

K-9900

T-504

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
 FACULTAD DE FARMACIA  
 DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
 BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DE LA PROTEINA RECEPTORA GABA<sub>A</sub> EN  
 EL SISTEMA NERVIOSO DE LA RATA: EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
 SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
 en folio 201 número 155 del libro  
 correspondiente.

Sevilla, 18 DIC. 1992

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Alvaro Soffel*

Tesis que presenta el Ldo.  
 Diego Ruano Caballero  
 para optar al grado de Doctor  
 en Biología.

*Diego R.*

Sevilla, Diciembre de 1992.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

Tesis que presenta el Ldo. Diego Ruano Caballero para optar al grado  
de Doctor en Biología.

Fdo. Diego Ruano Caballero.

Director

Fdo. Dr. Alberto Machado  
de la Quintana

Director

Fdo. Dr. Javier Vitorica Ferrandez

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

FACULTAD DE FARMACIA

c/. Prof. García González, s/n.

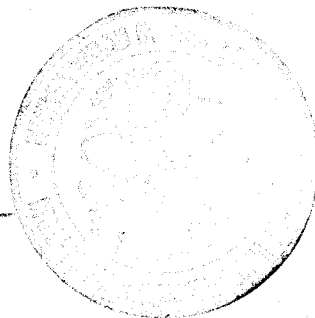
41012 - SEVILLA

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada " Caracterización farmacológica de la proteína receptora  $GABA_A$  en el sistema nervioso de la rata: efecto del envejecimiento.", presentada por el Ldo. DIEGO RUANO CABALLERO para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a  
17 de Abril de 1992.

Handwritten signature of Alberto Machado de la Quintana.



Fdo. Alberto Machado de la Quintana.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

FACULTAD DE FARMACIA

c/. Prof. García González, s/n.

41012 - SEVILLA

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRATICO NUMERARIO Y JAVIER VITORICA FERRANDEZ, PROFESOR TITULAR, DEL DPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada " Caracterización farmacológica de la proteina receptora GABA<sub>A</sub> en el sitema nervioso de la rata: efecto del envejecimiento.", presentada por el Ldo. DIEGO RUANO CABALLERO para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 17 de Abril de 1992.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', with a horizontal line extending to the right.

Edo. Alberto Machado de la Quintana

Edo. Javier Vitorica Ferrandez

## **SUMARIO**

## 1.- INTRODUCCION.

Página

1.1.- Alteraciones cognitivas producidas durante el proceso normal de envejecimiento.

1.2.- Implicación del sistema gabaérgico en los procesos de memoria y aprendizaje.

1.3.- Transmisión gabaérgica.

1.3.1.- Receptores de GABA.

1.3.1.1.- Receptores GABA<sub>B</sub>.

1.3.1.2.- Receptores GABA<sub>A</sub>.

1.3.1.2.1.- Moduladores de la transmisión gabaérgica.

1.3.1.2.2.- Heterogeneidad farmacológica.

1.3.1.2.3.- Heterogeneidad molecular.

## 2.- OBJETIVOS.

### 3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1.- Animales.

3.2.- Reactivos.

3.3.- Purificación del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas.

3.3.1.- Síntesis de la columna.

- 3.3.2.- Preparación del extracto.
- 3.4.- Obtención de anticuerpos policlonales.
- 3.5.- Preparación de membranas.
- 3.6.- Solubilizaciones.
- 3.7.- Inmunoprecipitaciones.
- 3.8.- Unión de radioligandos. "BINDING".
  - 3.8.1.- Condiciones de incubación.
  - 3.8.2.- Eliminación del exceso de ligando radiactivo.
    - 3.8.2.1.- Filtración.
    - 3.8.2.2.- Centrifugación.
- 3.9.- Caracterización farmacológica.
  - 3.9.1.- Experimentos de saturación.
  - 3.9.2.- Experimentos de competición.
  - 3.9.3.- Experimentos de dosis-respuesta. Alostereismo.
    - 3.9.3.1.- GABA/benzodiazepinas.
    - 3.9.3.2.- GABA/barbitúricos.
    - 3.9.3.3.- GABA/proconvulsivantes/barbitúricos.
- 3.10.- Fotomarcaje.
- 3.11.- Preparación de cortes de cerebro de rata.
- 3.12.- Unión de radioligandos en cortes de cerebro de rata.
  - 3.12.1.- Ensayos con [<sup>3</sup>H]zolpidem.
  - 3.12.2.- Ensayos con [<sup>3</sup>H]flumazenil.
- 3.13.- Otros métodos.
  - 3.13.1.- Proteínas.
  - 3.13.2.- Actividades enzimáticas.

3.13.3.- Geles de poliacrilamida con SDS.

3.13.4.- Fluorografía de geles con SDS.

3.14.- Análisis de datos.

#### 4.- RESULTADOS.

4.1.- Caracterización de las membranas obtenidas por diferentes métodos de homogeneización.

Efecto del envejecimiento.

4.2.- Caracterización farmacológica preliminar del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas.

#### HIPOCAMPO

4.3.- Caracterización farmacológica del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en hipocampo de rata.

Efecto del envejecimiento.

4.3.1.- Estudios de saturación.

4.3.2.- Interacciones alostéricas.

4.3.2.1.- GABA/barbitúricos.

4.3.2.2.- GABA/proconvulsivantes/barbitúricos.

4.3.2.3.- GABA/benzodiazepinas.

4.3.3.- Cuantificación de los diferentes sitios de unión de benzodiazepinas.

4.4.- Efecto del GABA sobre la unión de

[<sup>3</sup>H]flunitrazepam en distintas

regiones del sistema nervioso de la rata.



- 4.5.- Distribución de los diferentes sitios de unión de benzodiazepinas en distintas regiones del sistema nervioso de la rata.
- 4.6.- Estudio autorradiográfico de la distribución de los sitios de unión de benzodiazepinas con alta, media y baja afinidad para [<sup>3</sup>H]zolpidem.
- 4.7.- Efecto del GABA sobre los distintos sitios de unión de benzodiazepinas.
- 4.8.- Distribución de los diferentes péptidos del receptor de benzodiazepinas en distintas regiones del sistema nervioso de la rata.
- 4.9.- Cuantificación de los sitios de unión de benzodiazepinas con alta, media y baja afinidad para [<sup>3</sup>H]zolpidem en hipocampo de rata. Efecto del envejecimiento.
- 4.10.- Caracterización de la interacción alostérica entre el sitio de unión  $\omega_1$  y el receptor de GABA en varias regiones del cerebro de la rata.
- 4.10.1.- Caracterización por técnicas de unión de radioligandos en membranas.
- 4.10.2.- Caracterización por técnicas autorradiográficas.
- 4.11.- Caracterización farmacológica del receptor  $\omega_1$  en varias regiones del cerebro de la rata.
- 4.12.- Efecto del envejecimiento sobre el receptor

omega<sub>1</sub>/GABA en hipocampo de rata.

4.12.1.- Estudios de saturación.

4.12.1.1.- Caracterización por técnicas  
de unión de radioligandos en  
membranas.

4.12.1.2.- Caracterización autorradiográfica.

4.12.2.- Interacciones alostéricas.

4.13.- Caracterización inmunológica del receptor

GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en varias regiones  
del cerebro de la rata.

4.13.1.- Caracterización de los anticuerpos.

4.13.2.- Caracterización inmunológica.

4.13.2.1.- Monoclonal 62-3G1.

4.13.2.2.- Anticuerpo policlonal.

4.13.2.3.- Anticuerpo policlonal específico  
contra la subunidad gamma<sub>2</sub>.

4.14.- Cambios moleculares en el receptor

GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas durante el  
envejecimiento.

#### CORTEZA PREFRONTAL

4.15.- Cuantificación de los distintos sitios

de unión de benzodiazepinas con CL218.872.

Efecto del envejecimiento.

4.16.- Estudios de saturación de la unión de

[<sup>3</sup>H]muscimol en membranas de corteza prefrontal.

Efecto del envejecimiento.

4.17.- Efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam.

Efecto del envejecimiento.

## 5.- DISCUSION

5.1.- Caracterización farmacológica del receptor

GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en ratas controles

5.1.1.- Heterogeneidad farmacológica.

5.1.2.- Interacciones alostéricas.

5.1.3.- Receptor benzodiazepínico omega<sub>1</sub>.

5.2.- Efecto del envejecimiento.

5.2.1.- Corteza prefrontal.

5.2.2.- Hipocampo.

5.3.- Posibles causas y repercusiones fisiológicas.

## 6.- CONCLUSIONES

## 7.- BIBLIOGRAFIA

## **INTRODUCCION**

## 1. ALTERACIONES PRODUCIDAS DURANTE EL PROCESO NORMAL DE ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento lleva asociado la alteración de algunas facultades motoras, sensoriales y cognitivas, alcanzando su mayor grado en la demencia, que está caracterizada por una cierta desorientación y un profundo deterioro intelectual (Dunnett S.,1991). De entre todas las alteraciones debidas al envejecimiento, una de las más comunmente observadas es la de las funciones cognitivas y la memoria, alteraciones que forman parte de la sintomatología de ciertas enfermedades seniles y en concreto de la enfermedad de Alzheimer.

En humanos, este tipo de alteraciones en funciones que requieren una plasticidad en el comportamiento del sistema nervioso, son relativamente selectivas, estando más acentuadas en los procesos de memoria de fijación o a corto plazo. Por el contrario, las funciones cognitivas bien establecidas como por ejemplo el vocabulario, no sufren alteraciones significativas (Landfield y col.,1986).

En los últimos años, una gran cantidad de estudios se han centrado sobre la causa y el tratamiento de la demencia senil y muy pocos han abordado el estudio de las alteraciones en las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento. Los resultados obtenidos a partir del estudio de la enfermedad de Alzheimer demostraron, entre otras alteraciones, una clara disfunción en el sistema colinérgico, lo que dio lugar a postular la hipótesis colinérgica de la disfunción cognitiva producida

durante el envejecimiento (Bartus y col.,1982) y a raíz de ahí, el sistema colinérgico cobró un papel importante, debido a la aparente correlación que existe entre el grado de disfunción colinérgica y el grado de alteración cognitiva en pacientes de Alzheimer.

Aunque existe un cierto paralelismo cualitativo entre la disfunción colinérgica que presentan los enfermos de Alzheimer y los individuos viejos, esta alteración es menos pronunciada en estos últimos. Así, mientras que la pérdida de neuronas colinérgicas durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es un hecho bien establecido dentro de la etiología de esta enfermedad (Collerton D.,1986; Giacobini E.,1988), esta pérdida a lo largo del proceso normal de envejecimiento es menos acusada (Giacobini E.,1988; Decker M.W.,1987). Esta misma diferencia la encontramos en marcadores como son las enzimas de síntesis de acetilcolina. Datos más contradictorios existen a cerca del número de receptores muscarínicos (Müller W.E. y col.,1991). Por el contrario, sí parece que la liberación de acetilcolina se encuentra disminuida a lo largo del envejecimiento y esto podría ser relevante funcionalmente y representar un mecanismo básico de la disfunción colinérgica asociada al envejecimiento (Müller W.E. y col.,1991).

Este tipo de resultados, en los que no se observa una clara relación entre las alteraciones producidas en los enfermos de Alzheimer y los individuos viejos, son los que han sugerido que la disfunción colinérgica no proporciona una base suficiente para explicar los déficits en las funciones cognitivas producidas por el envejecimiento.

## **2. IMPLICACION DEL SISTEMA GABAERGICO EN LOS PROCESOS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE.**

La profundización en el estudio del sistema colinérgico, como sistema neurotransmisor claramente afectado en la enfermedad de Alzheimer y en el proceso de envejecimiento, ha proporcionado resultados que apoyan cada vez más la idea de que el sistema colinérgico por si solo no proporciona una base fisiológica suficiente que explique el déficit cognitivo asociado al envejecimiento. Por ejemplo, una serie de resultados recientes indican que la lesión del núcleo basal de Meynert con quisquilato da lugar a una reducción de las aferencias colinérgicas a la corteza, mayor que la producida con ácido iboténico. Sin embargo, esta lesión origina déficits en la memoria menores que los ocasionados por el ácido iboténico (Fibiger H.C.,1991; Dunnett y col.,1987; Robbins y col.,1989; Wenk y col.,1989).

Este tipo de resultados hacen cuestionable una interpretación estricta de la hipótesis colinérgica y apuntan a considerar que la disfunción colinérgica tiene lugar dentro de un contexto en el que otros sistemas de neurotransmisores sufren modificaciones durante el proceso de envejecimiento. Por lo tanto, las alteraciones producidas en el sistema colinérgico durante el envejecimiento podrían interactuar con las producidas en otros sistemas de neurotransmisores y producir efectos aditivos o incluso sinérgicos sobre las funciones cognitivas.

Varios sistemas de neurotransmisores parecen tener un papel relevante en los procesos de memoria e interactuar con el sistema colinérgico.

co. Entre estos se incluyen; norepinefrina, dopamina, serotonina varios neuropéptidos y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Decker M.W. y Mcgaugh J.L.,1991).

Centrándonos en el sistema gabaérgico, los primeros datos que apuntaron hacia una modulación de la memoria por este sistema, provinieron del uso de la droga picrotoxinina, que actúa bloqueando la transmisión gabaérgica. Estos primeros estudios, indicaron que la memoria podía ser potenciada con la administración de picrotoxinina después del aprendizaje. (McGangh,1989). Posteriores estudios generalizaron este efecto en el sentido de que tanto la administración sistémica de antagonistas del GABA, como la aplicación de éstos directamente en la amígdala, aumentaban la retención (Brioni y McGaugh,1988; Brioni y col.,1989). Por el contrario, la administración por cualquiera de los dos sistemas anteriores de GABA y sus agonistas, empeora la retención (Castellano y col.,1989). Descubrimientos tales como estos, son los que han sugerido que el sistema gabaérgico desempeña un papel importante en el proceso de la memoria.

Estudios posteriores, (Izquierdo y col.,1991), han revelado que en ciertas formas de aprendizaje se liberan compuestos endógenos en el septum, la amígdala y el hipocampo, que disminuyen la retención y actúan a través del receptor  $GABA_A$ /benzodiazepinas, puesto que su acción es evitada si se microinyecta el antagonista flumacénil en estas regiones.

En resumen, todos estos resultados vienen a indicarnos que la activación del sistema gabaérgico, bien directamente o por la acción de moduladores positivos, artificiales o endógenos, conlleva una disminu-



ción en los procesos de retención memorística y mayor dificultad en el proceso de aprendizaje. Por el contrario, la inhibición o el bloqueo de este sistema neurotransmisor, por cualquier método, produce una mejora en el proceso de aprendizaje y una mayor retención memorística.

Todos estos resultados resaltan la importancia del sistema gabaérgico en los procesos de aprendizaje y memoria, pero no dicen nada acerca del mecanismo de acción. Es decir, ¿modula directamente el sistema gabaérgico, positiva o negativamente, el proceso de aprendizaje y memoria; lo hace modulando a otros sistemas de neurotransmisores como por ejemplo el colinérgico, o es una combinación de ambos métodos ?.

En este sentido, se conocen interacciones entre los sistemas gabaérgicos y colinérgicos, que pueden ser importantes en las funciones cognitivas. También existen evidencias de que el GABA puede afectar a estas funciones a través de sus efectos sobre la función colinérgica (ver Decker M.W. y Mcgaugh J.L.,1991 y referencias).

A nivel celular, existen evidencias de que el sistema gabaérgico puede modular la transmisión sináptica que se ha propuesto como modelo a través del cual puede operar la memoria y el aprendizaje. En 1973 Bliss y colaboradores, describieron que la estimulación de la vía perforante con un pulso breve de alta frecuencia, producía un aumento de la transmisión sináptica en el giro dentado. Este incremento podía mantenerse desde horas hasta semanas. (Bliss y Lomo,1973; Bliss y Gardner-Medwin, 1973). Este fenómeno de plasticidad sináptica, conocido como potenciación a largo plazo ("Long term potentiation", LTP) y descrito en hipo-

campo es el mecanismo que intenta explicar el proceso de memoria y aprendizaje a nivel celular.

Aunque el mecanismo molecular de este fenómeno de plasticidad sináptica se desconoce, se ha llegado a diferenciar dos fases: una primera de inducción y otra de mantenimiento (Bliss y Lynch, 1988; Nicoll y col.,1988). Se sabe que la fase de inducción requiere la activación de los receptores para glutamato tipo NMDA, que originan un influjo de calcio en el terminal postsináptico, así como de la activación de la PKC y la  $Ca^{++}$  calmodulina quinasa II (Kenedy M.B.,1989). Por otro lado la fase de mantenimiento parece depender de una combinación de un incremento de la liberación de neurotransmisor junto con una mayor sensibilidad de los receptores para quisquilato y kainato (Kenedy M.B.,1989).

Datos más recientes implican a los receptores  $GABA_B$  en la fase de inducción ( Mott y col.,1991). También la activación, no dependiente de  $Ca^{++}$ , de la PKC desempeña un papel importante en la fase de mantenimiento de la LTP (Klann y col.,1991).

Los receptores  $GABA_A$  juegan un papel muy importante en la fase de inducción en el sentido, de que la inhibición ejercida por ellos modula la despolarización llevada a cabo por el tren de estímulos de alta frecuencia que puede dar lugar a la formación de una LTP. Cuando los receptores  $GABA_A$  son bloqueados con el antagonista picrotoxina, la inhibición ejercida por este neurotransmisor disminuye, estimulándose la despolarización del terminal postsináptico y facilitando la inducción de la LTP (Wigstrom y col.,1983).

### 3. TRANSMISION GABAERGICA.

El ácido gamma-aminobutírico (GABA), es el neurotransmisor inhibitorio más importante dentro del sistema nervioso central. Se calcula que entre un 30-40% de las sinapsis que ocurren en el cerebro, están mediadas por este neurotransmisor (Turner y Whittle,1983).

Su síntesis se realiza a partir del aminoácido glutamato por la acción de la enzima citoplasmática, descarboxilasa del ácido glutámico (EC 4.1.1.15), la cual ha resultado ser un buen marcador inmunocitoquímico de las neuronas gabaérgicas (Turner y Whittle,1983).

#### 3.1 Receptores de GABA.

El GABA presenta dentro del cerebro, al menos, dos tipos de receptores, llamados receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Turner y Whittle,1983; Sieghart y col.,1989). Ambos receptores se encuentran colocalizados dentro del cerebro aunque pueden ser diferenciados a nivel de composición peptídica, farmacológico, de regulación, de sistemas efectores, etc.

##### 3.1.1 Receptores GABA<sub>B</sub>.

Los receptores GABA<sub>B</sub> se caracterizan farmacológicamente por ser activados por GABA y (-)baclofen, e inhibidos por flaclofen (Dutar y Nicoll.,1988). A diferencia de los receptores GABA<sub>A</sub>, que se hallan asociados a canal iónico, éstos están acoplados a canales de Ca<sup>++</sup> en el

ganglio de la raiz dorsal (Dolphin y Scott,1987; Holz y col.,1986) y a canales de  $K^+$  en las células piramidales del hipocampo ( Andrade y col.,1986; Dutar y Nicoll,1988). La acción del GABA a través de estos receptores se propaga por medio de sistemas de segundos mensajeros, y en concreto a través de proteínas G asociadas a ellos, produciendo la despolarización de la neurona (Bormann, 1988).

Los estudios de hidrofobicidad de la secuencia primaria de esta proteína receptora, indican la presencia de siete posibles segmentos transmembrana, con un bucle citoplasmático donde teóricamente interacciona con la proteína G (Ref.). Este tipo de organización es característica de las proteínas receptoras asociadas a sistemas de segundos mensajeros, las cuales están incluidas dentro del grupo de los receptores metabotrópicos.

En cuanto a la fisiología de estos receptores, parecen estar implicados en la regulación presináptica de la liberación de neurotransmisores (Hill y Bowery.,1981). Datos más recientes indican que desempeñan un papel importante en la fase de inducción de la LTP (Mott y col.,1991) y como moduladores de la función de los receptores  $GABA_A$  en cerebelo (Hahner y col.,1991) donde están altamente expresados (Wilkin y col.,1981).

### 3.1.2 Receptores $GABA_A$ .

Los receptores  $GABA_A$ , son proteínas transmembrana que son activados por GABA y su agonista muscimol, e inhibidos competitivamente por bicuculina y no competitivamente por picrotoxinina (Bormann.,1988). El

receptor  $\text{GABA}_A$  forma parte de una familia de receptores asociados a canal iónico modulados por ligandos (Olsen y Venter.,1986; Schofield y col.,1987), dentro de la cual se incluyen el receptor nicotínico de acetilcolina, el receptor de la glicina y el receptor del glutamato. Estas proteínas de membranas están incluidas dentro del grupo de los receptores ionotrópicos y comparten unas características estructurales como son:

i) Ser complejos heterooligoméricos constituidos por varias subunidades diferentes, que pueden agruparse formando estructuras pentaméricas, como se ha propuesto por semejanza con el receptor de acetilcolina muscular (Olsen y Tobin.,1990).

ii) Presentan un canal iónico delimitado por las diferentes subunidades, con permeabilidad para distintos iones.

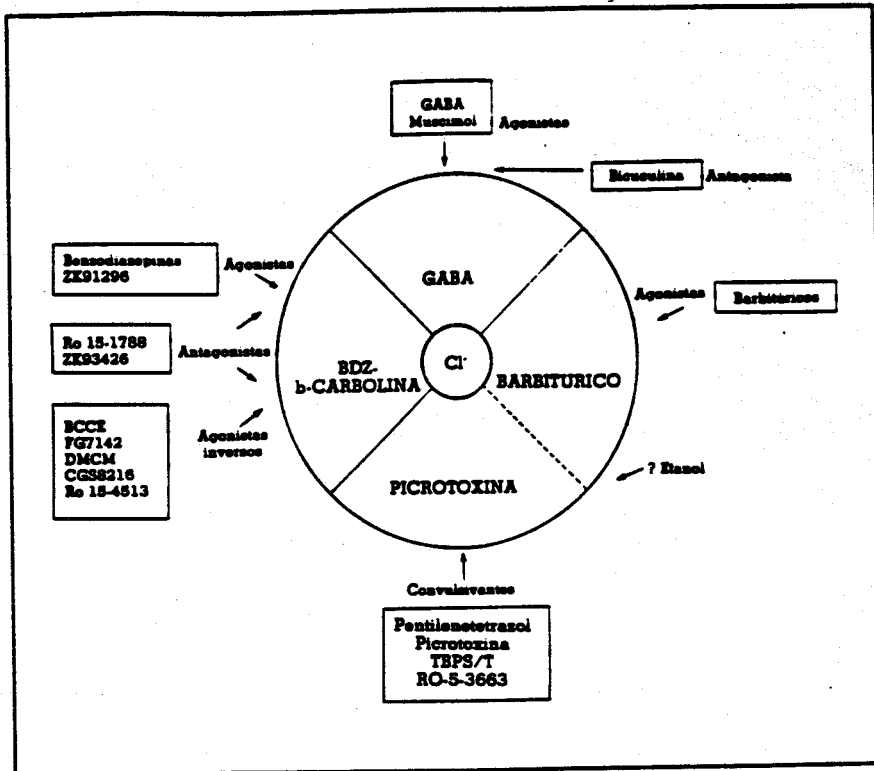
iii) Presentan sitios de unión para compuestos que modulan la transmisión sináptica.

El receptor  $\text{GABA}_A$  es una proteína de membrana, que delimita un canal iónico con permeabilidad selectiva para iones  $\text{Cl}^-$ . Estos iones atraviesan la membrana plasmática de la neurona, hiperpolarizando el terminal postsináptico, cuando el GABA se une a su proteína receptora (Tallman y Gallager.,1985; Mathers,1987).

### 3.1.2.1 Moduladores de la transmisión gabaérgica.

Dentro de este complejo receptor se encuentran sitios de unión para, al menos, tres tipos de drogas clínicamente importantes (Olsen, 1982; Tallman y Gallager, 1985). Estas drogas son usadas en clínica como agentes antiepilépticos, ansiolíticos, relajantes musculares, anestésicos e hipnóticos, e incluyen a las benzodiazepinas, como diazepam, lorazepam y flunitrazepam, barbitúricos, como el fenobarbital, convulsivantes, como la picrotoxina y el t-butilbiciclofosforotionato (TBPS), beta-carbolinas como el metil-4-etil-6,7-dimetoxi-beta-carbolina (DMCM), alcohol y ciertos metabolitos de las hormonas esteroideas como el 3-alfa-hidroxi-5-alfa pregnano-20-ona (Burt y col., 1991 y referencias).

Todos estos compuestos actúan modulando positiva o negativamente la transmisión gabaérgica. Además existe una modulación recíproca entre todos los sitios de unión, lo que hace muy complejo el estudio del comportamiento farmacológico de esta proteína receptora. De entre todas las interacciones entre los distintos sitios de unión dentro de esta proteína receptora, la modulación ejercida por las benzodiazepinas y los barbitúricos son las de mayor interés para nosotros. Ambas drogas actúan como moduladores positivos aunque su modo de acción es diferente. Los resultados electrofisiológicos, han puesto de manifiesto que las benzodiazepinas producen un incremento en la frecuencia de apertura del canal de cloruro, y los barbitúricos producen un incremento en el tiempo medio de apertura del canal para iones cloruro facilitando así la transmisión sináptica (Study y col., 1981).



Otro grupo de compuestos que modulan positivamente la transmisión gabaérgica y que no han sido mencionados anteriormente son, la triazolopiridacina CL218.872, la imidazopiridina zolpidem y el alpidem. Estas drogas son compuestos no benzodiazepínicos que se unen al sitio de unión de las benzodiazepinas localizado dentro de esta proteína receptora y tienen la capacidad de discriminar entre varios sitios de unión.

### 3.1.2.2 Heterogeneidad farmacológica.

Como hemos descrito anteriormente, dentro del receptor GABA<sub>A</sub> existen sitios de unión para las benzodiazepinas. Gracias a la utilización de compuestos no benzodiazepínicos como CL218.872, zolpidem y beta-carbolinas, entre otros, que se unen a estos sitios, y otros benzodiazepínicos como el quazepam, se han podido distinguir varios sitios de unión de benzodiazepinas en función de la afinidad diferencial que presentan por estos compuestos.

La triazolopiridacina CL218.872, fue el primer compuesto que pudo distinguir entre dos sitios de unión para benzodiazepinas en función de su afinidad (Squieres y col.,1979; Klepner y col.,1979; Sieghart y col.,1983). Estos resultados sugerían que la triazolopiridacina se une al mismo sitio de unión que las benzodiazepinas, pero con afinidades diferentes para dos poblaciones de sitios de unión, los cuales no son distinguibles utilizando como ligandos compuestos benzodiazepínicos. Los análisis de las curvas de desplazamiento, indicaron dos afinidades para la triazolopiridacina CL218.872 y permitió distinguir dos sitios de unión. Aquellos en los que el [<sup>3</sup>H]flunitrazepam es desplazado por bajas



concentraciones de CL218.872 (rango 0.1  $\mu$ M), se denominan sitios 1. tipo I. ó BZD1, y aquellos no desplazados por bajas concentraciones de CL218.872 y si por concentraiones del rango 1-2  $\mu$ M, se denominan sitios 2. tipo II. ó BZD2.

Ambos sitios de unión presentan heterogeneidad regional dentro del sistema nervioso, encontrándose zonas ricas en tipo I como cerebelo (Klepner y col.,1979; Sieghart y col.,1983; Sato y Neale,1989), zonas ricas en tipo II como médula espinal (Villiger.1984; Santi y col.,1988), hipocampo (Sieghart y col.,1987) y corteza neonatal (Vitorica y col.,1990; Garret y Tabakoff,1985; Eichinger y Sieghart,1986), y zonas tipo I/tipo II como corteza cerebral adulta (Klepner y col.,1979; Lippa y col.,1981; Sato y Neale,1989).

Asímismo una diferencial ontogenia ha sido demostrada para estos dos sitios de unión (Lippa y col.,1981; Vitorica y col.,1990).

Este mismo patrón de distribución puede ser obtenido con otros compuestos como las beta carbolinas (Braestrup y col.,1980), la benzodiazepina quazepam (Sieghart,1983) y la imidazopiridina zolpidem (Arbilla y col.,1986; Niddam y col.,1987; Benavides y col.,1988). Este último compuesto ha sido utilizado para proponer una nueva nomenclatura para los sitios de unión de benzodiazepinas (Langer y Arbilla,1988; Langer y Arbilla,1989). Con esta nueva nomenclatura, los sitios de unión denominados tipo I, se designan como omega<sub>1</sub> y los sitios de unión tipo II, se designan como omega<sub>2</sub>. El sitio de unión periférico, para benzodiazepinas (Schoemaker y col.,1982; Marangos y col.,1982) es designado como omega<sub>3</sub>

---

Clasificación de los receptores benzodiazepínicos del S.N.C.

<u>LIGANDO</u>	<u>RECEPTORES</u>	<u>AFINIDAD</u>
<b><u>CL218.872</u></b>		
Receptores nativos:	Tipo I, BZD1	0.1 $\mu$ M
	Tipo II, BZD2	1-2 $\mu$ M
Receptores artificiales:	alfa <sub>1</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	0.12 $\mu$ M
	alfa <sub>2</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	1.8 $\mu$ M
	alfa <sub>3</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ M
	alfa <sub>5</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	0.49 $\mu$ M
<b><u>Zolpiden</u></b>		
Receptores nativos:	omega <sub>1</sub> = Tipo I	10 nM
	omega <sub>2</sub> = Tipo II	200-300 nM
Receptores artificiales:	alfa <sub>1</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	0.02 $\mu$ M
	alfa <sub>2</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	0.45 $\mu$ M
	alfa <sub>3</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	0.40 $\mu$ M
	alfa <sub>5</sub> , beta <sub>3</sub> , gamma <sub>2</sub>	> 15 $\mu$ M

---

con esta nueva nomenclatura.

### 3.1.2.3 Heterogeneidad molecular.

Como hemos descrito anteriormente, una de las características compartidas por las proteínas receptoras asociadas a canal iónico, como es el caso del receptor GABA<sub>A</sub>, es que están constituidas por varias subunidades protéicas. El receptor GABA<sub>A</sub>, de varias especies de mamíferos, ha sido purificado por cromatografía de afinidad, utilizando una benzodiazepina unida covalentemente a un soporte sólido (Sigel y col.,1983; Sigel y Barnard,1984; Kirkness y Turner,1986; Schoch y Möhler,1983; Martini y col.,1983).

El producto de la purificación por cromatografía de afinidad, analizado en geles de SDS/PAGE, dio como resultado dos proteínas mayoritarias, ambas glicosiladas, que fueron llamadas subunidad alfa, de peso molecular aparente 51-53 Kd, y subunidad beta, de peso molecular aparente 55-57 Kd (Sigel y col.,1983; Sigel y Barnard, 1984; Sato y Neale,1987; Kirkness y Turner,1986). Un tetrámero heterólogo, de estequiometría alfa<sub>2</sub>/beta<sub>2</sub> fue propuesto (Mamalaki y col.,1987).

Por técnicas de fotomarcaje se pudo determinar, que la subunidad alfa es la portadora del sitio de unión de los agonistas y antagonistas de las benzodiazepinas (Stephenson y col.,1986; Park y de Blas.,1990) y la subunidad beta la portadora del sitio de unión del GABA y sus agonistas (Casalotti y col.,1986; Deng y col.,1986; Park y de Blas.,1990). Asimismo, se puso de manifiesto la variación regional de diferentes subunidades que eran fotomarcadas por [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, lo que ponía de

manifiesto un cierto grado de heterogeneidad en el receptor de benzodiazepinas (Sieghart y Drexler,1983; Tallman,1986).

La determinación y análisis de la secuencia primaria de ambas subunidades a partir de los correspondientes cDNAs, permitió proponer un modelo teórico de la organización de estas subunidades dentro de la membrana plasmática (Schofield y col.,1987; Stephenson,1988 y referencias). Ambas subunidades comparten dominios estructurales que también son comunes a la subunidad alfa del receptor de la glicina y de la acetilcolina (Stephenson,1988 y referencias). Entre los dominios estructurales más importantes cabe destacar, la presencia de cuatro dominios transmembrana, llamados M1-M4, con un gran bucle citoplasmático entre los dominios M3-M4, donde se encuentran secuencias consenso para fosforilación por proteínas quinasas. Estas secuencias consensos para fosforilación están descritas en todas las subunidades beta, para PKA, y gamma, para tirosina quinasas y PKC (Swope y col.,1992) . Asimismo, es importante reseñar la situación extracelular del extremo amino terminal con posibles sitios de glicosilación. También se hallan dos restos de cisteína que pueden formar un puente disulfuro, de gran importancia para el mantenimiento de la estructura terciaria y la unión de los diferentes ligandos (Schofield y col.,1987; Stephenson,1988 y referencias; Olsen y Tobin,1990 y referencias).

La aplicación de las técnicas de biología molecular al campo de las proteínas receptoras, y en concreto al receptor GABA<sub>A</sub> puso de manifiesto la presencia de numerosas subunidades que forman parte de esta proteína receptora. Actualmente existen clonadas 15 subunidades difer-

entes, agrupadas en seis familias distintas:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta_1$  y  $\rho_{1-2}$  (Burt y col.,1991; Olsen y Tobin,1990). El estudio de la secuencia primaria de cada subunidad ha puesto de manifiesto la presencia de un alto grado de homología entre las diferentes isoformas, 70-80%, siendo esta menor entre subunidades de distintos grupos, 30-40% (Burt y col.,1991; Olsen y Tobin,1990).

Esta gran cantidad de subunidades clonadas, da idea de la heterogeneidad potencial de esta proteína receptora y pone de manifiesto que la heterogeneidad molecular potencial es mucho mayor que la heterogeneidad farmacológica. También permite postular que el amplio abanico de efectos producidos por drogas de gran aplicación en clínica, como las benzodiazepinas, pueden estar mediadas por receptores compuestos por diferentes combinaciones de subunidades y distinta localización dentro del cerebro. En este sentido ha sido postulado en función de la localización de los sitios de unión para benzodiazepinas  $\omega_1$  y  $\omega_2$  dentro del cerebro, que los sitios  $\omega_1$ , localizados mayoritariamente en la corteza sensorimotora, mediarían los efectos hipnoticos/sedativos, mientras que los sitios  $\omega_2$ , localizados mayoritariamente en el sistema límbico y la médula espinal, mediarían los efectos miorelajantes y anticonvulsivantes (Benavides y col.,1991).

