < 0.001$.

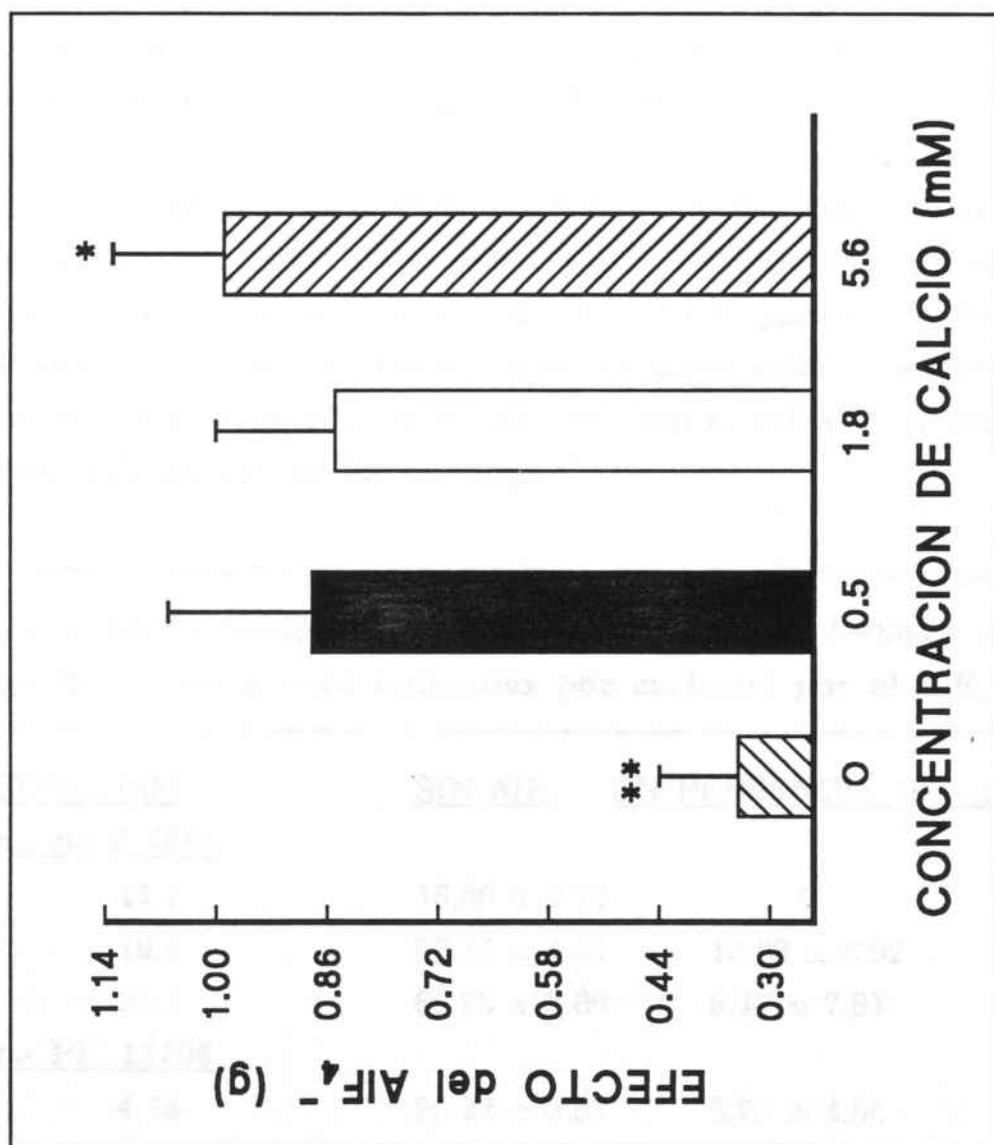


Figura 56: Influencia de la concentración de calcio de medio en las contracciones inducidas por ALF₄ en duodeno de rata.

a.- Reversión del efecto de las benzodiazepinas por NaF/AlCl₃ de las contracciones producidas por carbacol.

El efecto antagonista mostrado por Ro 5-4864 (10-25 μ M) y PK 11195 (15-90 μ M) en las contracciones inducidas por carbacol, no se presentaba si el órgano había estado tratado con NaF/AlCl₃ previamente a su exposición a ambos fármacos (Tabla 48).

El análisis estadístico (ANOVA y test de Scheffé) de la reversión del efecto de Ro 5-4864 y PK 11195 sobre el carbacol en presencia de AlF₄⁻ muestra un grado de significación de p<0.001 para el Ro 5-4864 y el PK 11195. Estos resultados indican, que, probablemente, el mecanismo de acción de estos fármacos está interrelacionado con el del AlF₄⁻ y, por tanto, podía estar relacionado con las proteínas G.

Tabla 48: Reversión del efecto inhibitor del Ro 5-4864 y del PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol por el AlF₄⁻.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>SIN AlF₄⁻</u>	<u>EN PRESENCIA DE AlF₄⁻</u>	<u>n</u>
a.- Ro 5-4864			
11.7	46.60 \pm 2.72	0	6
19.6	55.15 \pm 4.81	15.83 \pm 6.92	7
23.5	66.93 \pm 3.60	9.17 \pm 7.81	7
b.- PK 11195			
4.73	20.22 \pm 3.91	2.28 \pm 4.55	4
9.46	35.56 \pm 4.90	0	4
14.2	53.94 \pm 8.29	10.41 \pm 5.49	5
18.9	73.62 \pm 4.13	0	5

Resultados expresados como media (%) \pm DS.

"n": número de observaciones.

b.-Efecto de las benzodiazepinas en las contracciones inducidas por AlF_4^- .

En este caso, tanto Ro 5-4864 como PK 11195, mostraron un efecto inhibidor de las contracciones inducidas por AlF_4^- (Tablas 49 y 50). Los PD_2' calculados fueron respectivamente, 4.69 y 4.89 (CI_{50} de 20.1 ± 1.18 y $12.8 \pm 1.13 \mu M$).

Tabla 49: Efecto del Ro 5-4864 en las contracciones inducidas por AlF_4^- en duodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} (g)</u>	<u>%INHIBICION **</u>
0	8	0.85	0
11.70	8	0.41	51.33 ± 10.49
19.70	7	0.45	47.10 ± 11.55
23.45	6	0.47	44.55 ± 9.84

* Número de observaciones.

** Resultados expresados como media \pm DS.

Tabla 50: Efecto del PK 11195 en las contracciones inducidas por AlF_4^- en duodeno de rata.

<u>CONC. (μM)</u>	<u>n*</u>	<u>E_{max} (g)</u>	<u>INHIBICION (%)**</u>
0	8	0.85	0
4.65	4	0.56	33.85 \pm 15.31
9.46	4	0.57	33.15 \pm 8.98
14.20	5	0.43	49.02 \pm 13.75
18.90	4	0.15	82.31 \pm 9.34

* Número de observaciones.

** Resultados expresados como media \pm DS.

También en este caso se estudió el efecto de la concentración de calcio extracelular sobre el efecto de estos fármacos, y como en el caso descrito anteriormente, se varió la concentración de calcio de la solución Tyrode de 0.5 mM a 5.4 mM.

Se ensayó una única dosis de cada fármaco, próxima a su CI_{50} , y se observó que el efecto inhibitor, tanto en el caso del Ro 5-4864 como en el del PK 11195, depende de la concentración de calcio del medio, mostrando un mayor efecto cuanto menor es el contenido de calcio, como se muestra en la Tabla 49 (Fig. 57), donde se indican los diferentes grados de significación para cada caso.

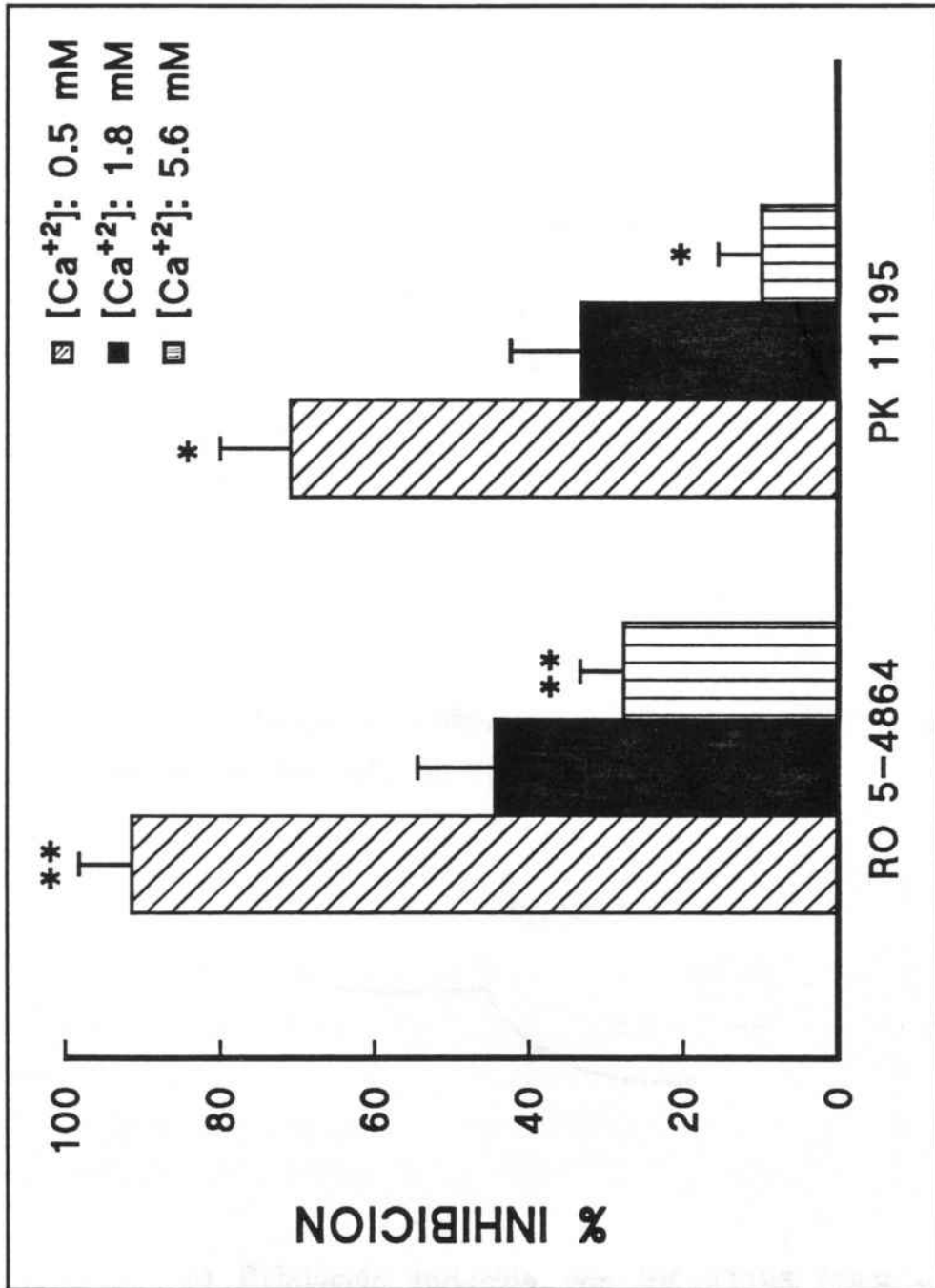
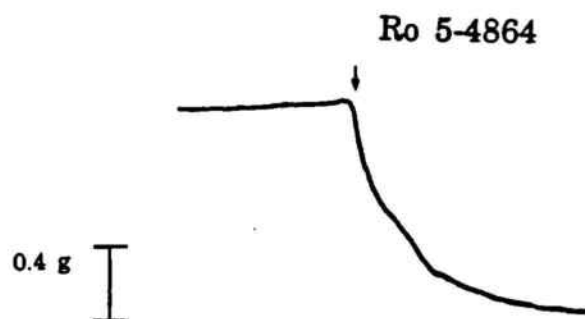
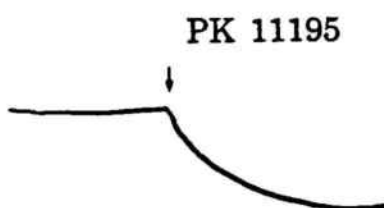


Figura 57: Influencia de la concentración de calcio de medio en el efecto inhibidor de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas por ALF₄ en duodeno de rata. *p<0.01; **p<0.001 vs [Ca²⁺]: 1.8 mM.

Efectos del Ro 5-4884 y del PK 11195 en las contracciones inducidas por AlF_4^- en duodeno de rata.



a) Relajación inducida por Ro 5-4884 ($23.5 \mu M$) de la contracción por AlF_4^- en duodeno de rata.



b) Relajación inducida por PK 11195 ($18.9 \mu M$) de la contracción por AlF_4^- en duodeno de rata.

Tabla 51: Inhibición (%) de las contracciones inducidas por AlF_4^- a diferentes concentraciones de calcio por diferentes compuestos.

COMPUESTO	CONCENTRACION DE CALCIO DEL MEDIO					
	Ca 0.5 mM	n	Ca 1.8 mM	n	Ca 5.6 mM	n
Ro (23.4 μ M)	91.38 \pm 6.78**	7	44.55 \pm 9.84	6	23.67 \pm 5.63**	12
PK (9.4 μ M)	70.87 \pm 9.09**	10	33.31 \pm 8.98	4	9.81 \pm 5.59*	4

Resultados expresados como % de inhibición (media \pm DS), siendo "n" el número de observaciones.

ANOVA y test de Scheffé: * $p < 0.01$ vs Ca 1.8 mM.

** $p < 0.001$ vs Ca 1.8 mM.

2.2.2.2.-Experiencias en presencia de Toxina pertussis y Toxina colera.

a.- Resultados en presencia de Toxina pertussis.

La presencia de toxina pertussis en el medio provoca una disminución del efecto contracturante del carbacol en duodeno aislado de rata. Tanto el efecto inhibitor del Ro 5-4864 (23.5 μ M) como el del PK 11195 (11.7 μ M) en este tipo de preparación, se potenció cuando el tejido se incubó con la toxina. Los resultados se muestran en la Tabla 52 (Fig. 58).

b.- Resultados en presencia de Toxina colera.

La inhibición producida, tanto por Ro 5-4864 (23.5 μ M) como por PK 11195 (11.7 μ M), no se vio significativamente afectada por la toxina colera, como se muestra en la Tabla 52 (Fig. 59).