La utilización de sistemas heterólogos de expresión de subunidades, ha proporcionado una gran herramienta, junto con las técnicas electrofisiológicas, para la caracterización farmacológica de receptores contruidos artificialmente. Estos receptores tienen una composición molecular conocida, lo que ha permitido una cierta aproximación al conocimiento de las relaciones entre la estructura y el comportamiento

TABLE 1. *Known subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor*

	Amino acids (+ signal) in rat	Sites for N-linked glycosylation	Message size (rat/mouse) in kilobases	Selected properties (Note: kinase sites are only potential)
<i>Affect benzodiazepine pharmacology, affinity for GABA</i>				
Alpha				
$\alpha_1$	428 (+ 27)	2	4.2, 3.8	Most abundant mRNA, associated with type I benzodiazepine pharmacology. High in cerebellar granule cells.
$\alpha_2$	423 (+ 28)	3	3.0	Loci include Bergmann glia of cerebellum.
$\alpha_3$	465 (+ 28)	4	4.2	Less conserved among species than most. Only in forebrain.
$\alpha_4$	521 (+ 35) (bovine)	3	4.0 (bovine)	Largest subunit. Very low or absent in rat and mouse.
$\alpha_5$	433 (+ 31)	4	2.8	Associated with unusual type II benzodiazepine pharmacology. Contributes positive cooperativity. Has three protein kinase C sites. Has been termed $\alpha_4$ (25, 39).
$\alpha_6$	434 (+ 19)	3	3.2	Found only in cerebellar granule cells. Selective for Ro 15-4513. Has two protein kinase C sites and a protein kinase A site.
<i>Needed for efficient assembly. Affect GABA affinity. Each has single protein kinase A site.</i>				
Beta				
$\beta_1$	449 (+ 25)	3	12	Usually gives higher GABA affinity than $\beta_2$ . mRNA less abundant than $\beta_2$ and $\beta_3$ .
$\beta_2$	450 (+ 24)	3	8	mRNA is more abundant than $\beta_3$ .
$\beta_3$	448 (+ 25)	3	6.0, 2.5	Has been termed $\beta_2$ (23).
$\beta_4$	459 (+ 25)	4	—	Alternative splicing by use of two splice donor sites.
$\beta_4'$	463 by alt. spl. (chicken)			
<i>Enable benzodiazepine binding</i>				
Gamma				
$\gamma_1$	430 (+ 35)	3	3.8	Contributes atypical benzodiazepine response. Has tyrosine kinase site.
$\gamma_{2S}$	428 (+ 38)	3	4.2, 2.8	Contributes typical benzodiazepine sensitivity, Zn <sup>2+</sup> insensitivity.
$\gamma_{2L}$	436 by alternative splicing (miniexon)			Has tyrosine kinase site. Extra exon gives new protein kinase C site, affects ethanol interactions.
$\gamma_3$	450 (+ 17) (mouse)	2	—	Distribution similar to $\gamma_2$ , but less abundant.
Delta				
$\delta$	433 (+ 16)	2	2.0 pub. <sup>a</sup>	Found in benzodiazepine-insensitive receptors?
Rho				
$\rho_1$	458 (+ 15) (human)	3	3.9, 4.8, 3.1 (bovine)	Highest in retina. Has three protein kinase C sites.

farmacológico. Este abordaje experimental ha permitido conocer que la farmacología de los receptores de benzodiazepinas viene principalmente determinada por la subunidad alfa que esté presente, así como determinar a nivel molecular la farmacología tipo I/ $\omega_1$  y tipo II/ $\omega_2$  (Pritchett y col., 1989; Pritchett y Seeburg, 1990). En este sentido estos autores, han determinado que la farmacología tipo I/ $\omega_1$  está asociada con la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  y la farmacología tipo II/ $\omega_2$  con la expresión de las subunidades  $\alpha_2$  ó  $\alpha_3$  ó  $\alpha_5$ . Esta última subunidad da lugar a la formación, junto con las subunidades  $\beta_3$  y  $\gamma_2$ , de receptores con muy baja afinidad para la imidazopiridina zolpidem (Pritchett y Seeburg, 1990).

Por último con respecto a las subunidades alfa, es nombrar la existencia de otras dos subunidades,  $\alpha_4$  y  $\alpha_6$ , que no presentan sitios de unión de alta afinidad para los agonistas benzodiazepínicos, lo que ha limitado el estudio de su comportamiento farmacológico.

En cuanto a las subunidades gamma, se sabe que confieren sensibilidad a las benzodiazepinas y que son necesarias para la modulación alostérica entre el sitio de unión de GABA y el sitio de unión de benzodiazepinas. Asimismo está descrito que las diferentes subunidades gamma, confieren diferentes grados de sensibilidad sobre este efecto modulador (Puia y col., 1991; Puia y col., 1992; Ymer y col., 1990; Pritchett y col., 1989; Knoflach y col., 1991). También pueden actuar como centros reguladores por fosforilación, de la proteína receptora, debido a la presencia de secuencias consenso para fosforilación, como he descrito anteriormente. Además, recientemente se han encontrado dos formas difer-

entes de la subunidad  $\gamma_2$  que difieren en la inserción de 8 aminoácidos, localizados en el bucle citoplasmático entre las dos teóricas regiones transmembrana M3 y M4 (Whiting y col.,1990; Kofuji y col.,1991). Estos ocho aminoácidos contienen una secuencia consenso para fosforilación por PKC.

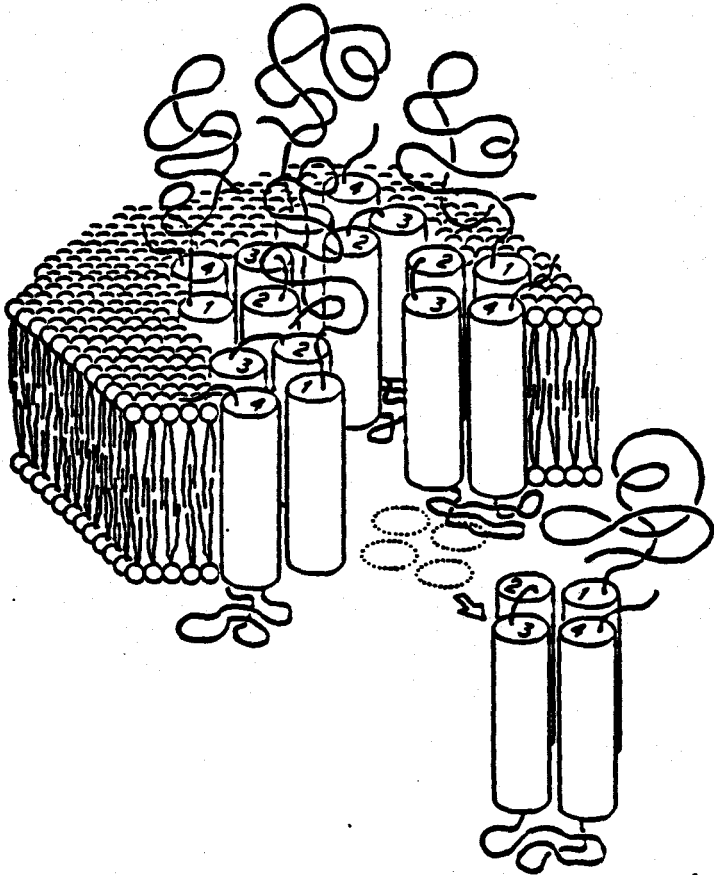
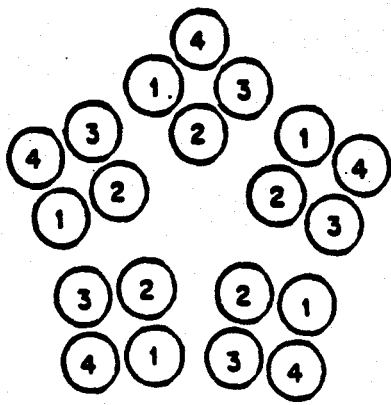
Por último, las subunidades beta, pueden desempeñar un papel muy importante en la regulación por fosforilación de la actividad de la proteína receptora, ya que aunque presenta secuencias consenso para fosforilación, al igual que las subunidades gamma, se ha demostrado con el receptor purificado fosforilación por PKA y PKC en subunidades beta (Kirkness y col.,1989; Browning y col.,1990).

Aunque la estequiometría de los receptores  $\text{GABA}_A$ , y la organización espacial de las diferentes subunidades para formar una proteína receptora, son desconocidas actualmente, se puede postular que la "proteína receptora básica", debe de contener al menos una subunidad alfa, otra beta y otra gamma. Este modelo se puede proponer en base a los resultados farmacológicos que han puesto de manifiesto, que todos los comportamientos farmacológicos descritos en los receptores nativos pueden ser reproducidos en receptores artificiales que contengan dicha combinación de subunidades (REF).

Los estudios de hibridaciones in situ, han permitido conocer la distribución regional y colocación de ciertas subunidades de esta proteína receptora. En este sentido, la proteína receptora básica más abundante podría estar compuesta por las subunidades  $\alpha_1/\beta_2, \beta_3/\gamma_2$ , que son las más expresadas y colocadas



dentro del cerebro.



## **MATERIALES Y METODOS**

## 1. ANIMALES.

Los animales utilizados fueron ratas machos de la raza Wistar nacidas en nuestro laboratorio. Las ratas fueron mantenidas en ciclos de luz y oscuridad (12h-12h) y a una temperatura de 20-25°C. Los animales tuvieron libre acceso a la comida (dieta de mantenimiento A.04 de Panlab S.L.) y agua. También se utilizaron ratas machos de la raza Fischer-344 suministradas por ( ).

Las ratas controles tenían una edad de 3-4 meses tanto Wistar como Fischer. Las viejas tenían 24-30 meses las de raza Wistar y 22-25 meses las de raza Fischer.

Para las inmunizaciones se utilizaron conejos albinos New Zealand suministrados por LETICA.

## 2. REACTIVOS.

Los ligandos marcados radiactivamente fueron suministrados por New England Nuclear con las siguientes actividades específicas: [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (86.6 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]muscimol (30.3 Ci/mmol) [<sup>3</sup>H]zolpidem (58.0 Ci/mmol) y [<sup>3</sup>H]flumazenil (Ro 15-1788) (75.2 Ci/mmol).

La triazolopiridazina CL218.872 fue suministrada por CYANAMID. La imidazopiridina zolpidem fue suministrada por SYNTHELABO. El resto de las benzodiazepinas utilizadas fueron suministradas por Hoffmann-La

Roche. El metil-6,7dimetoxi-4-etil-beta-carbolina-3-carboxilato (DMCM) fue suministrado por RBI. El ácido gamma-aminobutírico (GABA), pentobarbital y el resto de los reactivos fueron suministrados por Sigma.

Todos los compuestos se disolvieron en tampón o en etanol absoluto o en dimetil sulfoxido (DMSO). Cuando se utilizaron estos dos últimos compuestos, la concentración máxima de ellos no excedió del 0.005% (v/v) en el ensayo.

### 3. PURIFICACION DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepinas.

#### 3.1 Síntesis de la columna de afinidad.

La purificación del receptor de cerebro bovino se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad utilizando un agonista de las benzodiazepinas, Ro7-1986/01, unido covalentemente a agarosa, según describe Sigel y col.(1983). La columna fue sintetizada como se detalla a continuación. Se partió de 20 ml de dihidracida aminoadípica-agarosa (Sigma) que fueron lavados dos veces por decantación con agua destilada a 40C. El gel fue mezclado con una solución 1.2 M, (4.2g/20 ml) pH 5 de iodoacetato sódico, para dar un volumen final de 40 ml. A continuación, fue añadida una solución de carbodiimida ( 1g en 4 ml de agua destilada a 40C) en tres intervalos, entre los cuales, el pH fue ajustado a 5 con HCl. Tras la incubación de esta solución durante tres horas, en las cuales el pH es mantenido en 5 con HCl, el gel es lavado con 120 ml de agua destilada y posteriormente con 120 ml de carbonato sódico pH 9. A continuación el gel es incubado con 144 mg de Ro7-1986/01 disueltos en 20 ml de 100 mM carbonato sódico pH 9 (5% v/v de etanol) durante toda la

noche, a temperatura ambiente y con agitación. Los grupos libres se bloquean con beta-mercaptoetanol al 0.2% durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente la columna es empaquetada y lavada, a un flujo de 100 ml/h, con los siguientes medios antes de ser utilizada:

Medio A: 250 ml de 500 mM NaCl, 5 mM tris-HCl pH 7.4 - 7.5, 0.5 mM EDTA y 2% (p/v) tritón X-100.

Medio B: 250 ml de 6 M urea, 50 mM acetato sódico pH 5.5 y 1% (p/v) tritón X-100.

Medio C: 100 ml de 150 mM KCl, 5 mM tris-HCl pH 7.4 - 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1% (p/v) tritón X-100 y 0.02% azida sódica.

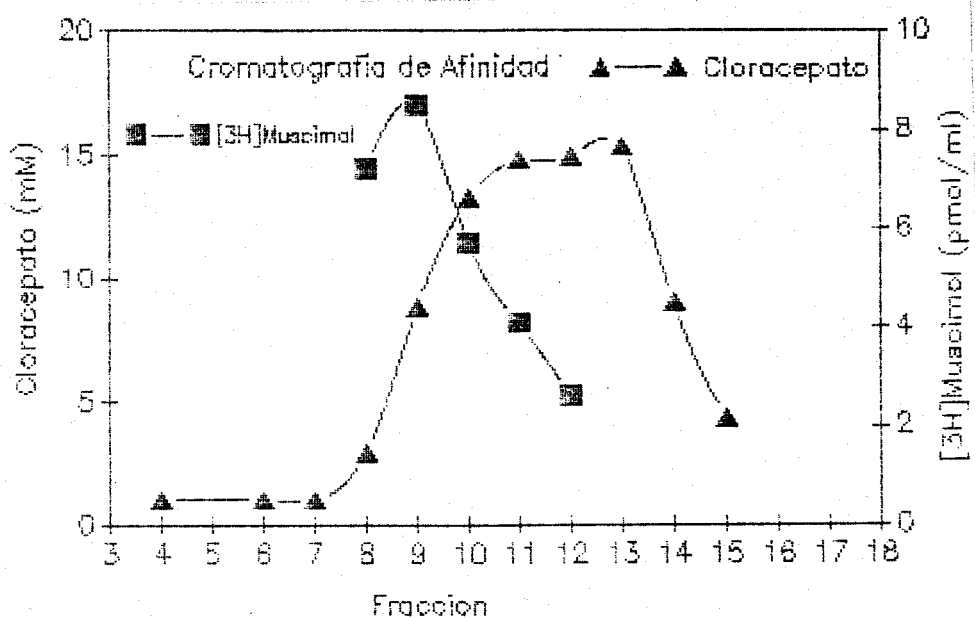
La columna se reconstituye después de cada ciclo de purificación realizando los lavados descritos anteriormente. Una misma columna puede ser empleada por periodos superiores a tres meses sin pérdida apreciable de su capacidad.

### 3.2 Preparación del extracto.

La purificación se realiza a partir de 100 g de corteza cerebral bovina (la cual ha sido desprovista de la materia blanca) que se homogeneizan en 10 volúmenes de 10 mM tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 300 mM sacarosa, 0.5 mM DTT, 1 mM benzamidina/HCl, 10 mg/l inhibidor de tripsina (tipo I) y 0.3 mM PMSF. Todos los pasos se realizaron a 40°C. El homogeneizado se centrifuga a 1,000xg, 15 min y el sobrenadante se

centrifuga a 27,000xg, 35 min. El sedimento de esta segunda centrifugación es resuspendido en el medio anterior, sin sacarosa ni PMSF, y es centrifugado a 27,000xg, 35 min. El sedimento resultante, fracción de membranas crudas, es resuspendido en 200 ml del mismo medio a una concentración aproximada de 15 mg de proteína/ml y se añade KCl hasta una concentración final de 150 mM. La solubilización del receptor se realizó mediante la adición, gota a gota, de deoxicolato sódico, hasta una concentración final de 0.5% (p/v), más 18 mg de bacitracina e incubación con agitación durante 45 min, a 42C, seguido por centrifugación a 100,000xg, 60 min. El sobrenadante de esta centrifugación, receptor solubilizado, es aplicado a la columna de afinidad, 40 ml de Ro7-1986/01- agarosa, a un flujo de 60 ml/h. La columna fue lavada toda la noche con 600 ml de 10 mM tampón fosfato potásico, pH 7.4, 200 mM KCl, 2 mM Mg acetato, 0.1 mM EGTA, 10% sacarosa y 0.2% Triton X-100 a un flujo de 40 ml/h. El receptor fue eluido con 10 mM clorazepato en 10 mM tampón fosfato potásico, pH 7.4, 2 mM Mg acetato, 10% sacarosa y 0.05% triton X-100 a un flujo de 20 ml/h y se recogieron fracciones de 5 ml. La actividad del receptor en las fracciones fue detectada por unión de [<sup>3</sup>H]muscimol 40 nM. En la figura 1, se muestra un perfil de elución representativo. Como se puede observar la actividad de unión de [<sup>3</sup>H]muscimol eluye en presencia de 10 mM del agonista de benzodiazepinas, clorazepato.

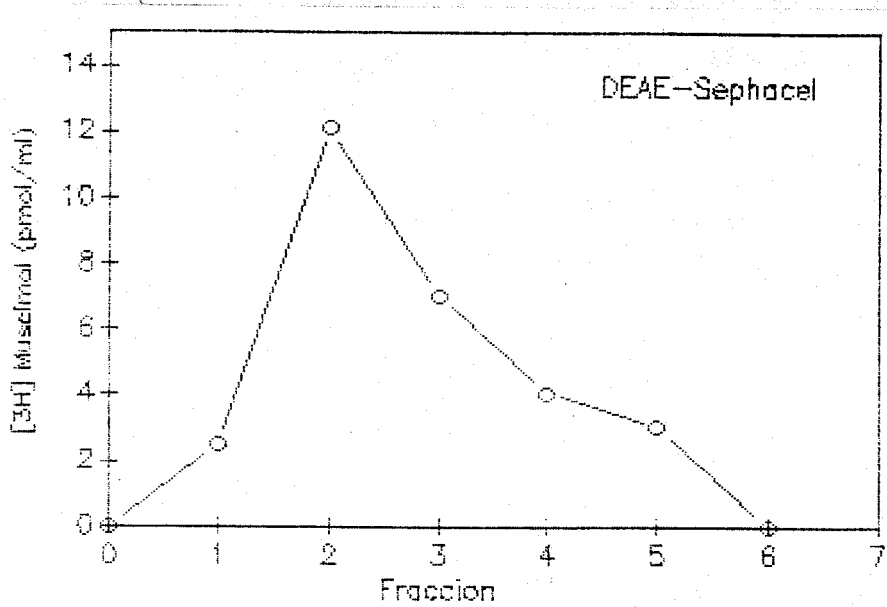
Con el fin de eliminar el clorazepato en el receptor purificado, las fracciones con actividad de unión de [<sup>3</sup>H]muscimol se unieron, ajustándose el pH a 6.5 con ácido fosfórico y el receptor purificado fue aplicado a una columna de DEAE-Sephacel (3 cm alto y 2 cm de diámetro).



**Figura 1:** Purificación del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas por cromatografía de afinidad utilizando el agonista Ro7-1986. Se representa un perfil representativo. La elución se realizó utilizando el agonista del receptor de benzodiazepinas, cloracepato.

Este paso además de limpiar el cloracepato consigue concentrar el receptor purificado en un factor de 10 veces aproximadamente. El receptor fue eluido a un flujo de 10 ml/h con 0.8 M KCl pH 6.5, recolectado en fracciones de 1 ml y el pH rápidamente ajustado a 7.5. Nuevamente la presencia del receptor se determinó mediante la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol 40 nM. En la figura 2, se muestra un perfil de elución representativo de los obtenidos de la columna de intercambio iónico en el que se puede ver que aproximadamente el 70% de la actividad de unión de la proteína purificada se encuentra en una sola fracción.





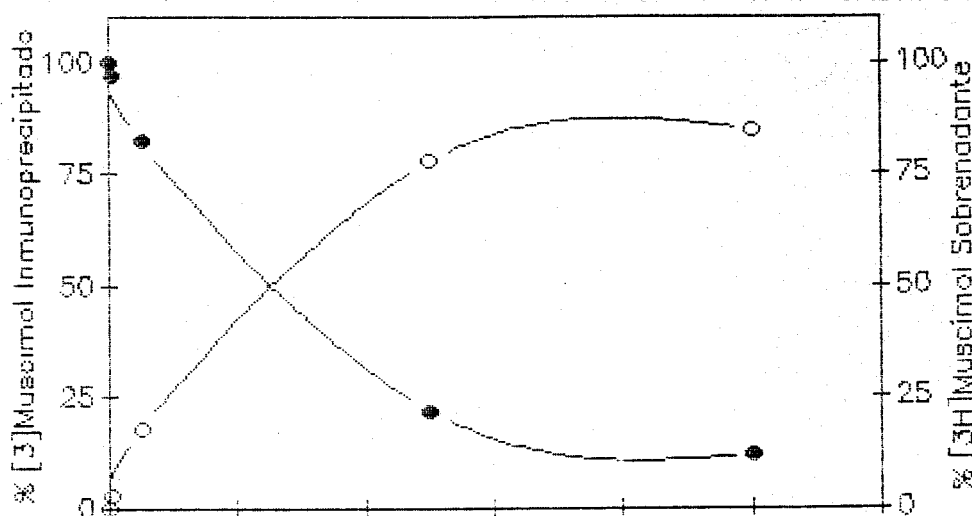
**Figura 2:** Purificación del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. Se representa un perfil representativo. La elución se realizó utilizando KCl 8 M.

#### 4. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

El receptor eluido de de la columna de intercambio iónico se dializa toda la noche a 40C en 2 litros de 10 mM tampón fosfato potásico pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.05% Tritón X-100 y 0.01% azida sódica para eliminar el KCl. El dializado se concentra por ultrafiltración a través de una membrana de triacetato de celulosa de corte nominal 10.000 (Sartorius). El concentrado, 3 ml, unos 100 µg de proteína aproximadamente, fue emulsionado con coadyuvante completo de Freund (1:1) e inyectado subcutáneamente en la parte dorsal a lo largo de la columna vertebral (10 pinchazos).

A los veinte días de la primera inmunización se inyectó nuevamente el mismo volumen de receptor en coadyuvante incompleto de Freund. El suero se obtuvo a los diez días de la última inmunización. Con anterioridad a la primera inmunización se obtuvo suero preinmune.

En la figura 3, se muestra la curva de inmunoprecipitación de la unión de 40 nM [ $^3\text{H}$ ]muscimol utilizando como antígeno el receptor purificado. Como se puede ver, el anticuerpo policlonal obtenido con este protocolo es capaz de inmunoprecipitar hasta un 80% del receptor purificado. Esta inmunoprecipitación de la actividad de unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol está acompañada por una disminución paralela de la actividad en el sobrenadante.



**Figura 3:** Inmunoprecipitación del receptor purificado GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas. La inmunoprecipitación se realizó utilizando el anticuerpo policlonal obtenido como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, y se determinó cuantificando los sitios de unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol en el precipitado ( ) y en el sobrenadante ( ).

## 5. PREPARACION DE MEMBRANAS.

Las diferentes regiones cerebrales se diseccionaron según el atlas de Paxinos y Watson (1986), congelándose rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se conservan a -80°C hasta su utilización. Este tiempo de conservación nunca fue superior a un mes.

Las membranas se prepararon siguiendo el método descrito por Mernoff y col., (1983) con algunas modificaciones. Para la homogeneización se utilizaron dos tipos de medios según el ligando a ensayar:

MEDIO A: Compuesto por 0.25 M sacarosa, 50 mM tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF. Este medio se utilizó para la obtención de membranas que iban a ser utilizadas para ensayar [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, [<sup>3</sup>H]flumazenil o [<sup>3</sup>H]zolpidem.

MEDIO B: Con la misma composición que el A pero sustituyendo el tris-HCl por 10 mM tampón fosfato potásico pH 7.4. Este medio se utilizó para la obtención de membranas que iban a ser utilizadas para ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]muscimol.

Los centros se homogeneizaron a 1/10 (p/v) por el método convencional, utilizando un homogeneizador de teflón-vidrio o alternatively, por sonicación 1/20 (p/v), en tubos de polycarbonato de ultracentrífuga (Beckman), dando dos pulsos de 30 segundos a 40 w y 4°C. Este

protocolo alternativo se utilizó en los casos de regiones pequeñas o cuando había limitación de muestra para evitar grandes pérdidas. Las condiciones de homogeneización fueron establecidas previamente. Estas condiciones maximizan la recuperación de actividad de unión, ver tabla 1.

---

Tabla 1. Porcentaje de recuperación de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en membranas obtenidas por ambos métodos de homogeneización.

<u>Método</u>	<u>% de recuperación de binding</u>
Poter-pistilo	74.5 ± 4.5%
Sonicación:	
2 pulsos	88.3 ± 5.2%
3 pulsos	90.8 ± 3.4%
4 pulsos	61.7 ± 6.2%

Los pulsos fueron de 30 - 40 vatios durante 30 segundos.

---

El homogeneizado obtenido por cualquiera de los dos métodos se centrifugó a 130,000 x g durante 30 min a 40°C y el sedimento se resuspendió en medio de lavado, de la misma composición que el de homogeneización pero sin sacarosa ni PMSF y se congelaron a -80°C durante 15-18h. Las membranas se descongelaron y se lavaron cuatro veces más en el mismo medio, se congelaron de nuevo a -80°C, 1 h, se lavaron una vez más y finalmente se resuspendieron en 50 mM tris-HCl, pH 7.4 ó en 140 mM KCl, 10 mM tampón fosfato potásico, pH 7.4, según el ligando que se fuera a ensayar, a una concentración final de 3-4 mg/ml de proteínas.

El gran número de lavados y los procesos de congelación /descongelación se realizan para eliminar el GABA endógeno que, o bien impediría la unión del [<sup>3</sup>H]muscimol (agonista del receptor del GABA), o bien, modularía positivamente la unión del resto de los ligandos excepto el [<sup>3</sup>H]flumazenil que es insensible a la modulación alostérica ejercida por el GABA.

Las membranas procedentes de la médula espinal se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo pero con la inclusión de un gradiente discontinuo (34 %, 28.5 % y 10 %, p/v) de sacarosa para eliminar la mielina, siguiendo el protocolo descrito por Jones y Matus, 1974.

## 6. SOLUBILIZACIONES.

La solubilización de esta proteína de membrana se realizó incubando las membranas de las diferentes regiones cerebrales con el medio de solubilización RIPA compuesto por 140 mM NaCl , 10 mM tris-HCl pH 7.6, 1% deoxicolato sódico, 1% tritón X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidina/HCl, 10 µg/ml inhibidor de tripsina y 10 µg/ml bacitracina a una concentración de proteínas de 4 mg/ml durante 1 h a 49C con agitación. Tras la incubación se centrifugaron las membranas a 130.000xg durante 1 h a 49C y se tomó el sobrenadante que correspondía al receptor solubilizado. Esta fracción es la que se utilizó para ensayar la unión de los diferentes radioligandos.

Con la utilización de este protocolo de solubilización conseguía-

mos solubilizar el  $80.5 \pm 9.4\%$  de los sitios de unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam. Este porcentaje de solubilización no lo conseguimos con otros detergentes como SDS, CHAPS, tritón X-100 etc. y la integridad farmacológica de la proteína receptora era la misma que la que se obtenía con alguno de los detergentes anteriores. Por esta razón utilizamos esta combinación de detergentes que permite un alto porcentaje de solubilización y un buen estado farmacológico de la proteína solubilizada.

## 7. INMUNOPRECIPITACIONES.

Las inmunoprecipitaciones se hicieron utilizando tres anticuerpos diferentes:

1) un anticuerpo policlonal obtenido en nuestro laboratorio según se describe en el apartado 4.

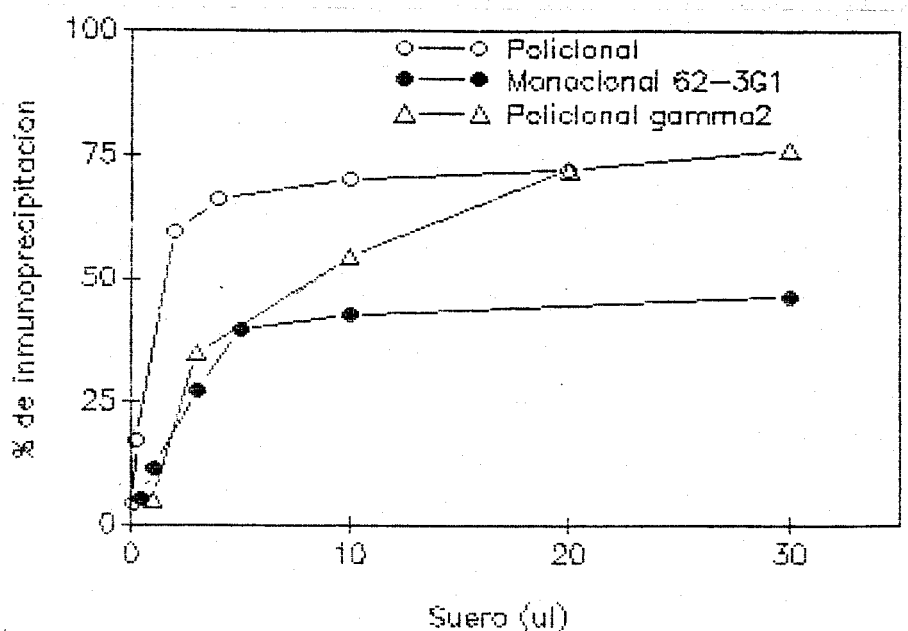
2) un anticuerpo policlonal específico contra la subunidad  $\gamma_2$  y obtenido contra una proteína de fusión, que incluía los ? aminoácidos que se hallan entre las dos teóricas regiones transmembranas M3 y M4 de la subunidad  $\gamma_2$  del receptor  $\text{GABA}_A$ /benzodiazepinas. Este anticuerpo fue obtenido en el laboratorio del Dr. de Blas y cedido por él.

3) un anticuerpo monoclonal, 62-3G1, obtenido contra el receptor purificado por cromatografía de afinidad de cerebro de vaca (Vitorica y col., 1988) y que reconoce específicamente a las subunidades  $\beta_2/\beta_3$  de esta proteína receptora (Ewert M. y col., 1992).

Los anticuerpos son previamente purificados utilizando 50  $\mu\text{l}$  de

una suspensión al 10% de proteína A-Sepharosa mediante incubación durante 4 h, a 40C y con agitación, con diferentes volúmenes del anticuerpo que se fuera a ensayar (7 µl de anticuerpo policlonal, 20 µl de anticuerpo policlonal anti  $\gamma_2$  y 25 µl de anticuerpo monoclonal 62-3G1). Estos volúmenes de anticuerpo representan condiciones de saturación para cada anticuerpo en relación con el volumen de receptor solubilizado que utilizamos, figura 4. Los anticuerpos unidos a la proteína A-Sepharosa son incubados en un volumen final de 300 µl de RIPA. Tras la incubación se lava el complejo anticuerpo-proteína A-Sepharose dos veces con el mismo medio y se añaden 250 - 300 µl de receptor solubilizado o de receptor fotomarcado y solubilizado, que corresponden aproximadamente a unas 25.000 - 30.000 cpm reversibles de [<sup>3</sup>H]flumazenil 5nM, 4.000 - 5.000 cpm reversibles de [<sup>3</sup>H]zolpidem 10 nM ó 6000 - 7000 cpm irreversibles de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam 5.nM. El receptor solubilizado se incuba con el anticuerpo y la proteína-A durante 12 - 15 h a 40C con agitación.

Tras la incubación, el complejo antígeno-anticuerpo-proteína-A-Sepharosa, se separa del receptor solubilizado no inmunoprecipitado por centrifugación. El complejo antígeno-anticuerpo se lava tres veces con el mismo medio. La cuantificación de la inmunoprecipitación se realizó determinando la unión de [<sup>3</sup>H]flumazenil 5 nM ó [<sup>3</sup>H]zolpidem 10 nM en los sobrenadantes y en los precipitados.



**Figura 4:** Curvas de saturación de los distintos anticuerpos. La inmunoprecipitación de los sitios de unión de [ $^3$ H]flunitrazepam, se determinó incubando el receptor solubilizado, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, con volúmenes crecientes del anticuerpo policlonal (○), monoclonal (●) y policlonal específico contra la subunidad gamma<sub>2</sub> (△).

## 8. UNION DE RADIOLIGANDOS. "BINDING".

### 8.1 Condiciones de incubación:

La unión de radioligandos se realizó siguiendo el método descrito por Vitorica y col., 1990. Todas las incubaciones se realizaron a 40°C durante 60 min para [ $^3$ H]flumazenil, 45 min para [ $^3$ H]flunitrazepam, 30 min para [ $^3$ H]zolpidem y 30 min, en oscuridad, debido a su carácter fotosensible, para [ $^3$ H]muscimol.



Los volúmenes de incubación fueron de 0.2 ml para los experimentos de saturación y competición ó de 0.4 ml para los de dosis respuesta. Este aumento de volumen se realizó para tener la seguridad de que la concentración del ligando libre no era alterada significativamente en el ensayo, y así evitar el problema del "secuestro del ligando".

Los medios de incubación estaban compuestos por 140 mM KCl y 10 mM tampón fosfato potásico pH 7.4 para [ $^3\text{H}$ ]muscimol y 50 mM tris-HCl pH 7.4 para el resto de los ligandos.

La cantidad de proteina osciló entre 0.1 y 0.2 mg en todos los ensayos y con todos los ligandos.

En todos los experimentos se determinó la unión no específica utilizando una concentración, al menos, 5000 veces superior a la concentración del ligando marcado radiactivamente. Los compuestos utilizados fueron flunitrazepam o clonazepam para determinar la unión no específica de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam, [ $^3\text{H}$ ]flumazenil y [ $^3\text{H}$ ]zolpidem y GABA para [ $^3\text{H}$ ]muscimol.

## 8.2 Eliminación del exceso de ligando radiactivo.

La reacción se finalizó por dos métodos, según el ligando que se ensayara:

8.2.1 Filtración: para [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam, [ $^3\text{H}$ ]flumazenil y [ $^3\text{H}$ ]zolpidem. En este caso se utilizaron filtros GF/B Whatman y una

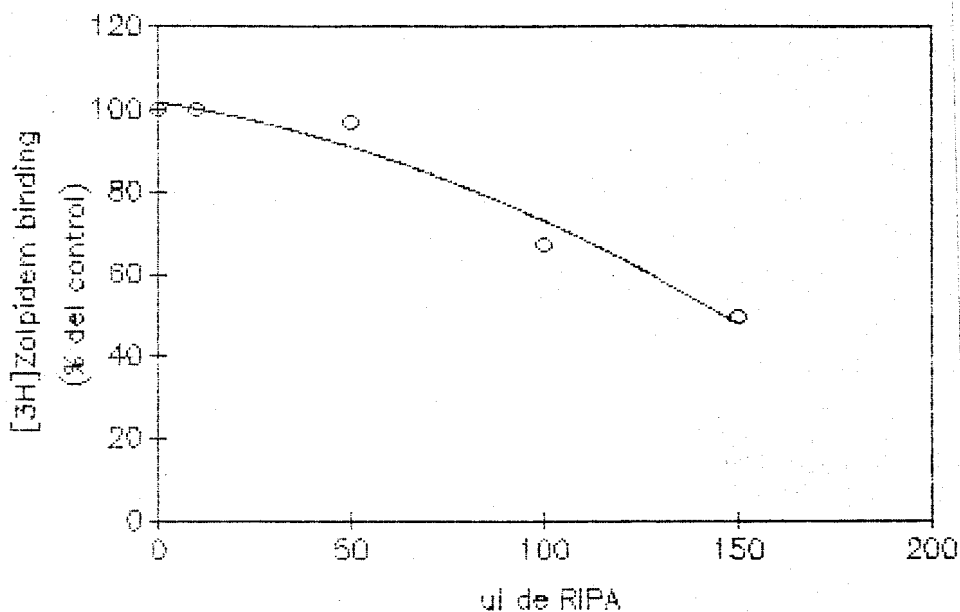
bomba de vacío conectada a un kitasato con una torreta de filtración. Los filtros, se lavan previamente con 5 ml de medio de incubación a 40C, se filtra la muestra y se vuelve a lavar el filtro con el mismo volumen anterior. Estos filtros se secan a 600C durante 1 h y se les añade 5 ml de líquido de centelleo compuesto por, tolueno:triton X-100 (2:1), 5 g/l de PPO y 50 mg/l de dimetil POPOP. La radiactividad incorporada se determinó con un contador de centelleo Beckman LS 1800.