Asimismo, tampoco la respuesta contráctil de duodeno aislado de rata al carbacol varía significativamente, en presencia de toxina colera. Este resultado parece indicar que la proteína G_s no está implicada en la respuesta contráctil al carbacol en duodeno aislado de rata.

Tabla 52: Influencia de Toxina pertussis y Toxina colera en el efecto inhibidor de Ro 5-4864 (23.5 μ M) y de PK 11195 (11.5 μ M) en las contracciones inducidas por carbacol en duodeno aislado de rata.

Toxina pertussis (125 ng/ml)

	<u>INHIBICION (%)</u>	<u>n</u>
Ro 5-4864	64.28 \pm 2.65	4
Ro 5-4864 + TP	84.03 \pm 3.15**	4
PK 11195	35.84 \pm 2.9	3
PK 1195 + TP	67.28 \pm 4.07*	3

Toxina colera (4 μ g/ml)

Ro 5-4864	68.89 \pm 3.62	4
Ro 5-4864 + TC	73.31 \pm 2.85	4
PK 11195	48.81 \pm 3.39	4
PK 11195 + TC	48.82 \pm 2.80	4

ANOVA y test de Scheffé: * $p < 0.02$. ** $p < 0.01$.

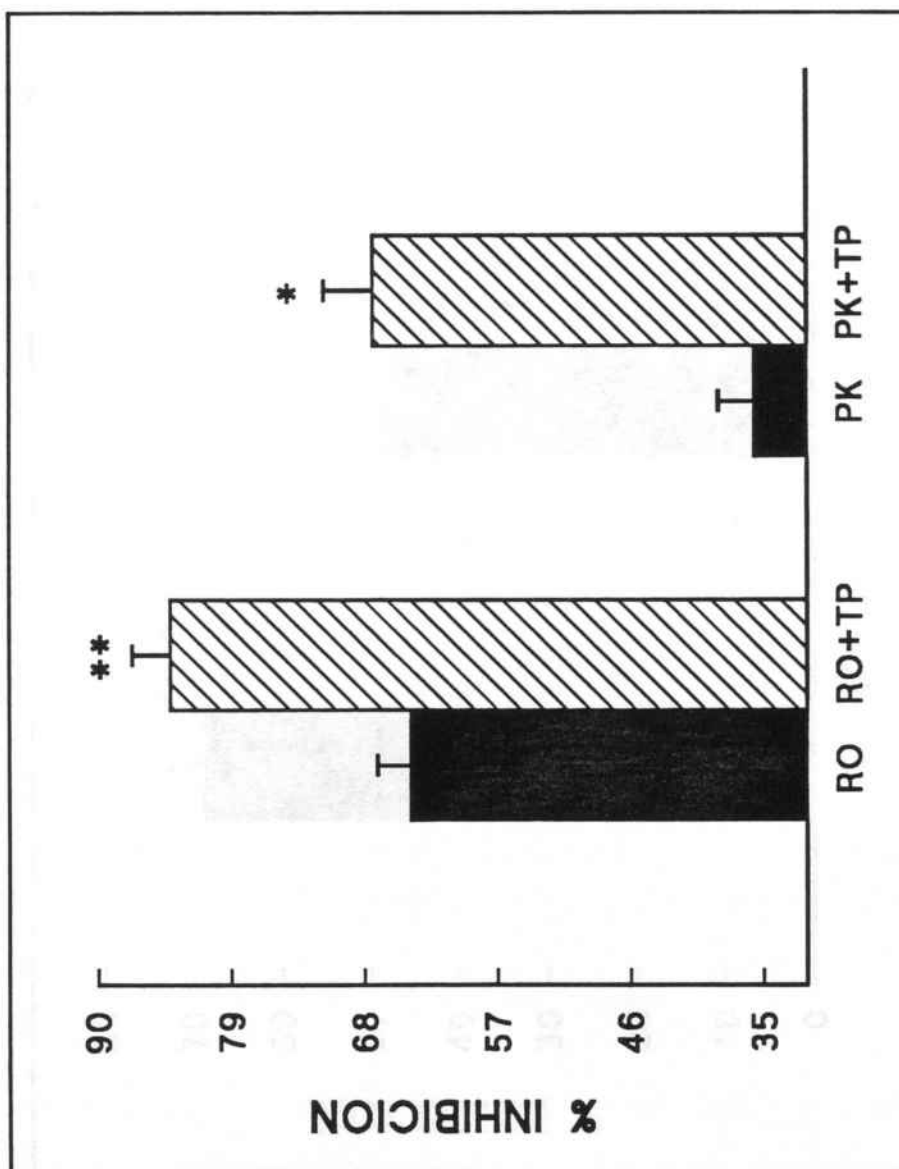


Figura 58: Influencia de toxina pertussis (TP) en el efecto inhibidor del Ro 5-4864 y del PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol en duodeno de rata.

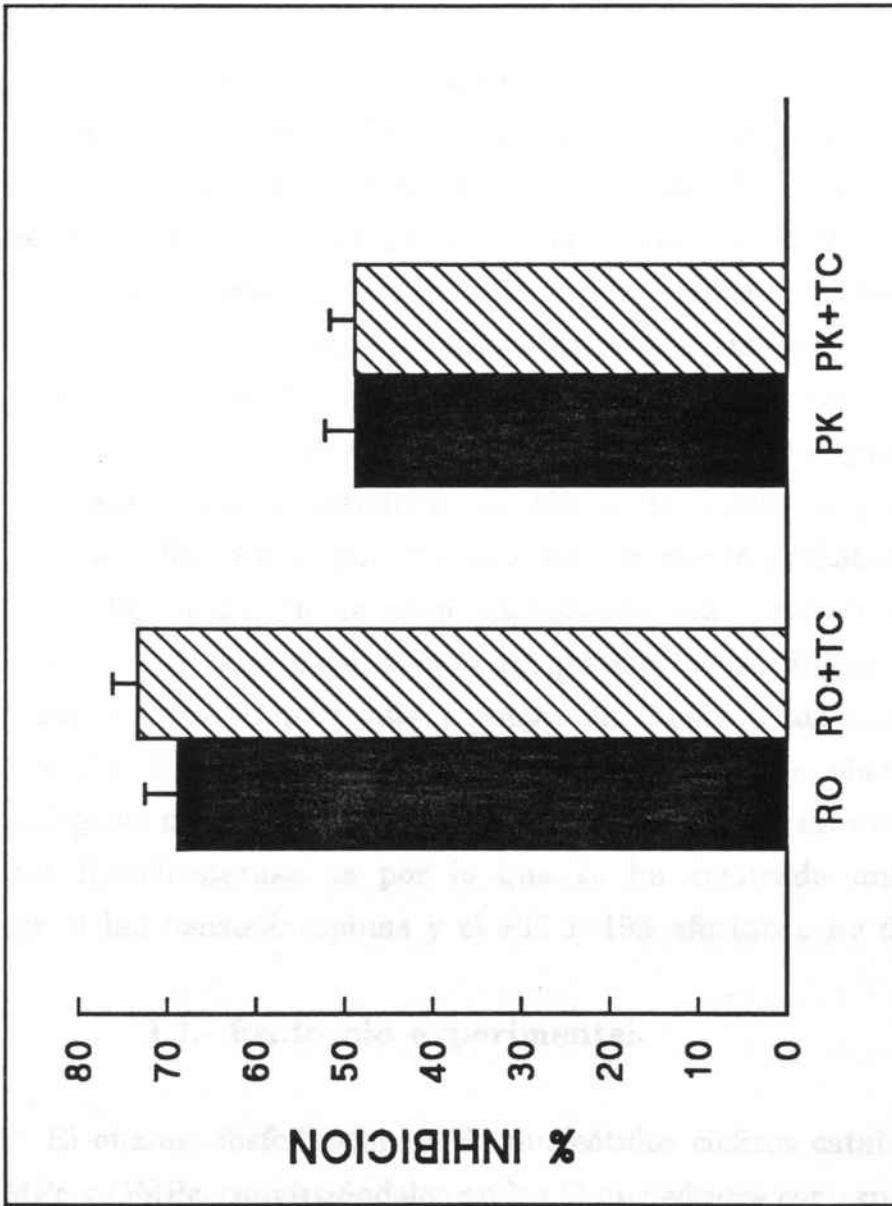


Figura 59: Influencia de toxina colera (TC) en el efecto inhibidor del Ro 5-4864 y del PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol en duodeno de rata.

C.- EFECTO DE LAS BENZODIACEPINAS Y DEL PK 11195 SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA.

Debido a los resultados expuestos en los anteriores apartados parece probable que la acción inhibitoria de las benzodiazepinas y PK 11195 se centre de una manera general en la regulación de la actividad de algún sistema de segundos mensajeros. Al ser descartada la hidrólisis de los fosfatidilinosoles como punto de acción de estos compuestos, hemos creído oportuno realizar una primera aproximación al sistema de regulación del AMPc, nucleótido implicado directamente en los procesos de contracción-relajación, procesos que se ven afectados por las benzodiazepinas y PK 11195. Concretamente, hemos estudiado el efecto de estos compuestos sobre la actividad fosfodiesterasa, por dos razones: parece improbable que su acción a nivel de la regulación de estos nucleótidos sea a través de la adenilato ciclasa ya que en este caso se hubiera puesto de manifiesto en los ensayos realizados con toxina pertussis y colera en duodeno aislados de rata (Ver apartado B). Sin embargo, el hecho de que se hayan observado acciones farmacológicas cuyo mecanismo de acción podría residir en una afectación del complejo fosfodiesterasa es por lo que se ha realizado una prueba para detectar si las benzodiazepinas y el PK 11195 afectan o no dicho complejo.

1.1.- Protocolo experimental.

El enzima fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos cataliza la hidrólisis del AMPc y GMPc, convirtiéndolos en los 5'-nucleótidos correspondientes. Para la valoración espectrofotométrica de esta actividad existe el inconveniente de que tanto el sustrato como el producto de la reacción presentan absorción a las mismas longitudes de onda, lo que implica que en la valoración deberá utilizarse reacciones enzimáticas acopladas para convertir el producto en otro que absorba a una longitud de onda distinta.

En este trabajo, que puede considerarse como una prueba inicial o de screening, se utilizó el método descrito por Menahan y col.(1969), en el se determina la disminución de absorbancia a 265 nm debida a la desaparición del sustrato (AMPc). Para ello, en la mezcla de incubación se incluyen los enzimas adenosindeaminasa y fosfatasa alcalina en exceso. El primero de estos enzimas cataliza la transformación del 5'-AMP en 5'-inosinmonofosfato y el segundo, la transformación de este compuesto a inosina. La inosina no presenta absorción a 265 nm, por lo que la disminución de la absorbancia será debida únicamente a la desaparición del AMPc.

La metodología a seguir se inició añadiendo a la cubeta de reacción:

-2 ml de tampón Tris HCl, que contenía $MgSO_4$ (0.55 mM), pH 7.4.

-400 μ l de solución de AMPc (concentración final 50 μ M).

-300 μ l de una solución que contenía adenosindeaminasa (concentración final 2 μ g/ml) y fosfatasa alcalina (125 U/ml).

La cubeta blanco contenía únicamente tampón Tris HCl. La cubeta de reacción se agitó, se colocó en la celda correspondiente a la muestra y se mantuvo a 37 °C durante 5 min.

Después de este período de tiempo se añadieron a la cubeta 300 μ l de una solución de fosfodiesterasa (0.02 mg/ml), se agitó y se empezó a registrar la absorbancia después de 20 s. A partir de este momento, la absorbancia se registró cada 15 s hasta los 2 min, en que empieza a perderse la linealidad.

Los compuestos, Ro 5-4864, diazepam, clonazepam y PK 11195 se disolvieron en tampón Tris HCl, a una concentración de 100 μ M en la mezcla de reacción. Como sustancia patrón de la inhibición del enzima fosfodiesterasa se utilizó teofilina a la misma concentración que las sustancias estudiadas.

Los valores de actividad corresponden a la pendiente de las rectas resultantes de representar la absorbancia frente al tiempo.

1.2.-Resultados.

Todos los compuestos estudiados presentan el mismo patrón de respuesta. Tanto la teofilina como las benzodiazepinas y el PK 11195 provocaron, a la dosis ensayada (100 μ M) la inhibición del enzima fosfodiesterasa (Fig. 60). A esta dosis los inhibidores más potentes fueron teofilina y diazepam (47.12 % y 45.45 %, respectivamente), después Ro 5-4864 (30.26%) y PK 11195 (30.38 %), y por último el clonazepam (16.16 %).

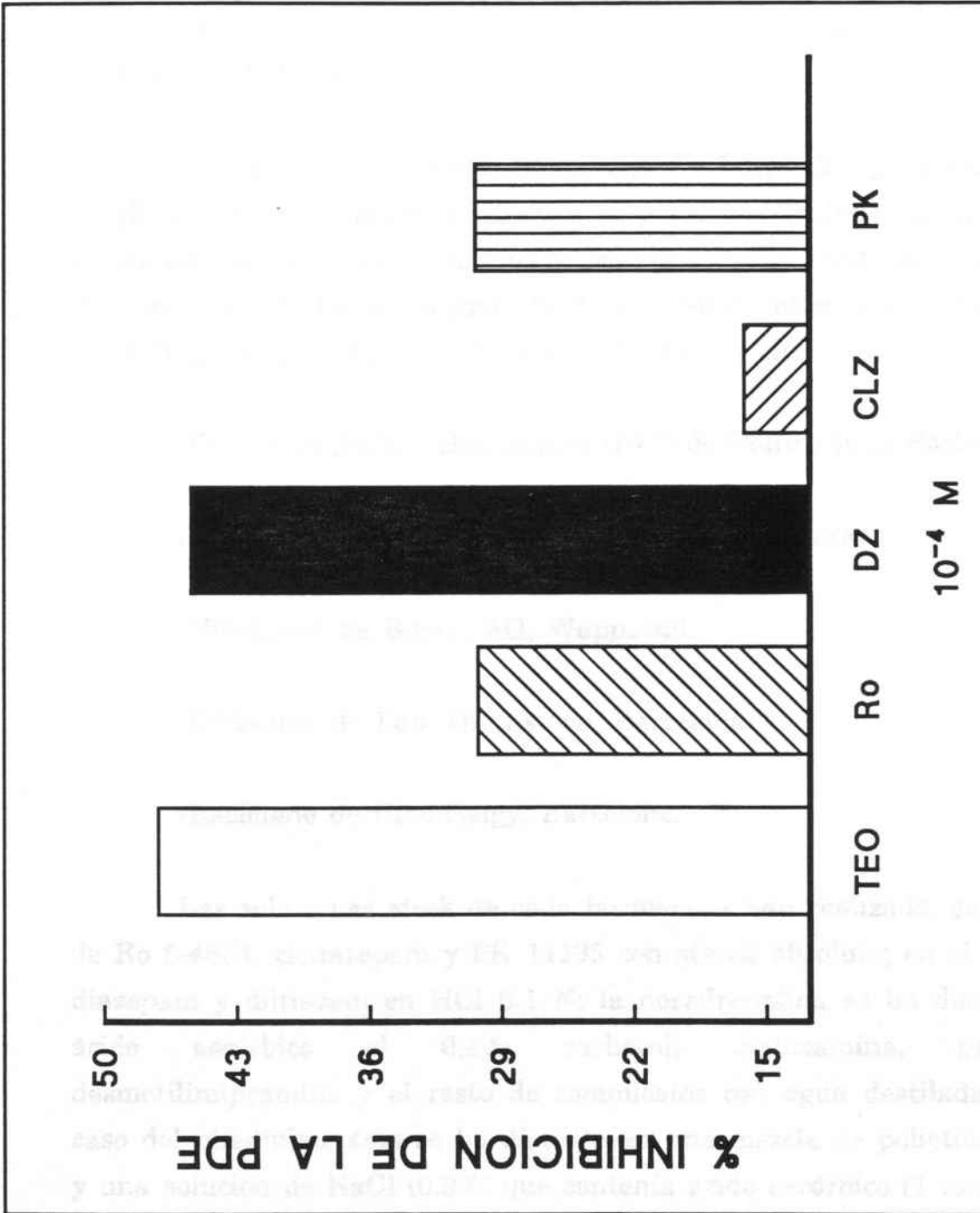


Figura 60: Inhibición de la actividad fosfodiesterasa por teofilina (TEO), Ro 5-4864 (Ro), diazepam (DZ), clonazepam (CLZ) y PK 11195 (PK).

FARMACOS Y REACTIVOS.

Se han utilizado los siguientes compuestos:

-Noradrenalina bitartrato, Ro 5-4864, Ro 15-1788, EGTA y EDTA de Fluka, AG, Basel.

-Carbacol (HCl), metoxamina (HCl), desmetilimipramina (HCl), pargilina (HCl), prazosín (HCl), toxina pertussis, toxina colera, GABA, muscimol, ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico (MOPS), adenosina (hemisulfato), 2-cloroadenosina, S-(2-hidroxi-5-nitrobencil)-6-tioguanosina (HNBTG), LiCl₃ de Sigma, Chem. Co., St. Louis, MO.

-Diazepam (HCl) y clonazepam (HCl) de Hoffmann-LaRoche, Basel.

-PK 11195 de Pharmuka-Rhône Poulenc, Asnières.

-Nifedipino de Bayer, AG, Wuppertal.

-Diltiazem de Lab. Dr. Esteve, Barcelona.

-Baclofeno de Ciba-Geigy, Barcelona.

Las soluciones stock de cada fármaco se han realizado, en el caso de Ro 5-4864, clonazepam y PK 11195 con etanol absoluto; en el caso de diazepam y diltiazem en HCl 0.1 N; la noradrenalina se ha disuelto en ácido ascórbico al 0.1%; carbacol, metoxamina, pargilina, desmetilimipramina y el resto de compuestos con agua destilada. En el caso del nifedipino, éste se ha disuelto en una mezcla de polietilenglicol y una solución de NaCl (0.9%) que contenía ácido ascórbico (1 mM). Para evitar la degradación del nifedipino por acción de la luz, las experiencias se han realizado bajo luz de sodio. En todos los casos las diluciones posteriores han sido realizadas con Krebs-Henseleit, siendo la concentración final de etanol y de HCl 0.1 N inferior al 1% ya que de esta forma los resultados no se vieron afectados de manera significativa.

Los reactivos utilizados en la determinación de la actividad fosfodiesterasa fueron:

- AMPc, forma ácida (Boehringer Mann.).
- Adenosin deaminasa de intestino de carnero (Boehringer Mann., 10 mg/ml).
- Fosfatasa alcalina de intestino de carnero (Boehringer Mann., 2.7 mg/0.54 ml/7500 U).
- Fosfodiesterasa de corazón de buey (Boehringer Mann., sol. en glicerol 50% v/v, pH 7, 0.25 U/mg a 25 °C, A-3:5-MP como sustrato).
- Teofilina de Sigma, Chem. Co., St. Louis, MO.

Las soluciones de cada uno de estos compuestos se han preparado en tampón Tris-HCl 50 mM con MgSO₄ 0.55 mM, pH 7.4. Tanto las soluciones de AMPc como las soluciones enzimáticas deben prepararse de manera extemporánea justo antes de realizar el ensayo, manteniéndose durante éste en baño de hielo.

III.-DISCUSSION

DISCUSION

Las acciones generales de las benzodiazepinas a nivel del sistema nervioso central y su mecanismo de acción están íntimamente relacionados con el sistema inhibitor del GABA, responsable, tras su activación de la ansiolisis y sedación, acciones por las que estos compuestos son ampliamente reconocidos y utilizados en clínica.

Esta acción GABA-mimética se lleva a cabo a través de receptores específicos denominados receptores benzodiazepínicos centrales y (Squires y col., 1977) que se localizan en el sistema nervioso central. Como ya se ha indicado previamente, este receptor está relacionado con el complejo-receptor GABA-ionoforo del cloro (Tallman y col., 1978; Marangos y col., 1981).

Sin embargo, la acción que ejercen las benzodiazepinas estudiadas (Ro 5-4864, diazepam y clonazepam) y el PK 11195 en el presente trabajo no está mediada por este tipo de receptor benzodiazepínico, como lo demuestran los resultados obtenidos.

En primer lugar el ácido gamma-aminobutírico no es capaz de producir el mismo efecto inhibitor sobre las contracciones inducidas por noradrenalina exógena como lo hacen los compuestos estudiados. Asimismo, para descartar la participación de receptores benzodiazepínicos asociados al sistema gabaérgico en este tipo de respuesta, se utilizó un antagonista específico de los receptores centrales, el Ro 15-1788, que no revirtió el efecto inhibitor de las benzodiazepinas.

Igualmente se puede descartar la participación de receptores gabaérgicos como mediadores del efecto inhibitor de las benzodiazepinas estudiadas, del hecho que ni el baclofeno, ni el muscimol, fármacos agonistas específicos del sistema gabaérgico, no contrarrestaron los efectos de las benzodiazepinas estudiadas.

Podría postularse que los efectos de estos compuestos a nivel periférico se deben a la interacción de éstos con otro tipo de lugares de unión denominados receptores benzodiazepínicos periféricos descubiertos posteriormente (Davies y col., 1981; LeFur y col., 1983a). La unión de las benzodiazepinas a este receptor, no se ve afectada por la presencia del GABA ni de otros ligandos neuronales como las β -carbolinas (Marangos y col., 1982). Aunque hasta el momento no se conoce con exactitud su función fisio-farmacológica, estudios recientes *in vitro* los relacionan con el crecimiento y la diferenciación celular (Anholt y col., 1986) y con la posible regulación del flujo del ión calcio, especialmente a nivel de los canales de calcio voltaje-dependientes (Rampe y col. 1986; Cantor y col., 1984). Los últimos trabajos indican que la interacción de las benzodiazepinas con este receptor periférico está relacionada con la estimulación de la esteroidogénesis (Yanagibashi y col., 1989).

El antagonismo mostrado por las tres benzodiazepinas estudiadas, tanto a nivel de conducto deferente y duodeno aislado de rata ha resultado ser de tipo no competitivo, por ello se ha calculado el pD_2' de todas ellas, en cada uno de los casos. El orden de potencia de estos compuestos es el mismo que se aprecia en otros tejidos periféricos estudiados, siendo el más potente el Ro 5-4864, seguido por diazepam y clonazepam (LeFur y col. 1983a; 1983b; Camarasa y col., 1988; 1989; Escubedo y col., 1991).

Sin embargo, el hecho de que el PK 11195, antagonista específico del receptor benzodiazepínico periférico, no anule el efecto de las benzodiazepinas indica que, posiblemente, la acción de las benzodiazepinas a este nivel, no está relacionada con estos lugares de unión periféricos. Por otra parte, sorprendentemente, este compuesto, el PK 11195, no sólo no antagoniza la acción inhibitoria de las benzodiazepinas estudiadas, sino que él mismo provoca la inhibición de la respuesta contráctil en todos los experimentos realizados, tanto a nivel de conducto deferente como a nivel del duodeno aislado de rata. En todos los casos, el PK 11195 ha mostrado una potencia similar o superior a la del Ro 5-4864.

Asimismo, el hecho que las concentraciones requeridas para observar el efecto antagonista de estos compuestos sean del orden micromolar, mientras que el rango de concentraciones a nivel del receptor benzodiazepínico periférico se hayan descrito en el orden nanomolar, sugieren que los efectos provocados por las benzodiazepinas y el PK 11195 observados en esta Tesis no están directamente implicados con el receptor benzodiazepínico periférico descrito por otros autores.

Por otra parte, Taft y col. (1984) sugirieron la existencia de un receptor a la benzodiazepinas con una afinidad del rango micromolar. Este receptor "micromolar" estaría relacionado con los canales de calcio voltaje-dependientes. Más tarde, Doble y col. (1985) observaron que este receptor periférico micromolar mostraba el mismo patrón de distribución subcelular que los receptores a las dihidropiridinas.

La exclusión del receptor benzodiazepínico periférico nanomolar en las acciones de las benzodiazepinas a nivel de conducto deferente y duodeno de rata, no llevó a pensar en la implicación de este receptor periférico de orden micromolar como mecanismo de acción de estos compuestos en tejidos periféricos. Así pues, la posible modulación del canal de calcio voltaje-dependiente por estos compuestos era otro de los posibles mecanismos de acción de las benzodiazepinas que explicaría la inhibición de la respuesta contráctil a diferentes tipos de estímulos.

En primer lugar se evidenció la inhibición de las benzodiazepinas ensayadas (Ro 5-4864, diazepam y clonazepam) y del PK 11195 en las contracciones inducidas por noradrenalina exógena en conducto deferente de rata. El orden de potencia basado en los valores de pD_2' fue de:
Ro 5-4864 > PK 11195 > diazepam > clonazepam.

Este efecto inhibitor de las contracciones inducidas por noradrenalina exógena en el conducto deferente aislado de rata puede revertirse significativamente aumentando la concentración de calcio extracelular, excepto en el caso del PK 11195 cuya actividad no se ve afectada.

Por otra parte, en experimentos en los que se ensayaron estos compuestos en un medio despolarizado con altas concentraciones de potasio, se observó que eran capaces de inhibir las contracciones inducidas en conducto deferente aislado de rata por calcio extracelular, indicando que las benzodiazepinas estaban implicadas, en cierto modo, con la modulación de la entrada de calcio o con los efectos desencadenados por el calcio.

En el caso de la respuesta contráctil bifásica inducida por la adición de KCl 160 mM, ésta se debe principalmente a un aumento de la permeabilidad al calcio resultado de la despolarización producida en las membranas celulares del conducto deferente aislado de rata. La despolarización a este nivel provoca una activación secuencial de distintas poblaciones de canales de calcio voltaje-dependientes (Hay y Wadsworth, 1982). Los canales de calcio de activación-inactivación rápida son los primeros en abrirse facilitando una entrada masiva de calcio al interior de la célula, que da lugar a la fase fásica de la respuesta. La inactivación rápida de estos canales de calcio provoca la disminución de esta fase a un nivel inferior denominado de actividad tónica que se origina por la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes de activación-inactivación lenta, como consecuencia de la continua despolarización, que permite mantener un influjo de calcio que da lugar a dicha fase.

Las benzodiazepinas estudiadas, Ro 5-4864, diazepam y clonazepam, mostraron una gran selectividad de acción por la fase fásica, llegando incluso a anularla a altas concentraciones. Sin embargo, no presentaron el mismo efecto por la fase tónica. Estos compuestos no llegan a anularla completamente a pesar de aumentar considerablemente su concentración. Parecía, por tanto, que la acción de las benzodiazepinas a este nivel consistía en un bloqueo más selectivo de los canales de calcio voltaje-dependientes de activación-inactivación rápida (probablemente de tipo T), anulando así el influjo de calcio. Ya que la contracción tónica no había sido anulada por estos compuestos, podíamos deducir que los canales de calcio voltaje-dependientes de activación-inactivación lenta son menos sensibles al efecto de estos compuestos.

Sin embargo, la hipótesis de un mecanismo de acción mediado por el bloqueo de los canales de calcio es incompleta ya que esta acción inhibidora no se modifica si aumentamos la concentración de calcio del medio. Si el efecto dependiera sólo del bloqueo de los canales de calcio, al aumentar este ión en el medio debería observarse una reversión de la inhibición por las benzodiazepinas y el PK 11195.

En cambio, los antagonistas clásicos del calcio han presentado un patrón de comportamiento distinto al de las benzodiazepinas. Nifedipino y diltiazem, a bajas concentraciones, han mostrado una mayor afinidad por la respuesta tónica que por la respuesta fásica, reflejando así, una mayor selectividad por los canales de calcio voltaje-dependientes de activación-inactivación lenta (canales tipo L). A altas concentraciones, los antagonistas del calcio inhiben ambas fases, a excepción del nifedipino que tan solo muestra una inhibición del 80% de ambas fases de la respuesta, resultados que confirman los obtenidos por Hay y Wadsworth (1982).

La estimulación tetánica del conducto deferente de rata mediante trenes de pulsos da lugar a una respuesta contráctil en la que pueden diferenciarse dos componentes. En primer lugar, se produce una contracción inmediata y rápida del tejido (primer componente), a la que sigue una contracción lenta y sostenida (segundo componente). Se ha sugerido la existencia de una compleja participación e interacción de receptores y neurotransmisores, tanto de naturaleza adrenérgica como de naturaleza no-adrenérgica, en ambos componentes de la respuesta tetánica, pero presentando cada una orígenes distintos. Es presumible que el primer componente requiera de la movilización del calcio intracelular, mientras que el segundo dependa del influjo de calcio a través de diferentes canales, o de diferentes estados del mismo canal (Amobi y Smith, 1987b).