En los casos en los que se utilizaba el receptor solubilizado, antes de filtrar, se incubó el receptor solubilizado con 40µl de gamma-globulina al 1% y 100µl de polietilen-glicol al 30% durante 5 min a 40C para conseguir la precipitación del receptor solubilizado y aumentar la eficiencia de la retención. En este caso el tampón de lavado incluía 8% de polietilen-glicol para el lavado de los filtros.

En los casos en que se determinó el porcentaje de solubilización las membranas también se procesaron de la misma forma durante la filtración.

Este tratamiento con gamma-globulina y polietilen-glicol no pudo ser utilizado en los casos que ensayamos [<sup>3</sup>H]zolpidem debido a que esta pequeña dilución, junto con la disminución en la velocidad de filtración producida por el polietilen-glicol, producía la disociación de parte del ligando de la proteína receptora además de obtener una gran variabilidad en los resultados. Este efecto es debido a la rápida constante de disociación del [<sup>3</sup>H]zolpidem por el receptor (resultados no mostrados). Para estos casos utilizamos un protocolo alternativo que consistía en realizar la filtración utilizando filtros tratados con polietilenimina al

0.3% (Mahdy y col.,1988; Morgan y col.,1987). El tratamiento consistió en incubar los filtros durante 8-12 h con polietilenimina al 0.3%. Con este protocolo, el detergente no podía exceder de 0.01% del volumen de ensayo, puesto que porcentajes superiores producían disminuciones considerables en la retención, figura 5.



**Figura 5:** Efecto del detergente sobre la retención de los filtros tratados con polietilenimina. Las membranas se incubaron con [<sup>3</sup>H]zolpidem 7 nM y volúmenes crecientes de RIPA. Tras alcanzar el equilibrio, se filtraron utilizando filtros tratados con polietilenimina y se determinó la radiactividad retenida. Los resultados están expresados con respecto al control que se incubó sin RIPA.

8.2.2 Centrifugación: para [<sup>3</sup>H]muscimol. Este método fue utilizado

para evitar el efecto de disociación por dilución del ligando radiactivo y poder detectar los sitios de unión de más baja afinidad. Para ello tras el tiempo de incubación las muestras se centrifugan en una microfuga de mesa durante 10 minutos a 40°C. El sedimento resultante de la centrifugación se lava superficialmente con tampón de incubación evitando la resuspensión del sedimento. El sedimento se seca a 80°C durante 30 minutos y se solubiliza con protosol:agua (3:1) a 50°C durante 10 horas, según las indicaciones del fabricante. La radiactividad incorporada se determina añadiendo líquido de centelleo que se neutraliza con ácido acético glacial.

## 9. CARACTERIZACION FARMACOLOGICA.

### 9.1 Experimentos de saturación.

Este tipo de experimentos se realizaron para determinar la afinidad del ligando por su receptor(es) y la capacidad máxima de unión de nuestra muestra. Para ello incubamos una cantidad fija de membranas con cantidades crecientes de ligando radiactivo. Las concentraciones utilizadas fueron las mostradas en la tabla 2. La unión no específica se determinó para cada concentración.

La transformación de Scatchard de los resultados obtenidos de los experimentos de saturación con el programa LIGAND nos permitió obtener los valores de  $K_d$  y  $E_{max}$  para cada ligando y muestra.

-----

Tabla 2. Rango de concentraciones de los distintos ligandos radiactivos utilizados en los experimentos de saturación.

<u>LIGANDO</u>	<u>RANGO</u>	<u>Kd descrita</u>	<u>REFERENCIA</u>
[ <sup>3</sup> H]flunitrazepam	1 - 30	2	Squires F.R.,1984
[ <sup>3</sup> H]muscimol	0.5 - 500	1/200	Olsen y col.,1980
[ <sup>3</sup> H]zolpidem	1 - 20	10	Benavides y col.,1988

-----

## 9.2 Experimentos de competición.

Este tipo de experimentos se realizaron para identificar los distintos tipos de isoreceptores (omega) para las benzodiazepinas y calcular las distintas proporciones de ellos en las regiones cerebrales ensayadas, así como conocer los valores de las distintas constantes de inhibición. Para ello utilizamos los compuestos benzodiazepínicos y no benzodiazepínicos, descritos en el apartado de Introducción, a las concentraciones que nos permiten marcar todos los receptores benzodiazepínicos para los que presentan afinidad, tabla 3. En el caso del DMCM y flumazenil estos fueron utilizados para detectar farmacológicamente la presencia de la subunidad  $\gamma_1$  (Ymer y col.,1990). Los experimentos de competición se realizaron incubando una cantidad fija de muestra, con una concentración determinada de ligando radiactivo, aproximadamente dos

o tres veces por debajo de la  $K_d$ , y concentraciones crecientes de los distintos ligandos no marcados.

---

Tabla 3. Rango de concentraciones de los distintos ligandos utilizados en los experimentos de desplazamiento.

<u>LIGANDO MARCADO</u>	<u>DESPLAZANTE</u>	<u>CONCENTRACION</u>
$[^3\text{H}]\text{FNZ}$ (1 nM)	CL218.872	10 nM - 100 $\mu\text{M}$
	zolpidem	1 nM - 100 $\mu\text{M}$
	clonazepam	1 nM - 100 nM
$[^3\text{H}]\text{zolpidem}$ (5 nM)	clonazepam	1 nM - 100 nM
	diazepam	1 nM - 100 nM
	flumazenil	0.5 nM - 1 $\mu\text{M}$
	DMCM	0.5 nM - 10 $\mu\text{M}$
	CL218.872	10 nM - 100 $\mu\text{M}$

---

### 9.3 Experimentos de dosis respuesta. Alosteroismo.

Este tipo de experimentos se realizaron para caracterizar las principales interacciones alostéricas que ocurren entre los distintos sitios de unión de esta proteína receptora. Para ello realizamos los siguientes experimentos:

#### 9.3.1 Modulación alostérica GABA/benzodiazepinas. Con este fin

determinamos el efecto de varias concentraciones de GABA, ver tabla 4, sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam ó [ $^3\text{H}$ ]zolpidem. Este tipo de experimentos nos da una idea del grado de interacción alostérica o del efecto modulador existente entre el receptor del GABA y los receptores omega para benzodiazepinas.

9.3.2 Modulación alostérica GABA/barbitúricos. Con este fin determinamos el efecto de varias concentraciones de pentobarbital, tabla 4, sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol. Este tipo de experimentos nos da idea del grado de interacción alostérica que existe entre el sitio de unión para barbitúricos y el sitio de unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol.

9.3.3 Modulación alostérica GABA/Proconvulsivantes/barbitúricos. Con este fin determinamos el efecto de varias concentraciones de la droga proconvulsivante picrotoxinina, sobre la modulación alostérica que ejerce el sitio de unión de los barbitúricos sobre el sitio de unión de GABA. Este último efecto lo ensayamos a una sola concentración, en condiciones de saturación, determinada de los experimentos descritos en el apartado anterior.

Estos experimentos se realizaron incubando la muestra con una concentración fija de ligando radiactivo (una o dos veces por debajo de su  $K_d$ ) y concentraciones crecientes de GABA, pentobarbital o picrotoxinina.

El porcentaje de estimulación se calcula con respecto a un punto control el cual no lleva modulador y estos porcentajes de estimulación calculados para cada concentración son utilizados para el ajuste de las curvas utilizando la ecuación (1) y el programa BMDP PAR de regresión no lineal (Dixon, 1987).

-----  
Tabla 4. Rango de concentraciones usadas en los experimentos de dosis respuesta.

<u>LIGANDO</u>	<u>MODULADOR</u>	<u>CONCENTRACION</u>
[ <sup>3</sup> H]flunitrazepam (1 nM)	GABA	10 nM - 100 $\mu$ M
[ <sup>3</sup> H]zolpidem (3 nM)	GABA	10 nM - 100 $\mu$ M
[ <sup>3</sup> H]muscimol (40 nM)	Pentobarbital	50 $\mu$ M - 1 mM
[ <sup>3</sup> H]muscimol (40 nM)	Pentobarbital	1 mM
	Picrotoxinina	0.1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M

-----

#### 10. FOTOMARCAJE.

Una de las características bioquímicas del agonista del receptor de las benzodiazepinas, [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, es la unión irreversible del ligando a su sitio de unión cuando el complejo receptor-ligando es irradiado con luz ultravioleta. Esta incorporación irreversible trae consigo la inactivación de aproximadamente el 70-75% de los sitios de unión restantes, es decir la unión irreversible del ligando viene a ser del 25% de la unión reversible, sin irradiación ( Sieghart W. y Drexler G., 1983 ).

Para realizar el fotomarcage, seguimos el protocolo descrito por



Vitorica y col., 1990. Las membranas de los distintos centros se resuspenden a una concentración de 1-2 mg de proteínas/ml en 50 mM tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM benzamidina, 50 µg/ml inhibidor de tripsina, 50 µg/ml bacitracina y 5 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. Las membranas se incuban a 40°C durante 60 min en oscuridad y con agitación. Tras la incubación, las membranas fueron irradiadas con luz ultravioleta (365 nm) durante 7 min a 3 cm de distancia. Tras la irradiación se añadió clonacepam 5 µM y se incubó de nuevo a 40°C durante 60 min en oscuridad y con agitación. La adición de un exceso de clonacepam tras la irradiación se realiza para desplazar el ligando radiactivo que no se ha unido covalentemente. El exceso de ligando radiactivo no unido covalentemente se eliminó lavando las membranas 4-5 veces por centrifugación con 10 mM tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA hasta que la radiactividad en el sobrenadante alcanzó los niveles de ruido de fondo del contador de centelleo (100 cpm). La unión no específica fue determinada incluyendo 5 µM de clonacepam antes de la irradiación.

A continuación el complejo receptor-ligando se solubilizó a una concentración de 4 mg de proteínas/ml como se describe en la sección de solubilizaciones y fue procesado para la inclusión en geles de poliacrilamida al 10%.

#### 11. PREPARACION DE CORTES DE CEREBRO DE RATA.

Para la preparación de los cortes se utilizaron ratas de la raza Fischer 344 controles (3-4 meses) y viejas (22-25 meses) siguiendo el

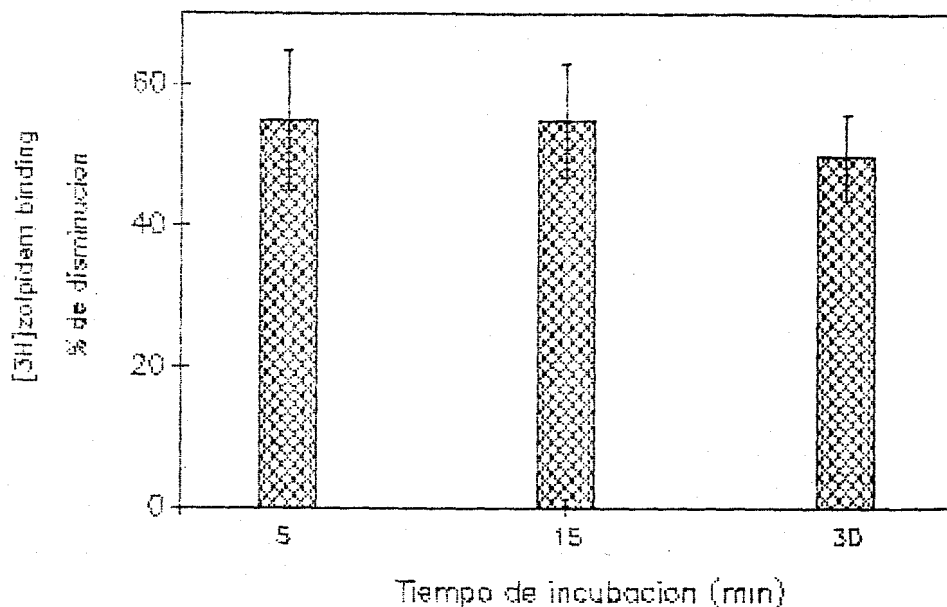
método descrito por (Benavides y col.,1988). Las ratas se matan por decapitación, los cerebros se extraen rápidamente y se congelan en isopentano a  $-48^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente fueron incluidos en una solución al 4% de carboximetil celulosa y se obtuvieron cortes coronales de  $15\ \mu\text{m}$  de espesor a  $-20^{\circ}\text{C}$  utilizando un criostato Leitz 1720. Para la elección de los distintos niveles se utilizó el atlas de Paxinos y Watson, 1986. Los cortes se recogieron en láminas de vidrio tratadas con gelatina y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 12. UNION DE RADIOLIGANDOS EN CORTES DE CEREBRO DE RATA

Para los ensayos de unión de los radioligandos en cortes de cerebro, utilizamos dos ligandos: i) [ $^3\text{H}$ ]zolpidem y ii) [ $^3\text{H}$ ]flumazenil.

12.1. Ensayos con [ $^3\text{H}$ ]zolpidem. Básicamente seguimos la técnica descrita por Niddan y col. 1987 con algunas modificaciones. Antes de incubar los cortes con el ligando radiactivo, se incuban las secciones durante 5 minutos a temperatura ambiente en 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 50 mM tris-HCl, pH 7.4 con el fin de lavar el GABA endógeno presente en los cortes. Como se muestra en la figura 6, este tiempo de incubación fue suficiente para lavar el GABA endógeno puesto que tiempos de incubación superiores producían resultados similares. A continuación los cortes se secan en una campana de aire seco y se incuban durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en 4 ml del mismo medio anterior incluyendo 5 nM [ $^3\text{H}$ ]zolpidem y  $10\ \mu\text{M}$  bicuculina o  $100\ \mu\text{M}$  GABA para el control y el estimulado respectivamente. La unión no específica fue determinada en presencia de  $2\ \mu\text{M}$  flumazenil y representó siempre menos del 10% de la unión total. Finalmente

la incubación se finalizó lavando las secciones durante 3 minutos en el medio de incubación a 40°C, seguido de un lavado rápido en agua destilada a 40°C. Finalmente las secciones se secan con una corriente de aire frío y se colocan sobre una película fotográfica sensible a [<sup>3</sup>H] durante 15 días a 40°C para generar el autorradiograma.



**Figura 6:** Efecto del tiempo de incubación sobre la eliminación de GABA endógeno de cortes de cerebro de rata. Secciones sagitales de 15 µm de espesor se incubaron durante 5, 15 y 30 min en tampón 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH<sub>i</sub> = 7.4) a temperatura ambiente. Los valores representan el porcentaje de disminución de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem 5 nM con respecto al control no incubado.

12.2 Ensayos con [<sup>3</sup>H]flumazenil. El procedimiento seguido con este ligando es básicamente el mismo descrito anteriormente. Las únicas diferencias se encuentran en que no se preincuban las secciones, el tiempo de incubación es de 1 hora y el tampón de incubación está compuesto por 50 mM tris-HCl, pH 7.4. El [<sup>3</sup>H]flumazenil se desplazó de su

sitio de unión, incubando los cortes con distintas concentraciones de zolpidem que se incluía en el medido de incubación.

### 13. OTROS METODOS.

#### 13.1 Proteínas.

La determinación de proteínas se realizó utilizando el método descrito por Lowry con una modificación que consistió en la introducción de 0.1% de SDS para solubilizar la proteínas y obtener una mejor estimación de las proteínas de membranas ( Lowry y col.,1951 ).

#### 13.2 Actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas determinadas fueron:

- 1) Actividad fosfofructoquinasa.
- 2) Actividad fumarasa.

Ambas actividades se determinaron por métodos colorimétricos como previamente han descrito Vitorica y col., 1984; Vitorica y Satrústegui, 1985.

#### 13.3 Geles de poliacrylamida con SDS.

Los geles de poliacrylamida al 10% se realizaron siguiendo el método descrito por Laemmli, 1970.

### 13.5 Fluorografía de geles con SDS.

El tratamiento de los geles para la exposición sobre films fotográficos lo realizamos siguiendo el siguiente protocolo. Una vez destañido el gel se incuba en agua destilada durante 1 h para eliminar el exceso de ácido acético. A continuación se incuba en 200 ml de DMSO durante 30 min seguido por 100 ml de DMSO durante 30 min. Tras la eliminación del exceso de agua del gel por el DMSO, se incuba en 4 volúmenes de PPO al 22.2% disuelto en DMSO durante 3 h. Finalmente se incuba en 20 volúmenes de agua destilada durante 1 h, se seca por vacío y se expone sobre un film fotográfico a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 30-40 días.

### 14. ANALISIS DE DATOS

La transformación de Scatchard de las curvas de saturación y el análisis de las curvas de desplazamiento se realizaron utilizando el programa LIGAND (Munson and Rodbard, 1980). Este programa proporciona una buena estimación de los parámetros de unión (constantes de afinidad, capacidades de unión unión no específica etc.) de uno o varios ligandos que se unen a uno o varios sitios de unión, a la vez que nos proporciona una valoración estadística del mejor modelo de sitios de unión al cual se ajustan los resultados obtenidos en el experimento. Conociendo el volumen de incubación del ensayo, la actividad específica del ligando radiactivo y las concentraciones de los ligandos no radiactivos podemos obtener una muy buena estimación de los datos anteriores.

Las curvas de dosis respuesta se ajustaron a la función logística (Shenker et al.,1987):

$$E = \frac{E_{\max}}{1+(EC_{50}/A)^n} \quad (1)$$

donde E es el porcentaje de estimulación de la unión a la concentración A del agonista; E<sub>max</sub> es el efecto máximo; EC<sub>50</sub> es la concentración del agonista a la que se consigue la mitad del efecto máximo y n es el coeficiente de Hill o factor de pendiente. Para el ajuste se utilizó el programa BMDP PAR de regresión no lineal (Dixon, 1987).

La comparación estadística de los resultados se realizó utilizando el test de T de Student, ANOVA y el test de Tukey.

## **RESULTADOS**

1. CARACTERIZACION DE LAS MEMBRANAS OBTENIDAS POR DIFERENTES METODOS DE HOMOGENEIZACION. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO

Como un paso previo y necesario para la caracterización farmacológica de la proteína receptora a lo largo del proceso de envejecimiento normal, realizamos una caracterización de las membranas. Esta caracterización fue hecha con el fin de comprobar que la homogeneización por sonicación, no altera las propiedades de unión de ligandos del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en comparación con el método de homogeneización más ampliamente usado como es el teflón-vidrio. Para ello, medimos la unión de 10 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (cerca de saturación), en el homogeneizado y en membranas aisladas de hipocampo obtenidas por ambos métodos, así como la unión de 40 nM [<sup>3</sup>H]muscimol en membranas aisladas (ver más adelante). Como se muestra en la tabla 5, la homogeneización por sonicación no modifica ni la actividad medida en el homogeneizado (en pmol de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam/g de tejido), ni el porcentaje de recuperación en las membranas con respecto al homogeneizado.

La recuperación de aproximadamente un 50% de los sitios de unión en membranas podría parecer baja, sin embargo, hay que tener en cuenta que este número podría estar subestimado debido a la presencia de GABA endógeno en los homogeneizados, que modula alostéricamente la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (ver la sección de Introducción). Por esta misma razón, no pudimos determinar ni el efecto de la homogeneización sobre la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol, ni la recuperación de esta actividad en membranas. Sin embargo, un parámetro utilizable para determinar la posible modificación en la unión de este ligando o, en su recuperación en mem-



branas, es la razón entre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam y [<sup>3</sup>H]muscimol. Esta razón fue de 2.1 y 2.2 para teflón-vidrio y sonicación respectivamente.

---

Tabla 5. Caracterización de las membranas obtenidas utilizando dos métodos de homogeneización: teflón-vidrio y sonicación.

	<u>TEFLON-VIDRIO</u>	<u>SONICACION</u>
[ <sup>3</sup> H]flunitrazepam	87.5±2.5	82.1±7.7
(pmol/g de tejido)	(3)	(3)
Unión de [ <sup>3</sup> H]FNZ	52.8±7.2	51.6±3.5
(% de recuperación)	(3)	(3)

Los valores son la media ± S.D. del número de experimentos dado entre paréntesis.

---

Estos resultados indican la ausencia de cambios relevantes en los parámetros de unión del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas, debidos al método de homogeneización utilizado y demuestran que el protocolo de sonicación, es un método igual de válido que el método de teflón-vidrio para la obtención de membranas. Por lo tanto, este método alternativo de homogeneización presenta la ventaja de que puede ser utilizado para la homogeneización de regiones cerebrales pequeñas, sin grandes pérdidas de tejido.

Una vez caracterizadas las membranas obtenidas por ambos métodos de homogeneización, pasamos a caracterizar las membranas procedentes de rata vieja con el fin de poder determinar las posibles diferencias, entre controles y viejas, debidas al proceso de elaboración de las

membranas y que no reflejarían modificaciones debidas al proceso de envejecimiento.

Para esta caracterización determinamos: i) la recuperación de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (10 nM) determinado como el porcentaje de unión en membranas con respecto al homogeneizado, ii) la recuperación de proteínas de membranas expresada en mg de proteínas/peso total de tejido y iii) la contaminación de proteínas solubles procedentes del citoplasma, para lo que medimos la actividad de la enzima fosfofructoquinasa, o de la matriz mitocondrial, para lo que medimos la actividad de la enzima fumarasa.

Como se muestra en la tabla 6, ninguno de los parametros determinados fue alterado con el proceso de preparación de membranas, lo que

---

**Tabla 6.** Caracterización bioquímica de las membranas de hipocampo de ratas controles y viejas.

Edad	[ <sup>3</sup> H]FNZ Binding	Proteínas	Contaminación con proteínas solubles	
	Recuperación (% del total) <sup>a</sup>	Recuperación (mg/g peso total)	Mitocondrial <sup>b</sup>	Citosólica <sup>b</sup>
3 meses	51.57 ± 13.07 (6)	35.17 ± 4.13 (6)	15.07 ± 2.18 (6)	26.80 ± 8.85 (6)
24 meses	53.24 ± 15.31 (6)	35.24 ± 4.92 (6)	14.60 ± 1.40 (6)	23.60 ± 6.30 (6)

Los resultados son la media ± S.D. del numero de experimentos dado entre parentesis.

a) Recuperación de la unión de [<sup>3</sup>H]FNZ en membranas (determinado a 10nM) calculado con respecto al homogeneizado.

b) La contaminación mitocondrial y citosolica fue calculada determinando la actividad fumarasa y fosfofructoquinasa en homogeneizado y membranas.

---

nos proporciona, un importante control en el sentido de que modificaciones en las propiedades farmacológicas del receptor, no son debidas al proceso de preparación de membranas, y por tanto, reflejan cambios reales del envejecimiento.

## 2. CARACTERIZACION FARMACOLOGICA PRELIMINAR DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/BENZODIACEPINAS.

Como un primer abordaje experimental nos propusimos hacer una caracterización farmacológica general de esta proteína receptora, en disitintos centros, con el fin de detectar posibles modificaciones en los parámetros determinados. En un segundo lugar haríamos una caracterización más profunda de las posibles diferencias detectadas, con el fin de poder determinar las bases moleculares de los cambios producidos por el envejecimiento.

Los parámetros que determinamos en un primer lugar fueron:

- 1) Caracterización del sitio de unión de las benzodiazepinas, cuantificando la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam a dos concentraciones, 1 y 10 nM.
- 2) Caracterización del sitio de unión del GABA y sus agonistas cuantificando la unión de [<sup>2</sup>H]muscimol a una concentración, 40 nM.
- 3) Caracterización de la interacción alostérica entre el receptor de las benzodiazepinas y el receptor del GABA, cuantificando el efecto del GABA (100 µM) sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam 1 nM.

En la tabla 7, se puede ver que el proceso de envejecimiento

va a implicar alteraciones en el receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas. Los cambios más destacables fueron: i) un aumento significativo en el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en hipocampo de ratas viejas con respecto a ratas controles y ii) una disminución de la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol 40 nM en la corteza prefrontal de ratas viejas con respecto a controles.

Estos resultados preliminares nos permitieron elegir las regiones en las cuales realizamos una caracterización farmacológica más profunda, para intentar determinar las bases moleculares de los cambios detectados preliminarmente.

---

Tabla 7. Efecto del envejecimiento en la farmacología del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en varias regiones del cerebro de la rata.

<u>Región</u>	<u>Modificación</u>
Hipocampo	Interacción alostérica GABA <sub>A</sub> /benzodiazepinas.
Corteza prefrontal	Disminución del número de receptores para el GABA.
Corteza cerebral	N.D.
N.D. No detectado.	

---

## HIPOCAMPO.

### 3. CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/BENZODIACE- PINAS EN HIPOCAMPO DE RATA. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO

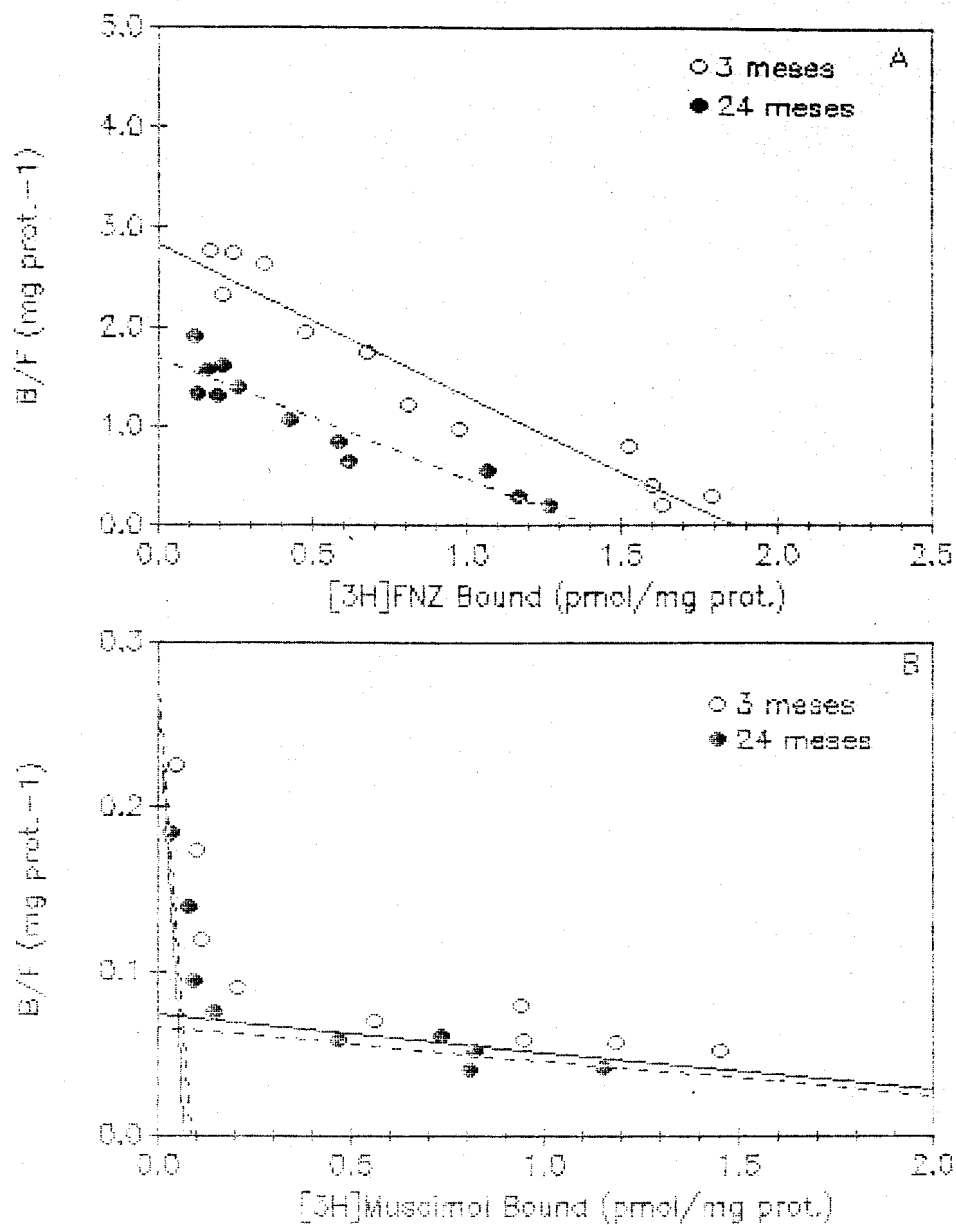
A la vista de los resultados preliminares nos propusimos realizar un estudio farmacológico más extenso y detallado de esta región, con el fin de determinar las posibles causas que dan lugar al efecto diferencial del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en viejos, con respecto a controles y poder detectar otros posibles cambios en la farmacología del receptor. Esta caracterización farmacológica la llevamos a cabo realizando experimentos de saturación, inhibición y alosterismo, con varios tipos de ligandos. Es decir, una caracterización farmacológica lo más completa posible que incluye la mayor parte de los sitios de unión presentes en esta proteína receptora.

#### 3.1 Estudios de saturación.

Los estudios de saturación nos permiten conocer la constante aparente de disociación (Kd), que da idea de la afinidad que presenta el ligando por su sitio de unión y la Emax, que da idea del número máximo de sitios de unión presentes en las membranas. Estos experimentos se realizaron utilizando [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (agonista del receptor de las benzodiazepinas) y [<sup>3</sup>H]muscimol (agonista del receptor de GABA).

La transformación de Scatchard de las curvas de saturación se muestran en la figura 7. Los resultados obtenidos con [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (figura 7A) se ajustaron a un modelo de un sitio de unión de alta afinidad (rango nM) como previamente han descrito otros autores (Squires,1984). Este perfil farmacológico no se vio afectado con el envejecimiento, tan sólo se observó una ligera disminución en el valor de Emax en ratas viejas con respecto a controles pero sin llegar a ser significativamente diferente, tabla 8.

El [<sup>3</sup>H]muscimol presentó un comportamiento más complejo presentando un mejor ajuste a un modelo de dos sitios de unión, uno de alta afinidad (rango nM) y otro de baja afinidad (rango nM-µM), figura 7B. Como se ve en la tabla 8, ni las afinidades de los dos sitios de unión, ni el número máximo de sitios de unión de alta y baja afinidad, ni la proporción de los dos sitios de unión calculadas a partir de los valores de Emax, se modificaron con el envejecimiento (97.0 ± 0.8% y 98.1 ± 0.7% de sitios de unión de baja afinidad para controles y viejos respectivamente). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores (Olsen R.W. y col.,1981.; Olsen R.W. y Snowman A.M.,1982).



**Figura 7:** Representación de Scatchard de las curvas de saturación de  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam, (A), y  $[^3\text{H}]$ muscimol, (B), de hipocampo de ratas de 3 meses ( ) y 24 meses ( ). Los puntos se ajustaron por regresión lineal utilizando los parámetros ( $K_d$  y  $B_{max}$ ), obtenidos del ajuste de las curvas con el programa LIGAND. Los valores de los diferentes parámetros se muestran en la tabla ?.

-----

Tabla 8. Efecto del envejecimiento sobre los parámetros de unión de [<sup>3</sup>H]FNZ y [<sup>3</sup>H]Muscimol en membranas de hipocampo.

Edad	<sup>3</sup> H]FNZ binding		<sup>3</sup> H]Muscimol binding			
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg prot.)	Kd (nM)		Bmax (pmol/mg prot.)	
			alta	baja	alta	baja
3 meses	3.3 ± 0.7	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.9	216 ± 15.1	0.07 ± 0.03	3.2 ± 0.01
	(4)	(4)	(3)	(3)	(3)	(3)
24 meses	4.0 ± 0.9	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.6	234 ± 36.6	0.06 ± 0.01	3.1 ± 0.3
	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)

Los valores fueron calculados a partir de la figura 7a y b y son la media ± S.D. del numero de experimentos dado entre parentesis.

-----

La significación fisiológica de estos sitios de unión para [<sup>3</sup>H]muscimol es cuestionada, puesto que presentan afinidades que no están en el rango de las descritas en los experimentos electrofisiológicos, rango μM (Akaike y col., 1986; Mathers D.A., 1987 y referencias). Igualmente, estas afinidades, tampoco son del orden de los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos por nosotros a partir del ajuste de las curvas de dosis respuesta (ver más adelante), los cuales son más parecidos a los datos electrofisiológicos (rango μM).

En este sentido, Maddes y col. (1989) propusieron, que la baja proporción de los sitios de unión de alta afinidad para el GABA, puede ser más un reflejo de la alteración producida en dicho receptor durante la elaboración de las membranas, que un sitio de unión con



relevancia fisiológica, es decir, puede ser que estemos marcando distintos estados de afinidad de una misma proteína receptora en lugar de distintos receptores. En este sentido es importante notar la baja proporción de estos sitios de unión en nuestras preparaciones de membranas (menor de un 5%).

En resumen, estos resultados nos permiten postular que el envejecimiento no afecta a las afinidades de unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam y posiblemente a la de otros compuestos benzodiazepínicos ni a la de [<sup>3</sup>H]muscimol y posiblemente a la de GABA.

### 3.2 Interacciones alostéricas.

Como se describe en el apartado de Introducción, la farmacología del receptor GABA<sub>A</sub> /benzodiazepinas es bastante compleja tanto desde el punto de vista de la gran variedad de compuestos que se unen a esta proteína receptora, como desde el punto de vista de la modulación alostérica que ejercen unos sitios de unión sobre otros.

Nosotros hemos determinado tres tipos de interacciones alostéricas que se dan dentro de esta proteína receptora: i) efecto de los barbitúricos sobre el sitio de unión de GABA; ii) efecto de proconvulsivantes sobre el sitio de unión de GABA y iii) efecto del GABA sobre el sitio de unión de benzodiazepinas.

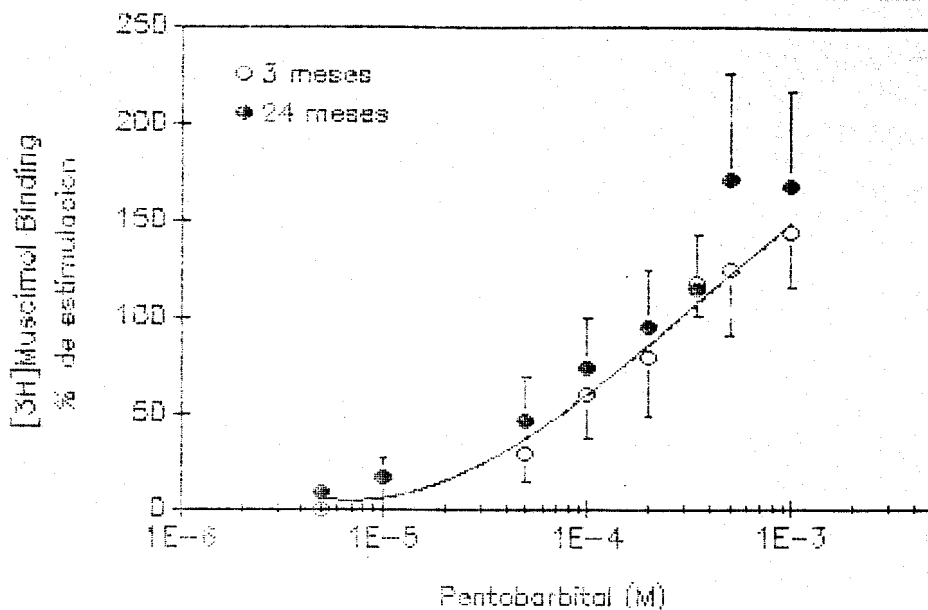
Esta determinación, pensamos que es lo suficientemente extensa como para obtener una visión global de los posibles cambios que puede

implicar el proceso de envejecimiento en cuanto a modulaciones alostéricas se refiere. Es decir, conocer los posibles cambios en la regulación de la transmisión gabaérgica que tienen lugar con el envejecimiento.