A nivel del primer componente de la respuesta, las benzodiazepinas presentaron un patrón de comportamiento muy similar al del nifedipino y del diltiazem. Así, tanto las benzodiazepinas, como los antagonistas del

calcio ensayados, no afectaron de forma significativa los dos primeros pulsos de la respuesta contráctil.

En el segundo componente de la respuesta contráctil inducida eléctricamente, el patrón de respuesta que presentaron las benzodiazepinas y los antagonistas del calcio, nifedipino y diltiazem, también fue muy similar. Todos ellos inhibieron de forma dosis-dependiente el último pulso de la respuesta contráctil inducida eléctricamente en conducto deferente aislado de rata.

La potencia relativa que presentaron las benzodiazepinas a nivel del segundo componente fue Ro 5-4864>diazepam>clonazepam, potencia relativa que ha sido idéntica a la obtenida en los experimentos de estimulación con noradrenalina exógena, con calcio y en preparaciones despolarizadas con KCl.

También en este caso, para estudiar más profundamente la posible relación existente entre el mecanismo de acción de las benzodiazepinas a nivel periférico con los mecanismos mediados por el calcio, se realizaron experimentos en los que se duplicó y triplicó la cantidad de calcio del medio.

Cuando se duplicó la concentración de calcio extracelular se observó una reversión parcial de la inhibición por las benzodiazepinas y por el PK 11195, así como por los antagonistas del calcio, nifedipino y diltiazem. Por el contrario, al triplicar la concentración de calcio del medio únicamente se consiguió una reversión total del efecto en el caso del nifedipino, diltiazem y PK 11195. En cambio, en el caso de las benzodiazepinas no se obtuvo una reversión significativamente distinta a la obtenida con una concentración doble de calcio.

El hecho que se revirtiera de forma parcial el efecto inhibitor de las benzodiazepinas refleja que su mecanismo de acción presenta otros componentes además del posible bloqueo de la entrada de calcio, como ya se había puesto de manifiesto en experimentos anteriores.

Por otro lado, tanto el Ro 5-4864 como el diazepam potenciaron el efecto inhibitor de la adenosina en las contracciones inducidas eléctricamente en conducto deferente de rata. Sin embargo, en presencia de la HNBTG, ninguno de estos fármacos fue capaz de potenciar la respuesta a la adenosina. Además, tampoco afectaron la acción de la 2-cloroadenosina, derivado adenosínico que no es sustrato del sistema de recaptación. Estos resultados indican que parte del efecto del Ro 5-4864 y el diazepam puede deberse a la inhibición de la recaptación de la adenosina. No obstante, ni el PK 11195 ni el clonazepam se mostraron capaces de potenciar la acción inhibitora de la adenosina tanto en presencia como en ausencia de la HNBTG.

Las concentraciones a las que aparece este efecto y los compuestos que lo manifiestan evidencia que el receptor benzodiazepínico periférico de afinidad nanomolar no parece estar involucrado en el sistema de recaptación de la adenosina. Es más probable, que se trate de un efecto competitivo de estas benzodiazepinas con la adenosina por su unión a este transportador, competencia ésta basada en cierta analogía estructural del núcleo benzodiazepínico y purinérgico.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, se determinó mediante una metodología más específica la influencia de las benzodiazepinas en los mecanismos de regulación de la movilización del calcio.

Se precisa una elevación de la concentración de calcio en el citosol para que se produzca la contracción del músculo liso. Este aumento del calcio intracelular se puede producir por la entrada de este ión a través de canales (voltaje-dependientes o receptor-dependientes) y también por la movilización de calcio de sus almacenes intracelulares.

En primer lugar, se comprobó si la acción inhibitora de las benzodiazepinas a nivel de órgano aislado implicaba un bloqueo de la captación de calcio, a través de los canales voltaje-dependientes.

Se estudió, por tanto, la influencia de estos compuestos en la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ inducida por KCl en conducto deferente de rata. Los resultados obtenidos mostraron que Ro 5-4864 y PK 11195 inhibían la entrada de calcio inducida por KCl, de forma dosis-dependiente, aunque las concentraciones necesarias para suprimir totalmente la entrada de calcio son superiores a las que se precisa para anular la respuesta a KCl y noradrenalina en conducto deferente aislado de rata. Sin embargo, diazepam y clonazepam, sólo presentaron esta acción a concentraciones muy elevadas y, por tanto, con poca selectividad.

Estos resultados parecen indicar que el mecanismo prioritario de acción de estos compuestos no está relacionado exclusiva y directamente con los canales de calcio voltaje-dependientes, confirmando los resultados obtenidos en los experimentos de despolarización con KCl en órgano aislado, más bien parece que la disminución de la entrada del calcio sea el resultado de otro efecto intracelular. Esta hipótesis se acentúa en el caso del PK 11195, que si bien inhibe la entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$, en órgano aislado su efecto no se revierte al aumentar la concentración de calcio del medio.

A continuación, se realizaron experiencias para determinar la influencia de estos compuestos tanto a nivel de la salida de calcio de la célula, como de la salida de calcio de sus almacenes intracelulares hacia el citosol.

En el primer caso, si la salida de calcio de la célula se hubiera visto afectada por las benzodiazepinas o el PK 11195, este efecto se traduciría en una disminución de la concentración de calcio a nivel intracelular y por tanto en la inhibición de la contracción del músculo liso. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la salida basal de calcio de la célula no era afectada ni por el Ro 5-4864 ni por el PK 11195, y que por tanto la acción inhibidora de estos compuestos a nivel del músculo liso no implicaba a los mecanismos de extrusión de calcio de la célula.

En segundo lugar, el estudio de la influencia de estos compuestos en la salida de calcio de los almacenes intracelulares se llevo a cabo mediante la estimulación de la célula con noradrenalina exógena. En determinadas condiciones experimentales este protocolo es una medida de la movilización de calcio de sus almacenes intracelulares (Deth y col., 1977). En este caso los compuestos estudiados tampoco modificaron la salida de calcio inducida por noradrenalina de los almacenes intracelulares. Por otra parte, a priori era poco probable que estos compuestos produjeran un aumento en la liberación de calcio de sus almacenes intracelulares, ya que ello supondría haber observado en las preparaciones en órgano aislado una acción contracturante de las benzodiazepinas y del PK 11195 *per se*, hecho que no se puso de manifiesto en ningún caso.

De forma global parece, pues, que las benzodiazepinas periféricas son capaces de afectar la respuesta contráctil inducida por estímulos relacionados con el calcio en el conducto deferente de rata. Esta inhibición se debe, en parte, a un bloqueo de la entrada de calcio, pero ello no explica totalmente el comportamiento de estos compuestos. Probablemente en este efecto inhibitor entren en juego otros mensajeros secundarios íntimamente relacionados con dicho ión. La potenciación de los efectos de la adenosina parece ser simplemente un efecto adicional al antes descrito.

Es por ello que los estudios siguientes se encaminaron a determinar los efectos de las benzodiazepinas en procesos mediados por otros sistemas efectores del músculo liso.

Uno de estos mecanismos de regulación de la concentración de calcio a nivel intracelular se centra en el sistema de segundos mensajeros de los fosfatidilinositoles; debido a ello se estudió la implicación de este sistema con el mecanismo de acción de las benzodiazepinas y del PK 11195 en el músculo liso. Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que dosis elevadas de Ro 5-4864 no afectaban la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, lo cual permitía descartar la influencia de este compuesto en dicho sistema; en el caso del PK 11195 sólo se observó un pequeño grado de inhibición a dosis elevadas. Esta inespecificidad junto

a los resultados negativos con el otro compuesto ensayado, permiten descartar que la acción de las benzodiazepinas, a las dosis ensayadas, se centre en este sistema de regulación.

Se creyó oportuno seguir este estudio con el efecto de estos compuestos sobre un sistema que implicara la participación de las proteínas G. Debido a ello, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se determinó la influencia de las benzodiazepinas y del PK 11195 en las contracciones inducidas por activación del sistema colinérgico. Para ello, se escogió la preparación del duodeno aislado de rata y las contracciones inducidas por carbacol.

En estas condiciones, tanto las benzodiazepinas como el PK 11195 provocaron un desplazamiento de las curvas dosis-respuesta al carbacol hacia la derecha, de forma no paralela. El orden de afinidad que presentaron en este caso fue idéntico al de los anteriores experimentos en órgano aislado. Sin embargo, cabe destacar que las CI_{50} que se obtuvieron fueron más pequeñas que en los casos anteriores, indicando una mayor selectividad de acción a nivel de este tipo de respuesta.

Asimismo, se estudió la influencia del calcio extracelular en esta preparación y, al igual que en conducto deferente aislado de rata, se produjo una reversión parcial del efecto inhibitor de las benzodiazepinas pero no del PK 11195.

Está descrita la regulación directa e indirecta de ciertos canales iónicos por proteínas G (Bockaert, 1989). Teniendo en cuenta que las benzodiazepinas ensayadas se mostraron muy efectivas inhibiendo las contracciones inducidas por carbacol en duodeno de rata y que esta acción estaba modulada, en parte, por la concentración de calcio del medio, se estudió la acción de estos compuestos en la incorporación de $^{45}Ca^{+2}$ en conducto deferente de rata inducida por AlF_4^- ; descrito como un activador inespecífico de las proteínas G (Bigay y col., 1985). Los resultados de estos experimentos fueron negativos, es decir no se observó la inhibición de la entrada de calcio inducida por AlF_4^- en conducto deferente de rata.

Sin embargo, ya que la acción de los receptores colinérgicos esta mediada principalmente a través del sistema de activación-inhibición de las proteínas G, se realizó un estudio de la actividad de estos compuestos sobre dichas proteínas, a nivel de órgano aislado.

La inhibición de las contracciones inducidas por carbacol en duodeno aislado de rata por las benzodiazepinas y el PK 11195, fue eficazmente anulada cuando se incorporó al medio el AlF_4^- . Asimismo, el Ro 5-4864 y el PK 11195 inhibían las contracciones inducidas por esta sal en duodeno aislado de rata. Esto hecho parece indicar que estos compuestos actúan a nivel del sistema de regulación de las proteínas G o de algún mediador directamente modulado por estas proteínas. Parece ser que la acción contracturante del AlF_4^- está relacionada con su capacidad de estimular la G_i y la G_p (Zeng y col., 1989) y como se comprobó experimentalmente no es dosis-dependiente. La inhibición de las proteínas G_p , como diana de la acción de estos compuestos, no parece probable ya que, como hemos indicado anteriormente, estos compuestos mostraron una actividad prácticamente nula sobre la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, sin modificar la entrada de calcio inducida por AlF_4^- . Todo ello nos inducía a creer que el efecto de estos compuestos sobre las contracciones por carbacol y AlF_4^- estaba relacionado o bien con el sistema de las proteínas G, o con el sistema del AMPc.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los experimentos con toxina pertussis y toxina colera en las preparaciones de duodeno aislado de rata, ponen de manifiesto que la acción inhibidora del Ro 5-4864 y el PK 11195 en las contracciones inducidas por carbacol no está mediada por las proteínas G_i o G_p . En el primer caso la presencia de toxina pertussis, inhibidora del sistema G_i , debería haber anulado el efecto de estos compuestos en el caso de que la inhibición inducida por ellos en las contracciones por carbacol en duodeno fuera mediada por la proteína G_i ; por el contrario, el efecto observado es una potenciación de este efecto inhibidor. En segundo lugar la presencia de toxina colera, cuya acción se

centra en la activación de la proteína G_s , no afectaba la acción de estos compuestos en este tipo de preparación.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos parece probable que la acción de estos compuestos a nivel de tejidos periféricos, una vez eliminado su posible interacción con la movilización del calcio y teniendo en cuenta su capacidad para inhibir las contracciones inducidas por varios estímulos diferenciados, esté relacionada con la modulación de algún sistema efector implicado en la contracción del músculo liso.

Uno de los principales sistemas de regulación de la contracción en el músculo liso está integrado por los nucleótidos cíclicos, como el AMPc y el GMPc. Existen diferentes mecanismos de regulación para la formación y degradación de estos compuestos, en los cuales se puede actuar para modular su acción.

Ya que las dos toxinas ensayadas no anulan el efecto de estos compuestos, se puede descartar una acción inhibitoria de la adenilato ciclasa.

Por otra parte, el hecho de que estas benzodiazepinas sean capaces de modular la recaptación de la adenosina, las relaciona con el mecanismo de acción de fármacos que presentan también esta acción, como el dipiridamol. Este compuesto se caracteriza también por su actividad inhibitoria de la fosfodiesterasa. Este enzima es capaz de desactivar el AMPc y el GMPc, degradándolos.

Si consideramos que el aumento de AMPc a nivel del músculo liso induce una relajación de éste, los compuestos capaces de inhibir la fosfodiesterasa inactivadora del AMPc inducen un incremento de éste y, por tanto, una relajación de la musculatura lisa. Descartados otros mecanismos, es posible que las benzodiazepinas y el PK 11195 actúan de forma análoga al dipiridamol inhibiendo la fosfodiesterasa. El hecho de que en la determinación preliminar del efecto de las benzodiazepinas y del PK 11195 sobre la actividad fosfodiesterasa, se haya observado que estos

compuestos son capaces de inhibir este enzima, apoya la tesis antes planteada y permite suponer que la inhibición de la contracción en conducto deferente y duodeno de rata inducida por estos compuestos sea debida a un efecto modulador de la actividad fosfodiesterasa. Por último cabe señalar el papel del calcio y calmodulina en la regulación de ciertas fosfodiesterasas, lo que explicaría los efectos observados relativos a la modulación y control de los niveles intracelulares de este ión.

IV.-CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Las tres benzodiazepinas ensayadas, Ro 5-4864, diazepam y clonazepam, así como el PK 11195, antagonista de los receptores benzodiazepínicos periféricos de alta afinidad, inhiben, de manera dosis-dependiente, las contracciones inducidas por diferentes estímulos a nivel de la musculatura lisa (conducto deferente y duodeno de rata). El orden de potencia relativa que han presentado ha sido Ro 5-4864 > PK 11195 > diazepam > clonazepam.