### 3.2.1 Interacción entre el sitio de unión de barbitúricos y el sitio de unión de GABA.

Para estudiar la interacción alostérica entre los dos sitios de unión, realizamos una curva de dosis respuesta evaluando el efecto de diferentes concentraciones de pentobarbital sobre la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol.

En la figura 8, se muestran las curvas de dosis respuesta obtenidas con pentobarbital y [<sup>3</sup>H]muscimol. Como se ve, el efecto es dependiente de la dosis en ambos grupos de edad. En este caso la variabilidad experimental fue alta, sin embargo, no se observaron diferencias, ni en la eficacia, ni en la potencia del efecto de pentobarbital sobre la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol, ni considerando la media de los cuatro experimentos, tabla 9, ni considerando cada experimento por separado (dato no mostrado).



**Figura 8:** Efecto del envejecimiento sobre la interacción alostérica entre el sitio de unión de barbitúricos y el sitio de unión de GABA. La estimulación de la unión de 40 nM [ $^3\text{H}$ ]muscimol por diferentes concentraciones de ( $\pm$ ) pentobarbital se determinó en membranas de hipocampo de rata de 3 meses ( ) y 24 meses ( ). Los valores vienen expresados como el porcentaje de estimulación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol con respecto al control. El valor control (expresado en pmol/mg de proteína) fue de  $0.52 \pm 0.07$  y  $0.45 \pm 0.06$  para membranas de hipocampo de rata de 3 y 24 meses respectivamente. Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de estas curvas, se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Efecto del envejecimiento sobre la estimulación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol ejercida por ( $\pm$ )Pentobarbital en membranas de hipocampo.

Edad	$E_{\text{max}}$ (% estimulación)	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	n
3 meses	$168.60 \pm 48.30$ (4)	$190.03 \pm 27.67$ (4)	$1.13 \pm 0.40$ (4)
24 meses	$205.51 \pm 79.81$ (4)	$211.91 \pm 63.18$ (4)	$1.30 \pm 0.55$ (4)

Los valores son la media  $\pm$  S.D. del número de experimentos dado entre parentesis de los datos mostrados en la figura 8, ajustados a la ecuación (1).

### 3.2.2 Interacción alostérica entre el sitio de unión de proconvulsivantes y el sitio de unión de GABA.

Está descrito que la droga convulsivante  $^{35}\text{S}$ -t-butilbiciclofosforotionato (TBPS) es un buen marcador del sitio de unión del proconvulsivante picrotoxinina (Squires, 1984; Wong y col., 1984). Igualmente está descrito una disminución, como consecuencia del proceso de envejecimiento, en el número de sitios de unión de TBPS en corteza de rata (Erdö S.L. y Wolff J.R., 1989).

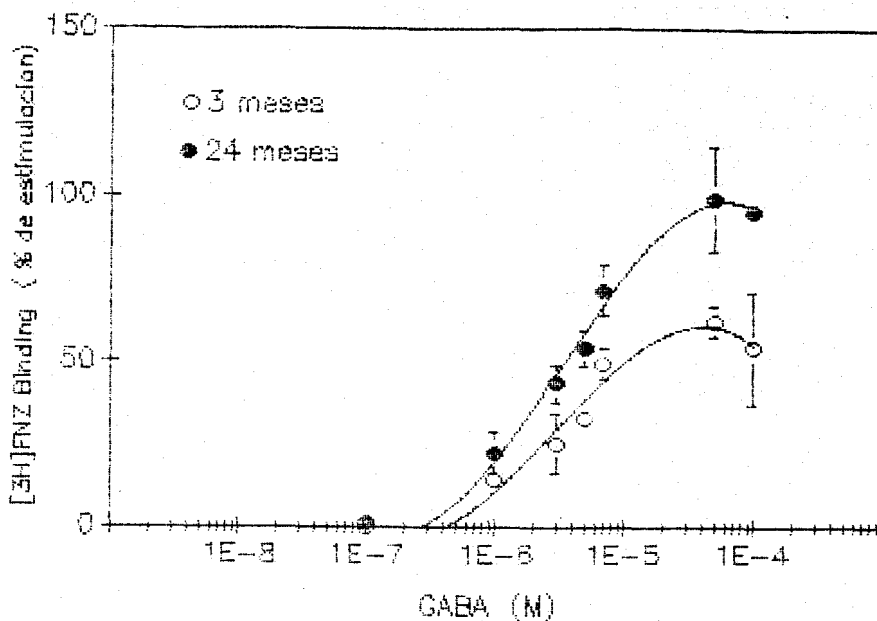
Con el fin de determinar si esta disminución tenía lugar también en hipocampo de rata vieja, realizamos una caracterización de forma indirecta, considerando que la picrotoxinina inhibe de una manera dependiente de la dosis la estimulación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol ejercida por pentobarbital como han descrito otros autores (Olsen R.W. y Snowman A.M., 1982; Kirkness y Turner., 1986). Para ello, determinamos la inhibición ejercida por picrotoxinina sobre el efecto modulador de pentobarbital sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol.

Esta determinación la realizamos incubando las membranas con cantidades crecientes de picrotoxinina junto con una concentración de [ $^3\text{H}$ ]muscimol y pentobarbital. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas con el proceso de envejecimiento (datos no mostrados).

### 3.2.3 Interacción alostérica entre el sitio de unión de GABA y el sitio de unión de benzodiazepinas.

Para caracterizar este tipo de interacción alostérica realizamos curvas de dosis respuesta evaluando el efecto de diferentes concentraciones de GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. Este tipo de interacción mostró diferencias con el envejecimiento, como vimos en los resultados preliminares, y como se muestra en la figura 9, el efecto ejercido por este neurotransmisor sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, fue dependiente de la dosis en ambos grupos de edad y mostró diferencias en viejos con respecto a controles en el mismo sentido que las observadas en la caracterización preliminar. Los parámetros determinados a partir del ajuste de estas curvas de dosis-respuesta a la ecuación (1), mostrados en la tabla 10, indican que el mayor efecto obtenido en viejos es debido a un aumento de la eficacia o E<sub>max</sub> (65.6±12.3%, n=6 frente a 109.2±18.1%, n=3 para controles y viejos respectivamente) sin cambios en la potencia o EC<sub>50</sub>.

Considerando que los barbitúricos y las benzodiazepinas regulan la hiperpolarización neuronal en el mismo sentido pero actuando de forma diferente, estos resultados parecen indicar que el receptor GABA<sub>A</sub> es más sensible a las benzodiazepinas en membranas de hipocampo de ratas viejas que en membranas de ratas jóvenes.



**Figura 9:** Efecto del envejecimiento sobre la interacción alostérica entre el sitio de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA. La estimulación de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam por diferentes concentraciones de GABA se determinó en membranas de hipocampo de rata 3 meses (○) y 24 meses (●). Los valores vienen expresados como el porcentaje de estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam con respecto al control, en ausencia de GABA. El valor control (expresado en pmol/mg de proteína) fue de  $0.46 \pm 0.09$  y  $0.42 \pm 0.06$  para membranas de hipocampo de rata de 3 y 24 meses respectivamente. Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas, se muestran en la tabla 10.

**Table 10.** Efecto del envejecimiento sobre la estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ejercida por GABA en membranas de hipocampo.

Edad	$E_{max}$ (% de estimulation)	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	n
3 meses	$65.56 \pm 12.81$ (6)	$3.72 \pm 1.24$ (6)	$1.20 \pm 0.45$ (6)
24 meses	$109.21 \pm 18.10^*$ (3)	$4.64 \pm 1.18$ (3)	$1.14 \pm 0.40$ (3)

Los valores son la media  $\pm$  S.D. del número de experimentos dado entre parentesis y fueron calculados de los datos mostrados en la figura 9 ajustados a la ecuación (1).

\* Diferencia significativa con respecto a controles  $p < 0.004$ .

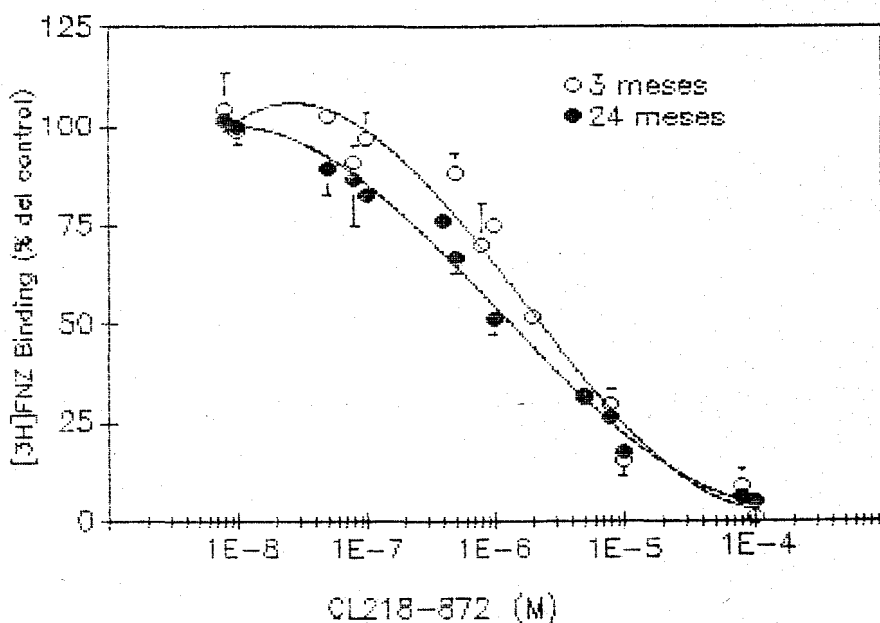
### 3.3 Cuantificación de los diferentes sitios de unión de benzodiazepinas.

Los resultados obtenidos en los experimentos de modulación alostérica, demuestran un mayor efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en hipocampo de rata vieja. Como había descrito Unnesterall y col.,1981, la potencia y/o eficacia de la estimulación ejercida por el neurotransmisor GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, varía dentro de cada región cerebral y este efecto podría estar relacionado con la presencia de diferentes sitios de unión para benzodiazepinas (Santi y col.,1988; Corda y col.,1989). Considerando todos estos resultados, nos propusimos realizar una cuantificación de los diferentes sitios de unión para benzodiazepinas.

La utilización de compuestos no benzodiazepínicos como la triazolopiridacina CL218.872, las beta-carbolinas, el oxoquacepam y la imidazopiridina zolpidem, permiten discriminar varios sitios de unión farmacológicamente diferentes en función de la afinidad diferencial que presentan por los distintos sitios de unión (ver clasificación en el apartado de Introducción).

La cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas se ha realizado a partir de los experimentos de competición, utilizando [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (agonista del receptor de benzodiazepinas, no selectivo) y diferentes concentraciones de la triazolopiridacina CL218.872.

La figura 10, muestra las curvas de desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam por distintas concentraciones de CL218.872 en hipocampo de rata control y vieja.



**Figura 10:** Efecto del envejecimiento sobre el desplazamiento de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam por la tiazolopiridacina CL 218.72. El desplazamiento de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam por CL 218.872 se determinó en membranas de hipocampo de ratas de 3 meses (○) y 24 meses (●). Los valores están expresados como porcentaje de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam con respecto al control, en ausencia de CL 218.872. Los valores controles fueron similares a los dados en la figura 9. Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas se muestran en la tabla 7.

En la tabla 11 se muestran los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas ( $K_i$  y  $B_{max}$ ).



Tabla 11. Efecto del envejecimiento sobre el desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H]FNZ por Cl 218-872 en membranas de hipocampo.

Edad	n	K <sub>i</sub> (μM)		E <sub>max</sub> (pmol/mg proteínas)			% de alta afinidad
		Alta	Baja	Alta	Baja	Total	Sitios de unión
3 meses	4	0.1 ± 0.07	2.0 ± 0.6	0.3 ± 0.2	1.08 ± 0.56	1.35 ± 0.56	20.02 ± 8.5
24 meses	4	0.07 ± 0.03	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.24 ± 0.46	1.84 ± 0.46	32.43 ± 4.9*

Los valores son la media ± S.D. de n experimentos hechos en paralelos. Los parametros de las curvas de desplazamiento fueron calculados a partir de los datos mostrados en la fig. 10, ajustados utilizando el programa LIGAND.

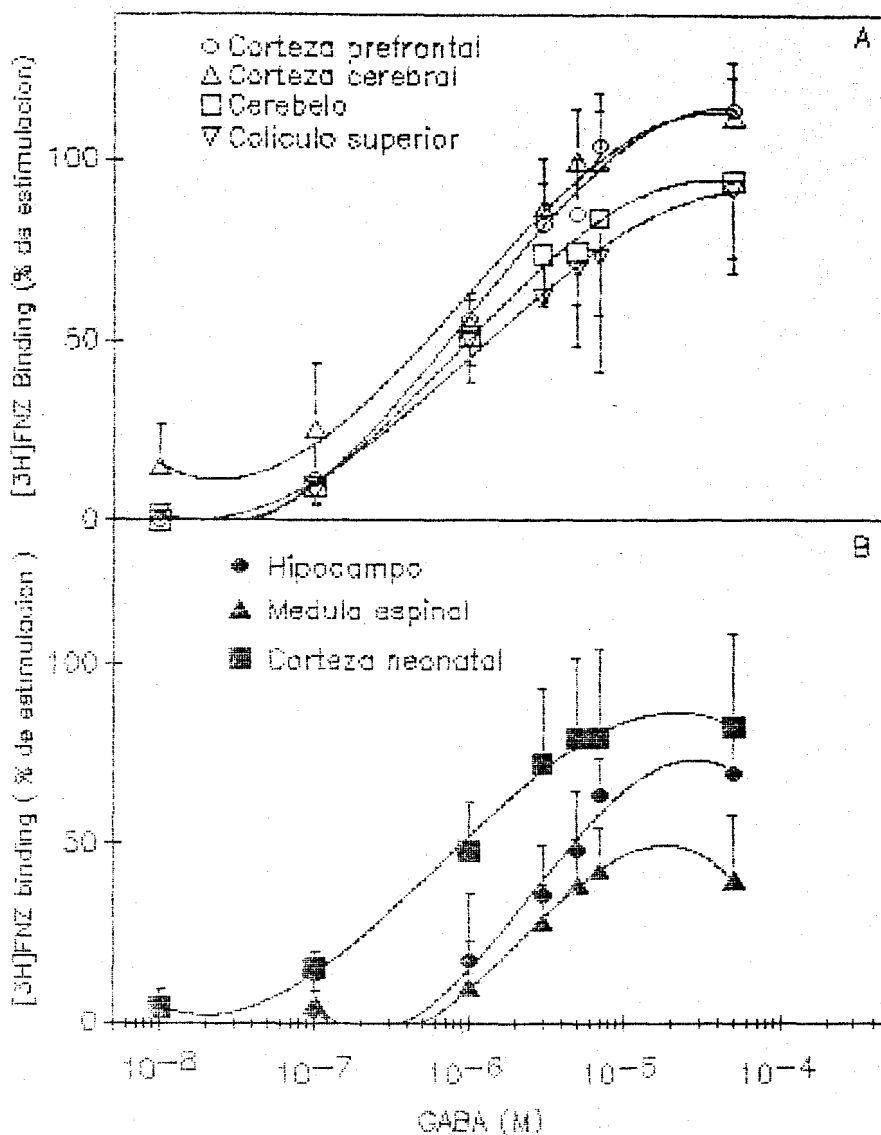
Como se desprende de los resultados, la triazolopiridacina CL218.872 discriminó dos sitios de unión; uno de alta afinidad (correspondiente a omega 1, tipo I) y otro de baja afinidad (correspondiente a omega 2, tipo II) tanto en controles, como han descrito otros autores (Sieghart y col., 1987) como en viejos. Sin embargo, la proporción de sitios de unión de alta afinidad para CL218.872 fue significativamente mayor en hipocampo de rata vieja con respecto a controles (32.4 ± 4.3% y 20.0 ± 8.5% n= 4 respectivamente) lo cual demuestra un aumento en la proporción de receptores omega<sub>1</sub> en el hipocampo de rata vieja.

#### 4. EFEECTO DEL GABA SOBRE LA UNIÓN DE [<sup>3</sup>H]flunitrazepam EN DISTINTAS REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA RATA.

Como un primer paso para poder verificar la posible relación entre eficacia en el acople alostérico y presencia de distintos isoreceptores, determinamos el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. Para ello realizamos curvas de dosis respuesta en distintas regiones y en corteza cerebral de rata de cinco días, en la que está ampliamente descrito su mayoritario carácter farmacológico omega<sub>2</sub> (Lippa y col.,1981; Vitorica y col.,1990).

Como se puede ver en la figura 11 A y B, en todas las regiones ensayadas el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam fue dependiente de la dosis, lo que indica que los sitios de unión de GABA y flunitrazepam, o benzodiacepinas en general, están acoplados alostéricamente. Los resultados del ajuste de dichas curvas de dosis respuesta se muestran en la tabla 13.

El efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam presenta heterogeneidad regional, que se manifiesta en una eficacia diferente según la región que se ensaye. Como se desprende de la figura 12 A y B y la tabla 13, las distintas regiones se pueden separar en dos grupos según la eficacia del acople: 1) de alta eficacia, aquellas con una E<sub>max</sub> de 100% o superior, como corteza prefrontal, corteza cerebral adulta, cerebelo y colículo superior, figura 11 A y 2) de baja eficacia, aquellas con una E<sub>max</sub> inferior a 100%, como hipocampo, médula espinal y corteza cerebral de rata de cinco días, figura 11 B.



**Figura 11:** Diferencias regionales en la interacción alostérica entre el sitio de unión de GABA y el sitio de unión de benzodiazepinas. La estimulación de la unión de 1 nM  $[^3H]$ flunitrazepam por GABA se determinó en membranas de (A), corteza prefrontal ( ), corteza cerebral ( ), cerebelo ( ) y colicula superior ( ); o (B), hipocampo ( ), médula espinal ( ) y corteza neonatal ( ). Los valores representan el porcentaje de estimulación de la unión de  $[^3H]$ flunitrazepam con respecto al control, en ausencia de GABA. Los valores controles fueron  $16.5 \pm 7.0$ ,  $29.4 \pm 15.5$ ,  $24.0 \pm 11.0$ ,  $9.6 \pm 4.9$ ,  $34.5 \pm 10.8$ ,  $10.9 \pm 4.8$  y  $25.9 \pm 9.2$  fmol, para corteza prefrontal, corteza cerebral, cerebelo, colicula superior, hipocampo, médula espinal y corteza neonatal.

Estas tres últimas regiones presentan diferencias significativas en la eficacia con respecto a la corteza cerebral adulta que es la región de mayor eficacia dentro del primer grupo.

Como se desprende también de la tabla 13, la potencia del GABA, que viene determinada por el valor de  $EC_{50}$ , no presentó grandes

diferencias entre las distintas regiones. Solamente en el hipocampo fue significativamente menor,  $p < 0.01$ , comparada con las otras regiones. Estas diferencias podrían estar revelando diferencias en la composición de las subunidades beta, que confieren distinta sensibilidad para el neurotransmisor GABA.

Tabla 13 Diferencias regionales en el efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam a su receptor

Región	$E_{\text{max}}$ (% de estimulación)	$EC_{50}$ $\mu\text{M}$	$n_H$	N
Médula espinal	$44.00 \pm 18.5^*$	$2.06 \pm 0.56$	$1.30 \pm 0.56$	3
Hipocampo	$71.89 \pm 10.09^{**}$	$3.10 \pm 1.46^*$	$1.18 \pm 0.42$	9
Corteza de 5 días	$89.12 \pm 6.46^*$	$1.26 \pm 0.70$	$0.86 \pm 0.14$	3
Corteza cerebral <sup>1</sup>	$119.27 \pm 12.01$	$0.97 \pm 0.33$	$0.96 \pm 0.56$	5
Corteza prefrontal	$121.27 \pm 16.71$	$1.52 \pm 0.77$	$1.10 \pm 0.45$	5
Cerebelo	$99.55 \pm 24.58$	$1.10 \pm 0.50$	$0.90 \pm 0.20$	5
Colículo superior	$100.89 \pm 21.78$	$0.99 \pm 0.64$	$1.18 \pm 0.45$	4

Los valores son la media  $\pm$  S.D. de n experimentos de los datos mostrados en la figura 12 A y B ajustados a la ecuación (1).

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.004$ . Diferencias significativas con respecto a corteza cerebral o corteza prefrontal

1- La corteza cerebral engloba al cortex sin la corteza prefrontal.

En resumen, estos resultados demuestran que la interacción entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas, se da en todas las regiones que hemos ensayado y, que presenta

heterogeneidad regional. Estos resultados pueden estar indicando diferencias en la proporción de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas en las distintas regiones cerebrales, como ha sido descrito por otros autores.

## 5. DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES SITIOS DE UNION DE BENZODIAZEPINAS EN DISTINTAS REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA RATA.

Para comprobar la veracidad de la hipótesis de, mayor proporción de receptores omega 1, mayor eficacia en el acople alostérico entre el sitio de unión de GABA y el sitio de unión de benzodiazepinas, cuantificamos en primer lugar (sección anterior) el acople entre los sitios de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA. A continuación cuantificamos los distintos isotipos farmacológicos de receptores de benzodiazepinas.

### 5.1 Estudio de la distribución con la triazolopiridacina CL218.872.

La cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas, se realizó mediante ensayos de desplazamientos de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam con diferentes concentraciones de CL218.872.

Como se describe en el apartado de Introducción, el CL218.872, presenta diferentes afinidades para los distintos sitios de unión de benzodiazepinas.

Las curvas de desplazamiento obtenidas con CL218.872 presentan perfiles diferentes según la región ensayada (dato no mostrado), lo cual está indicando heterogeneidad, en la distribución de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas, dentro del sistema nervioso central de la rata. Al ajustar estas curvas de desplazamiento encontramos regiones que presentan un mejor ajuste a un modelo de un solo sitio de unión, como cerebelo y médula espinal, tabla 14, y otras donde el ajuste es significativamente mejor,  $p < 0.05$ , a un modelo de dos sitios de unión, como corteza cerebral adulta, corteza prefrontal, colículo superior e hipocampo, tabla 14.

Tabla 14. Distribución de los sitios de unión  $\omega_1$  y  $\omega_2$  para benzodiazepinas en ratas controles.

Quantificación con CL218.872.

Region	CL218-872		CL218-872		n
	K <sub>i</sub>		E <sub>max</sub>		
	Alta (K <sub>i</sub> a)(nM)	Baja (K <sub>i</sub> b)(nM)	Alta sitios (% del total)	Baja	
Médula espinal	N.D.	5.0 ± 1.4	N.D.	100	4
Hipocampo	90.7 ± 70.4	2.8 ± 1.8	27.9 ± 15.2	72.2 ± 15.2	4
Corteza cerebral <sup>1</sup>	96.1 ± 15.3	3.3 ± 1.6	50.4 ± 11.3	49.6 ± 11.3	4
Corteza prefrontal	90.4 ± 39.6	2.5 ± 1.4	37.2 ± 5.3	62.7 ± 5.2	3
Cerebelo	137.9 ± 32.5	N.D.	100	N.D.	3
Colículo superior	83.4 ± 16.1	1.4 ± 0.3	35.0 ± 5.5	64.9 ± 5.5	4

Las K<sub>i</sub>(s) y la proporción entre los diferentes sitios de unión fueron calculadas del ajuste de las curvas de desplazamiento de 1nM [<sup>3</sup>H]FNZ por CL218.872. Los valores son la media ± S.D. de n experimentos.

1- La corteza cerebral engloba al cortex sin la corteza prefrontal.

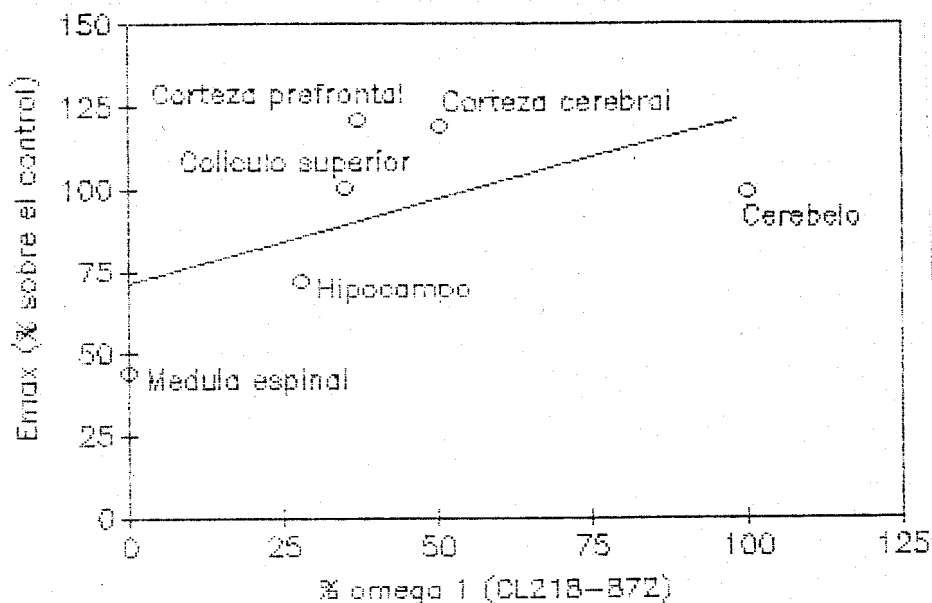
N.D.- no detectado.

Las proporciones de los distintos sitios de unión presentan variación regional y coinciden con las descritas por otros autores (Niddam y col., 1987; Sato y Neale, 1989). El sitio de unión de alta afinidad para CL218.872 (receptor  $\omega_1$ ) está enriquecido en cerebelo (100%) y en corteza cerebral adulta ( $50.4 \pm 11.3\%$ ) mientras que el sitio de unión de baja afinidad, (receptor  $\omega_2$ ), es mayoritario en médula espinal (100%), hipocampo ( $72.22 \pm 15.2\%$ ), colículo superior ( $64.96 \pm 5.5\%$ ) y corteza prefrontal ( $62.7 \pm 5.3\%$ ).

Estos resultados demuestran que la distribución de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas es heterogénea dentro del sistema nervioso de la rata, sin embargo, cuando comparamos los valores de la cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas con los valores de eficacia de las distintas regiones, como se muestra en la figura 12, comprobamos que no existe una relación directa entre la proporción de sitios  $\omega_1$  y la eficacia del efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam. Así tenemos regiones como cerebelo, con el 100% de los sitios de unión para benzodiazepinas del tipo  $\omega_1$ , con una eficacia menor que la de corteza cerebral adulta que posee el 50% de los sitios de unión de benzodiazepinas del tipo  $\omega_1$ . También es interesante ver que en el colículo superior y en la corteza prefrontal, dos regiones donde el sitio de unión  $\omega_1$  representa el 35-40% del total de sitios, encontramos eficacias mayores que en cerebelo.

Estos resultados nos demostraron, que aunque la eficacia en las regiones ricas en sitios de unión  $\omega_1$ , es alta, podemos encontrar

regiones con una proporción media o baja de sitios  $\omega_1$  y una eficacia en el acople alostérico alta. Por lo tanto, estos resultados no apoyan totalmente nuestra hipótesis de trabajo y no podemos concluir que el aumento en la eficacia del acople alostérico descrita en hipocampo de rata vieja, sea debido al aumento en la proporción de receptores  $\omega_1$ .



**Figura 12:** Relación entre el porcentaje de sitios de unión tipo I/ $\omega_1$  para benzodiazepinas y la máxima estimulación ( $E_{max}$ ), de la interacción alostérica entre el sitio de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA. El porcentaje de sitios de unión tipo I/ $\omega_1$ , se determinó del ajuste de las curvas del desplazamiento de la unión de 1 nM [ $^3H$ ]flunitrazepam por CL 218.872 mostrados en la tabla ?. Los valores de  $E_{max}$  provienen del ajuste de las curvas de dosis-respuesta y son mostrados en la tabla ?.

### 5.2 Estudio de la distribución con la imidazopiridina zolpidem.

A la vista de los resultados obtenidos con CL218.872, los cuales no apoyan la hipótesis de trabajo, nos propusimos hacer una determinación más detallada de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas. Para ello, utilizamos la imidazopiridina zolpidem que puede discriminar los mismos sitios de unión que el CL218.872, pero presenta una afinidad más alta para el sitio de unión  $\omega_1$ .



Desplazando la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam con concentraciones crecientes de zolpidem, pudimos cuantificar los distintos sitios de unión de benzodiazepinas. En la tabla 15, se muestran los resultados de los ajustes de las curvas de desplazamiento en las distintas regiones ensayadas. Al igual que con Cl218.872, la curva de desplazamiento de cerebelo se ajustó a un modelo de un sitio de unión con alta afinidad ( $18.5 \pm 5.4$  nM) y en corteza cerebral adulta y corteza prefrontal a un modelo de dos sitios de unión con alta afinidad ( $14.6 \pm 1.5$  nM y  $12.05 \pm 2.9$  nM respectivamente) y media afinidad ( $382.65 \pm 85.7$  nM y  $346.4 \pm 53.3$  nM respectivamente). Estas afinidades se corresponden muy bien con las obtenidas por Pritchett y Seeburg, 1990, con receptores construidos a partir de la inyección de diferentes subunidades en células de riñón.

Las curvas de corteza cerebral de rata de cinco días y médula espinal presentaron un mejor ajuste a un modelo de dos sitios de unión de media afinidad ( $258.1 \pm 26.3$  nM y  $123.9 \pm 67.1$  nM respectivamente) y baja afinidad ( $4.61 \pm 0.12$   $\mu$ M y  $4.15 \pm 3.05$   $\mu$ M respectivamente). Estas dos regiones clásicamente han sido clasificadas como tipo II a partir del ajuste de las curvas de desplazamiento monofásicas con Cl218.872. Esta afinidad de rango  $\mu$ M coincide también con las descritas por Pritchett y Seeburg, 1990. Estos autores describen un nuevo tipo de receptor, no nativo, dentro de los receptores omega 2 que presenta afinidad en el rango  $\mu$ M por zolpidem y que está determinado a nivel molecular por la presencia de la subunidad alfa<sub>5</sub>.

Tabla 15. Distribución regional de los sitios de unión omega para benzodiazepinas en ratas controles.

Cuantificación con zolpidem.

Region	Zolpidem						n
	K <sub>i</sub>			B <sub>max</sub>			
	Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja	
	(K <sub>i</sub> a)	(K <sub>i</sub> m)	(K <sub>i</sub> b)	(sitios (% del total))			
Médula espinal	N.D.	123.9 ± 67.1	4.1 ± 3.1	N.D.	62.1 ± 23.8	38.0 ± 23.9	4
Hipocampo	14.5 ± 7.5	225.8 ± 82.0	6.1 ± 4.6	20.7 ± 9.5	54.6 ± 6.3	24.6 ± 6.8	4
Corteza de 5 días	N.D.	258.1 ± 26.3	4.6 ± 0.1	N.D.	72.4 ± 3.7	27.5 ± 3.7	4
Corteza cerebral <sup>1</sup>	14.6 ± 1.5	382.6 ± 85.7	N.D.	49.3 ± 3.2	50.3 ± 3.2	N.D.	2
Corteza prefrontal	12.0 ± 2.9	346.4 ± 53.3	N.D.	46.0 ± 2.5	53.8 ± 2.5	N.D.	3
Cerebelo	18.5 ± 5.4	N.D.	N.D.	100	N.D.	N.D.	3
Colículo superior	10.40	205.30	10.4	35.60	53.90	10.40	1

Las K<sub>i</sub>(s) y la proporción entre los diferentes sitios de unión fueron calculadas del ajuste de las curvas de desplazamiento de 1nM [<sup>3</sup>H]FNZ por zolpidem. Los valores son la media ± S.D. de n experimentos.

1- La corteza cerebral engloba al cortex sin la corteza prefrontal.

N.D.- no detectado.

En el hipocampo, las curvas de desplazamiento presentaron un comportamiento más complejo con respecto al modelo de sitios de unión al que se ajustaban. El ajuste a un modelo de un sitio de unión resultó significativamente peor  $p < 0.05$  que el ajuste a un modelo de dos sitios de unión (dato no mostrado). Sin embargo, las afinidades que obtuvimos con el modelo de dos sitios de unión se correspondían

con un sitio de media afinidad ( $110.9 \pm 39.6$  nM) y otro de baja afinidad para zolpidem ( $3.61 \pm 1.8$   $\mu$ M). Es decir, al contrario de lo que pensábamos no fuimos capaces de discriminar el sitio de unión para el que zolpidem presenta mayor afinidad. A la vista de estos resultados nos planteamos ajustar las curvas de desplazamiento a un modelo de tres sitios de unión. Lo que obtuvimos fue que de cinco experimentos, dos de ellos presentaron una mejora significativa con respecto al modelo de dos sitios de unión,  $p < 0.05$ , ajustandose mejor a un modelo de tres sitios de unión con afinidades alta, ( $13.5 \pm 5.5$  nM) media ( $297.9 \pm 55.01$  nM) y baja ( $4.95 \pm 0.49$   $\mu$ M). Los otros tres casos no presentaron diferencias significativas con respecto al modelo de dos sitios de unión siendo estadísticamente igual de bueno el ajuste a un modelo de dos que a un modelo de tres sitios de unión.

Como hemos visto, en hipocampo, el sitio de unión de alta afinidad para zolpidem no puede ser discriminado ajustando las curvas de desplazamiento a un modelo de dos sitios de unión. Sin embargo, con CL218.872 un ligando selectivo al igual que zolpidem, se discriminan perfectamente el sitio de unión de alta afinidad y el de baja afinidad. Esta discrepancia en el comportamiento de estos dos ligandos selectivos, que presentan alta afinidad por la misma población de sitios de unión, puede ser debido a la menor proporción de sitios de unión de alta afinidad con respecto al total de sitios omega 2, en el caso del zolpidem y a la razón entre las afinidades de los sitios de unión de media y alta afinidad con respecto a los sitios de baja y media afinidad.

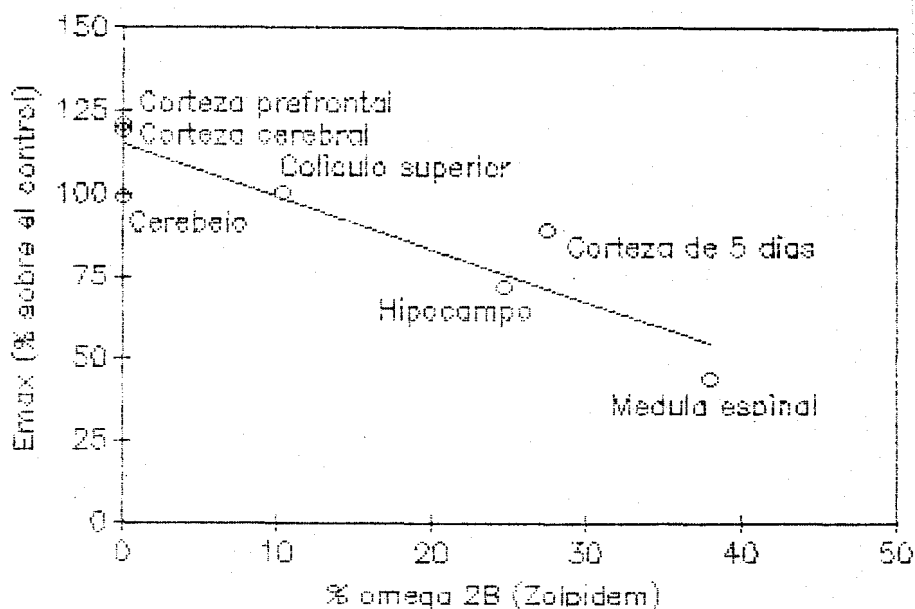
A pesar de que el ajuste a un modelo de tres sitios de unión es

estadísticamente igual que a un modelo de dos sitios de unión, pero en el ajuste a un modelo de dos sitios de unión no discriminábamos el sitio de alta afinidad, claramente discriminado con CL218.872, realizamos todos los ajustes a un modelo de tres sitios de unión. Los resultados se muestran en la tabla 15. Lo más importante que cabe destacar es la buena correspondencia que existe en la proporción entre los sitios de unión de alta afinidad detectados con CL218.872 y los detectados con zolpidem, y que la proporción de sitios de baja afinidad para CL218.872 ( $72.22 \pm 15.21 \%$ ) puede ser dividida en dos grupos con afinidades media, representando el  $54.6 \pm 6.28 \%$  y baja, representando el  $24.6 \pm 6.85 \%$  para zolpidem.