2.- La participación de los receptores benzodiazepínicos centrales en este efecto inhibitor ha sido descartado utilizando agonistas específicos del receptor del GABA y el flumazemil.

3.- Ya que el PK 11195 no ha anulado la acción de las benzodiazepinas, sino que también ha presentado el mismo patrón de respuesta y las CI_{50} obtenidas son del orden micromolar, se deduce que el mecanismo de acción no está relacionado con el receptor benzodiazepínico periférico de afinidad nanomolar.

4.- El efecto inhibitor de estos compuestos es dependiente de calcio, ya que tanto en conducto deferente como en duodeno aislado de rata se ha conseguido revertir, en parte, aumentando la concentración de calcio del medio.

5.- En las contracciones inducidas por KCl en conducto deferente estos compuestos mostraron una gran selectividad por la respuesta fásica, indicando que afectaban preferentemente a los canales de calcio voltaje dependientes de activación-inactivación rápida (tipo T), a diferencia de los antagonistas clásicos del calcio.

6.- La inhibición de estos compuestos a nivel de la musculatura lisa se debe parcialmente a que afectan la incorporación celular del calcio ya que, la entrada de $^{45}Ca^{+2}$ es afectada por Ro 5-4864 y PK 11195, aunque muy poco por diazepam y clonazepam. Los resultados de las experiencias con $^{45}Ca^{+2}$

permiten concluir que la inhibición de la entrada de calcio inducida por despolarización es el resultado de la alteración de otro sistema efector.

7.- El efecto inhibitor de las benzodiazepinas ensayadas y del PK 11195 no está relacionado con la movilización intracelular del calcio.

8.- Estos compuestos no interaccionan con el sistema de las proteínas G, pero sí modifican alguno de los sistemas efectores dependientes de dichas proteínas.

9.- Ro 5-4864 y diazepam potencian la acción de la adenosina al inhibir su recaptación.

10.- Las benzodiazepinas ensayadas y el PK 11195 actúan a nivel del sistema de nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, a través de la inhibición de las fosfodiesterasas, probablemente de tipo I, ya que muestran efectos dependientes de calcio y relacionados con la recaptación de adenosina.

V.-BIBLIOGRAFIA

Ambache,N,Zar,MA,1971

Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea-pig vas deferens

J. Physiol.,216,359-389.

*

Amobi,NIB,Smith,ICH,1986

Effect of calmodulin antagonist, W-7 on neuromuscular response of isolated rat vas deferens

J. Physiol.,381,103P.

*

Amobi,NIB,Smith,ICH,1987a

A study of the post-tetanic twitch depression at the prostatic end of the rat vas deferens

Eur. J. Physiol.,408,628-633.

*

Amobi,NIB,Smith,ICH,1987b

Effects of $\alpha\beta$ -methyleneATP on biphasic responses of rat vas deferens

Eur. J. Pharmacol.,133,75-82.

*

Anholt,RRH,DeSouza,EB,Oster-Granite,ML,Snyder,SH,1985

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

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

*

Anholt,RRH,Murphy,KMM,Mack,GE,Snyder,SH,1984

Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves

J. Neurosci.,4,593-603.

*

Anholt,RRH,Pedersen,PL,DeSouza,EB,Snyder,SH,1986

The peripheral-type benzodiazepine receptors: localization to the mitochondrial outer membrane

J. Biol.Chem.,261,576-583.

*

Asano,T,Sakibara,J,Ogasawara,N,1983

Molecular sizes of photolabeled GABA and benzodiazepine receptors are identical

FEBS Lett.,151,277-280.

*

Auger,KR,Serunian,LA,Soltoff,ST,Libby,P,Cantley,LC,1989

PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells

Cell,57,167-175.

*

Barnes,CM,White,WF,Ditcher,MA,1983

Etazolate (SQ 20009): Electrophysiology and effects on [3H]flunitrazepam binding in cultured cortical neurons

J. Neurosci.,3,726-772.

*

Baukal,AJ,Gaetan,G,Rubin,R,Spat,A,Catt,KJ,1985

Binding sites for inositol trisphosphate in the bovine adrenal cortex

Bochem. Biophys. Res. Commun.,113,532-538.

*

Beaumont,K,Skowronski,R,Vaughn,DA,Fanestil,DD,1988

Interactions of lipids with peripheral type benzodiazepine receptors

Biochem. Pharmacol.,37,1009-1014.

*

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.

*

Benavides,J,Quateronet,D,Imbault,R,Malgouris,C,LeFur,G,1983

Labelling of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, and isoquinoline carboxamide derivative: kinetics studies and autoradiographic localization

J. Neurochem.,41,1744-1750.

*

Benavides,J,Savaki,HE,Malgouris,C,Laplace,C,Daniel,M,1984

Autoradiographic localizations of peripheral benzodiazepinebinding sites in

the cat brain with [3H]PK 11195.

Brain Res. Bull.,18,49-61.

*

Bender,AS,Hertz,L,1985

Pharmacological evidence that the non-neuronal diazepam binding site in primary cultures of glial cells is associated with a calcium channel

Eur. J. Pharmacol.,110,287.

*

Benham,CD,Tsien,RW,1987

A novel receptor-operated Ca^{+2} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle

Nature,328,275-278.

*

Berridge,MJ,1983

Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol

Biochem. J.,212,849-858.

*

Berridge,MJ,1989

Inositol trisphosphate, calcium, lithium and cell signalling

J. Amer. Med. Ass.,262(13),1834-1841.

*

Berridge,MJ,Irvine,RF,1984

Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction

Nature,312,315-321.

*

Berridge,MJ,Downes,CP,Hanley,MR,1982

Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands

Biochem. J.,206,587-595.

*

Bigay,J,Deterre,P,Pfister,C,Chanvre,M,1985

Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site

FEBS Lett.,191,181-185.

*

Birnbaumer,L,1990

G proteins in signal transduction

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,30,675-705.

*

Bloomquist,BT,Shortridge,RD,Schneuwly,S,Perdew,M,Montell,C,1988

Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction

Cell,54,723-733.

*

Blumenthal,DK,Stull,JT,1980

Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by Ca^{+2} and calmodulin

Biochem.,19,5608-5614.

*

Bockaert,J,1989

Les proteines G etendent leur pouvoir sur les canaux ioniques

M/S,5,562-569.

*

Bolger,GT,Weissman,H,Lueddens,AS,Basile,CR,Mantione,JE,Barret,JM,Witkin,SM,Paul,SM,Skolnick,P,1985

Late evolutionary appearance of peripheral-type binding sites for benzodiazepines

Brain Res.,338,366.

*

Bourne,HR,1988

Do GTPases direct membrane traffic in secretion?

Cell,53,669-667.

*

Boyer,JL,García,A,Posadas,C,García-Sainz,JA,1984

Differential effect of pertussis toxin on the affinity state of renal α_1 and α_2 adrenoreceptors

J. Biol. Chem.,259,8076-8079.

*

Brabet,P,Dumuis,A,Sebben,M,Pantaloni,C,Bockaert,J,Homburger,V,1988
Immunocytochemical localisation of the guanine nucleotide binding protein
 G_o in primary cultures of neuronal and glial cells
J. Neurosci.,8,701-708.

*

Bradford.Rubin,RP,1986
Guanine nucleotide regulation of phospholipase C activity in permeabilized
rabbit neutrophils: inhibition by pertussis toxin and sensitization to
submicromolar calcium concentrations
Biochem. J.,239,97-102.

*

Braestrup,C,Albrechtsen,R,Squires,RF,1977a
High densities of benzodiazepine receptors in human cortical
Nature,269,702-704.

*

Braestrup,C,Nielsen,M,1981a
[3H]propyl- β -barboline-3-carboxylate as a selective radioligand for the BZ1
benzodiazepine receptor subclass
J. Neurochem.,37,333-341.

*

Braestrup,C,Nielsen,M,1981b
GABA reduces binding of [3H]-methyl- β -barboline-3-carboxylate to brain
benzodiazepine receptors
Nature,294,472-474.

*

Braestrup,C,Nielsen,M,1983
Benzodiazepine receptors
Handbook of Psychopharmacol.,17,285-384.

*

Braestrup,C,Squires,RF,1977b
Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity
[3H]diazepam binding
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,74,3805-3809.

*

Braestrup,C,Squires,RF,1978

Pharmacological characterization of benzodiazepine receptors in the brain
Eur. J. Pharmacol.,48,263-270.

*

Breitwieser,GE,Szabo,G,1985

Uncoupling of cardiac muscarinic and beta-adrenergic receptors from ion channels a guanine nucleotide analogue

Nature,317,538-540.

*

Briley,MS,Langer,SZ,1978

Influence of GABA receptors agonists and antagonists on the binding of [3H] diazepam to the benzodiazepine receptor

Eur. J. Pharmacol.,52,129-132.

*

Brown,AM,Birnbaumer,L,1988

Direct G protein gating of ion channel

Am. J. Physiol.,245,H401-H410.

*

Burgess,GM,Godfrey,PP,McKinney,JS,Berridge,MJ,Irvine,RF,Putney,JW,1984
The second messenger linking receptor activation to internal Ca^{+2} release in liver

Nature,309,63-66.

*

Cantor,EH,Kenessey,G,Semenuck,G,Spector,S,1984

Interaction of calcium channel blockers with non-neuronal benzodiazepine binding sites

Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.,81,1549.

*

Cantor,EH,Kennessey,G,Semenuk,G,Spector,S,1984

Interactions od calcium channel blockers with non-neuronal benzodiazepine binding sites

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,81,1549.

*

Carafoli,E,Crompton,M,1976

Calcium ions and mitochondria

in,Calcium in biological systems,Duncan.CJ,Ed. Cambrigde University

Press,Cambridge,89-115.

*

Carafoli,E,Tiosso,R,Lugli,G,Crovetti,F,Kratzing,C,1974

The release of calcium from heart mitochondria by sodium

J. Mol. Cell Cardiol.,6,361-371.

*

Carafoli,E,Chiesi,M,Gazzotti,P,1990

The membrane carriers related to intracellular calcium regulation

en,Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management,Chapter

62,Laragh,JH,Brenner,BM,Ed. Raven Press,Ltd.,New York.

*

Carbone,E,Lux,HD,1984

A low voltage activated, fully inactivating Ca channel invertebrate sensory neurones

Nature,310,501-511.

*

Clanachan,AS,1979

Modification of release by adenosine and adenine nucleotides

en, The release of catecholamines from adrenergic nerves,Paton,DM,

Ed. Pergamon Press,Oxford,267-273.

*

Clanachan,AS,Johns,A,Paton,DM,1977a

Inhibitory actions of adenine nucleotides and adenosine on neurotransmission in rat vas deferens

Neuroscience,2,597-602.

*

Clanachan,AS,Paton,DM,1977b

Inhibitory actions of adenine nucleotides and adenosine on transmission in rat vas deferens

Br. J. Pharmacol.,59,534P.

*

Clanachan,AS,Marshall,RJ,1980

Potentiation of the effects of adenosine on isolated cardiac and smooth muscle by diazepam

Br. J. Pharmacol.,71,459-466.

*

Cockcroft,S,Gomperts,BD,1985

Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase

Nature,314,534-536.

*

Colucci,WS,Brock,TA,Gimbrone,MA,Alexander,RW,1985

Nonlinear relationship between α_1 -adrenergic receptor occupancy and norepinephrine-stimulated calcium flux in cultured vascular smooth muscle cells

Mol. Pharmacol.,27,517-524.

*

Costa,E,Guidotti,A,1979

Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,19,531-545.

*

Costa,E,Guidotti,A,1985

Endogenous ligands for benzodiazepine recognition sites

Biochem. Pharmacol.,34,3399-3403.

*

Coughlin,SR,Escobedo,JA,Williams,LT,1989

Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signaltransductions

Science,243,1191-1194.

*

Cowen,PJ,Green,AR,Nutt,DJ,Martin,JL,1981

Ethyl β -Barboline carboxylate lowers seizure treshold and antagonizes flurazepam-induced sedation in rats

Nature,290,54-55.

*

Crompton,M,1985

The regulation of mitochondrial calcium transport in heart

in,Current topics in membrane and trasnport,Shamoo,AE,Ed.Academic Press,New York,231-276.

*

Davies,J,Polc,P,1978

Effect of a water soluble benzodiazepine on the responses of spinal neurones to acetylcholine and excitatory aminoacids analogues.

Neuropharmacol.,17,217-220.

*

Davies,LP,Huston,V,1981

peripheral benzodiazepine binding system in heart and their interaction with dipyridamole

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

*

Dawson,AP,1985

GTP enhances inositol trisphosphate-stimulated Ca^{+2} release from rat liver microsomes

FEBS Lett.,185,147-150.

*

Dawson,AP,Hills,G,Comerford,JG,1987

The mechanism of action of GTP on Ca^{+2} efflux from rat liver microsomal vesicles

Biochem. J.,244,87-92.

*

Deng,L,Ransom,R,Olsen,R,1986

[3H] muscimol photolabels the gamma-aminobutyric acid receptor binding site peptide subunit distinct from that labeled with benzodiazepines

Biochem. Biophys. Res. Commun.,128,1308-1314.

*

Denton,RM,McCormack,JG,1985

The calcium sensitive deshydrogenases of vertebrate mitochondria

Cell Calcium,7,377-386.

*

DePinto,V,Tommasino,M,Benz,R,Palmieri,F,1985

The 35 kDa DCCD-binding protein from pig heart mitochondria is the mitochondrial porin

Biochem. Biophys. Acta,813,230-242.

*

DeSouza,EB,Anholt,RRH,Murphy,KMM,Snyder,SH,Kuhar,MJ,1985

Peripheral type benzodiazepine receptors in endocrine

organs:autoradiographic localization in rat pituitary, adrenals and testis
Endocrinology,116,567-573.

*

Deterre,P,Paupardin-Tritsch,D,Bockaert,J,Gerschenfeld,HM,1982
 Cyclic-AMP mediated decrease in K conductance evoked by serotonin and
 dopamine in the same neuron: a biochemical and physiological single cell
 study

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,79,7934-7938.

*

Deth,R, Van Breemen,C,1977

Agonist induced release of intracellular calcium in the rabbit aorta

J. Membrane Biol.,30,360-365.

*

Devaud,L,Murray,TF,1987

Interactions of pyrethroids insecticides with the peripheral-type
 benzodiazepine receptor

Soc. Neurosci. Abstr.,13,1230.

*

Devaud,L,Szot,P,Murray,TF,1986

PK 11195 antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity

Eur. J. Pharmacol.,120,269-273.

*

DeWinter,JM,Vianen,GM, Van Den Bosch,H,1982

Purification of rat liver mitochondrial phospholipase A2

Biochem. Biophys Acta,712,332-341.

*

Doble,A,Benavides,J,Ferris,O,Bertrand,P, Menager,J,Vuacher,N,Burgevin,
 MC,Uzan,A,Gueremy,C,LeFur,G,1985

Dihydropyridine and peripheral type benzodiazepine binding
 sites:subcellular distribution and molecular size determination

Eur. J. Pharmacol.,119,153-167.

*

Doble,A,Ferris,O,Burgevin,MC, Menager,J,Uzan,A,1987

Photoaffinity labeling of peripheral-type benzodiazepine-binding sites

Mol. Pharmacol.,31,42-49.

*

Dragunow, M, Farell, RLM, 1988
Neuroprotective effects of adenosine
Trends Pharmacol. Sci., 9, 193-194.

*

Durell, J, Garland, JT, Friedel, RO, 1969
Acetylcholine action: Biochemical aspects
Science, 165, 862-870.

*

Eggermont, JA, Vrolix, M, Raeymaekers, L, Wuytack, F, Casteels, R., 1988
Ca²⁺-transport ATPase of vascular smooth muscle
Circ. Res., 62, 266-278.

*

Ehrlich, BE, Watras, J, 1988
Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle
sarcoplasmic reticulum
Nature, 336, 583-586.

*

Euler, US von, Hedqvist, P, 1969
Inhibitory action of prostaglandin E1 and E2 on the neuromuscular
transmission in the guinea pig vas deferens
Acta Physiol. Scan., 93, 572-573.

*

Ferrendelli, JA, Daniels-McQueen, S, 1982
Comparative actions of phenytoin and other anticonvulsant drugs on
potassium- and veratridine- stimulated calcium uptake in synaptosomes
J. Exp. Ther., 220, 29-34.

*

Fesenko, EE, Kolesnikov, SS, Lyubarky, AL, 1985
Induction by cyclic GMP of a cationic conductance in plasmamembrane of
retinal rod outer segment
Nature, 313, 310-323.

*

Fieck, C, Benz, R, Roos, N, Brdiczka, D, 1982
Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the

mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria
 Biochim. Biophys. Acta,688,429-440.

*

File,SE,Lister,RG,1983

The anxiogenic action of Ro 5-4864 is reversed by pephytoin
 Neurosci Lett.,35,93-96.

*

Flaim,S,Zelis,R,1982

Calcium bockers. Mechanisms of action and clinical applications
 Ed. Urban and Schwarzenberg,Baltimore\ Maryland.

*

Fleckenstein,A,1983a

Calcium antagonist in heart smooth muscle
 en,Experimental facts and therapeutic prospects, Ed. Wiley,NewYork,1,399.

*

Fleckenstein,A,1983b

History of calcium antagonists
 Circ. Res.,52,I3-I16.

*

Fleckenstein,A,Fleckenstein,G,Frey,M,Zorn,J,1987

Future directions in the use of calcium antagonists
 Amer. J. Cardiol.,59,117B-187B.

*

Fleckensteins,A, Van Breemen,C,Gross,R,Hoffmeister,F,1986

Cardiovascular effects of dihydropyridine type calcium antagonists and
 agonists

Ed. Springer Verlag,Berlín.

*

Flórez,J,Armijo,JA,Mediavilla,A,1987

Fármacos hipnóticos

en,Farmacologia Humana.Tomo I,Colección Ciencias Médicas, Ed.
 Eunsa,Pamplona,317-327.

*

Flórez,J,1989

Benzodiacepinas y antagonistas

en, Nuevos Medicamentos. Cursos de La Granda, Gandia, L, Garrido, B, Garcia, AG, Ed. Farmaindustria, Madrid, 253-266

*

Fredholm, BB, 1988

How does adenosine inhibit transmitter release?

Trends Pharmacol. Sci., 9, 130-134.

*

Gill, DL, Veda, T, Chueh, SH, Noel, MW, 1986

Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum is mediated by a guaninenucleotide regulatory mechanism

Nature, 320, 461-464.

*

Gillespie, JS, Macrae, IM, 1983

The contractile response to and the release of noradrenaline by transmural nerve stimulation in the guinea pig vas deferens and a comparison with the response to noradrenaline

Br. J. Pharmacol., 80, 477-484.

*

Gilman, AG, 1984

G proteins and dual control of adenylate cyclase

Cell, 36, 577-579.

*

Glossman, H, Striessnig, J, 1988

Structure and pharmacology of voltage-dependent calcium channels

ISI Atlas of Sci.: Pharmacol., 202, 210.

*

Godfraind, T, 1976

Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum

J. Physiol., 260, 21-26.

*

Godfraind, T, Vanhoutte, PM, Govoni, S, Paoletti, R, 1985

Calcium entry blockers and tissue protection

Ed. Raven Press, New York.

*

Godfraind,T,Morel,N,Wibo,M,1988

Tissue specificity of dihydropyridine-type calcium antagonist in human isolated tissues

Trends Pharmacol. Sci.,9(1),37-39.

*

Gold,GH,Nakamura,T,1987

Cyclic nucleotide gated conductances: a new class of ion channels mediates visual and olfactory conductance

Trends Pharmacol. Sci.,8,312-316.

*

González,RA,Crews,FT,1985

Cholinergic and adrenergic stimulated inositol hydrolysis in brain: interaction, regional distribution, and coupling mechanism

J. Neurochem.,45,1076-1084.

*

Goodhart,M,Ferry,N,Geynet,P,Hanoune,J,1982

Hepatic α_1 adrenergic receptors show agonist-specific regulation by guanine nucleotides

J. Biol. Chem.,257,11577-11583.

*

Grandison,L,1981

Characterization of benzodiazepine binding and action on rat anterior pituitary cells

Neuroscience,7,Abstrac,503.

*

Gray,PW,Glaister,D,Seeburg,P,Guidotti,A,Costa,E,1986

Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,83,7547-7551.

*

Gross,R,Bechem,M,Kayser,M,Schramm,M,Tariel,R,Thomas,G,1985

en, Effects of calcium antagonists 1,4-dihydropyridine, Bay K 8644 on the heart. 218-232.

*

Guidotti,A,Forchetti,CM,Corda,MG,Konkel,C,Bennett,CD,Costa,E,1983
Isolation, characterization and purification to homogeneity of an
endogenous polypeptide with agonist action on benzodiazepine receptors
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,80,3531-3535.

*

Guidotti,A,Toffano,G,Costa,E,1978
An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine
receptors in rat brain
Nature,275,553-555.

*

Harris-Warrick,RM,Hammond,C,Paupardin-Tritsch,D,1988
An α_1 subunit of a GTP binding protein immunologically related to G_o
mediates a dopamine induced decrease of calcium current in snail neurons
Neuron,1,27-32.

*

Hasselbach,W,Makinose,M,1961
Die calcium pumpe der "Erschlaffungsgrana" des muskels und ihre
Abhngigkeit von der ATP-spaltung
Biochem. Z,33,518-528.

*

Hauser,G,Eichberg,J,1973
Improved conditions for the preservation and extraction of
polyphosphoinositides
Biochem. Biophys. Acta,326,201-209.

*

Hay,DWP,Wadsworth,RM,1984
Effects of KCl on ^{45}Ca uptake and efflux in the rat vas deferens
Br. J. Pharmac.,81,440-447.

*

Hay,DWP,Wadsworth,RM,1982
Effects of some organic calcium antagonists and other procedures affecting
 Ca^{+2} translocation on KCl-induced contractions in the rat vas deferens
Br.J.Pharmacol.,76,103-113.

*

Hepler, JR, Harden, TK, 1986

Guanine nucleotide-dependent pertussis toxin insensitive stimulation of inositol phosphate formation by carbachol in a membrane preparation from human astrocytoma cells

Biochem. J., 239, 141-146.

*

Hescheler, J, Rosenthal, W, Trautwein, W, Shultz, G, 1987

The GTP binding protein, G_o , regulates neuronal calcium channels

Nature, 325, 445-447.

*

Hirsch, JD, 1984

Peripheral and central-type benzodiazepine binding sites in mammalian ocular tissues

Exp. Eye Res., 38, 101-104.

*

Hirsch, JD, Beyer, CF, Malkowitz, L, Loullis, CC, Beer, B, Blume, AJ, 1988

A functional analysis of mitochondrial benzodiazepine receptor

FASEB J., 2, A619.

*

Hirst, GDS, Neil, TO, 1980

Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle

Nature, 283, 769-772.

*

Hokin, MR, Hokin, LE, 1953

Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices

J. Biol. Chem., 203, 967-977.

*

Homburger, V, Brabet, P, Audigier, Y, Pantaloni, C, Bockaert, J, Rouot, B, 1987

Immunological localisation of the GTP binding protein G_o indifferent tissues of vertebrates and invertebrates

Mol. Pharmacol., 31, 313-319.

*

Hondeghem, LM, Katzung, BG, 1977

Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels

Biochem. Biophys. Acta,372,373-398.

*

Hondeghem,LM,Katzung,BG,1984

Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-bloking drugs

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,24,387-423.

*

Hunkeler,W,Möhler,H,Pieri,L,Polc,P,Bonetti,EP,Cumin,R,Schaffner,R,Haefely,W,1981

Selective antagonist of benzodiazepines

Nature,290,514-516,

*

Huxley,AF,1971

The activation of striated muscle and its mechanical response

Proc. R. Soc. Lond. [Biol.],178,11.

*

Ikebe,M,Iragaki,M,Kanamaru,K,Hidaka,H,1985

Phosphorylation of smooth muscle light chain kinase by calcium activated, phospholipid dependent protein kinase

J. Biol. Chem.,260,4547-4550.

*

Irvine,RF,Brown,KD,Berridge,MJ,1984

Specificity of inositoltrisphosphate-induced calcium release from permeabilized Swiss-mouse 3T3 cells

Nature,222,269-272.

*

Irvine,RF,1989

Functions of inositol phosphates

e n , I n o s i t o l l i p i d s i n c e l l s

signalling,Michell,RH,Drummond,AH,Downes,CP,Ed. Academic Press

Inc.,Orlando,135-161.

*

Irvine,RF,Letcher,AJ,Heslop,JP,Berridge,MJ,1986a

The inositol tris/tetrakis phosphate pathway-demonstration of Ins(1,3,4)P₃ kinase activity in animal tissue

Nature,320,631-634.

*

Irvine,RF,Moor,RM,1986b

Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca⁺²

Biochem. J.,240,917-920.

*

Irvine,RF,Moor,RM,Pollock,WK,Smith,PM,Wreggett,KA,1988

Inositol phosphates: proliferation, metabolism and function

Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.,320,281-298.

*

Janis,RA,Triggle,DJ,1983

New developments in calcium channels antagonists

J. Med. Chem.,26,775-785.

*

Jensen,M,Lambert,JDC,1986

Electrophysiological studies in cultures mouse CNS neurones of the action of an agonist and inverse agonist at the benzodiazepine receptor

Br. J. Pharmacol.,88,717-731.

*

Johns,A,Lategan,TW,Lodge,NJ,Ryan,US, Van Breemen,C,Adams,DJ,1987

Calcium entry through receptor-operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells

Tissue & Cell,19(6),733-745.

*

Jones,BJ,Oakley,NR,1981

The convulsant properties of methyl-β-carbolines-3-carboxylate in the mouse

Brit. J. Pharmacol.,74,884P-885P.

*

Jorgensen,AO,Shen,ACY,MacLennan,DH,Tokuyasu,KT,1982

Ultrastructural localization of the Ca⁺²-Mg⁺²-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle by ferritin labelling of ultrathin frozen sections

J. Cell Biol.,92,409-416.

*

Kaibuchi,K,Takai,Y,Nishizuka,Y,1981

Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase

J. Biol. Chem.,256(14),7146-7149.

*

Kamp,TJ,Miller,RJ,1987

Voltage sensitive calcium channels and calcium antagonists

ISI Encyclopedia Pharmacol.,1,133-138.

*

Kaplan,NM,1988

Calcium and calcium antagonists in the treatment of hypertension

Isi Atlas of Sci.,2(1),61-65.

*

Karaki,H,Weiss,GB,1988

Calcium release in smooth muscle

Life Sci.,42,111-122.

*

Karobath,M,Sperk,G,1979

Stimulation of benzodiazepine receptor binding by gamma-aminobutyric acid

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,76,1004-1006.

*

Kerr,LM,Filloux,F,Olivera,BM,Jackson,H,Wamsley,JK,1988

Autoradiographic localization of calcium channels with [¹²⁵I] omega-conotoxin in rat brain

Eur. J. Pharmacol.,146,181-183.

*

Kerr,LM,Yoshikami,D,1984

A toxic peptide from the venom of a marine snail blocks calcium evoked-release of neurotransmitter

Nature,30,282.

*

Khoyi,MA,Westfall,DP,Gerthoffer,WT,1987

Effects of potassium and norepinephrine on calcium influx in guinea pig vas deferens

Eur. J. Pharmacol.,140,58-62.

*

Kikkawa,U,Takai,Y,Minakuchi,R,Inohara,S,Nishizuka,Y,1982

Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties

J. Biol. Chem.257(22),13341-13348.

*

Kish,SJ,Sperk,J,Hornykiewicz,O,1983

Alterations in benzodiazepine and GABA receptors binding in rat brain following systemic injection of kainic acid

Neuropharmacology.,22,1303-1309.

*

Kishimoto,A,Kajikawa,N,Shiota,M,Nishizuka,Y,1983

Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease

J. Biol. Chem.,258,1156-1164.

*

Kistler,J,Stroud,RM,Klimkowsky,MW,Lancrette,RA,Fariclugh,RH,1982

Structure and function of an acetylcholine receptor

Biophys. J.,37,371-383.

*

Klee,CB,Vanaman,TC,1982

Calmodulin

Adv. Protein Chem.,35,621-629.

*

Kraft,AS,Anderson,WB,1983

Phorbol esters increase the amount of Ca^{+2} , phospholipid-depedent protein kinase associated with plasma membrane

Nature,301,621-627.