Como muestran estos resultados, la utilización de la imidazopiridina zolpidem pone de manifiesto por primera vez, a nivel farmacológico, la presencia de una población de receptores nativos que presentan baja afinidad para zolpidem presentes en médula espinal, corteza cerebral de rata de cinco días, hipocampo y en menor proporción en colículo superior, es decir en regiones clásicamente definidas como tipo II con CL218.872. Estos resultados coinciden nuevamente con los descritos por Pritchett y Seeburg, 1990 en el sentido de que los tres tipos de receptores construidos en células de riñón con diferentes subunidades alfa pueden existir farmacológicamente como receptores nativos y posiblemente este comportamiento farmacológico sea debido a la presencia de la subunidad  $\alpha_5$  dentro de estos receptores.

El otro hecho importante de destacar, es la clara relación que

existe entre la mayor proporción de receptores con baja afinidad para zolpidem y la menor eficacia en el acople alostérico entre el receptor de GABA y los receptores de benzodiazepinas, figura 13.



**Figura 13:** Relación entre el porcentaje de sitios de unión tipo II/ $\omega_2$  para benzodiazepinas, con baja afinidad para zolpidem, y la máxima estimulación ( $E_{max}$ ) de la interacción alostérica entre el sitio de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA. El porcentaje de sitios de unión tipo II/ $\omega_2$ , se determinó del ajuste de las curvas del desplazamiento de la unión de 1 nM [ $^3H$ ]flunitrazepam por zolpidem mostrados en la tabla ?. Los valores de  $E_{max}$  provienen del ajuste de las curvas de dosis-respuesta y son mostrados en la tabla ?.

## 6. ESTUDIO AUTORADIOGRAFICO DE LA DISTRIBUCION DE LOS SITIOS DE UNION PARA BENZODIAZEPINAS (OMEGA) CON ALTA, MEDIA Y BAJA AFINIDAD PARA ZOLPIDEM.

El uso de la técnica de autoradiografía nos permitió realizar un estudio de la distribución de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas dentro del cerebro de rata Fischer 344, caracterizados previamente con la técnica de unión de radioligandos. De la misma

forma, pretendíamos visualizar el sitio de unión de baja afinidad para zolpidem que habíamos descrito farmacológicamente en hipocampo y así comprobar su localización.

Para visualizar los tres sitios de unión, utilizamos el antagonista [<sup>3</sup>H]flumazenil, que no discrimina entre los distintos sitios de unión, y tres concentraciones de la imidazopiridina zolpidem. El sitio de unión de alta afinidad para zolpidem lo definimos como la fracción de unión específica de [<sup>3</sup>H]flumazenil que es desplazado por 100 nM de zolpidem. El sitio de unión de afinidad intermedia viene determinado por la fracción de unión específica que es resistente a 100 nM de zolpidem pero es desplazado por 3 µM de zolpidem. Por último, el sitio de unión de baja afinidad para zolpidem viene definido como la fracción de unión específica de [<sup>3</sup>H]flumazenil que es resistente a 3 µM de zolpidem.

En la tabla 16, se muestran los resultados de la cuantificación autoradiográfica de los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]flumazenil así como la distribución anatómica de los sitios de unión con alta, media y baja afinidad expresados en fmol/mg de tejido y en porcentaje con respecto al total. Es interesante resaltar la buena correspondencia entre los resultados obtenidos por la técnica de binding y los obtenidos por autoradiografía. También es importante resaltar la buena correspondencia existente entre dos especies de ratas distintas como son Wistar y Fischer 344. En este sentido, la distribución y los porcentajes del sitio de unión de baja afinidad para zolpidem, coinciden con las regiones previamente determinadas por binding como son, hipocampo, colículo superior y médula espinal.

coinciden con las regiones previamente determinadas por binding como son, hipocampo, colículo superior y médula espinal.

Una de las ventajas de la técnica de autorradiografía, es que nos permite realizar un estudio más amplio y de ciertas áreas de difícil evaluación por la técnica de binding. Así podemos detectar el sitio de unión de baja afinidad para zolpidem en el septum (22%), hipotálamo ventromedial (32%), dorsomedial (17%) y lateral (13%) y en el estriado (27%) entre otras regiones. También es importante destacar la ausencia de este sitio de unión en el cerebelo y en la corteza cerebral y prefrontal como habíamos descrito por la técnica de unión de radioligandos.

En la figura 14, (fotografía) podemos ver la distribución de los tres sitios de unión de alta, media y baja afinidad para zolpidem en secciones sagitales de cerebro de rata. Lo más importante es ver la alta concentración de sitios de unión para [<sup>3</sup>H]flumazenil con baja afinidad para zolpidem presentes en hipocampo.

Estos resultados autorradiográficos demuestran la existencia del sitio de unión de baja afinidad para zolpidem caracterizado previamente por técnicas de binding y nos permite visualizar su localización dentro del cerebro de rata y concretamente comprobar su existencia mayoritaria dentro de hipocampo.

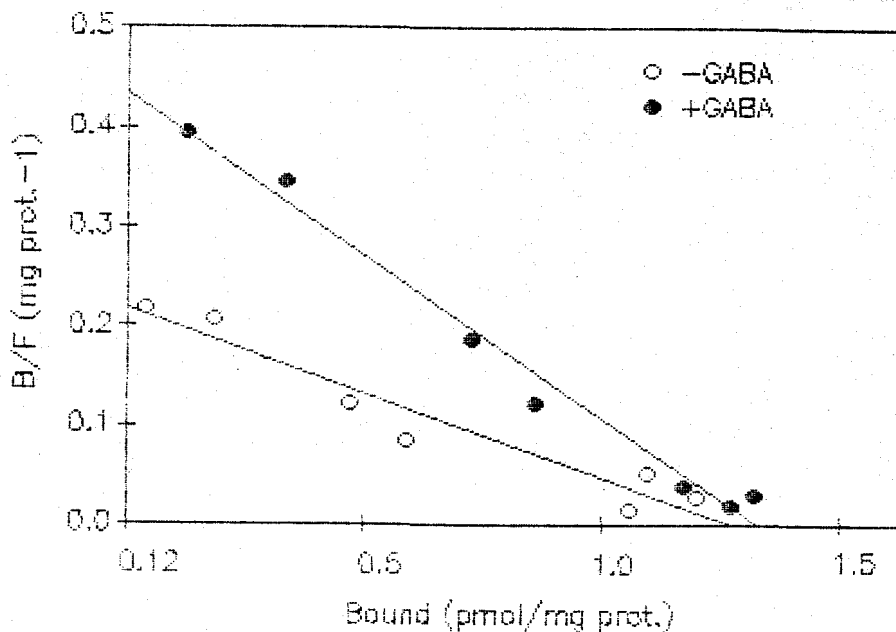
## 7. EFECTO DEL GABA SOBRE LOS DISTINTOS SITIOS DE UNIÓN DE BENZODIACEPINAS DENTRO DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA RATA.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas, junto con los de la estimulación por GABA de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, demostraron que no existe una relación directa entre mayor porcentaje de sitios de unión omega 1 y mayor eficacia en el acople alostérico. Por otro lado, si parece clara la relación entre un mayor porcentaje de receptores de baja afinidad para zolpidem y una menor eficacia en el acople alostérico, debido a que éstos se encuentran en aquellas regiones donde la eficacia del acople alostérico es baja. Llegados a este punto, nos planteamos hacer una caracterización del acople alostérico entre los tres sitios de unión de benzodiazepinas y el receptor de GABA.

Está descrito que el GABA ejerce un efecto modulador positivo sobre la unión de benzodiazepinas incrementando la afinidad para estas drogas (Squires y col., 1984). Para estudiar el efecto del GABA sobre los distintos sitios de unión de benzodiazepinas, lo primero que hicimos fue comprobar que el GABA modifica la afinidad del sitio de unión de benzodiazepinas sin afectar al número de sitios de unión. Para comprobar esto, realizamos experimentos de saturación de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en presencia y ausencia de 100 µM GABA (concentración saturante).

En la figura 15, se muestra la transformación de Scatchard de los resultados. Como se ve, el efecto del GABA se traduce en un aumento de la afinidad (disminución de la K<sub>d</sub>) sin cambios en el número máximo de sitios de unión.





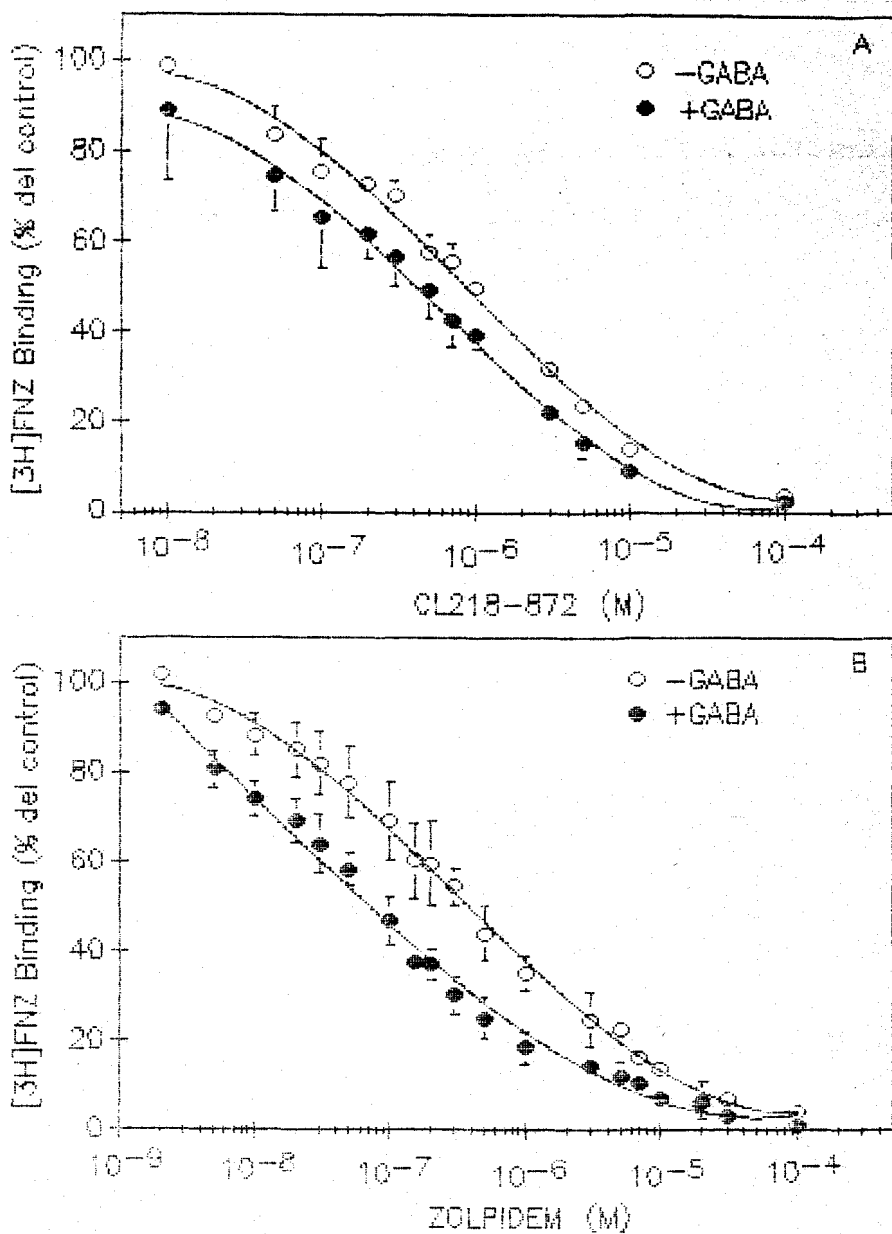
**Figura 15:** Efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam. Las curvas de saturación de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam se realizaron en membranas de hipocampo de rata de 3 meses, en presencia (●), o en ausencia (○), de GABA (100  $\mu\text{M}$ ).

Para cuantificar el efecto del GABA sobre los distintos sitios de unión,  $\omega_1$ ,  $\omega_{2m}$  y  $\omega_{2b}$ , realizamos experimentos de desplazamiento de la unión de 1 nM [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam en presencia y ausencia de GABA. Como índice del grado de acople alostérico, consideramos la razón entre los valores de  $K_i$  en ausencia y presencia de GABA, habiendo comprobado que el GABA afecta solamente al valor de  $K_d$  y no al número de sitios de unión, figura 15.

En la figura 16, se muestran las curvas de desplazamiento de la unión de 1nM de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam, más/menos GABA, por CL218.872 (A) o zolpidem (B) en membranas de hipocampo de rata control. Como se puede ver, el GABA aumenta la afinidad para ambos ligandos como refleja el desplazamiento hacia la izquierda de las curvas en presen-

cia de este neurotransmisor. El grado de acople alostérico, se determina ajustando las curvas de desplazamiento a los distintos modelos de sitios de unión, según la región, y viendo la razón entre los valores de las  $K_{is}$  obtenidos en ausencia y presencia de GABA. Para realizar los ajustes en presencia de GABA, consideramos el cambio en el valor de  $K_d$  para [ $^3H$ ]flunitrazepam originado por el GABA en las distintas regiones, ver tabla 17.

En la mayor parte de los ajustes, el GABA sólo afectó a los valores de  $K_d$  o  $K_i$  sin afectar al número máximo de sitios de unión. Sólo en aquellos experimentos en los que la variación del valor de  $R$ , que da idea del número máximo de sitios de unión y es obtenido del programa LIGAND, o la proporción entre los distintos sitios de unión, fue superior al 20% con respecto al valor en ausencia de GABA, se utilizaron los valores de  $R$  obtenidos en el ajuste sin GABA y se fijó este valor para obtener los valores de las distintas  $K_{is}$  en presencia de GABA.



**Figura 16:** Efecto del GABA sobre el desplazamiento de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. El desplazamiento de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam e membranas de hipocampo por CL 218.872 (A) o zolpidem (B), se realizaron en presencia (●), o en ausencia (○) de GABA (100 μM). Los valores están expresados como porcentaje de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam con respecto al control, en ausencia de CL 218.872. Los valores de los parámetros provenientes del ajuste de las curvas se muestran en la tabla ?.

---

Tabla 17. Variación regional del efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam

Region	[ <sup>3</sup> H]FNZ	
	$Kd\text{-}^a/Kd\text{+}^b$	n
Médula espinal	1.9 ± 0.3	5
Hipocampo	2.2 ± 0.1	4
Corteza de 5 días	2.4 ± 0.4	3
Corteza cerebral <sup>1</sup>	3.3 ± 0.1	2
Cerebelo	2.7 ± 0.2	3

Las constantes de afinidad, en ausencia o presencia de 100 μM GABA, fueron calculadas a partir de los experimentos de saturación de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. Los datos están expresados como la razón entre la constante de afinidad en ausencia y presencia de GABA y son la media ± S.D. de n experimentos.

a- Constante de afinidad calculada en ausencia de GABA.

b- Constante de afinidad calculada en presencia de GABA.

1- La corteza cerebral engloba al cortex sin la corteza prefrontal.

---

A partir del ajuste de las curvas del desplazamiento de la unión de 1 nM [<sup>3</sup>H]flunitrazepam por Cl218-872 en hipocampo de rata control, mostradas en la figura 17 A, obtuvimos los valores de las constantes de inhibición con y sin GABA. El GABA disminuye 3.38 ± 0.17 veces (n=3) el valor de la  $K_i$  del sitio de alta afinidad ( $\omega_1$ ) y 2.05 ± 0.12 veces (n=3) el valor de la  $K_i$  del sitio de baja afinidad ( $\omega_2$ ). Este efecto del GABA sobre las  $K_i$ s de los dos sitios de unión es significativamente diferente ( $p < 0.004$ ), lo que nos

da idea de un diferente grado de acople entre los dos sitios de unión o entre los receptores  $\omega_1$  y  $\omega_2$  con el receptor del GABA.

El ajuste de las curvas de desplazamiento de la unión de 1 nM [ $^3$ H]flunitrazepam por zolpidem en hipocampo de rata control, mostrada en la figura 16B, a un modelo de dos sitios, da lugar a dos sitios de unión con afinidades media y baja para zolpidem como hemos visto antes. El GABA disminuyó las constantes de inhibición de estos dos sitios de unión,  $4.28 \pm 1.52$  veces ( $n=4$ ) la del sitio de afinidad media ( $110.9 \pm 39.6$  nM) y  $2.02 \pm 0.3$  veces ( $n=4$ ) la del sitio de afinidad baja ( $3.6 \pm 1.8$   $\mu$ M). Estos dos números son significativamente diferente ( $p < 0.03$ ), lo que nos da idea de que el acople alostérico entre los dos sitios de unión clásicamente definidos como tipo II es heterogeneo.

Ajustando esas mismas curvas a un modelo de tres sitios de unión pudimos determinar el efecto del GABA sobre estos tres sitios. Como se muestra en la tabla 18, el GABA disminuyó de la misma manera las constantes de inhibición de los sitios  $\omega_1$  y  $\omega_{2m}$  y en menor cantidad la constante de inhibición del sitio de unión de baja afinidad  $\omega_{2b}$ .

Utilizando este mismo protocolo pudimos determinar el efecto del GABA sobre los distintos sitios de unión en otras regiones cerebrales que presentan diferentes eficacias en el acople alostérico. Los resultados se presentan en la tabla 18 y como se puede ver, el efecto del GABA es igual sobre los receptores  $\omega_1$  y  $\omega_{2m}$  en

todas las regiones ensayadas excepto en la médula espinal y es significativamente mayor que sobre los receptores  $\omega_2$ .

Tabla 18. Variación regional del efecto del GABA sobre la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam a los diferentes sitios de unión de benzodiazepinas.

Región	Zolpidem			n
	$K_i \text{ a-}^a / K_i \text{ a}^b$	$K_i \text{ m-}^a / K_i \text{ m}^b$	$K_i \text{ b-}^a / K_i \text{ b}^b$	
Médula espinal	N.D.	$1.67 \pm 0.51$	$1.19 \pm 0.88$	5
Hipocampo	$4.77 \pm 1.41$	$4.67 \pm 1.10$	$1.31 \pm 1.10^{**}$	4
Corteza de 5 días	N.D.	$3.68 \pm 0.57$	$1.66 \pm 0.88^*$	3
Corteza cerebral <sup>1</sup>	$3.58 \pm 0.68$	$3.50 \pm 0.18$	N.D.	2
Cerebelo	$2.63 \pm 0.75$	N.D.	N.D.	3

Las constantes de inhibición, en ausencia o presencia de 100  $\mu$ M GABA, fueron calculadas a partir de los experimentos de competición usando [ $^3$ H]FNZ y zolpidem. Los valores están expresados como la razón entre la constante de inhibición en ausencia y presencia de GABA y son la media  $\pm$  S.D. de n experimentos.

N.D.- no detectado.

a.- Constante de afinidad calculada en ausencia de GABA.

b.- Constante de afinidad calculada en presencia de GABA.

1- La corteza cerebral engloba al cortex sin la corteza prefrontal.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.008$  Diferencias significativas con respecto a la razón del sitio de alta o media afinidad.

En resumen, todos estos resultados demuestran la existencia de un nuevo sitio de unión de benzodiazepinas que presenta baja afinidad para la imidazopiridina zolpidem, (rango  $\mu\text{M}$ ) y que está acoplado con baja eficiencia al receptor del GABA. Considerando en conjunto los resultados de la distribución de estos sitios de unión de baja afinidad para zolpidem y el efecto diferencial del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam, se podría concluir que en las regiones cerebrales donde estén presente estos sitios de unión, la eficacia en el acople alostérico entre el sitio de unión del GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas será menor que en las regiones que presenten una baja proporción o carezcan de estos sitios de unión.

## 8. DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES PEPTIDOS DEL RECEPTOR DE BENZODIACEPINAS EN DISTINTAS REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.

La aplicación de la técnica de fotomarcaje en combinación con técnicas inmunológicas, ha permitido caracterizar el receptor de benzodiazepinas a nivel de composición peptídica, así como la correspondencia entre los distintos péptidos fotomarcados y las distintas subunidades clonadas del receptor. Así se sabe que el péptido fotomarcado P51 se corresponde con la subunidad  $\alpha_1$ , P53 con  $\alpha_2$ , P57 con  $\alpha_{4-5}$  y P59 con  $\alpha_3$  (Olsen y col., 1991). Esta técnica también ha permitido situar el sitio de unión de las benzodiazepinas sobre las subunidades alfas y el sitio de unión del GABA sobre las subunidades betas (Mölher y col., 1980; Deng y col., 1986; Bureau y col., 1988).

A nivel molecular, el receptor  $\omega_1$  viene determinado por la presencia del péptido P51 y los receptores  $\omega_2$  están determinados por la presencia de cualquiera de las otras subunidades (ver el apartado de Introducción).

El uso de la técnica de fotomarcaje nos permitió visualizar la composición peptídica del receptor de las benzodiazepinas en distintas regiones que habían sido caracterizadas previamente a nivel farmacológico. Como se muestra en la figura 18, (foto) el perfil peptídico que presentan las dos regiones cerebrales, es cuantitativa y cualitativamente diferente y se corresponde con las proporciones de los diferentes sitios de unión descritas anteriormente. En cerebelo, una región 100%



omega<sub>1</sub> a nivel farmacológico, presenta sólo una banda fotomarcada de masa molecular aparente de 51 Kd, correspondiente a la subunidad alfa<sub>1</sub>. Sin embargo, en corteza cerebral adulta, aparecen cuatro bandas fotomarcadas correspondientes a las subunidades alfa<sub>1</sub>, (P51), alfa<sub>2</sub> (P53), alfa<sub>5</sub> y alfa<sub>3</sub> (P59). Estas tres últimas subunidades determinan receptores omega<sub>2</sub>. Farmacológicamente, la corteza de rata neonatal es 100% omega<sub>2</sub>, lo cual se refleja a nivel de subunidades fotomarcadas en ausencia o una proporción muy baja de P51. Es importante destacar que en esta región detectamos el receptor de baja afinidad para zolpidem que viene determinado a nivel molecular por la proteína P57 (alfa<sub>4-5</sub>).

Como se ve, la heterogeneidad farmacológica detectada dentro de los receptores omega<sub>2</sub> tiene una correspondencia a nivel de composición de subunidades alfa y demuestra el hecho de que la farmacología de los receptores benzodiazepínicos viene determinada por la presencia de diferentes subunidades alfa dentro del complejo GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas.

#### **9. CUANTIFICACION DE LOS SITIOS DE UNION PARA BENZODIAZEPINAS CON ALTA MEDIA Y BAJA AFINIDAD PARA ZOLPIDEM. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO.**

Una vez caracterizada la distribución de los sitios de unión omega con alta, media y baja afinidad para zolpidem en varias regiones cerebrales de ratas controles por técnicas de unión de radioligandos, y comprobada su presencia en hipocampo por técnicas autorradiográficas, nos propusimos identificar farmacológicamente estos sitios de unión en hipocampo de rata vieja.

Teniendo en cuenta la baja eficacia en el acople alostérico entre

el sitio de unión de baja afinidad para zolpidem y el sitio de unión de GABA, y el aumento en la interacción alostérica durante el envejecimiento, la explicación más evidente suponía un aumento de sitios de unión  $\omega_1$  en decremento de sitios de unión  $\omega_{2B}$ .

En la tabla 19 se muestran los resultados del ajuste de las curvas de desplazamiento de la unión de 1 nM [ $^3$ H]flunitrazepam por zolpidem a un modelo de tres sitios de unión. Como se ve, el envejecimiento no modificó las constantes de inhibición de ninguno de los tres sitios de unión.

-----

Tabla 19. Desplazamiento de la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam por zolpidem en hipocampo de ratas controles y viejas.

Edad	$\Omega_{\omega_1}$		$\Omega_{\omega_{2M}}$		$\Omega_{\omega_{2B}}$		n
	Ki(nM)	% <sup>1</sup>	Ki(nM)	%	Ki( $\mu$ M)	%	
3 meses	8.9 $\pm$ 8.4	27.1 $\pm$ 8.0	165.8 $\pm$ 69.3	42.1 $\pm$ 8.1	2.5 $\pm$ 0.9	28.7 $\pm$ 5.1	5
24 meses	19.5 $\pm$ 8.3	42.8 $\pm$ 10.3*	176.3 $\pm$ 90.4	26.3 $\pm$ 3.9*	3.1 $\pm$ 2.9	37.5 $\pm$ 5.9	5

Los valores fueron calculados a partir del ajuste de las curvas de desplazamiento de la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam por zolpidem con el programa LIGAND y son la media  $\pm$  S.D. de n experimentos hechos en paralelo.

1.- Expresado como % del total de sitios de unión.

\* p<0.05. Diferencia significativa con respecto a controles.

-----

En cuanto a las proporciones de los distintos sitios de unión se observa que el aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad descrito con la triazolopiridacina CL218.872, se observa tam-

bién con la imidazopiridina zolpidem ( $27.1 \pm 8.0\%$  frente a  $42.8 \pm 10.3\%$ ,  $n = 5$ , para controles y viejos respectivamente) con un grado de significación de  $p < 0.05$ . Este aumento, es aproximadamente de un 60% dentro de los receptores  $\omega_1$  y es similar al aumento descrito con CL218.872.

La proporción de los sitios de unión de baja afinidad para zolpidem, ( $\omega_{2B}$ ) como se muestra en la tabla 19, no se modifica durante el proceso normal de envejecimiento, contrariamente a como esperabamos.

El aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad para zolpidem, va acompañado de una disminución del sitio de unión de afinidad media ( $\omega_{2m}$ ), pasando de un  $44.2 \pm 8.1\%$  en controles, a un  $26.3 \pm 3.9\%$  en viejos, con un grado de significación de  $p < 0.005$ .

En resumen, estos resultados demuestran que durante el proceso de envejecimiento se produce una redistribución de los distintos sitios de unión para benzodiazepinas en el hipocampo de la rata, sin modificaciones significativas en el número total de receptores para benzodiazepinas, como se demuestra a partir de los resultados obtenidos de las curvas de saturación de [ $^3$ H]flunitrazepam mostradas anteriormente.

Este tipo de modificaciones en las proporciones de los distintos tipos de receptores benzodiazepínicos, es un hecho que ocurre también durante los primeros días de vida de la rata, como han descrito varios autores (Sieghart y col., 1982; Vitorica y col., 1990).

Sin embargo, estos resultados no dan cuenta del aumento en la eficacia del acople alostérico descrito en hipocampo de ratas viejas, ya que, aunque la proporción de receptores  $\omega_1$ , de alto acople alostérico aumenta a lo largo del envejecimiento, disminuyen de manera similar, los receptores  $\omega_{2m}$ , de alto acople alostérico

#### 10. CARACTERIZACION DE LA INTERACCION ALOSTERICA ENTRE EL SITIO DE UNION $\omega_1$ Y EL RECEPTOR DE GABA EN VARIAS REGIONES DEL CEREBRO DE RATA.

Como demuestran los resultados presentados anteriormente, durante el envejecimiento se produce un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad para zolpidem en el hipocampo de rata. Los sitios de unión de alta afinidad presentan un acople alostérico de alta eficacia con el receptor de GABA, e igual al de los sitios de unión  $\omega_{2m}$  que disminuyen aproximadamente en la misma medida. Estos dos hechos, no explicarían el aumento en la eficacia en el acople alostérico observado entre los receptores  $\omega$  y el sitio de unión de GABA en hipocampo de rata vieja.

Actualmente existe una gran cantidad de subunidades clonadas que forman parte del receptor  $GABA_A$ /benzodiazepinas (ver apartado de Introducción) y es conocido que la heterogeneidad a nivel molecular supera en gran medida a la heterogeneidad farmacológica. En concreto, con respecto a las subunidades gamma existen clonadas hasta la fecha, tres subunidades diferentes que confieren distinta sensibilidad a benzodiazepinas y eficacia en el acople alostérico con el

receptor de GABA (Ymer y col.,1990; Pritchett y col., 1989; Knoflach y col.,1991). Basándonos en estos hechos realizamos una caracterización farmacológica de la interacción alostérica entre el sitio de unión omega 1 y el receptor del GABA, con el fin de encontrar alguna diferencia en dicha interacción alostérica que pudiese dar cuenta del aumento en la eficacia observada en hipocampo de rata vieja.

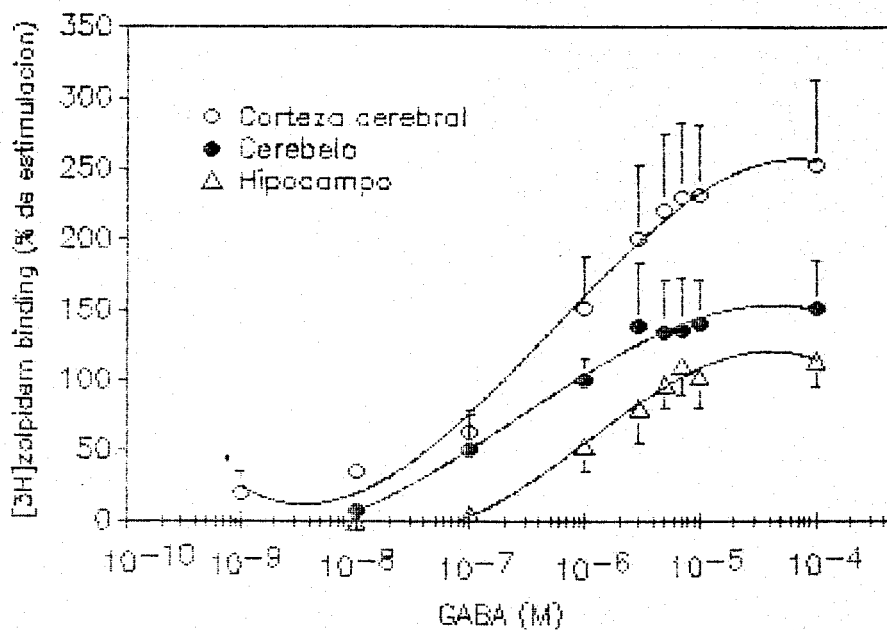
Basándonos en la distribución de las distintas subunidades gamma a partir de los resultados de las hibridaciones "in situ", elegimos las regiones ,corteza cerebral, cerebelo e hipocampo que además presentan eficacias diferentes en el acople alostérico y presentan proporciones diferentes de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas.

La disponibilidad de un ligando específico para el sitio de unión omega<sub>1</sub>, como [<sup>3</sup>H]zolpidem, nos permitió caracterizar este sitio de unión marcando directamente los receptores omega<sub>1</sub>.

#### 10.1 Caracterización por técnicas de unión de radioligandos en membranas.

Lo primero que determinamos fue el efecto del GABA sobre la unión de 3 nM [<sup>3</sup>H]zolpidem en membranas lavadas de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de rata control. La concentración de [<sup>3</sup>H]zolpidem utilizada nos permite marcar los receptores omega<sub>1</sub> puesto que el valor de Kd para este sitio de unión, oscila entre 10 - 15 nM y el valor de Kd para los receptores omega<sub>2M</sub> oscila entre 200 - 300 nM.

En la figura 19, se muestran las curvas de dosis respuesta en las regiones ensayadas.



**Figura 19:** Variación regional del efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem al sitio de unión de benzodiazepinas tipo I/omega<sub>1</sub>. La estimulación de la unión de 3 nM [<sup>3</sup>H]zolpidem por GABA se determinó en membranas de corteza cerebral (○), cerebelo (●) e hipocampo (△) de ratas de 3 meses. Los valores están expresados como el porcentaje de estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem sobre el control sin GABA. Los valores controles expresados en fmol fueron 20.7 ± 7, 23.2 ± 5 y 16.7 ± 5 para corteza cerebral, cerebelo e hipocampo respectivamente.

Como se ve, el efecto es dependiente de la dosis en las tres regiones. El gráfico proporcionó los valores de E<sub>max</sub> y EC<sub>50</sub>. Como habíamos determinado anteriormente, de manera indirecta, el acople entre el sitio de unión omega 1 y el sitio de unión de GABA es de alta eficacia en las tres regiones. Como se puede ver en la figura 19, este acople alostérico presenta heterogeneidad regional dentro del cerebro de rata, siendo

en corteza significativamente (one-way ANOVA,  $F(2,11)=13.86$ ,  $p=0.0018$ , Tukey  $p<0.03$ ) de mayor eficacia ( $265 \pm 47\%$ ,  $n=4$ ) que en cerebelo ( $165 \pm 48\%$ ,  $n=4$ ) o hipocampo ( $118 \pm 17\%$ ,  $n = 4$ ).

La potencia de este efecto, determinada por el valor de  $EC_{50}$ , fue significativamente menor (one-way ANOVA,  $F(2,11) = 17.04$ ,  $p = 0.0009$ , Tukey,  $p<0.01$ ) en hipocampo que en corteza o cerebelo, tabla 20.

-----  
**Tabla 20.** Efecto del GABA sobre la unión de [ $^3H$ ]zolpidem en varias regiones del cerebro de rata control.

Región	$E_{max}$ (% de estimulación)	$EC_{50}$ $\mu M$	$K_H$	n
Corteza cerebral <sup>1</sup>	$265 \pm 47^a$	$0.6 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1^c$	4
Cerebelo	$165 \pm 48$	$0.4 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.3$	4
Hipocampo	$118 \pm 17$	$1.8 \pm 0.6^b$	$1.2 \pm 0.4$	4

Los valores están expresados como porcentaje de la unión de [ $^3H$ ]zolpidem en ausencia de GABA y son la media  $\pm$  S.D. de n experimentos hechos en paralelo.

a.-  $p<0.0006$ . Diferencia significativa con respecto a cerebelo e hipocampo.

b.-  $p<0.008$ . Diferencia significativa con respecto a corteza y cerebelo.

c.-  $p<0.045$ . Diferencia significativa con respecto a hipocampo.

1.- La corteza cerebral representa el cortex sin la corteza prefrontal.

-----

## 10.2 Caracterización por técnicas autorradiográficas.

Esta heterogeneidad regional observada en el acople alostérico entre el sitio de unión  $\omega_1$  y el sitio de unión de GABA, fue comprobada por técnicas autorradiográficas y como se muestra en la tabla 21, el efecto del GABA, expresado como número de veces que el GABA estimula la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem, está generalizado dentro del cerebro de la rata.

Con esta técnica pudimos evaluar un mayor número de regiones y pudimos ver que existe una gradación del efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem dentro del cerebro de la rata, sin que exista en principio ninguna relación funcional, figura 20 (foto). Así encontramos regiones con un alto acople alostérico, como la sustancia negra, el geniculado lateral, el tubérculo olfatorio, el núcleo rojo y la corteza frontoparietal, entre otras. Regiones con un acople intermedio, como cerebelo, hipocampo y el colículo superior. Dentro del cerebelo el efecto del GABA fue mayor en la capa molecular que en la capa granular. En el hipocampo también encontramos heterogeneidad, siendo el efecto del GABA mayor en las regiones CA1 y CA2 que en CA3 y el giro dentado. En el resto de las áreas que examinamos el efecto del GABA fue inferior a tres veces, tabla 21.