*

Krause,J,Hay,R,Kowollic,C,Brdicza,D,1988

Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane

Biochem. Biophys. Acta,860,672-689.

*

Kuno,M,Gardner,P,1987

Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasmamembrane of human T-lymphocytes

Nature,326,301-304.

*

Kuprinski,J,Coussen,F,Bakalyar,HA,Tang,WJ,Feinstein.1989

Adenyl cyclase amino-acid sequence possible channel-like or transporter-like structure

Science,244,1558-1564.

*

Laird,HE,Duerson,K,Buckley,AR,Montgomery,DW,Russell,DH,1987

Peripheral benzodiazepine (BZ) receptor enhances prolactin(PRL)-dependent mitogenesis im N62 node lymphoma cells

Fed. Proc.,46,528.

*

Leeb-Lundberg,LM,Olsen,RW,1982

Heterogeneity of benzodiazepine receptor interactions with gamma-aminobutyric acid and barbiturate receptor sites

Mol. Pharmacol.,23,315-325.

*

LeFur,G,Perrier,ML,Vaucher,N,Imbault,F,Flamier,A,Benavides,J,Uzan,A,R enault,C,Dubroeuq,MC,Gueremy,C,1983a

Peripheral benzodiazepine binding sites: effects of PK 11195,1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies.

Life Sci.,32,1839-1847.

*

LeFur,G,Uzan,A,Gueremy,C,Benavides,J,1983c

Peripheral benzodiazepine binding sites: in vivo and in vitro labelling by [³H]PK 11195

Neurosci.,9,Abstrac,405.

*

LeFur,G,Vaucher,N,Perrier,ML,Flamier,A,Benavides,J,Renault,C, Dubroeuq,MC,Gueremy,C,Uzan,A,1983b

Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepinebinding sites, [3H]Ro 5.4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies.
Life Sci.,33,449-457.

*

Lenting,HBm,Neys,FW, Van Den Bosch,H,1987
Hydrolysis of exogenous substrates by mitochondrial phospholipase A₂
Biochem. Biophys. Acta,917,178-185.

*

Limbird,LE,1981
Activation and attenuation of adenylate cyclase: the role of GTP-binding proteins as macromolecular messengers in receptor-cyclase coupling
Biochem. J.,195,13.

*

Lister,RG,Nutt,DJ,1987
Is Ro 15-413 a specific alcohol antagonist?
Trends Neurosci.,10,223-225.

*

Litosch,I,Fain,JN,1985
Regulation of phosphoinositide breakdown by guanine nucleotides
Life Sci.,39,187-194.

*

Lodge,NJ,Adams,DJ,Johns,A,Ryan,US, Van Breemen,C,1988
Ca⁺² activation of endothelial cells
en,Proc. 2nd Int. Symp. Resistance Arteries,Halpen,W,Ed. Ithaca,New York.

*

Lynch,CJ,Charest,R,Blackmore,PF,Exton,JH,1984
Studies on the hepatic α_1 -adrenergic receptors modulation of guanine nucleotide effects by calcium, temperature and age
J. Biol. Chem.,260,1593-1600.

*

Mannella,CA,1984
Phospholipase induced crystallization of channel in mitochondrial outer membrane
Science,224,164-166.

*

Mantione,CR,Goldman,ME,Martin,B,Bolger,GT,Luddens,H,1988

Purification and characterization of an endogenous protein modulator of radioligands binding to peripheral-type benzodiazepine receptor and dihidropiridine calcium channel antagonist binding sites

Biochem. Pharmacol.,3,339-347.

*

Marangos,PJ,Patel,J,Boulenger,JP,Clark-Rosenberg,R,1982

Characterization of peripheral benzodiazepine binding sites in brain using [³H]Ro 5-4864

Mol. Pharmacol.,22,26-32.

*

Mathers,DA,Barker,JL,1980

(-)Pentobarbital opens ion channels of long duration in cultures mouse spinal neurons

Science,209,507-509.

*

Matthew,E,Lanskin,JD,Zimmerman,EA,Weintein,JB,Hsu,KD,Eglenhard,DZ,1981

Benzodiazepines have high affinity binding sites and induced melanogenesis in B16/c3 melanoma cells

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,78,3935-3939.

*

McDonald,RL,Barker,JL,1978

Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones

Nature,271,563-564.

*

Meldrum,LA,Burnstock,1983

Evidencia that ATP acts as a cotransmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens

Eur. J. Pharmacol.,92,161-166.

*

Menahan,LA,Hepp,KO,Wieland,O,1969

Liver 3':5'-nucleotide phosphodiesterase and its activity in rat livers perfused with insulin

Eur. J. Biochem.,8,435-443.

*

Merritt,E,Taylor,CW,Rubin,RP,Putney,JW,1986

Evidence suggesting that a novel guanine nucleotide regulatory protein couples receptors to phospholipase C in exocrine pancreas

Biochem. J.,236,337-343.

*

Mestre,M,Carriot,T,Uzan,A,Gueremy,C,LeFur,G,1984a

Cardiac electrophysiological effect of PK 11195, a new ligand of peripheral benzodiazepine sites

IUPHAR 9th. Int. Congr. Pharmac.,London, Ed. MacMillan, Abstracts:1830P.

*

Mestre,M,Carriot,T,Belin,C,Uzan,A,Renault,C,Dubroeuq,MC,Gueremy,C, LeFur,G,1984b

Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral benzodiazepine receptors in guinea pig heart preparation

Life Sci.,35,9953-9962.

*

Mestre,MT,Carriot,T,Belin,C,Uzan,A,Renault,C,Dubroeuq,MC,Gueremy,C, Doble,A,LeFur,G,1985

Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral type benzodiazepine receptors are coupled to calcium channels in the heart

Life Sci.,36,391.

*

Michell,RH,1975

Inositol phospholipids and cell surface receptor function

Biochim. Biophys. Acta,415,81-147.

*

Minneman,KP,Johnson,RD,1984

Characterization of α_1 -adrenergic receptors linked to [3 H] inositol metabolism in rat cerebral cortex

J. Pharmacol. Exp. Ther.,230,317-323.

*

Minneman,KP,1988

α_1 adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{+2}

Pharmacol Rev.,40(2),87-119.

*

Mizoule,J,Gauthier,A,Uzan,A,Renault,C,Dubroeuq,MC,Gueremy,C,
LeFur,G,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.

*

Möhler,H,Okada,T,1977

Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system
Science,198,849-851.

*

Möhler,H,Okada,T,1978

Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by [3H] diazepam binding
Life Sci.,22,985-996.

*

Mottram,DR,1988

Agonist at presynaptic receptors on sympathetic nerves differentially affect two phases of the contractile response in the rat vas deferens
Pharmacol. Res. Commun.,20(11),963-973.

*

Nakamura,T,Ui,M,1985

Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin

J. Biol. Chem.,260,3584-3593.

*

Neer,EJ,Clapham,DE,1988

Role of G protein structures in transmembrane signalling
Nature,333,129-134.

*

Nelson,BD,Kabir,F,1986

The role of the mitochondrial outer membrane in energy metabolism of tumor cells

Biochimie,68,407-415.

*

Newman,AH,Lueddens,HWM,Skolnick,P,Rice,KC,1987

Novel irreversible ligands specific for peripheral type benzodiazepine receptors: (\pm)-, (+) and (-)-1-(2-chlorophenyl)-N-(1-methylpropyl)-N-(2-isothiocyanatoethyl)-3-Isoquinolinecarboxamide and 1-(2-isothiocyanatoethyl)-7-chloro-1,3-dihydro-5-(4-clorophenil)-2H-1,4-benzodiazepin-2-one

J. Med. Chem.,30,1901-1905.

*

Nicholls,DG,Akerman,K,1982

Mitochondrial calcium transport

Biochim. Biophys. Acta,683,57-88.

*

Nishizuka,Y,1983

Phospholipid degradation and signal transduction for protein phosphorylation

trens Pharmacol. Sci.,8,13-16.

*

Nishizuka,Y,1984

The role of protein kinase C in cell cusrface signal transduction and tumor promotion

Nature,308,693.

*

Nishizuka,Y,1988

The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation

Nature,334,661-665.

*

Nowycky,MC,Fox,AP,Tsien,RW,1985

Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity

Nature,316,440-443.

*

Nutt,DJ,Cowen,PJ,1982

Unusual interaction of benzodiazepine receptor antagonist

Nature,295,436-438.

*

Oakley,NR,Jones,BJ,1980

The proconvulsant and diazepam-reversing effects of ethyl- β -barboline-3-carboxylate

Eur. J. Pharmacol.,68,381-382.

*

Ohlendieck,K,Riesinger,I,Adams,V,Krause,J,Dieter,B,1986

Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat-liver mitochondria

Biochim. Biophys. Acta,860,672-689.

*

Olsen,RW,1982

Role of the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,22,245-277.

*

Olsen,RW,Snowman,AM,Lee,RJ,Lomax,P,Wamsley,JK,1984

Role of the gamma-amino butyric acid receptor ionophore complex in seizure disorders

Ann. Neurology,(Suppl.) 16,90-119.

*

Opie,LH,1984

Calcium antagonists and cardiovascular disease

Ed. Raven Press,New York.

*

Opie,LH,1984

Pumps, channels and currents

in,The Heart,Grune,Straton,London,42-46.

*

Ovchinnikov,YA,Gubanov,VV,Khramtsov,NV,Ischenko,KA,Zagranichny,VE,
1987

Cyclic GMP phosphodiesterase from bovine retina. Amino acid sequence of the $\alpha 1$ subunit and nucleotide sequence of the corresponding cDNA
FEBS Lett.,223,169-173.

*

Ovchinnikov, YA, Lipkin, VM, Kumarev, VP, Gubanov, VV, Khramtsov, NV, 1986
Cycle GMP phosphodiesterase from cattle retina. Amino acid sequence of the gamma-subunit and nucleotide sequence of the corresponding cDNA
FEBS Lett.,204,286-292.

*

Pato, MD, Kerc, E, 1985

Purification and characterization of a smooth muscle myosin phosphatase from turkey gizzards
J. Biol. Chem.,260,12359-12366.

*

Paul, SM, Kempner, ES, Skolnick, P, 1981

In situ molecular weight determination of brain peripheral binding receptors
Eur. J. Pharmacol.,76,465-466.

*

Pellow, S, File, SE, 1984

Behavioural actions of Ro 5-4864: a peripheral-type benzodiazepine?
Life Sci.,35,229-240.

*

Pfaffinger, PJ, Martin, JM, Hunter, DD, Nathanson, NN, Hille, B, 1985

GTP binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel
Nature,317,536-538.

*

Pfeilschifter, J, Bauer, C, 1986

Pertussis toxin abolishes angiotensin II induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells
Biochem. J.,236,289-294,

*

Polc, P, 1988

Electrophysiology of benzodiazepine receptor ligands: multiple mechanisms and sites of action

Neurobiol.,31 (5),349-424.

*

Polc,P,Bonetti,EP,Pieri,L,Cumin,R,Angioi,RM,Möhler,H,Haefely,W,1981
Caffeine antagonises several central effects of diazepam
Life Sci.,28,2265-2275.

*

Putney,JW,1986
A model for receptor regulated calcium entry
Cell Calcium,7,1-12.

*

Raeymaekers,L,Jones,LR,1986
Evidence for the presence of phospholamban in the endoplasmic reticulum
of smooth muscle
Biochem. Biophys. Acta,882,258-265.

*

Rahwan,RG,Witiak,DT,1982
Calcium antagonists
Ed. American Chemical Society,Washington DC.

*

Rampe,D,Triggle,DJ,1986
Benzodiazepines and calcium channel function
Trends Pharmacol. Sci.,11,461-464.

*

Rampe,D,Triggle,DJ,1987
Benzodiazepine interactions at neuronal and smooth muscle Ca^{+2} channels
Eur. J. Pharmacol.,134,189-197.

*

Regan,JW,Roeske,WR,Yamamura,HI,1980
[³H] Flunitrazepam binding to bovine and the effect of GABA thereon
Neuropharmacology,19,413-414.

*

Regan,JW,Yamamura,HI,Yamada,S,Roeske,WK,1981
High affinity renal [³H]Flunitrazepam binding: characterization,localization
and alteration in hypertension
Life Sci.,28,991-998.

*

Richards,JC,Mölher,H,Haefely,W,1982
Benzodiazepine binding sites: receptors or acceptors?
Trends Pharmacol. Sci.,3,233.

*

Rivier,JR,Galyean,WR,Gray,A,Azimi-Zonooz,JM,McIntosh,LJ,Cruz,JM,
Olivera,BM,1987
Neuronal calcium channel inhibitors. Synthesis of omega-CgTx GVIA and
effects of ⁴⁵calcium uptake by synaptosomes
J. Biol. Chem.,262,1194.

*

Rosenthal,W,Hescheler,J,Hinsch,KD,Spicher,K,Trautwein,W,Shultz,G,1988
Cyclic AMP-independent, dual regulation of voltage-dependent calcium
currents by LHRH and somatostatin in a pituitary cell line
EMBO J.,7,1627-1633.

*

Ross,CA,Meldolesi,J,Milner,TA,Satoh,T,Supattapone,S,Snyder,SH,1989
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in
cerebellar Purkinje neurons
Nature,339,468-470.

*

Ruff,MR,Pert,CB,Weber,RJ,Wahl,LM,Paul,SM,1985
Benzodiazepine receptor mediated chemotaxis of human monocytes
Science,229,1281-1283.

*

Saida,K, Van Breemen,C,1984
Cyclic-AMP modulation of adrenoreceptor-mediated arterial smooth muscle
contraction
J. Gen. Physiol.,84,307-318.

*

Sanguinetti,MC,Kass,RS,1984
Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac
Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists
Circ. Res.,55,336-348.

*

Schoch,P,Richards,JG,Hring,P,Takacs,B,Sthli,C,Haefely,W,Mhler,H,1985
Co-localization of GABA a receptors and benzodiazepine receptors in the
brain shown by monoclonal antibodies

Nature,314,168-171.

*

Schofield,PR,Darlison,MG,Fujita,N,1987

Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand
gated receptor super-family

Nature,328,221-227.

*

Schramm,M,Towart,R,1985

Modulation of calcium channel function by drugs

Life Sci.,37,1843.

*

Schulz,S,Yuen,PST,Garbers,DL,1991

The expanding family of guanylyl cyclases

Trends Pharmacol. Sci.,12,114-120.

*

Schwaiger,M,Herzog,V,Neupert,W,1987

Characterization of translocation contact sites involved in the import of
mitochondrial proteins

J. Cell Biol.,105,235-246.

*

Seiler,SM,Arnold,AJ,Stanton,HC,1987

Inhibitors of inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release from isolated
platelet membrane vesicles

Biochem. Pharmacol.,36,3331-3337.

*

Selinger,Z,Minke,B,1988

Inositol lipid cascade of vision studied in mutant flies

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.,53,333-341.

*

Shah,J,Pant,HC,1988

Potassium-channel blockers inhibit trisphosphate-induced calcium release in
the microsomal fractions isolated from the rat brain

Biochem. J.,250,617-620.

*

Shangold,G,Murphy,S,Miller,R,1988

Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium transients in a single identified gonadotropes require both intracellular calcium mobilization and calcium influx

Proc. Natl. Acad. Sci. USA,85,6566-6570.

*

Shoemaker,H,Bliss,M,Yamamura,HI,1981

Specific high-affinity saturable binding of [³H]Ro 5-4864 to benzodiazepine binding site in rat cerebral cortex

Eur. J. Pharmacol.,71-173.

*

Shoemaker,HH,Boles,RG,Horst,WD,Yamamura,HI,1983

Specific high affinity binding sites for [³H]Ro 5-4864 to benzodiazepine binding sites in the rat brain and kidney

J. Pharmacol. Exp. Ther.,225,51-69.

*

Shoemaker,H,Morelli,M,Deshmukh,P,Yamamura,HI,1982

[³H]Ro 5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's disease basal ganglia

Brain Res.,248,369-401.

*

Shoyab,M,Gentry,LE,Marquandt,H,Todaro,GJ,1986

Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepine (endozepine) from bovine and human brain

J. Biol. Chem.,261,11968-11973.

*

Shultz,G,Rosenthal,W,Hescheler,J,Trautwein,W,1990

Role of G proteins in calcium channel modulation

Annu. Rev. Physiol.,52,275-292.

*

Shwartz,A,Taira,N,1983

Calcium channel blocking drugs: a novel intervention for the treatment of cardiovascular diseases

Cir. Res.,52(II),180.

*

Sibley,DR,Nambai,P,Peters,JR,Lefkowitz,A,1984

Phorbol diesters promote alpha-adrenergic receptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization in duck erythrocytes

Biochem. Biophys. Res. Commun.,121,973-979.

*

Sieghart,W,Karobath,M,1980

Molecular heterogeneity of benzodiazepine receptors

Nature,286,285-287.

*

Sieghart,W,Mayer,A,Drexler,G,1983

Properties of flunitrazepam binding to different benzodiazepine binding proteins

Eur. J. Pharmacol.,88,291-299.

*

Sigel,E,Barnard,EA,1984

A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex

J. Biol. Chem.,259,7219-723.

*

Skolnick,P,Paul,SM,1988

The benzodiazepine/GABA receptor chloride channel complex

ISI Atlas Sci. Pharmacol.,1,22.

*

Skowronski,R,Fanestil,DD,Beaumont,K,1988

Photoaffinity-labeling of peripheral-type benzodiazepine receptors in rat kidney mitochondria with [³H]PK 14105

Eur. J. Pharmacol.,148,182-193.

*

Smigel,MD,1986

Purification of the catalyst of adenylate cyclase

J. Biol. Chem.,261,1976-1982.

*

Smith,JS,Coronado,R,Meissner,G,1985

Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels

Nature,316,446-449.

*

Snaveley,MD,Insel,PA,1982

Characterization of α_1 -adrenergic receptors subtypes in rat renal cortex:differential regulation of α_1 and α_2 adrenergic receptors by guanilnucleotides and Na^+

Mol. Pharmacol.,22,532-546.

*

Sneddon,P,Westfall,DP,1984

Pharmacological evidence that adenosine trisphosphate and noradrenaline are co-transmitters in guinea pig vas deferens

J. Physiol. ,347,569-580.

*

Snyder,SH,Verma,A,Trifiletti,RR,1987

The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands

FASEB J.,1,282-288.

*

Speeding ,M,1987

Three types of Ca^{+2} channel explain discrepancies

Trends Pharmacol. Sci.,8(4),115-117.

*

Squires,RF,1983

Benzodiazepine receptor multiplicity

Neuropharmacology,22,1443-1450.

*

Squires,RF,Braestrup,C,1977

Benzodiazepine receptors in rat brain

Nature,266,732-734.

*

Steinberg,SF,Drugge,ED,Bilezikian,JP,Robinson,RB,1985

Acquisition by innervated cardiac myocytes of a pertussis toxin specific regulatory protein linked to the α_1 -receptors

Wash. DC,230,186-188,

*

Stephens,L,Hawkins,PT,Downes,CP,1989

Metabolic and structural evidence for the existence of a third species of polyphosphoinositide in cells: D-phosphatidyl-myo-inositol-3-phosphate
Biochem. J.,259,267-276.

*

Stephenson,FA,Watkins,AE,Olsen,RW,1982

Physico-chemical characterization of detergent-solubilized gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptor proteins from bovine brain

Eur. J. Biochem.,123,291-298.

*

Streb,H,Irvine,RF,Berridge,MJ,Shulz,I,69>3

Release of Ca^{+2} from non mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-trisphosphate
Nature,306,67-69.

*

Strittmatter,WJ,Hirata,F,Axelrod,J,Mallorga,P,Tallman,JF,Henneberry,RC,1979

Benzodiazepine and β -adrenergics ligands independently stimulate phospholipid methylation
Nature,282,857-859.

*

Strupish,J,Cooke,AM,Potter,BVL,Gigg,R,Nahorski,SR,1988

Stereospecific mobilization of intracellular calcium by inositol 1,4,5-trisphosphate
Biochem. J.,253,901-905.

*

Stull,JT,Kamm,KE,Taylor,DA,1988

Calcium control of smooth muscle contractility
Amer. J. Med. Sci.,31(10),241-245.

*

Suematsu,E,Hirata,M,Hashimoto,T,Kuriyama,H,1984

Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{+2} from intracellular store sites in

skinned single cells of porcine coronary artery

Biochem. Biophys. Res. Comm.,120,481-485.

*

Supattapone,S,Worley,PF,Baraban,JM,Snyder,SH,1988

Solubilization, purification and characterization of an inositoltrisphosphate receptor

J. Biol. Chem.,263,1530-1534.

*

Sutherland,EW,Rall,TW,1958

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles

J. Biol. Chem.,232,1077-1091.

*

Swedin,G,1971

Studies on neurotransmission mechanisms in the rat and guinea pig vas deferens

Acts Physiol. Scand.,83 (suppl. 369),34.

*

Taft,WC,DeLorenzo,RJ,1984

Micromolar-affinity benzodiazepine receptors regulate voltage-sensitive calcium channels in nerve terminal preparations

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,81,3118.

*

Takahashi,M,Ohizumi,Y,Yasumoto,T,1983

Maiotoxin, a Ca^{+2} channel activator candidate

J. Biol. Chem.,257,7283-7289.

*

Tallman,JF,Paul,SM,Skolnick,P,Gallager,DW,1980

Receptors for the age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines
Science,207,274.

*

Tallman,JF,Thomas,JW,Gallager,D,1978

GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity

Nature,274,383-385.

*

Tanabe,T,Takeshima,HH,Mikami,A,Flockerzi,V,Takahashi,H,1987

Primary structure of the receptor channel blockers from skeletal muscle
Nature,328,313-318.

*

Taylor,CW,Blakeley,DM,Corps,AN,Berridge,MJ,Brown,KD,1988

Effects of Pertussis toxin on growth factor-stimulated inositolphosphate
formation and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells
Biochem. J.,249,917-920.

*

Ticku,MK,1986

Convulsant binding sites on the benzodiazepine/GABA receptor
en,Receptor Biochemistry and Methodology, Olsen,RW,Venter,JC. Ed. Alan
R. Lis,New York,vol.5,195-207.

*

Trifiletti,RR,Verma,A,Snyder,SH,1986

Molecular identification of peripheral type benzodiazepine receptor
Neuroscience,Abstr. 12,666.

*

Triggle,DJ,Janis,RA,1987

Calcium channels ligands
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,27,347-469.

*

Tsien,RW,Bean,BP,Hess,P,Nowycky,MC,1983

Calcium channels: mechanism of β -adrenergic modulation and ion
permeation
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology,157,201-212.

*

Tsien,RW,Fox,AP,Hess,McCleskey,EW,Niulius,B,Nowycky,MC,Rosenberg,R
L,1987

Multiple types of calcium channel in excitable cells
en, Proteins of excitable cells. Society of General Physiologists Series,n^o
41,Hille,B,Fambrough,DM, Ed. Wiley-Interscience,New York,167-187.

*

Twort,C, Van Breemen,C,1988

Cyclic GMP-enhanced sequestration of Ca^{+2} by sarcoplasmic reticulum in

vascular smooth muscle

Circ. Res.,62,961-964.

*

Tulapaty,PDMV,Altura,BT,Altura,BM,1978

Ethanol reduces Ca^{+2} concentrations in arterial and venous smooth muscle
Experientia,35(5),639-640.

*

Uhing,RC,Prpic,V,Jiang,H,Exton,JH,1986

Hormone stimulated polyphosphoinositide breakdown in rat liver plasma
membranes: roles of guanine nucleotides and calcium
J. Biol. Chem.,261,2140-2146.

*

Unnerstall,JR,Kuhar,MJ,Niehoff,DL,Palacios,JE,1981

Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of
gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors: evidence from a quantitative
autoradiographic study

J. Pharmacol. Exp. Ther.,218,797-804.

*

Van Breemen,C,1965

Calcium distribution and exchange in rat uterus
report,PhD thesis,University of Alberta,115-120.

*

Van Breemen,C,1989

Cellular mechanisms regulating $[Ca^{+2}]$ in smooth muscle
Annu. Rev. Physiol.,51,315-329.

*

Van Breemen,C,Saida,K,Yamamoto,H,Hwang,K,Twort,C,1988

Vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. Function and mechanism
of Ca^{+2} release

Ann. NY Acad. Sci.,522,60-73.

*

Van Dongen,AMJ,Codina,J,Olate,J,1988

Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide
binding protein G_0

Science,242,1433-1437.

*

Verma,A,Nye,JS,Snyder,SH,1987

Porphirins are endogenous ligands for the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,84,2256-2260.

*

Verma,A,Snyder,SH,1989

Peripheral type benzodiazepine receptors

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,29,307-322.

*

Volpe,P,Krause,KH,Hashimoto,S,Zorzato,F,Pozzan,T,Meldolesi,J,Lew,DP,1988
Calciosome, a cytoplasmatic organelle: the IP₃ sensitive calcium store of non muscle cells?

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,85,1091-1095.

*

Von Tscherner,V,Prodhom,B,Baggiolini,M,Reuter,H,1986

Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration

Nature,324,369-372.

*

Wallace,MA,Fain,JN,1985

Guanosine 5'-O-thiotriphosphate stimulates phospholipase C activity in plasma membranes of rat hepatocytes

J. Biol. Chem.,260,9527-9530.

*

Wang,JKT,Morgan,JI,Spector,S,1984

Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,81,3770-3772.

*

Weissman,BA,Cott,J,Jackson,JA,Bolger,GT,Weber,KH,Horst,WD,Paul,SiM,Skolnick,P,1985

Peripheral-type binding siter for benzodiazepine in brain:relationship to the anticonvulsants actions of Ro 5-4864

J. Neurochem.,44,1494-1499.

*

Weissman,BA,Skolnick,P,Klein,DC,1984

Regulation of peripheral-type binding sites for benzodiazepines in the pineal gland.

Pharmacol. Biochem. Behav.,21,821-824.

*

Wei,XY,Luchowski,EM,Rutledge,A,Su,CM,Triggle,DJ,1986

A pharmacological and radioligand binding analysis of the actions of 1,4-dihidropyridine activator-antagonist pairs in smooth muscle

J. Pharmacol. Exp. Ther.,239,144-153.

*

Wei,XY,Triggle,DJ,1987

Comparative radioligand binding and pharmacological activities of the enantiomers of Bay K 8644 and other 1,4-dihidropiridines

proc,Symp. Calcium Antagonist,Pharmacol. Clin. Res. N.Y. Acad.Sci., New York,10-13.

*

Weir,SW,Weston,AH,1988

A comparison of the lanthanum and EGTA methods for measuring calcium influx into vascular smooth muscle cells

J. Pharmacol. Meth.,19,243-252.

*

Weiss,GB,1978

Calcium in drug action

Ed. Plenum Press,New York.

*

Weiss,GB,1981

New perspectives on calcium channel antagonists

Ed. American Physiology Society,Bethesda.

*

Whitman,M,Downes,CP,Keeler,M,Keller,T,Cantley,L,1988

Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositolphospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate

Nature,332,644-646.

*

Winegrad,S,1970

The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle

J. Gen. Physiol.,55,77-88.

*

Yamamoto,H, Van Breemen,C,1985

Inositol 1,4,5-trisphosphate releases calcium from skinned cultured smooth muscle cells

Biochem. Biophys. Res. Comm.,130,270-274.

*

Yanagibashi,K,Ohno,Y,Nakamichi,N,Matsui,T,Hayashida,K,Takamura,M,
Yamada,K,Tou,s,Kawamura,M,1989

Peripheral-type- benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria

J. Biochem.,106,1026-1029.

*

Yatani,A,Imoto,Y,Codina,J,Hamilton,SL,Brown,AM,Birnbaumer,L,1988

The stimulatory G protein of adenyl cyclase, Gs, directly stimulates dihydropyridine-sensitive skeletal muscle calcium channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase

J. Biol. Chem.,263,9887-9895.

*

Young,WS,Kuhar,MJ,1979

Autoradiographic localisation of benzodiazepine receptors in the brains of humans and animals

Nature,280,393-395.

*

Young,WS,Kuhar,MJ,1980

Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain

J. Pharmacol. Exper. Ther.,212,337-346.

*

Zavala,F,Lenfant,M,1987

Peripheral benzodiazepines enhance the respiratory burst of macrophage-like P388D1 cells stimulated by arachidonic acid

Int. J. Immunopharmacol.,9,269-274.