Es importante notar que por técnicas autorradiográficas el efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem presentó la misma gradación, es decir corteza > cerebelo > hipocampo, que la observada por técnicas de unión de radioligandos en membranas.



ENHANCEMENT BY GABA OF  $^3\text{H}$ -ZOLPIDEM BINDING TO RAT BRAIN SECTIONS

5 nM  $^3\text{H}$ -zolpidem

5 nM  $^3\text{H}$ -zolpidem + 100  $\mu\text{M}$  GABA



ENHANCEMENT BY GABA OF  $^3\text{H}$ -ZOLPIDEM BINDING TO RAT BRAIN SECTIONS

5 nM  $^3\text{H}$ -zolpidem

5 nM  $^3\text{H}$ -zolpidem + 100  $\mu\text{M}$  GABA

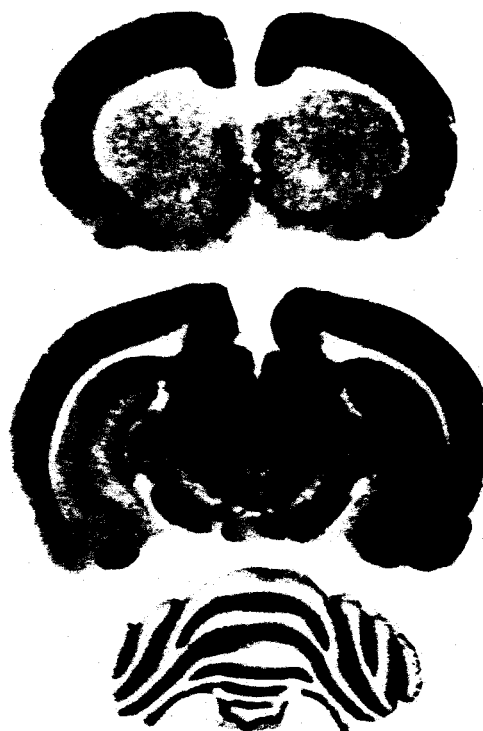


Figura 20: Estimulación ejercida por GABA sobre la unión de 5 nM [ $^3\text{H}$ ]zolpidem en secciones de cerebro de rata. Secciones consecutivas se incubaron con 5 nM [ $^3\text{H}$ ]zolpidem más/menos 100  $\mu\text{M}$  GABA. Las fotografías muestran la estimulación observada en hipocampo (A) y a otros niveles dentro del cerebro de la rata (B) y son representativas de los datos obtenidos de 4-5 ratas.

-----  
**Tabla 21.** Cuantificación autorradiográfica del efecto de GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem  
 a secciones de cerebro de rata control Fischer 344.

Estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem por 100 μM GABA

<u>Estructura</u>	<u>Número de veces</u>
<b>CORTEZA</b>	
- Cingulado anterior	4.2 ± 0.2
- Cingulado	4.1 ± 0.7
- Capa frontoparietal I-III	3.3 ± 0.2
- Capa frontoparietal IV	3.4 ± 0.6
- Capa frontoparietal V-VI	4.2 ± 0.5
- Entorrinal	2.1 ± 0.4
<b>EULBO OLFATORIO</b>	3.4 ± 0.3
<b>AMIGDALA</b>	2.4 ± 0.3
<b>NUCLEO ACCUMBENS</b>	1.7 ± 0.3
<b>ESTRIADO</b>	3.1 ± 0.5
<b>SEPTUM</b>	3.4 ± 0.6
<b>HIPOCAMPO</b>	
- Area CA <sub>1</sub>	3.5 ± 0.6
- Area CA <sub>2</sub>	3.5 ± 1.5
- Area CA <sub>3</sub>	2.2 ± 0.3
- Giro dentado	2.5 ± 0.3
<b>NUCLEO ROJO</b>	4.3 ± 0.4
<b>GENICULADO LATERAL</b>	4.2 ± 1.1
<b>COLICULO SUPERIOR</b>	
- Capa superficial	2.4 ± 0.3
- Capa interna	3.6 ± 0.6
<b>MATERIA GRIS CENTRAL</b>	3.5 ± 0.4
<b>SUSTANCIA NEGRA</b>	4.4 ± 1.1
<b>CEREBELO</b>	
- Capa molecular	3.8 ± 1.3
- Capa granular	2.1 ± 0.6
<b>MEDULA PONS</b>	2.6 ± 0.1

Los valores son la media ± S.D. obtenidos de tres ratas.

-----

En resumen, estos resultados demuestran que el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem, presenta heterogeneidad regional dentro del cerebro de la rata, determinado tanto por técnicas de unión de radioligandos como por autorradiografía y en dos razas diferentes de ratas como son Wistar y Fischer 344. Este efecto diferencial nos puede dar idea de diferencias en el acople alostérico entre los receptores omega<sub>1</sub> y el receptor de GABA, que pueden ser reflejo de diferencias en la composición molecular del receptor GABA<sub>A</sub>/omega<sub>1</sub> dentro de las distintas regiones cerebrales, y, que la heterogeneidad molecular de esta proteína receptora puede ser mayor que la esperada a partir de los resultados farmacológicos.

#### 11. CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR omega<sub>1</sub> EN VARIAS REGIONES DEL CEREBRO DE RATA.

Una de las posibles explicaciones de la heterogeneidad regional observada en el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem, puede ser la presencia de diferentes isoformas de la subunidad alfa<sub>1</sub>, que confieran farmacología omega<sub>1</sub>, es decir alta afinidad para CL218.872 y zolpidem, pero con diferente farmacología. Para considerar esta posibilidad, realizamos una caracterización farmacológica amplia del sitio de unión omega<sub>1</sub>.

Como se muestra en la tabla 22, ni los valores de K<sub>d</sub> obtenidos de los experimentos de saturación, ni los valores de K<sub>i</sub> obtenidos de los experimentos de competición, mostraron diferencias significativas entre las tres regiones ensayadas.

Este comportamiento farmacológico fue determinado también en presencia de GABA con el fin de ver si el GABA modificaba algún parámetro que no se modificaba en ausencia de este neurotransmisor. Para ello, realizamos experimentos de competición en presencia y ausencia de GABA con dos ligandos, CL218.872 y DMCM. Como se muestra en la tabla 22, no se observaron diferencias en ninguno de los dos casos.

Un parámetro que puede indicar heterogeneidad es el factor de pendiente o índice de Hill. Como se puede ver en la tabla 22, este parámetro solamente mostró diferencias significativas (one-way ANOVA  $F(5,43) = 4.9$ ,  $p = 0.002$ , Tukey,  $p < 0.05$ ) con DMCM tanto en corteza, como en hipocampo. Este resultado puede estar indicando que este compuesto discrimine entre varios sitios de unión dentro de los receptores clasificados como  $\omega_1$ , y que están presentes en la misma medida tanto en corteza como en hipocampo, por lo que en principio no explicarían la diferencia observada en el acople alostérico entre los receptores  $\omega_1$  de estas dos regiones.

Tabla 22. Caracterización farmacológica del receptor  $\omega_1$  GABA<sub>A</sub>/benzodiazepina

en membranas de corteza, cerebelo e hipocampo de ratas controles Wistar.

Ligando	Corteza		Cerebelo		Hipocampo	
	Afinidad	$n_H$	Afinidad	$n_H$	Afinidad	$n_H$
[ <sup>3</sup> H]zolpidem	11.2±3.5	1.0±0.1 (6)	13.5±6.1	0.9±0.1 (3)	9.1±6.5	0.9±0.1 (4)
Clonazepam	1.7±1.6	1.1±0.1 (4)	3.8±2.5	1.0±0.4 (2)	3.3±2.5	1.1±0.2 (3)
Diazepam	3.1±3.1	0.9±0.1 (3)	2.2±0.8	1.2±0.4 (2)	3.4±2.5	0.9±0.1 (2)
Flumazenil	1.5±0.1	0.8±0.1 (3)	1.3±0.8	0.9±0.3 (2)	0.7±0.4	0.9±0.3 (3)
DMCM	3.6±1.3	0.6±0.2*(6)	3.6±2.8	0.7±0.2 (3)	3.4±1.3	0.6±0.3*(5)
+100µM GABA	5.4±2.1	0.8±0.1 (4)	N.D.	N.D.	7.4±4.0	0.7±0.1 (4)
CL 218-872	58.7±15.1**	0.8±0.1 (3)	N.D.	N.D.	58.8±22.1**	0.8±0.1 (3)
+100µM GABA	17.8±11.0	0.8±0.1 (3)	N.D.	N.D.	23.9±12.2	0.9±0.2 (3)

La constante de afinidad ( $K_d$  o  $K_i$ ) y el índice de Hill ( $n_H$ ) para cada ligando fueron calculados a partir del ajuste de las curvas de saturación de [<sup>3</sup>H]zolpidem o a partir de las curvas de desplazamiento de [<sup>3</sup>H]zolpidem (5 nM). Los resultados son la media ± S.D. del número de experimentos dado entre paréntesis. Las afinidades ( $K_d$  o  $K_i$ ) están expresadas en nM.

Los valores de  $K_i$  o  $n_H$  de corteza e hipocampo fueron comparados mediante un análisis multifactorial de varianza seguido de la aplicación de un test de Tukey. ANOVA entre los ligandos fue significativo para  $n_H$  ( $F(5,43)=4.90$ ,  $p=0.002$ ) o  $K_i$  ( $F(5,43)$ ,  $p=0.0001$ ). No se hallaron diferencias significativas entre corteza e hipocampo o entre corteza e hipocampo y los ligandos tanto para la  $K_i$  o  $n_H$ . Tukey: \*  $p<0.05$  para zolpidem y clonazepam; \*\*  $p<0.01$  para el resto de los ligandos.

Como ha sido descrito (Ymer y col.,1990), los receptores construidos con las subunidades alfa-1, gamma-1 y beta-1, es decir farmacológicamente  $\omega_1$ , carecen de sitios de unión para el antagonista flumazenil y el agonista inverso DMCM. Estos resultados nos proporcionan un método farmacológico para detectar la presencia de la subunidad gamma-1, la cual está implicada en la modulación alostérica

entre los receptores de benzodiazepinas y el receptor de GABA, como se explica en el apartado de Introducción. También está descrito que la subunidad gamma-1 confiere una menor eficacia en el acople alostérico entre estos dos sitios de unión que la subunidad gamma-2, (Puia y col.,1991) por lo tanto, una posible explicación de los resultados obtenidos a partir de las curvas de dosis respuesta, puede ser una mayor proporción, en hipocampo y cerebelo, de receptores omega<sub>1</sub> que contengan la subunidad gamma-1 en su estructura polipeptídica.

Como se desprende de la tabla 22, en las tres regiones cerebrales ensayadas, las curvas de desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem por flumazenil o DMCM mostraron un mejor ajuste a un modelo de un sitio de unión de alta afinidad, rango nM, tanto en presencia, como en ausencia de GABA en el caso del DMCM.

En resumen, estos resultados demuestran que los receptores omega<sub>1</sub> de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo son farmacológicamente similares, por lo que es poco probable que existan diferentes isoformas de la subunidad alfa-1, y por otro lado, la ausencia de sitios de unión de muy baja afinidad para flumazenil y DMCM en cualquiera de las tres regiones, indica que los receptores omega<sub>1</sub> carecen, o incluyen en muy baja proporción, la subunidad gamma-1 en su composición peptídica. Estos resultados farmacológicos concuerdan con la ausencia de subunidad gamma<sub>1</sub> detectada por técnicas de hibridación in situ dentro del cerebro de rata (Wisden y col.,1992; Laurie y col.,1992).

Por último, el efecto diferencial del GABA en las distintas regiones cerebrales, podría indicar diferencias en la composición molecular de los receptores  $\omega_1$  dentro del cerebro de rata.

## 12. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL RECEPTOR $\omega_1$ /GABA EN HIPOCAMPO DE RATA.

Como hemos descrito anteriormente, durante el proceso de envejecimiento se produce un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad para CL218.872 y zolpidem en hipocampo de rata. Estos resultados han sido obtenidos a partir del ajuste de las curvas de desplazamiento de la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam por CL218.872 y zolpidem, dos ligandos no benzodiazepínicos que discriminan entre varios sitios de unión para las benzodiazepinas. La disponibilidad de zolpidem marcado radiactivamente, nos permitió marcar de manera directa los sitios de unión de alta afinidad y comprobar los resultados obtenidos a partir de los desplazamientos.

### 12.1 Estudios de saturación.

#### 12.1.1 Caracterización por técnicas de unión de radioligandos en membranas.

En la tabla 23, se muestran los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas de saturación de [ $^3$ H]zolpidem, figura 21. Estos experimentos, se realizaron utilizando 20 nM como concentración máxima de [ $^3$ H]zolpidem. A esta concentración, marcá-

bamos casi la totalidad de los sitios de unión de alta afinidad en ambos grupos de edad (90%) y no marcábamos a los receptores del siguiente grupo de afinidad cuya Kd oscila entre 200-300 nM.

Como se puede ver en la tabla 23, tanto en ratas Wistar ( $0.19 \pm 0.04$  frente a  $0.32 \pm 0.05$  pmol/mg de proteínas, n = 4, para control y viejo respectivamente) como en ratas Fischer 344 ( $0.17 \pm 0.03$  frente a  $0.27 \pm 0.05$  pmol/mg de proteínas, n = 4, para control y viejo respectivamente) se observa un aumento en el número de sitios de unión de alta afinidad ( $\omega_1$ ) en hipocampo, durante el envejecimiento. Este aumento de sitios de unión de alta afinidad, está en torno al 60% en ambas razas de ratas y coincide con el aumento descrito con CL218.872 y zolpidem, en torno al 60% también.

---

Tabla 23. Efecto del envejecimiento sobre el sitio de unión  $\omega_1$  en membranas de hipocampo de ratas Wistar y Fischer 344.

Edad	Wistar		Fischer 344		n
	Kd	Bmax	Kd	Bmax	
	(nM)	(pmol/mg prot.)	(nM)	(pmol/mg prot.)	
3 meses	$5.9 \pm 3.3$	$0.19 \pm 0.04$	$4.0 \pm 2.3$	$0.17 \pm 0.03$	4
24 meses	$9.3 \pm 2.6$	$0.32 \pm 0.05^*$	$8.8 \pm 1.4$	$0.27 \pm 0.05^*$	4

Los valores se obtuvieron del ajuste de las curvas de saturación utilizando el programa LIGAND y son la media  $\pm$  S.D. de n experimentos.

\*.-  $p < 0.05$ . Diferencia significativa con respecto a controles.

---



En la figura 21, se muestra la transformación de Scatchard de una curva representativa de un experimento de saturación de [<sup>3</sup>H]zolpidem en hipocampo de rata control y vieja.

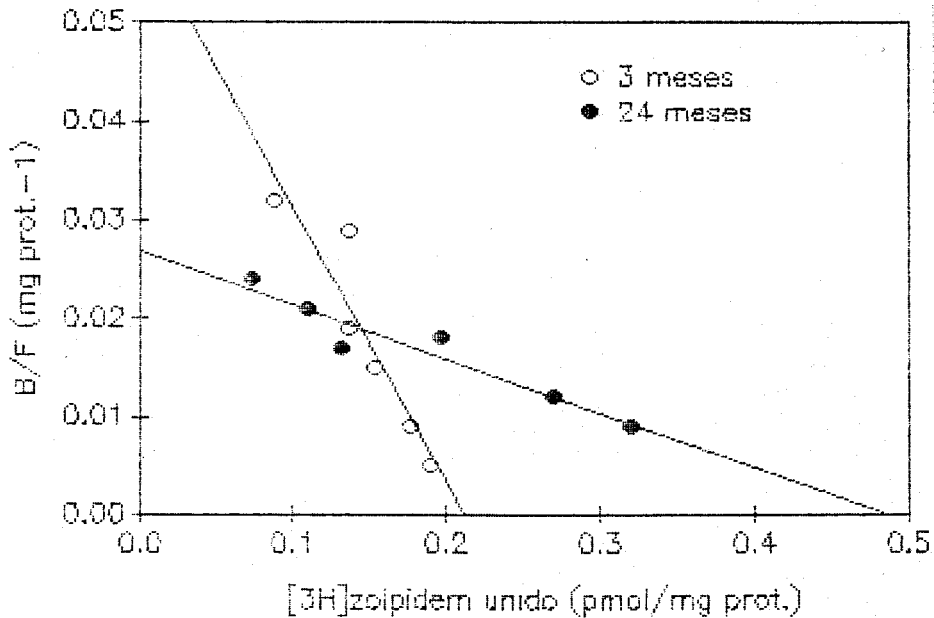


Figura 21: Efecto del envejecimiento sobre las curvas de saturación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem al sitio de unión de benzodiazepinas tipo I/ $\omega_1$ . Las curvas de saturación de [<sup>3</sup>H]zolpidem se realizaron en membranas de hipocampo de rata de 3 meses ( ) y 24 meses ( ) utilizando una concentración máxima de [<sup>3</sup>H]zolpidem de 20 nM.

Por lo tanto estos resultados demuestran de manera directa, es decir marcando los sitios de unión  $\omega_1$ , que éstos aumentan durante el envejecimiento y que este fenómeno no parece estar restringido a una especie determinada de rata sino más bien, ser una consecuencia general del proceso de envejecimiento y permite la posibilidad de especular que esté extendido a otras especies de mamíferos.

### 12.1.2 Caracterización autorradiográfica.

Esta cuantificación de los sitios de unión de alta afinidad utilizando [<sup>3</sup>H]zolpidem también la realizamos por técnicas autorradiográficas. Teniendo en cuenta la mayor capacidad de resolución que presenta esta técnica, nos propusimos:

i) Visualizar el aumento descrito a nivel farmacológico de estos sitios de unión, viendo si el aumento en el número de sitios de unión de alta afinidad para zolpidem ocurría dentro de todo el hipocampo, o estaba limitado a ciertas zonas.

ii) Ver si este aumento observado durante el envejecimiento es un proceso generalizado dentro del cerebro de rata, o está restringido exclusivamente al hipocampo.

En la figura 22, se muestra una fotografía en falso color representativa de un corte sagital a nivel de hipocampo y sustancia negra, en la que se muestra la distribución de los receptores de alta afinidad para zolpidem, marcados con [<sup>3</sup>H]zolpidem 15 nM. Se puede observar, que principalmente en el giro dentado es donde aparecen los mayores niveles de sitios de unión de alta afinidad para [<sup>3</sup>H]zolpidem a lo largo del envejecimiento.

Como se muestra en la tabla 24, los valores de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem, expresados en fmol/mg de tejido, no muestran diferencias significativas con el envejecimiento en la mayoría de las estructuras determinadas. Sólo en hipocampo, es donde el valor de la

unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem es significativamente mayor en viejos que en controles.

En resumen, estos resultados comprueban los resultados obtenidos utilizando técnicas de unión de radioligandos, en el sentido de un aumento en la densidad de sitios de unión en hipocampo de rata como consecuencia del envejecimiento. Por otro lado nos permiten ver de manera directa que este aumento, ocurre principalmente en el giro dentado y que no es un fenómeno generalizado que tiene lugar en la mayoría de las regiones cerebrales como consecuencia del envejecimiento, sino más bien parece estar restringido a hipocampo.

Tabla 24. Determinación cuantitativa del estudio autorradiográfico de la distribución anatómica de los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem (omega<sub>1</sub>) en el SNC de ratas Fischer. Efecto del envejecimiento.

Región	Unión específica de [ <sup>3</sup> H]zolpidem.		
	fmol/mg de tejido		
	CONTROL	VIEJA	CONTROL/VIEJA
<b>CORTEZA</b>			
- Cingulado posterior	70.7± 8	74.2±22	1.0
- Capa frontoparietal I-III	58.4±13	75.8±22	1.3
- Capa frontoparietal IV	117.0±22	130.0±30	1.1
- Capa fronto parietal V-VI	70.1±13	81.4±21	1.2
- Entorrinal	30.0±10	39.3±17	1.3
<b>AMIGDALA</b>			
	40.7±23	44.6±29	1.1
<b>NUCLEO ROJO</b>			
	38.9±7	38.0±8	1.0
<b>NUCLEO GENICULADO</b>			
	38.7±7	42.1±8	1.1
<b>COLICULO SUPERIOR</b>			
- Capa superficial	33.2±3	32.3±1	1.0
- Capa interna	60.2±3	47.7±15	0.8
<b>HIPOCAMPO</b>			
- Area CA1	33.7±1	41.1±10	1.2
- Area CA2	11.3±1	21.6±4	1.9
- Area CA3	11.1±1	19.1±4	1.7
- Giro dentado	38.0±3	58.0±17	1.5

Los valores son la media ± S.D. obtenidos de tres ratas.

## 12.2 Interacciones alostéricas.

Otro de los cambios que hemos descrito en la farmacología del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas durante el envejecimiento, es el aumento en la eficacia del acople alostérico entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión omega para benzodiazepinas. Este aumento en la eficacia no puede ser explicado, como he descrito antes, por una disminución en la proporción de los sitios de unión de baja afinidad para zolpidem, con baja eficacia en el acople alostérico con el receptor de GABA, puesto que éstos también aumentan a lo largo del proceso de envejecimiento.

Como he descrito anteriormente, el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem presenta heterogeneidad regional dentro del cerebro de rata, con zonas de alto y bajo acople alostérico. Considerando esta observación, nos propusimos hacer un estudio del efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem en hipocampo de rata control y vieja, con el fin de determinar si el acople entre los sitios de unión omega<sub>1</sub>, que aparecen durante el envejecimiento, y el sitio de unión de GABA también se modifica con el envejecimiento y pueden explicar el aumento en la eficacia del acople alostérico.

En la figura 23, se muestran las curvas de dosis respuesta del efecto de GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem, en hipocampo de rata control y rata vieja, en dos razas diferentes, Wistar y Fischer 344.

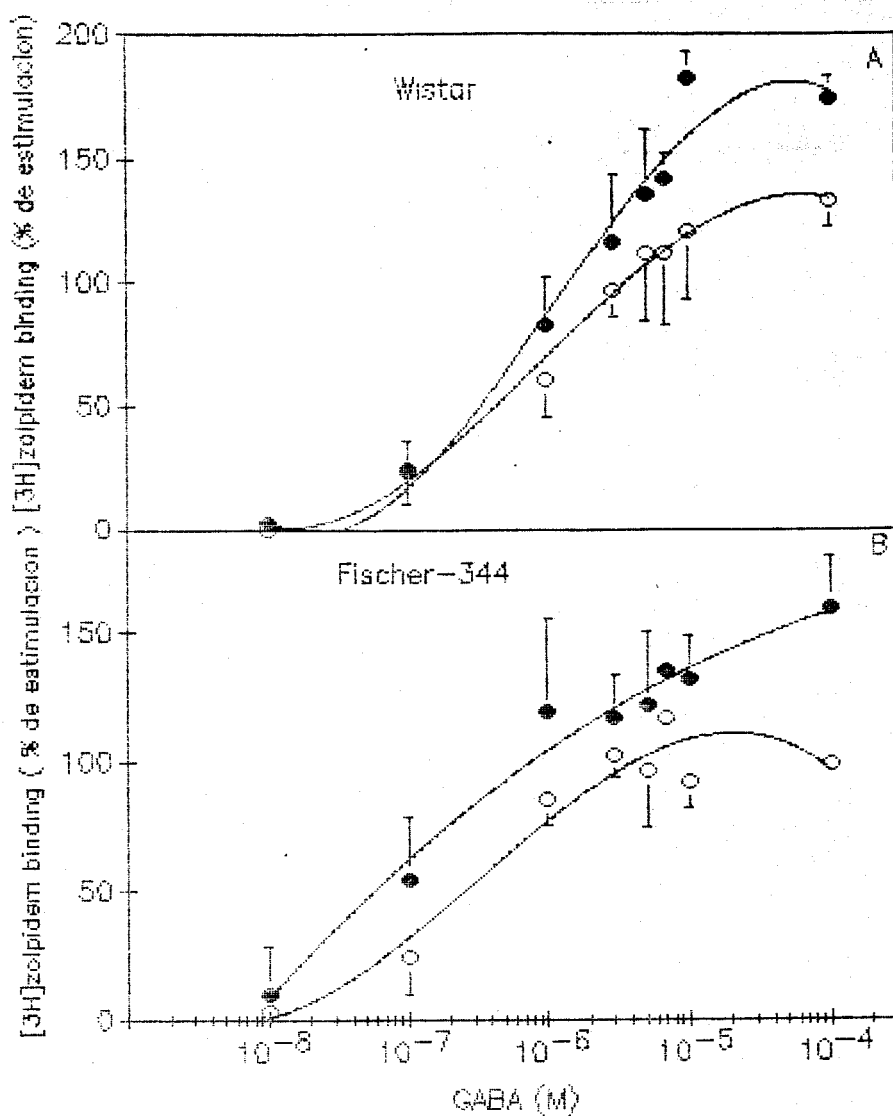


Figura 23: Efecto del envejecimiento sobre la estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem por GABA al sitio de unión para benzodiazepinas tipo I/omega<sub>1</sub>. La estimulación de la unión de 3 nM [<sup>3</sup>H]zolpidem por GABA fue determinada en ratas Wistar (●) y Fischer-344 (○), en membranas de hipocampo de ratas de 3 meses (○) y 24 meses (●).

Como se puede ver, el efecto fue dependiente de la dosis de GABA en todas las condiciones y el ajuste de las curvas a la ecuación (1), nos proporcionó los valores de  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  y  $n_H$  mostrados en la tabla 25. Estos datos, muestran un aumento en la eficacia del acople alostérico entre el sitio de unión  $\omega_1$  y el sitio de unión de GABA, en hipocampo de rata durante el envejecimiento y en las dos razas de ratas.

En resumen, estos resultados demuestran que durante el envejecimiento, se produce un aumento de los sitios de unión de alta afinidad para zolpidem y que estos "receptores  $\omega_1$  de nueva aparición" presentan un mayor acople alostérico con el receptor del GABA, lo que puede estar indicando, al igual que he descrito en controles, diferencias en la composición polipeptídica de los receptores  $\omega_1$ . Igualmente, estos nuevos sitios de unión  $\omega_1$  que tienen un alto grado de acople alostérico con el sitio de unión del GABA, podrían ser los responsables del aumento anteriormente descrito en el acople alostérico entre el sitio de unión del GABA y los sitios de unión para benzodiazepinas en hipocampo de rata vieja.

-----

Tabla 25. Efecto del envejecimiento sobre la interacción alostérica entre el sitio de unión  $\omega_1$  y el receptor del GABA en membranas de hipocampo de ratas Wistar y Fischer 344.

Edad	Wistar			Fischer 344		
	$E_{max}$	$EC_{50}(\mu M)$	$n_H$	$E_{max}$	$EC_{50}(\mu M)$	$n_H$
3 meses	135±21	1.1±0.4	0.9±0.3	107±10	0.3±0.05	1.2±0.4
	(4)	(4)	(4)	(3)	(3)	(3)
24 meses	178±13*	1.0±0.4	0.9±0.1	170±25*	0.8±0.4	0.6±0.2
	(4)	(4)	(4)	(3)	(3)	(3)

Los valores de  $E_{max}$  representan el porcentaje de unión de [ $^3H$ ]zolpidem en ausencia de GABA y son la media  $\pm$  S.D. del número de experimentos, hechos en paralelo, dado entre paréntesis.

\*.- $p < 0.05$ . Diferencia significativa con respecto a controles.

-----

### 13. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/BENZODIACE- PINAS EN VARIAS REGIONES DEL CEREBRO DE LA RATA.

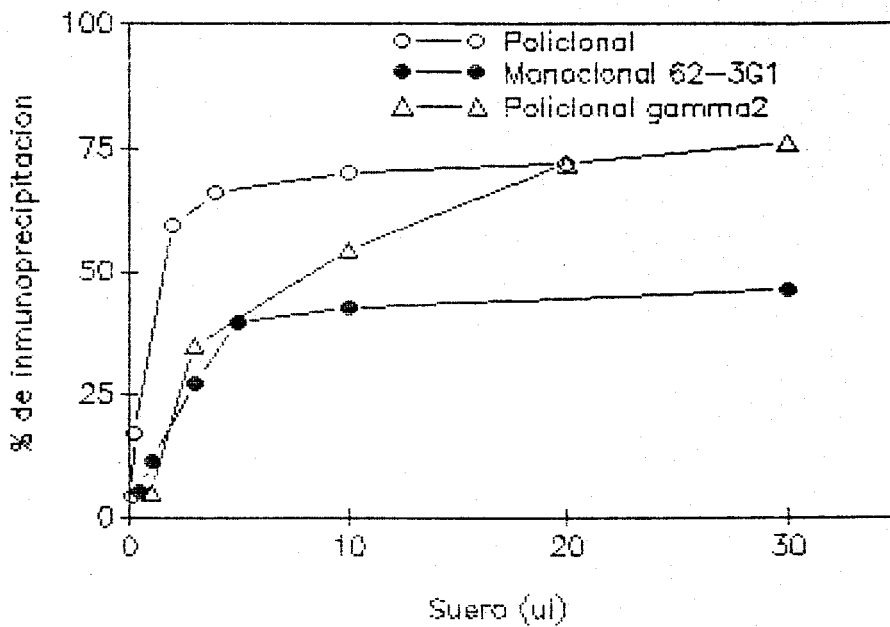
Los resultados obtenidos de la caracterización farmacológica del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en distintas regiones del cerebro y a lo largo del proceso de envejecimiento, apuntan hacia una gran heterogeneidad farmacológica. Este comportamiento heterogeneo, puede estar reflejando la heterogeneidad a nivel molecular, es decir, receptores con distinta composición peptídica entre las distintas regiones del cerebro de la rata y a lo largo del proceso de envejecimiento. Para demostrar esta hipótesis, hemos realizado una caracterización inmunológica de esta proteína receptora con los anticuerpos de que disponíamos.



### 13.1 Caracterización de los anticuerpos.

Con la utilización de anticuerpos mono y policlonales en combinación con ligandos específicos como [<sup>3</sup>H]zolpidem, que a bajas concentraciones se une a la subunidad alfa<sub>1</sub>, nos propusimos hacer una caracterización inmunológica de algunas de las subunidades que forman parte de los receptores nativos de varias regiones cerebrales. La inmunoprecipitación, realizada en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos, fue determinada como el porcentaje de unión de [<sup>3</sup>H]flumacenil o [<sup>3</sup>H]zolpidem presente en el sedimento con respecto al control, incubado en las mismas condiciones pero con suero preinmune.

En la figura 24, se muestran las curvas de inmunoprecipitación de los tres anticuerpos, mostradas anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, (figura 4). Estas curvas nos sirvieron para elegir los volúmenes de anticuerpo que nos permitían trabajar en condiciones de saturación. Estos volúmenes fueron 7, 20 y 25 µl de anticuerpo policlonal, policlonal específico contra la subunidad gamma<sub>2</sub> y monoclonal 62-3G1, respectivamente.



**Figura 24:** Curvas de saturación de los distintos anticuerpos. La inmunoprecipitación de los sitios de unión de [ $^3$ H]flunitrazepam, se determinó incubando el receptor solubilizado, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, con volúmenes crecientes del anticuerpo policlonal (○), monoclonal (●) y policlonal específico contra la subunidad gamma<sub>2</sub> (△).

## 13.2 Caracterización inmunológica.

### 13.2.1 Monoclonal 62-3G1.

El anticuerpo monoclonal 62-3G1 obtenido contra la proteína receptora purificada por cromatografía de afinidad a partir de cerebro de vaca. (Vitorica y col., 1988) reconoce específica y exclusivamente a las subunidades beta2/beta3 del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas (Ewert M. y col., 1992). Como se puede ver en la figura 25 A, no

encontramos diferencias significativas entre las dos regiones ensayadas en la proporción total de beta2/beta3, determinado por la inmunoprecipitación de la unión de 5 nM [<sup>3</sup>H]flumazenil y por la unión de 7 nM de [<sup>3</sup>H]zolpidem, siendo esta entre el 35-45% de la unión total. Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente por Vitorica y col.,1988.

### 13.2.2 Anticuerpo policlonal.

Este anticuerpo policlonal, se obtuvo también contra el receptor purificado, siguiendo el mismo protocolo que para el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente. La caracterización de este anticuerpo por Western-blot, dio lugar al reconocimiento de una banda mayoritaria de peso molecular 51 Kd que se corresponde con la P51 del receptor de benzodiazepinas (resultado no mostrado). Resultados similares han sido descritos por Vitorica y col.,1988 utilizando el mismo protocolo para la obtención de anticuerpos policlonales.

Los resultados de inmunoprecipitación mostrados en la figura 25 B, no muestran diferencias significativas en la inmunoprecipitación total del receptor de benzodiazepinas, determinada por la unión de 5 nM [<sup>3</sup>H]flumazenil, entre las dos regiones cerebrales, siendo esta en torno al 65-70% de la unión total.

Este resultado apoya el hecho de que este anticuerpo reconoce a todas, o a la mayoría de las subunidades alfa del receptor de benzodiazepinas, ya que aunque la distribución de las distintas subuni-

dades alfa dentro de las dos regiones ensayadas es heterogénea, la inmunoprecipitación es similar.

En cuanto a la inmunoprecipitación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem, los resultados mostrados en la fig 25 B, indican una diferencia significativa,  $p < 0.0001$ , en la proporción de la inmunoprecipitación entre corteza e hipocampo ( $66.0 \pm 5.8\%$ ,  $n = 9$  y  $86.7 \pm 5.2$ ,  $n = 7$ , respectivamente). Es interesante hacer notar el mayor porcentaje de inmunoprecipitación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem con respecto a la unión de [ $^3\text{H}$ ]flumazenil.

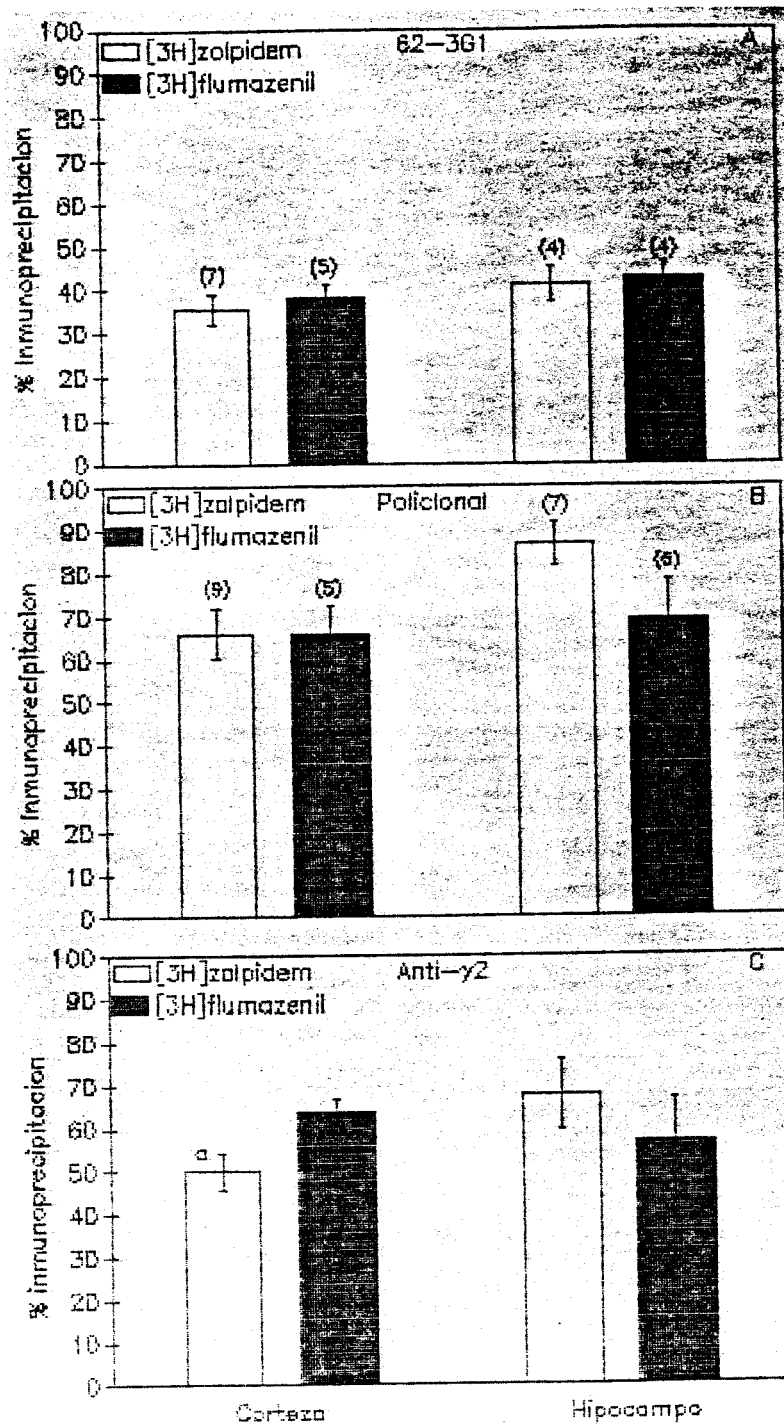
Estos resultados, indican que el anticuerpo policlonal podría discriminar entre varios tipos de receptores dentro de los receptores  $\omega_1$  entre corteza e hipocampo, aunque no nos dice nada a cerca de la composición peptídica de estos receptores.

### 13.2.3 Anticuerpo policlonal específico contra la subunidad $\gamma_2$ .

Este anticuerpo policlonal se obtuvo contra una proteína de fusión, que incluía la secuencia primaria correspondiente al bucle citoplasmático, entre las dos teóricas regiones transmembrana M3 y M4. Según está descrito, Olsen y Tobin, 1990, esta es la región que presenta un mayor grado de variabilidad entre las distintas subunidades que forman parte del receptor  $\text{GABA}_A$ /benzodiazepinas. La caracterización por Western-blot, dio lugar al reconocimiento de una sola banda de peso molecular 47-49 Kd (de Blas, comunicación personal).

El patrón de inmunoprecipitación que presentó este anticuerpo, figura 25 C, fue cualitativamente similar al descrito anteriormente para el policlonal. Como se muestra en esta figura, la inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]flumazenil 5 nM, fue ligeramente superior en corteza con respecto a hipocampo y.

Lo más destacado es la menor inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem en corteza ( $50.9 \pm 5.6$ , n=4) con respecto a hipocampo ( $72.3 \pm 3.4$ , n=4). Este dato nos indica que en corteza existe una menor proporción de receptores  $\omega_1$  que incluyen a la subunidad gamma 2 en su composición peptídica a pesar de haber igual cantidad total de subunidad gamma 2. Es decir, existe una menor proporción de asociación entre la subunidad gamma 2 y la subunidad alfa 1 en corteza, con respecto a hipocampo.



**Figura 25:** Immunoprecipitación del receptor solubilizado GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas. El receptor solubilizado de corteza cerebral ( ) e hipocampo ( ), se incubó (40.000 cpm de binding de [<sup>3</sup>H]flumazenil, 0.5 pmol de [<sup>3</sup>H]flumazenil) con 25, 7 y 20  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal 62-3G1 (A), policlonal (B) y policlonal específico contra la subunidad gamma<sub>2</sub> (C), respectivamente. Los resultados expresan el porcentaje de cpm inmunoprecipitadas, con respecto al control incubado con suero preinmune.

#### 14 CAMBIOS MOLECULARES PRODUCIDOS EN EL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/BENZODIACEPINAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Los resultados obtenidos en la caracterización inmunológica del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en las dos regiones cerebrales de ratas controles, apuntan a una heterogeneidad molecular que podría explicar parte de la heterogeneidad farmacológica descrita anteriormente.

Como hemos descrito antes, el comportamiento farmacológico del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas se modifica durante el proceso de envejecimiento en el hipocampo de la rata. Esta modificación, se refleja en un aumento en la eficacia del acople alostérico entre el receptor de benzodiazepinas omega 1 y el receptor de GABA, considerando.

i) El papel relevante que juegan las subunidades gamma en la modulación alostérica entre los receptores benzodiazepínicos y de GABA (Pritchett y col., 1989; Ymer y col., 1990; Knoflach y col., 1991; Puia y col., 1991).

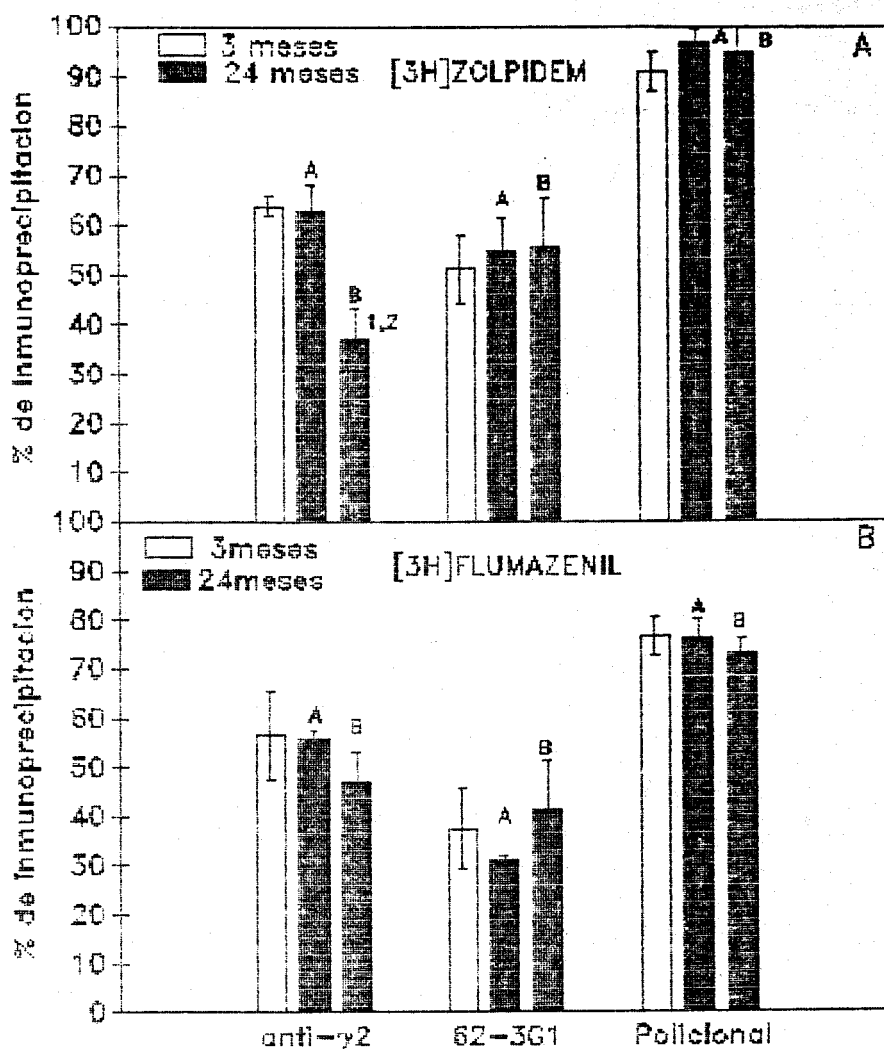
ii) Los resultados obtenidos en la caracterización inmunológica realizada en ratas controles, que apuntan a la presencia de receptores omega 1 con diferente proporción de gamma 2 en su composición molecular, entre regiones que presentan diferencias en la eficacia del acople alostérico, entre los receptores omega<sub>1</sub> y el receptor del

GABA, nos propusimos realizar la misma caracterización inmunológica en hipocampo de rata vieja.

En la figura 26 A y B se muestran los resultados de la caracterización inmunológica obtenidos en hipocampo de rata control y vieja con los tres anticuerpos descritos en el apartado anterior. Como se puede ver, no se encontraron diferencias significativas debidas al envejecimiento, ni con el anticuerpo monoclonal 62-3G1, específico para beta2/beta3, ni con el anticuerpo policlonal obtenido por nosotros, el cual en viejos, al igual que en controles, inmunoprecipita un mayor porcentaje de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem que de [<sup>3</sup>H]flumazenil.

Con el anticuerpo policlonal específico para la subunidad gamma<sub>2</sub>, obtuvimos una menor proporción de inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem en hipocampo de rata vieja en cuatro de seis casos. Como se puede ver en la figura 26 A y B, los resultados correspondientes a viejos se muestran desglosados en dos grupos, de cuatro (a) y dos ratas (b), referidos a la inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem con el anticuerpo policlonal específico para gamma<sub>2</sub>. Es importante considerar, que la inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]flumazenil es ligeramente menor, sin llegar a ser significativa, en el grupo de cuatro ratas viejas en las que encontramos una menor inmunoprecipitación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem. El hecho de que esta diferencia no sea tan acentuada puede ser debido a un proceso de amortiguación, puesto que con [<sup>3</sup>H]flumazenil marcamos todos los sitios de unión de benzodiazepinas y la disminución en el contenido de la subunidad gamma 2 parece estar asociada preferencialmente a los receptores omega<sub>1</sub>.





**Figura 26:** Inmunoprecipitación del receptor solubilizado GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas de hipocampo de rata. El receptor solubilizado de hipocampo de rata control ( ) y rata vieja ( ), se incubó (40.000 cpm de binding [<sup>3</sup>H]flumazenil, 0.5 pmol de [<sup>3</sup>H]flumazenil) con 25, 7 y 20  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal 62-3G1, policlonal y policlonal específico contra la subunidad  $\gamma_2$ , respectivamente. Los resultados expresan el porcentaje de cpm inmunoprecipitadas, con respecto al control incubado con suero preinmune.

## CORTEZA PREFRONTAL

Como se muestra en la tabla 7, la corteza prefrontal también presentó modificaciones con el envejecimiento en la determinación farmacológica preliminar. En concreto se observó una disminución con el envejecimiento en la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol a 40 nM. Con el fin de comprobar este resultado preliminar y detectar otras posibles modificaciones debidas al envejecimiento, realizamos una caracterización farmacológica más amplia, la cual incluyó: i) cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas con Cl218-872, ii) determinación del efecto del GABA sobre la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam y iii) estudios de saturación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol. Estos tres tipos de experimentos se realizaron en ratas controles y viejas.

### CUANTIFICACION DE LOS DISTINTOS SITIOS DE UNION DE BENZODIAZEPINAS CON Cl218-872. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO.

En la tabla 26, se muestran los resultados de la cuantificación de los distintos sitios de unión de benzodiazepinas en corteza prefrontal de ratas controles y viejas. Como se ve, el envejecimiento no altera ni las afinidades de los dos sitios de unión, ni las proporciones de ambos sitios a diferencia de lo que observamos en hipocampo.

**ESTUDIOS DE SATURACION DE LA UNION DE [<sup>3</sup>H]muscimol EN MEMBRANAS DE CORTEZA PREFRONTAL. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO.**

Los experimentos de saturación con [<sup>3</sup>H]muscimol se ajustaron significativamente mejor, al igual que en hipocampo, a un modelo de dos sitios de unión. Los resultados del ajuste se muestran en la tabla 27. Estos experimentos de saturación con [<sup>3</sup>H]muscimol presentaron una gran variabilidad, sin embargo, en todos los experimentos, que fueron realizados en paralelo, es decir control y viejo a la vez, el valor de Bmax obtenido para viejos fue siempre menor que el obtenido para controles sin cambios en las afinidades de los dos sitios de unión, tabla 27. Esta disminución osciló entre un 20 - 30% con respecto a controles. Esta mayor variabilidad interexperimental obtenida en corteza prefrontal con respecto a hipocampo podría estar reflejando diferencias regionales en la forma de regulación a la que se encuentra sometida esta proteína receptora.

**EFECTO DEL GABA SOBRE LA UNION DE [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO.**

Los resultados del ajuste de las curvas de dosis-respuesta a la ecuación (1) se muestran en la tabla 27. Como se ve, esta interacción alostérica también se modifica en esta región en las ratas viejas. Sin embargo, la naturaleza del cambio es diferente, modificándose la EC<sub>50</sub> y no la Emax como en hipocampo. La modificación en la interacción alostérica, es consecuente con la descrita en el apartado anterior ya que los sitios de unión de GABA y sus agonistas participan en

este efecto alostérico. Sin embargo los cambios en el parámetro  $EC_{50}$ , reflejan cambios en la afinidad que presenta el GABA, en este caso, por su sitio de unión, lo que nos puede hacer pensar que la disminución en el número máximo de sitios de unión sea debida a una disminución en la afinidad de los sitios de unión de GABA y sus agonistas, en lugar de una disminución en el número real de receptores  $GABA_A$  de corteza prefrontal de rata vieja.

Es interesante notar, que el valor de la  $E_{max}$  está por encima del 100% en ambos grupos de edad, lo que incluiría a esta región en el grupo de alta eficacia en el acople alostérico, correspondiéndose con los resultados mostrados anteriormente.

## **DISCUSION**

## DISCUSION

Los resultados presentados en la sección anterior, serán discutidos en un orden diferente al expuesto. Este cambio en el orden de la discusión ha sido realizado con el fin de obtener una idea global de todos los resultados obtenidos en ratas controles. Este punto será de gran interés para determinar con claridad qué tipo de cambios ocurren durante el proceso normal de envejecimiento y cual puede ser su naturaleza.

Como apuntamos en la sección de Introducción la heterogeneidad molecular de esta proteína receptora determinada a nivel de subunidades clonadas, hibridaciones in situ, péptidos fotomarcados etc. es muy superior a la heterogeneidad farmacológica. Actualmente existen 15 subunidades clonadas que forman parte de esta proteína receptora. Dentro de las subunidades alfa, existen seis isoformas que podrían dar lugar a la formación de 6 receptores benzodiazepínicos, si consideramos que sólo esta presente una subunidad alfa por proteína receptora, o de 21 receptores si consideramos la posibilidad de que existan dos subunidades alfa por proteína receptora. Este número de posibles receptores se ve incrementado con la inclusión de de las subunidades beta y gamma que también forman parte de esta proteína receptora.

Por esta razón, hemos comenzado la Discusión de esta tesis por la heterogeneidad farmacológica, con el fin de tener una visión global de los diferentes isotipos de receptores presentes en las diferentes regiones cerebrales de ratas adultas.

## 1.- CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>/BENZODIACE- PINAS EN RATAS CONTROLES.

### 1.1.- Heterogeneidad farmacológica.

La caracterización farmacológica del sitio de unión de benzodiazepina, ha puesto de manifiesto la presencia de, al menos, tres isotipos distintos de receptores benzodiazepínicos en el sistema nervioso central de la rata. Estos sitios de unión han sido identificados en función de la afinidad para la imidazopiridina zolpidem. Como se apunta en la sección de Introducción, clásicamente se habían definido solo dos sitios de unión, tipo I/ $\omega_1$  y tipo II/ $\omega_2$ , en función de la afinidad que presentan por una serie de compuestos, entre los que cabe destacar la triazolopiridacina Cl218.872. Nuestros resultados demuestran la presencia de un nuevo sitio de unión de benzodiazepinas, con baja afinidad para zolpidem, y que está incluido dentro de los receptores clásicamente definidos como tipo II/ $\omega_2$ . Este nuevo sitio de unión es la primera vez que se describe en membranas y lo hemos denominado como  $\omega_{2b}$ . Además, su localización dentro del sistema nervioso central ha sido estudiada por técnicas autorradiográficas, demostrando que se trata de un sitio de unión abundante en cerebro de rata neonatal (resultados no mostrados) estando, por otra parte, restringido casi exclusivamente al sistema límbico en el cerebro de rata adulta. La existencia de este nuevo sitio de unión añade un grado más de complejidad a la clasificación farmacológica de los receptores GABA<sub>A</sub>.

La heterogeneidad farmacológica puede ser reflejo de heterogenei-

dad molecular, por lo tanto, estos tres sitios de unión para benzodiazepinas podrían reflejar receptores GABA<sub>A</sub> con diferente composición molecular. El sitio de unión con alta afinidad para Cl218.872 y zolpidem ha sido asociado a una población de receptores que incluyen a la subunidad alfa<sub>1</sub> (Levitan y col.,1988; Pritchett y col.,1989; Pritchett y Seeburg,1990) y con la presencia de un péptido fotomarcado por [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, de masa molecular aparente de 51 Kd (Sieghart y col.,1984; Vitorica y col.,1990; figura ? de esta tesis). Los sitios de unión de baja afinidad para Cl218.872 y zolpidem pueden corresponder con receptores que incluyen a las subunidades capaces de unir agonistas de las benzodiazepinas, alfa<sub>2</sub>, alfa<sub>3</sub> y alfa<sub>5</sub>. Basándonos en experimentos de transfección con distintas subunidades (Pritchett y Seeburg,1990) y en las características farmacológicas del receptor inmunoprecipitado por anticuerpos específicos contra las subunidades alfa (McKernan y col. 1991), proponemos que el nuevo sitio de unión descrito en membranas, con baja afinidad para zolpidem, corresponde a receptores GABA<sub>A</sub> que incluyen la subunidad alfa<sub>5</sub> en el complejo molecular. Esta proposición está, además, apoyada por la correspondencia que existe entre la expresión de la subunidad alfa<sub>5</sub> en el cerebro de la rata, determinada por hibridaciones "in situ" (Wisden y col.,1992; Laurie y col.,1992; Bovolin y col.,1992; Poulter y col.,1992), y la abundancia del sitio de unión omega<sub>2b</sub> determinada tanto en membranas como en cortes de cerebro. Por ejemplo, alfa<sub>5</sub> está especialmente enriquecida en el sistema límbico y corteza neonatal al igual que el sitio de unión de baja afinidad para zolpidem (tabla 15). Por otro lado, los receptores GABA<sub>A</sub> que posean alfa<sub>2</sub> o alfa<sub>3</sub> son indistinguibles farmacológicamente, debido a la ausencia de ligandos selectivos.



En resumen, con la descripción de este nuevo sitio de unión de baja afinidad para zolpidem,  $\omega_{2b}$ , y considerando que las subunidades  $\alpha_4$  y  $\alpha_6$  no unen con alta afinidad agonistas de las benzodiazepinas (Wisden y col.1991), podemos decir que existen cuatro tipos farmacológicos de receptores benzodiazepínicos: i)  $\omega_1$  con alta afinidad para zolpidem, ii)  $\omega_{2m}$ , con afinidad media para zolpidem, iii)  $\omega_{2b}$ , con baja afinidad para zolpidem y iv) los constituidos por las subunidades  $\alpha_4$  y  $\alpha_6$ . Es importante destacar que de estos cuatro grupos, dos son potencialmente heterogeneos, lo que acerca un poco más la discrepancia entre la heterogeneidad farmacológica y molecular. La aparición de nuevos ligandos selectivos permitirá establecer una relación más clara entre la heterogeneidad molecular y la heterogeneidad farmacológica.

#### 1.2.- Interacciones alostéricas.

Otra característica farmacológica del complejo receptor  $GABA_A$  es la interacción alostérica entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas. La cuantificación del efecto del GABA sobre la unión de [ $^3H$ ]flunitrazepam nos da una idea del acoplamiento alostérico entre estos sitios de unión.

En todas las regiones del SNC estudiadas, la unión de [ $^3H$ ]flunitrazepam es potenciada por GABA. Esto indica claramente que, en todos los casos, los sitios de unión para benzodiazepinas están acoplados alostericamente al sitio de unión de GABA. Sin embargo, la eficacia de esta interacción alostérica muestra, nuevamente, heterogeneidad regional. Esta heterogeneidad regional podría estar determinada por la presen-

cia de diferentes isotipos de receptores benzodiazepínicos, que como demuestran nuestros resultados, presentan diferentes grados en el acople alostérico con el sitio de unión de GABA.

La cuantificación de la eficiencia en el acople alostérico entre los isotipos de receptores benzodiazepínicos y el sitio de unión de GABA ha demostrado que los sitios de unión de benzodiazepinas con farmacología tipo I/ $\omega_1$  y tipo II/ $\omega_{2m}$  presentan un grado en el acople alostérico similar y superior al de los sitios de unión de benzodiazepinas con farmacología tipo II/ $\omega_{2b}$ . En base a estos resultados, podríamos proponer que la alta eficacia viene dada por la presencia de sitios de unión de farmacología tipo I/ $\omega_1$  y/o tipo II/ $\omega_{2m}$ , en tanto que la menor eficacia estaría determinada por la presencia del nuevo sitio de unión de farmacología tipo II/ $\omega_{2m}$ . Apoyando esta idea está el hecho de que el sitio de unión de farmacología tipo II/ $\omega_{2b}$  colocaliza con la baja eficacia en el acople alostérico entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas (por ejemplo: hipocampo, médula espinal y corteza neonatal). De hecho, parece existir una buena correlación inversa entre baja eficacia y abundancia relativa de sitio de unión tipo II/ $\omega_{2b}$  (fig. 13).

En su conjunto, estos resultados parecen indicar que aquellos receptores  $GABA_A$  que presenten las subunidades  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$  o  $\alpha_3$ , es decir, que son farmacológicamente tipo I/ $\omega_1$  o tipo II/ $\omega_{2m}$ , presentan un grado de acople alostérico similar y mayor que los receptores que incluyan a la subunidad  $\alpha_5$ , con farmacología tipo II/ $\omega_{2b}$ . Sin embargo, en base a los presentes resultados, no es

posible concluir a que subunidad del complejo receptor GABA<sub>A</sub> es debida el acople alostérico. Es posible que las diferentes subunidades alfa, además de proporcionar diferente farmacología, interaccionen de forma diferente con las otras subunidades (betas/gammas), para dar lugar a proteínas receptoras que presentan diferentes grados en el acople alostérico. Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que el menor acople alostérico de los receptores que presentan alfa<sub>5</sub>, sea debido a una determinada composición molecular de estos receptores (ver mas adelante en la discusión).

### RECEPTOR BENZODIACEPINICO TIPO I/OMEGA<sub>1</sub>

Lo descrito anteriormente pone de manifiesto la existencia de heterogeneidad farmacológica dentro de los receptores benzodiazepínicos, que estaría determinada por la presencia de diferentes subunidades alfa. Asimismo, la heterogeneidad se manifiesta también en la interacción alostérica entre el sitio de unión de GABA y los diferentes isotipos de receptores benzodiazepínicos.

La disponibilidad de un ligando selectivo marcado radiactivamente, como es el caso de [<sup>3</sup>H]zolpidem, nos ha permitido caracterizar farmacológicamente el sitio de unión tipo I/omega<sub>1</sub>. A bajas concentraciones de este ligando, 20nM (maxima concentración empleada en los estudios de saturación), más del 90% de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem está asociada con el receptor omega<sub>1</sub> y menos de un 10% con el receptor omega<sub>2m</sub>. La unión de este ligando al receptor omega<sub>2b</sub> es menor al 0.3%. Por lo tanto, la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem en las presentes condiciones experimentales puede

ser considerada exclusivamente debida al receptor GABA<sub>A</sub> omega<sub>1</sub>.

Como era en principio esperable, las características farmacológicas (Kd y Ki para diversos ligandos, tabla 22) del isotipo omega<sub>1</sub> son constantes en tres regiones cerebrales estudiadas, corteza, hipocampo y cerebelo. Estos resultados están de acuerdo con la ausencia de cambios bioquímicos (glicosilación, mapas peptídicos) en la subunidad de Mr 51kDa entre corteza y cerebelo bovino (Park y de Blas, 1990). Sin embargo, la eficacia en la interacción alostérica entre el sitio de unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem y el de GABA, en estos receptores GABA<sub>A</sub> omega<sub>1</sub>, es heterogénea. La eficacia en el acoplamiento es unas dos veces superior en membranas de corteza que en membranas de hipocampo o cerebelo. Esta misma heterogeneidad en el acoplamiento alostérico es fácilmente distinguible en cortes de cerebro. En este caso, y a diferencia con la distribución del sitio omega<sub>2b</sub>, no se puede observar una clara correlación entre la distribución anatómica y las diferentes eficacias. Esta diversidad en el efecto del GABA sobre la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem añade un grado más de complejidad a las características farmacológicas del receptor GABA<sub>A</sub> y nos permiten proponer la utilización de este parámetro para la detección de isotipos farmacológicos, como un método complementario a la utilización de compuestos selectivos.

Al igual que los diferentes subtipos farmacológicos, la heterogeneidad en la interacción alostérica entre omega<sub>1</sub> y el sitio de unión de GABA puede ser reflejo de diferencias en la composición molecular de receptores que contengan alfa<sub>1</sub>.

Como se describe en la sección de Introducción, las subunidades gamma (gamma<sub>1</sub>, gamma<sub>2</sub>, gamma<sub>3</sub>) son necesarias para el acople alostérico

entre el sitio de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA. Por otra parte, la caracterización electrofisiológica de receptores expresados en oocitos de *Xenopus Laevis* parece indicar que, diferentes tipos de subunidades gamma proporcionan diferentes grados de acoplamiento alostérico (Pritchett y col., 1988; Ymer y col., 1990; Knoflach y col., 1991; Puia y col., 1991). Por lo tanto, la heterogeneidad en la eficacia del acoplamiento alostérico entre el sitio  $\omega_1$  y el GABA podría ser debida a la presencia de distintas subunidades gamma asociadas a  $\alpha_1$ .

De las tres subunidades gamma identificadas hasta la fecha, la subunidad gamma2 es, en primer lugar, la mayoritariamente expresada en el SNC y, en segundo lugar, la que proporciona un mayor grado de interacción alostérica (determinado por aumento de la conductancia a  $\text{Cl}^-$  en receptores transfectados en células embrionarias de riñón humano) (Puia y col. 1991) entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Por lo tanto, una posible explicación para el diferente grado de acoplamiento alosterico dentro del isotipo  $\omega_1$  sería que la proporción de estos receptores asociados a gamma2 fuera mayor en corteza que en hipocampo.

Para determinar la proporción de subunidad gamma2 asociada al isotipo  $\omega_1$ , utilizamos un anticuerpo específico contra la región intracelular de esta subunidad, gamma2, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem. Este anticuerpo ha sido preparado en el laboratorio del Dr. A. L. de Blas y su caracterización ha sido descrita recientemente (Khan y col. 1992). Los resultados obtenidos demuestran que, efectivamente, la subunidad gamma2 es mayoritaria dentro del cerebro de rata, hasta un 70% de los isotipos  $\omega_1$  y un 60% de los

sitios totales de unión de benzodiazepinas son inmunoprecipitados por el anticuerpo. Sin embargo, la proporción de subunidad  $\gamma_2$  asociada a farmacología  $\omega_1$  (subunidad  $\alpha_1$ ) es igual o menor (15%) en corteza que en hipocampo. Estos resultados coinciden con los niveles del mRNA de la subunidad  $\gamma_2$ , más abundante en hipocampo que en corteza (Wisden y col. 1992), pero no permiten explicar la diferencia en el acoplamiento alostérico entre estas dos regiones.

Es destacable que, aproximadamente, un 30% de isotipo  $\omega_1$  en hipocampo y casi un 40% en corteza de rata no son inmunoprecipitables por este anticuerpo. Por lo tanto, estos receptores  $\text{GABA}_A$  y con farmacología  $\omega_1$  podrían estar asociados a otra subunidad  $\gamma$ .

La sustitución de la subunidad  $\gamma_2$  por  $\gamma_1$ , da lugar a la formación de receptores con bajo grado en el acople alostérico entre el sitio de unión de benzodiazepinas y el sitio de unión de GABA, determinado por técnicas electrofisiológicas en receptores transfectados en células embrionarias de riñón (Puia y col., 1991). Sin embargo, estos receptores ( $\alpha_1$ ,  $\gamma_1$ , beta) presentan una farmacología atípica para las benzodiazepinas, como es la disminución de unas diez veces en su afinidad para ciertos ligandos del sitio de unión de benzodiazepinas y la ausencia de sitios de unión para el antagonista flumazenil y el agonista inverso DMCM (Ymer y col., 1990). Estas características farmacológicas deberían ser fácilmente detectables mediante ensayos de desplazamiento con estos ligandos. Sin embargo, y como se muestra en la tabla 22, estas características diferenciales de  $\gamma_1$  parecen no estar presentes ni en hipocampo, ni en corteza, ni en cerebelo. En base a estos resultados farmacológicos, parece poco probable que  $\gamma_1$  forme

parte, al menos en una proporción alta, de los receptores GABA<sub>A</sub> de farmacología omega<sub>1</sub> en las tres regiones ensayadas, corteza, hipocampo y cerebelo. Estos resultados, junto con la escasa expresión de la subunidad gamma<sub>1</sub> en el cerebro de rata, determinada por hibridación "in situ" (Wisden y col., 1992; Laurie y col., 1992) permiten descartar la posibilidad de que la subunidad gamma<sub>1</sub> sea la responsable de la menor estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem por GABA en hipocampo de rata.

Con respecto a las subunidades gamma<sub>3</sub>, experimentos de transfección de subunidades han puesto de manifiesto que los receptores contruidos con las subunidades alfa<sub>1</sub>, gamma<sub>3</sub>, beta<sub>2</sub>, carecen de sitios de unión de alta afinidad para zolpidem (Herb y col. 1992). Por lo tanto, y en las condiciones de nuestros ensayos de unión (baja concentración de [<sup>3</sup>H]zolpidem), estos receptores GABA<sub>A</sub> con gamma<sub>3</sub> en su composición molecular no estarían siendo marcados por este ligando. Estos resultados junto con la escasa expresión de esta subunidad dentro del cerebro, determinada por hibridación "in situ" (Wilson-Shaw y col. 1991; Wisden y col. 1992), nos permiten considerar que la subunidad gamma<sub>3</sub>, no está implicada en la diferencia de eficacia observada dentro de los receptores tipo I/omega<sub>1</sub>.

En resumen, nuestros resultados indican que no existe una relación entre la proporción de receptores GABA<sub>A</sub>, de farmacología tipo I/omega<sub>1</sub>, que incluyen a la subunidad gamma<sub>2</sub> en su composición molecular y la mayor estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem ejercida por el GABA. Además, una alta proporción de receptores omega<sub>1</sub> no son precipitables por un anticuerpo anti gamma<sub>2</sub>. Esta población de recetores GABA<sub>A</sub> no

precipitables, hasta un 40% en corteza, tampoco parece probable que contengan otra subunidad gamma distinta de  $\gamma_2$ . Por lo tanto, es posible que exista otro tipo de subunidad, de distinta familia de las gamma, pero que puedan ejercer una función similar a ellas. En este sentido, ..... y col (1992) han descrito la existencia de una, relativamente, alta proporción de sitios de unión de benzodiazepinas asociados a la subunidad delta. No conocemos el tipo de farmacología de estos receptores asociados a delta ni sus características alostéricas.

Por otro lado, la información existente sobre la posible contribución de las subunidades beta en el acoplamiento alostérico no es muy abundante. Parece que estas subunidades determinan, mas bien, la afinidad del receptor por el neurotransmisor (Bureau y Olsen 1990). Sin embargo, la sustitución de  $\beta_2$  por  $\beta_1$ , en receptores expresados por transfección de oocitos con  $\alpha_1$  y  $\gamma_2$ , dan como resultado receptores de menor activación de la conductancia a  $\text{Cl}^-$  por diazepam (Sigel y col. 1990). Además, esta subunidad  $\beta_1$  es más abundante en hipocampo que en corteza cerebral (Wisden y col., 1992) y, por tanto, podría estar implicada en las diferencias de acoplamiento alostérico entre los receptores  $\text{GABA}_A$   $\omega_1$  en estas dos áreas cerebrales. La inmunoprecipitación con el monoclonal 62-3G1 (especifico de  $\beta_{2-3}$ ) de la unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem es, sin embargo, similar en corteza, hipocampo y cerebelo (aproximadamente 40% en las tres areas). En base a estos datos, y debido al bajo porcentaje de inmunoprecipitación obtenida en nuestros experimentos (un 60% de la actividad de unión de [ $^3\text{H}$ ]zolpidem no es precipitada), no podemos concluir si, efectivamente, existe una mayor proporción de subunidad  $\beta_1$  asociada a la farmacología  $\omega_1$  en hipocampo que en corteza. Para dilucidar este punto sería necesario la realización de



nuevos experimentos de inmunoprecipitación secuencial de la actividad [<sup>3</sup>H]zolpidem por el monoclonal 62-3G1.

Por ultimo, no podemos ignorar la posibilidad de que existan receptores GABA<sub>A</sub> con más de una subunidad alfa en su composición molecular. Estos receptores podrían incluir a la subunidad gamma<sub>2</sub>. En este sentido es importante destacar que ha sido detectada la existencia de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades alfa<sub>1</sub> y alfa<sub>3</sub> dentro del mismo complejo molecular (Luddens y col.,1991; Mackernan y col.,1991). Además, los receptores contruidos con alfa<sub>1</sub>, alfa<sub>3</sub>, beta<sub>2</sub> y gamma<sub>2</sub>, presentan una potenciación por diazepam de la corriente de Cl<sup>-</sup> inducida por GABA mayor que la determinada por una sola subunidad alfa (Sigel y col. 1990). Por tanto, no podemos descartar que las diferencias en el acoplamiento alostérico, entre los sitios de unión de [<sup>3</sup>H]zolpidem y GABA, en corteza e hipocampo sean debidas a la existencia de estas combinaciones de subunidades alfa dentro de una misma molecula receptora GABA<sub>A</sub>.

En resumen, la caracterización farmacológica del receptor GABA<sub>A</sub> en cerebro de ratas adultas ha puesto de manifiesto que:

i) Existen al menos tres tipos de isoreceptores con distinta afinidad para zolpidem. Estos tres isotipos pueden estar determinados por la distinta subunidad alfa presente en el complejo receptor GABA<sub>A</sub>.

ii) El acople alostérico entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas es tambien heterogeneo. Esta heterogeneidad parece ser funcion del isotipo farmacologico de union a benzodiazepinas presente en cada region cerebral.

iii) Dentro de un mismo isotipo farmacológico,  $\omega_1$ , también existe heterogeneidad a nivel de la interacción allostérica con el sitio de unión de GABA. No es conocido a qué subunidad(es) dentro del complejo receptor GABA<sub>A</sub> puede ser debido esta diferencia en el acoplamiento allostérico.

## 2.- EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO

### 2.1.- Corteza prefrontal.

La caracterización farmacológica del receptor GABA<sub>A</sub> en la corteza prefrontal de ratas viejas, ha puesto de manifiesto una disminución en el número máximo de sitios de unión de agonistas de GABA así como una disminución en la EC<sub>50</sub> de la interacción alostérica GABA-benzodiazepinas. Esta modificación pensamos que puede ser reflejo de un estado fisiológico del receptor, en vez de una disminución real en la cantidad de proteína receptora. Esta hipótesis está basada, sobre todo, en la ausencia de modificaciones en el número máximo de sitios de unión de benzodiazepinas y en la proporción de los isotipos omega<sub>1</sub> y omega<sub>2</sub> presentes en esta región cerebral (ver tabla 26). No tenemos ninguna evidencia, ni farmacológica ni molecular, de la posible existencia de receptores GABA<sub>A</sub> sin sitios de unión para el neurotransmisor, pero con sitios de unión para benzodiazepinas.

En conjunto, estos resultados son muy similares a los descritos como efecto del estrés sobre el receptor GABA<sub>A</sub>. Es conocido que el estrés natatorio, en ratas, produce una disminución en el número máximo de sitios de unión de [<sup>3</sup>H]muscimol (agonista del GABA) sin modificar los parámetros de unión de benzodiazepinas, en membranas aisladas de corteza cerebral (Weitzman y col. 1990; Biggio y col. 1990). Por lo tanto, la disminución en el número máximo de sitios de unión para [<sup>3</sup>H]muscimol, en ratas viejas, podría ser debido a un mayor grado de estrés. En este sentido, ha sido descrito el aumento de sensibilidad al estrés durante el envejecimiento, probablemente debido a cambios en el eje Hipotálamo-

pituitaria-suprarrenal (Sapolsky 1990). Además, y según describe .....y col (...), la corteza prefrontal es una de las áreas cerebrales más sensibles a estados de estrés, no observándose variaciones, o siendo estas más débiles, en otras regiones tales como hipocampo o cerebelo.

Por otra parte, la naturaleza de los cambios bioquímicos-moleculares que inducen esta pérdida de sitios de unión para [ $^3\text{H}$ ]muscimol no es conocida. Como se pone de manifiesto en la sección de Resultados, la afinidad del GABA por su sitio de unión es distinta según se determine mediante ensayos de unión de radioligandos o electrofisiológicamente. Además, y como muestran nuestros resultados, la afinidad del [ $^3\text{H}$ ]muscimol por el receptor GABA<sub>A</sub> es, aproximadamente, un orden de magnitud superior que la determinada en la interacción alostérica entre el sitio de unión de GABA y el de benzodiazepinas. Este hecho podría indicar la existencia de sitios de unión para GABA (y sus agonistas) de muy baja afinidad, en el orden  $\mu\text{M}$ , que escaparían a la detección por ensayos de saturación con [ $^3\text{H}$ ]muscimol. En base a estos datos, la disminución en el número máximo de sitios de unión de [ $^3\text{H}$ ]muscimol, detectada por ensayos de saturación en corteza prefrontal de ratas viejas, podría ser debida a una disminución en la afinidad del receptor GABA<sub>A</sub> para el neurotransmisor inducida por estados de estrés. En base a estudios preliminares sobre el efecto del estrés en el receptor GABA<sub>A</sub> (no mostrados), pensamos que estos cambios serían, en principio, reversibles y pueden ser producidos por modificaciones post-traduccionales en esta proteína. Nuestra hipótesis de trabajo actual está enfocada a cambios en la fosforilación del receptor GABA<sub>A</sub>, como consecuencia de estados de estrés. En este sentido, es conocido que la fosforilación del receptor de glicina, muy parecido funcional y molecularmente al GABA<sub>A</sub>, produce una disminución en

la afinidad del receptor para su neurotransmisor (Vaello, 1992).

## 2.2.- Hipocampo

La primera característica destacable del receptor GABA<sub>A</sub>, en hipocampo de ratas viejas, es la ausencia de modificaciones farmacológicas generalizadas. Ni la afinidad por las benzodiazepinas o por agonistas del neurotransmisor GABA, ni el número máximo de sitios de unión de los mismos, mostró diferencias en membranas de hipocampo de ratas viejas. Asimismo, el efecto alosterico ejercido por el pentobarbital o la picrotoxinina sobre la unión de [<sup>3</sup>H]muscimol, tampoco parece estar afectado por el envejecimiento en este area cerebral. Estos resultados indican que, en su conjunto, la función del receptor GABA<sub>A</sub> esta perfectamente preservada durante el proceso de envejecimiento en hipocampo.

El unico cambio detectado en las propiedades farmacológicas del receptor, en hipocampo de rata vieja, fue un aumento en la eficacia de la interacción alosterica entre el sitio de unión de GABA y el de benzodiazepinas.

Como hemos establecido en ratas controles, la distinta eficacia en el acoplamiento alosterico entre estos dos sitios de unión, GABA y benzodiazepinas, puede ser reflejo de una distinta proporción en los isotipos farmacológicos del sitio de unión de benzodiazepinas y/o cambios en la eficacia de la interacción alosterica de un isotipo determinado, en concreto omega<sub>1</sub>.

La cuantificación de la proporción de los distintos isoreceptores

de benzodiazepinas en hipocampo de ratas viejas fue realizada, en primer lugar, por ensayos de desplazamiento de un agonista benzodiazepinico por CL218,872 o por zolpidem. Es destacable que, en ambos casos, nuestros resultados indican la existencia de un aumento (aproximadamente un 60% de aumento) en la proporcion de isotipo  $\omega_1$  en membranas de hipocampo de ratas viejas. Teniendo en cuenta que el numero maximo de sitios de union para benzodiazepinas no varia durante el envejecimiento, este aumento en la proporcion de  $\omega_1$  es paralela a una disminucion en la proporcion de isotipo  $\omega_2$ , en concreto del isotipo  $\omega_{2m}$ , permaneciendo constante la proporcion de  $\omega_{2b}$ .

Este aumento en  $\omega_1$  coincide, ademas, con la determinacion directa del numero maximo de sitios de union del isotipo  $\omega_1$ , mediante ensayos de saturacion con [ $^3$ H]zolpidem. Como se ha discutido anteriormente, en estos ensayos utilizando [ $^3$ H]zolpidem mas del 90% de la union especifica del mismo es debida a  $\omega_1$  (pagina 6).

Creo importante resaltar que este aumento en el numero maximo de sitios de union de [ $^3$ H]zolpidem en hipocampo puede ser observado tanto en ratas de raza Wistar como en ratas de raza Fischer 344. Como se detalla en Resultados, estas ratas provienen de origenes distintos y han sido mantenidas en condiciones distintas. Este hecho indica que el aumento en la proporcion de  $\omega_1$  esta asociado al envejecimiento y no refleja consecuencias de la raza o las condiciones de mantenimiento de las ratas.

Por otra parte, este aumento en la proporcion de isotipo  $\omega_1$

durante el envejecimiento fue, tambien, comprobado mediante autoradiografias en cortes de cerebro. Por lo tanto, el aumento en hipocampo de este isotipo farmacologico del receptor GABA<sub>A</sub> durante el envejecimiento es demostrable en dos razas distintas de rata y por dos tecnicas distintas de union de [<sup>3</sup>H]zolpidem. Es destacable que el aumento, durante el envejecimiento, de omega<sub>1</sub> esta exclusivamente localizado en la formacion hipocampal, no observandose cambios en ninguna otra area cerebral cuantificada. Las posibles razones que inducen a este cambio seran discutidas mas adelante (pag.....).

Teniendo en cuenta que, como se discute anteriormente, las características farmacologicas omega<sub>1</sub> son debidas a la presencia de la subunidad alfa<sub>1</sub> en el complejo GABA<sub>A</sub>, el aumento en el numero maximo de sitios de union de [<sup>3</sup>H]zolpidem en hipocampo de ratas viejas podria ser explicado por un aumento en la expresion de dicha subunidad alfa<sub>1</sub>. En este sentido, resultados preliminares, tanto por hibridaciones "in situ" como por Northern y Dot blots, parecen indicar la existencia de un aumento en los niveles del mRNA de dicha subunidad alfa<sub>1</sub> en hipocampo de ratas viejas (Gutierrez y col., 1992; Vitorica J., Gutierrez A. y de Blas A., resultados no publicados). Por lo tanto, parece que el aumento, durante el envejecimiento en hipocampo, en el isotipo omega<sub>1</sub> puede ser debido a un aumento en los niveles de mensajero para esta subunidad del receptor GABA<sub>A</sub>.

Como ya hemos comentado anteriormente, un cambio en la proporcion de los distintos isoreceptores podria explicar el cambio en la eficacia del acoplamiento alosterico encontrado en hipocampo de ratas viejas. En estos terminos, el aumento del isoreceptor omega<sub>1</sub> deberia estar acompla-

ñada por una disminución en  $\omega_{2b}$ . Sin embargo, los receptores de farmacología tipo I/ $\omega_1$  aumentan en hipocampo de rata vieja, en tanto que los receptores tipo II/ $\omega_{2m}$  disminuyen, no modificándose la proporción de isotipo  $\omega_{2b}$ . Como se demuestran en ratas adultas,  $\omega_1$  y  $\omega_{2m}$  presentan un grado de acople alostérico con el sitio de unión de GABA alto y similar. Por lo tanto, la reducción en la proporción de  $\omega_{2m}$  daría lugar, en términos de estimulación, a una compensación con el aumento del sitio de unión de alta afinidad para zolpidem, resultando que la eficacia del acople alostérico entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas no variaría con el proceso normal de envejecimiento. En base a estos datos, podemos concluir que el aumento en la proporción del isoreceptor  $\omega_1$  no es la causa directa del aumento en la eficacia de la interacción alostérica GABA-benzodiazepinas detectada en el hipocampo de ratas viejas.

Nuestros resultados de la caracterización farmacológica de los sitios de unión tipo I/ $\omega_1$  en hipocampo de rata vieja, demuestran que presentan una eficacia en el acople alostérico con el sitio de unión de GABA, mayor que la de los de hipocampo de rata joven. Estos nuevos sitios de unión son farmacológicamente más parecidos a los de corteza cerebral control, que a los de hipocampo. Por otro lado, la caracterización inmunológica ha demostrado que la proporción de receptores tipo I/ $\omega_1$  que incluyen a la subunidad  $\gamma_2$  en su composición molecular, disminuye como consecuencia del proceso normal de envejecimiento. Aunque nuestros resultados no demuestran que la disminución en el contenido de la subunidad  $\gamma_2$  coincida temporalmente con el aumento en la proporción de receptores benzodiazepínicos, nos permiten proponer que a lo



largo del proceso de envejecimiento, en hipocampo de rata, tiene lugar la aparición de un nuevo sitio de unión de farmacología tipo I/ $\omega_1$ , de alta eficacia en el acople alostérico con el sitio de unión de GABA y que no incluye a la subunidad  $\gamma_2$  en su composición molecular.

Estos nuevos receptores, más similares farmacológica e inmunológicamente a los de corteza cerebral que a los de hipocampo control, serían los responsables del aumento en la eficacia del acople alostérico observado en hipocampo de rata vieja entre el sitio de unión de GABA y los sitios de unión de benzodiazepinas. Nuestros resultados demuestran que la disminución en el contenido de  $\gamma_2$  dentro de los receptores tipo I/ $\omega_1$  en hipocampo de rata vieja ocurre en cuatro ratas de seis ensayadas, lo que hace pensar que se trate de un proceso neurodegenerativo.

La similitud en el contenido de la subunidad  $\gamma_2$  en los receptores tipo I/ $\omega_1$  de corteza cerebral adulta e hipocampo de rata vieja, pone de manifiesto la existencia de aproximadamente un 50% de receptores tipo I/ $\omega_1$  que no incluyen a la subunidad  $\gamma_2$  en ambos centros. Aunque parece existir una relación inversa entre mayor proporción de receptores tipo I/ $\omega_1$  que incluyen a la subunidad  $\gamma_2$  y menor eficacia en el acople alostérico con el sitio de unión de GABA, esta no parece ser lineal si comparamos corteza cerebral adulta con hipocampo de rata vieja. Por lo tanto no podemos asegurar que el aumento en la eficacia del acople alostérico sea debido exclusivamente a la disminución de receptores carentes de la subunidad  $\gamma_2$ .

### 3.- POSIBLES CAUSAS Y REPERCUSIONES FISIOLÓGICAS.

Los resultados mostrados en la sección anterior, ponen de manifiesto que el envejecimiento da lugar a cambios fisiológicos y moleculares en la proteína receptora GABA<sub>A</sub>, que se reflejan en modificaciones de ciertos parámetros farmacológicos. Estas modificaciones, pensamos que representan un cambio plástico compensatorio en respuesta al efecto del envejecimiento. El origen de estos cambios puede ser debido a un proceso neurodegenerativo, considerando que el hipocampo es uno de los centros del cerebro donde el efecto del envejecimiento se hace más pronunciado. Este efecto del envejecimiento se manifiesta en forma de neurodegeneración de las aferencias o fibras dentro del hipocampo (Landfield y col., 1986; Altavista y col., 1990). Asimismo, está descrito una diferente sensibilidad al proceso normal de envejecimiento en distintas zonas del hipocampo, encontrándose pérdida de neuronas en el estratum radiatum del área CA1 y en el giro dentado (Landfield y col., 1986).

Este efecto neurodegenerativo puede estar originado por la acción de los esteroides. Existen gran cantidad de evidencias que apuntan a que los esteroides ejercen un papel importante en el proceso de envejecimiento del cerebro, contribuyendo a la pérdida neuronal y reactividad glial del hipocampo de ratas viejas (ver Landfield y col. 1986 para una amplia discusión). Por otro lado, se conoce también que el proceso de envejecimiento da lugar a una alteración de la liberación de glucocorticoides (Sapolsky 1990), al igual que ocurre en situaciones estresantes (Ker y col. 1991). Este aumento en las concentraciones de hormonas esteroideas es lo suficientemente importante como para modular la trans-

misión gabaérgica, mediada por el receptor  $GABA_A$  (Purdy y col. 1991), e incluso para provocar cambios a más largo plazo, genómicos, en la composición molecular de esta proteína receptora, detectándose cambios en las subunidades  $\alpha_1$  y  $\gamma_2$  (Kang y col. 1991).

Considerando estos resultados, proponemos que el efecto neurodegenerativo que ocurre como consecuencia del envejecimiento normal, daría lugar a la pérdida de aferencias o interneuronas gabaérgicas hipocámpales, lo que originaría una modificación de la expresión génica que daría lugar a la aparición de un nuevo sitio de unión de mayor eficacia en el hipocampo de rata.

En este sentido, varios autores han descrito que la lesión de la vía estriado-nigral con ácido kaínico (Waddington y Cross, 1978) o electrolíticamente (Shibuya y col., 1980), da lugar a un aumento de la sensibilidad del receptor  $GABA_A$ /benzodiazepinas en sustancia negra, aumentando tanto, el número de sitios de unión de GABA, como la estimulación de la unión de benzodiazepinas por GABA. En el mismo sentido, la lesión de esta misma vía con ácido iboténico, (Lo y col., 1983) da lugar a un aumento en la densidad de sitios de unión para benzodiazepinas  $\omega_1$  en sustancia negra y una disminución en la densidad de sitios  $\omega_2$ .

Esta plasticidad del receptor  $GABA_A$ /benzodiazepinas, como respuesta a la degeneración farmacológica de ciertas vías gabaérgicas, ocurre de manera natural y ha sido descrita también en los ratones utilizados como modelo genético para el estudio de la ataxia (Möhler y col., 1991). Los individuos homocigóticos (pod/pod), presentan degeneración postnatal

de las células de Purkinje, a diferencia de los individuos heterocigóticos (-/pcd) que no la presentan. Las neuronas diana de la transmisión gabaérgica de las células de Purkinje, se encuentran en la zona interna del núcleo cerebelar. La expresión del receptor de benzodiazepinas  $\omega_1$  estudiada a nivel de hibridaciones in situ, inmunológico y farmacológico, ponen de manifiesto un aumento en la expresión de receptores  $\omega_1$  en la zona interna del núcleo cerebelar de los individuos (pcd/pcd) como respuesta a la ausencia de aferencias gabaérgicas.

En el hipocampo, resultados preliminares (Vitorica y col.,1992; Vitorica J., Ruano D., Feldblum S., Scatton B. y Benavides J., Society for Neuroscience, vol. 18 p 1483,1992), parecen indicar una menor señal de la enzima descarboxilasa ácido glutámico, (GAD), en interneuronas determinado por hibridaciones in situ.

La expresión de las diferentes subunidades que forman esta proteína receptora puede ser regulada por el neurotransmisor GABA. En este sentido, está descrito (Montpied y col.,1990), que la adición de GABA a cultivos de neuronas de embrión de pollo, da lugar a una reducción (40-80%) en los niveles de mRNA que codifican para la subunidad  $\alpha_1$  del receptor de benzodiazepinas. que como hemos descrito antes determina la farmacología  $\omega_1$ . Esta disminución en los niveles de mRNA es un mecanismo mediado por el receptor  $GABA_A$ /benzodiazepinas y va acompañada de una bajada de la unión de benzodiazepinas a las membranas de estas neuronas. Es decir, al aumentar la concentración de GABA, la respuesta es contraria a la que se observa en hipocampo de rata vieja donde lo que vemos es una disminución de marcadores gabaérgicos y por lo tanto de GABA.

Este fenómeno de adaptación a las variaciones de las concentraciones de GABA, puede estar mediado por el receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas, como demuestran los resultados de Montpied y col. (1990), en neuronas en cultivo. Sin embargo, no hay que olvidar que en el sistema nervioso central, los sistemas de neurotransmisores interactúan unos con otros (Decker y col., 1991). En este sentido Memo y col. (1991), han descrito la interacción entre los receptores NMDA y el receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas, en el sentido de que la expresión de las diferentes subunidades que forman parte del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas, está modulada por los receptores de glutamato sensibles a NMDA, encontrándose una mayor sensibilidad a la modulación en las subunidades alfa<sub>1</sub> y alfa<sub>5</sub> (llamada alfa<sub>4</sub> por Krestchatsky y col., 1989).

En resumen, el origen de los cambios detectados en la composición y en la farmacología del receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas en hipocampo de rata vieja, puede ser un proceso neurodegenerativo que da lugar a un desequilibrio entre los distintos sistemas de neurotransmisores, lo que da lugar a una respuesta plástica por parte del sistema nervioso.

En cuanto a las repercusiones fisiológicas que puede tener la aparición de este nuevo sitio de unión de mayor eficacia, considerando que la inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub> facilita la producción de la LTP y la activación de éstos, dificulta la generación de la misma, (ver apartado de Introducción) y que el sitio de unión de benzodiazepinas actúa como modulador positivo de la transmisión gabaérgica, podemos decir que durante el envejecimiento del hipocampo tiene lugar la aparición de un nuevo tipo de receptor GABA<sub>A</sub> de mayor actividad bajo la

acción de moduladores positivos como son las benzodiazepinas.

Por último es importante hacer notar que el aumento de sensibilidad a las benzodiazepinas detectado en individuos viejos (Greenblatt y col.,1989), ha sido explicado en parte por cambios en las propiedades farmacocinéticas de las benzodiazepinas como, disminución de la tasa de aclaramiento y aumento del tiempo medio de eliminación para ciertas benzodiazepinas en individuos viejos con respecto a jóvenes (Greenblatt y col.,1982; Greenblatt y col.,1986; Greenblatt y col.,1989; Barnhill y col.,1990; Montamat y col.,1989), y cambios en las propiedades farmacodinámicas que aún no han sido establecidas. En este sentido nuestros resultados ponen de manifiesto la presencia de un nuevo tipo de receptor en hipocampo de ratas viejas, con un mayor grado de acople alostérico con el sitio de unión de GABA, que podría explicar en parte el aumento de sensibilidad para benzodiazepinas descrito en individuos viejos.

## **BIBLIOGRAFIA**

Akaike M., Inoue M. and Krithal O.A. (1986). "Concentration-clamp" study of gamma-aminobutyric-acid-induced chloride current kinetics in frog sensory neurones. *J. Physiol.* 379: 171-185.

Altavista M.C., Rossi P., Bentivoglio A.R., Crociani P. and Albanese A. (1990). Aging is associated with a diffuse impairment of fore-brain cholinergic neuron. *Brain Res.* 508: 51-59.

Arbilla S.J., Allen A.W. and Langer S.Z. (1986). High affinity [<sup>3</sup>H]zolpidem binding in the rat brain: an imidazopyridine receptors. *European J. Pharmacol.* 130: 257.

Barnes C.A. and McNaughton B.L. (1980). Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. *J. of Physiology.* 309: 473-485.

Barnes C.A., Nadel L. and Honig W.K. (1980). Spatial memory deficits in senescent rats. *Can. J. Psychol.* 34: 29-39.

Barnhill J.G., Greenblatt D.J., Miller L.G., Gaver A., Harmatz J.S. and Shader R.I. (1990). Kinetic and dynamic components of increased benzodiazepine sensitivity in aging animals. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 253: 1153-1161.

Bartus R.T., Dean R.L., Beer B. and Lippa A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217: 408-417.



Benavides J., Bruno P., Dubois A., Perrault G., Morel E., Zivkovic B. and Scatton B. (1988). In vivo interaction of zolpidem with central benzodiazepine (BZD) binding sites (as labeled by [<sup>3</sup>H]Ro 15-1788) in the mouse brain. Preferential affinity of zolpidem for the omega-1 (BZD<sub>1</sub>) subtype. 245: 1033-1041.

Benke D., Mertens S., Trzeciak A., Gillessen D. and Möhler H. (1991). GABA<sub>A</sub> receptors display association of gamma<sub>2</sub>-subunit with alpha<sub>1</sub>-and beta<sub>2</sub>/beta<sub>3</sub>-subunits. J.Biol.Chem. 266: 4478-4483.

Bernstein D., Olton D.S., Ingram D.K., Waller S.B., Reynolds M.A. and London E.D. (1985). Radial maze performance in young and aged mice: Neurochemical correlates. Pharmacol. Biochem. Behav. 22: 301-307.

Betz H. (1990). Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. Neuron. 5: 383-392.

Bliss T.V.P. and Gardner-Medwin A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232: 357-374.

Bliss T.V.P. and Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 232: 331-356.

Bliss T.V.P. and Lynch M.A. (1988). Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: properties and mechanisms. In long-term potentiation: From Biophysics to Behavior. Neurology and Neurobiology. P.W. Landfield and S.A. Deadwyler, eds. (New York: Alan R. Liss, Inc.). 35: 3-72.

Bormann J. (1988). Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. Trends Neurosci. 11: 112-116.

Braestrup C., Nielsen M. Olsen C.E. (1980). Urinary and brain beta-carbolina-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2288-2292.

Brioni J.D. and McGaugh J.L. (1988). Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. Psychopharmacology. 96: 505-510.

Brioni J.D., Nagahara A.H. and McGaugh J.L. (1989). Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. Brain Res. 487: 105-112.

Burchinsky S.G. (1984). Neurotransmitter receptors in the central nervous system and aging: Pharmacological aspect. (Review). Experimental Gerontology. 19: 227-239.

Bureau M. and Olsen R.W. (1988). GABA/benzodiazepine receptor protein carries binding sites both ligands on two major peptide subunits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1006-1011.

Burt D.R. and Kamatchi G. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 5: 2916-2923.

Calderini G. and Toffano G. (1982). Phospholipid Methylation, [<sup>3</sup>H]Diazepam and [<sup>3</sup>H]GABA binding in the cerebellum of aged rats. In *The Aging Brain: Cellular and Molecular Mechanism of Aging in the Nervous System*, ed. by E. Giacobini, G. Filogamo, G. Giacobini and A. Vernadakis. 20: 87-92. Academic Press, New York.

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

Castellano C., Brioni J.D., Nagahara A.H. and McGaugh J.L. (1989). Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen impairs retention. *Behav. Neural. Biol.* 52: 170-179.

Collerton D. (1986). Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 19: 629-651.

Corde M.G., Giorgi O., Longoni B., Ongini E., Pesce G., Cruciani R. and Biggio G. (1989). Functional coupling of GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepine recognition site subtypes in the spinal cord of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 19: 205-213.

de Blas A.L. and Cherwinski H.M. (1983). Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. Anal. Biochem. 133: 214-219.

Decker M.W. (1987). The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. Brain Res. Rev. 12: 423-438.

Decker M.W. and McGaugh J.L. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. Synapse. 7. 151-168.

Deng L., Ransom R.W. and Olsen R.W. (1986). [<sup>3</sup>H]muscimol photolabels the GABA receptor site on a peptide subunit distinct from that labeled with benzodiazepine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 1308-1314.

Dennis T., Dubois A., Benavides J and Scatton B. (1988). Distribution of central omega-1 (benzodiazepine<sub>1</sub>) and omega-2 (benzodiazepine<sub>2</sub>) receptor subtypes in the monkey and human brain. An autoradiographic study with [<sup>3</sup>H]flunitrazepam and the omega-1 selective ligand [<sup>3</sup>H]zolpidem. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247: 309-322.

Dixon W.J. (1987). BMDP Statistical Software, Printing with Additions. University of California Press Berkeley.

Dunnett S. (1991). Cholinergic grafts, memory and aging. *TINS*. 14: 371-376.

Dunnett S.B., Whishaw I.Q., Jones G.H. and Bunch S.T. (1987). Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience*. 20: 653-669.

Dutar P. and Nicoll R.A. (1988). A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors in the central nervous system. *Nature*. 332: 156-158.

Richinger A. and Sieghart W. (1986). Postnatal development of proteins associated with different benzodiazepine receptors. *J. Neurochem*. 46: 173-180.

Erdo S.L. and Wolff J.R. (1989). Age related loss of t-[<sup>35</sup>S]Butylbicyclophosphorothionate binding to the gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor complex chloride ionophore in rat cerebral cortex. *J. Neurochem*. 53: 648-651.

Fibiger H.C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *TINS*. 14: 220-223.

Garrett K.M. and Tabakoff B. (1985). The development of type I and type II benzodiazepine receptors in the mouse cortex and cerebellum. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 22: 985-992.

Gee K.W., Bolger M.B. Brinton R.E., Coirini H. and McEwen B.S. (1988). J.Pharmacol.Exp.Ther. 246: 803-812.

Giacobini E. (1988). The cholinergic system in aging. In: The cholinergic synapse. Handbook of experimental pharmacology. 86:665-695.

Greenblatt D.J., Shader R.I. and Harmatz J. (1989). Implications of altered drug disposition in the elderly: studies of benzodiazepines. J. Clin. Pharmacol. 29: 866-872.

Greenblatt D.J., Abernethy D.R. and Shader R.I. (1986). Pharmacokinetic aspects of drug therapy in the elderly. Ther. Drug Monit. 8: 249-255.

Greenblatt D.J., Sellers E.M. and Shader R.I. (1982). Drug disposition in old age N.Engl.J.Med. 306: 1081-1088.

Greene E. and Naranjo J.N. (1987). Degeneration of hippocampal fibers and spatial memory deficit in the aged rat. Neurobiol. of Aging. 8: 35-43.

Hahner L., Mcquilkin S. and Harris A. (1991). Cerebellar GABA<sub>B</sub> receptors modulate function of GABA<sub>A</sub> receptors. FASEB J. 5: 2466-2472.

Herb A., Wisden W., Lüddens H., Puia G., Vicini S. and Seeburg P.H. (1992). The third gamma subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1433-1437.

Hill D.R. and Bowery N.G. (1981). [<sup>3</sup>H]baclofen and [<sup>3</sup>H]GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain. *Nature*. **290**: 149-152.

Ito Y., Ho I.K. and Hoskins B. (1988). GABA<sub>A</sub> and benzodiazepine receptor characteristics in young and aged mice. *Brain Res. Bull.* **21**: 251-255.

Izquierdo I. and Medina J.H. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends in Sciences*. **12**: 260-26.

Jones D. H. and Matus A. I. (1974). Isolation of synaptic plasma membranes from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Acta*. **356**: 276-287.

Kang I., Thompson M.L., Heller J. and Miller L.G. (1991). Persistent elevation in GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs following social stress. *Brain Res. Bull.* **26**: 809-812.

Kendal D.A., Strong R. and Enna S.J. (1982). Modifications in rat brain GABA receptor binding as a function of age. In *The Aging Brain: Cellular and Molecular Mechanism of Aging in the Nervous System*, ed. by E. Giacobini, G. Filogamo, G. Giacobini and A. Vernadakis. **20**: 211-221. Academic Press New York.

Kenedy M.B. (1989). Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: long-term potentiation. *Cell*. **59**: 777-787.

Kerr D.S., Campbell L.W., Applegate M.D., Brodish A. and Landfield P.W. (1991). Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *11*: 1316-1324.

Kirkness E.F. and Turner A.J. (1986) The gammaaminobutyrate/benzodiazepine receptor from pig brain. *Biochem J*. **233**: 265-270.

Kiyota Y., Miyamoto M. and Nagaoka A. (1991). Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res*. **538**: 295-302.

Klann E., Chen S-J. and Sweatt J.D. (1991). Persistent protein kinase activation in the maintenance phase of Long-term Potentiation. *J. Biochem. Chem*. **266**: 24253-24256.

Klepner C.A., Lippa A.S., Benson P.I. Sano M.C. and Beer B. (1979). Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav*. **11**: 457-462.

Knoflach F., Rhyner Th., Villa M., Kellenberger S., Drescher U., Malherbe P., Sigel E. and Möhler. (1991). The gamma-3 subunit of the GABA<sub>A</sub>-receptor confers sensitivity to benzodiazepine receptor ligands. **293**: 191-194.



Krestchatisky M., A.J.MacLennan, M.-Y. Chiang, W.Xu, M.B.Jackson, N.Brecha, C.Sternini, R.W.Olsen and A.J.Tobin. (1989). A novel alpha subunit in rat brain GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuron*. 3: 745-753.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Landfield P. W., Pitler T.A. and Applegate M.D. (1986). The Aged Hippocampus. A model system for studies on mechanisms of behavioral plasticity and brain aging. *The Hippocampus*. plenum Publishing Corporation. 3: 323-367.

Langer S.Z. and Arbilla S. (1988). Limitations of the benzodiazepine receptor nomenclature: a proposal for a pharmacological classification as omega receptor subtypes. *J. Fund. Clin. Pharmacol.* 2: 159.

Langer S.Z. and Arbilla S. (1989). Imidazopyridines as a tool for the characterization of benzodiazepine receptors: a proposal for a pharmacological classification as omega subtypes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 763.

Levitan E.S., Schofield P.R., Burt D.R., Rhee L.M., Wisden W., Kohler M., Fujita N., Rodriguez H.F., Stephenson A., Darlison M.G., Barnard E.A. and Seeburg P.H. (1988). Structural and functional basis for GABA<sub>A</sub> receptor heterogeneity. *Nature*. 335: 76-79.

Lippa A.S., Beer B., Sano M.C., Vogel R.A. and Meyerson L.R. (1981). Differential ontogeny of Type I and Type II benzodiazepine receptors. *Life Sci.* 28: 2343-2347.

Lippa A.S., Critchet D.J., Ehlert F., Yamamura H.I., Knna S.J. and Bartus R.T. (1981). Aged-related alterations in neurotransmitter receptors: An electrophysiological and biochemical analysis. *Neurobiol. Aging.* 2: 3-8.

Lo M.M.S., Niehoff D.L., Kuhar M.J. and Snyder S.H. (1983). Differential localization of Type I and Type II benzodiazepine binding sites in substantia nigra. *Nature.* 306: 57-60.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *193:* 265-275.

Lüddens H., Killsch I. and Seeburg P.H. (1991). More than one alpha variant may exist in a GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor complex. *Journal of Receptor Research.* 11: 535-551.

MacKernan R.M., Quirk K., Prince R., Cox P.A., Gillard N.P., Ragan C.I. and Whiting P. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor subtypes immunopurified from rat brain with alpha subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. *Neuron.* 7: 667-676.

Madtes P.(jr.), Fuller G. and Gregg K. (1989). Sensitivity of GABA-displaceable [<sup>3</sup>H]muscimol binding depends upon the composition of the buffering medium. *Neurochem. Int.* **15**: 179-183.

Maggi A., Schmidt M.J., Ghetti B. and Enna S.J. (1979). Effect of aging on neurotransmitter receptor binding in rat and human brain. *Life Sci.* **24**: 367-374.

Malherbe P., Sigel E., Baur R., Persohn E., Richards J.G. and Mohler H. (1990). Functional characteristics and sites of gene expression of the  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_2$ -isoform of the rat GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Neurosci.* **10**: 2330-2337.

Mamalaky C., Stephenson F.A., and Barnard E.A. (1987). The GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous alpha and beta subunits. *EMBO J.* **56**: 561-565.

Marangos P.J., Patel J.P., Boulenger J.P. and Clark-Rosenberg R. (1982). Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [<sup>3</sup>H]Ro 5-4864. *Mol. Pharmacol.* **179**: 339.

Martini C., Rigacci T. and Lucacchini A. (1983). [<sup>3</sup>H]Muscimol binding site on purified benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* **41**: 1183-1185.

Mathers D.A. (1987). The GABA Receptor: New insights from single-channel recording. *Synapse.* **1**: 96-101.

McGaugh J.L. (1989). Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage. Brain. Res. Bull. 23: 339-345.

Memo M., Bovolin P., Costa E. and Grayson R. (1991). Regulation of gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit expression by activation of N-Methyl-D-aspartate-selective glutamate receptors. J. Pharmacol. Exp. Therap. 39: 599-603.

Mernoff S. T., Cherwinski H. M., Becker J. W. and de Blas A.L. (1983). Solubilization of brain benzodiazepine receptor with a zwitterionic detergent: optimal preservation of their functional interactions with GABA receptor. J. Neurochem. 41: 752-758.

Michel M.E. and Klein A.W. (1978). Performance differences in a complex maze between young and aged rats. Age. 1: 13-16.

Möhler H., Battersby M.K. and Richards J.G. (1980). Benzodiazepine receptor protein identified and visualized in brain tissue by a photoaffinity label. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1666-1670.

Möhler H., Malherbe J., Richards G., Persohn E., Benke D., Barth M., Rhyner T. and Sigel E. (1991). Gamma-aminobutyric acid(GABA)<sub>A</sub>-receptor gene expression and regulation. Neurotransmitter regulation of gene transcription. 7: 111-124. ed by E. Costa and T.H. Joh editors. Fidia research foundation. Symposium series.

Montamat S.C., Cusack B.J. and Vestal R.E. (1989). Management of drug therapy in the elderly. *N.Engl.J.Med.* 321: 303-309.

Montpied P., Ginns E.I., Martin M.B., Roca D., Farb D.H. and Paul S.M. (1991). Gamma-aminobutyric acid (GABA) induces a receptor-mediated reduction in GABA<sub>A</sub> receptor alpha subunit messenger RNAs in embryonic chick neurons in culture. *J. Biological Chem.* 266: 6011-6014.

Morrow A.L., Pace J.R., Purdy R.H. and Paul S.M. (1990). *Mol. Pharmacol.* 37: 263-270.

Mott D.D. and Lewis D. (1991). Facilitation of the induction of Long-term Potentiation by GABA<sub>B</sub> receptors. *Science.* 252: 1718-1720.

Müller W.E., Stoll L., Schubert T. and Gelbman C.M. (1991). Central cholinergic functioning and aging. *Acta Psychiatr. Scand.* 366: 34-39.

Munson P.J. and Rodbard D. (1980). LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems *Anal. Biochem.* 107: 220-239.

Nicoll R.A., Kauer J.A. and Malenka R.C. (1988). The current excitement in long-term potentiation. *Neuron.* 1: 97-103.

Niddam R., Dubois A., Scatton B., Arbilla S. and Langer S.Z. (1987). Autoradiographic localization of [<sup>3</sup>H]zolpidem binding sites in the rat CNS: Comparison with the distribution of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding sites. *J. Neurochem.* **49**: 890-899.

Olsen R.W. (1982). Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. *Ann.Rev.Pharmacol.* **22**: 245-277.

Olsen R.W. and Venter J.C. eds. (1986). Benzodiazepine/GABA receptors and Chloride channels: Structural and functional properties. *Receptor Biochemistry and Methodology*. 5. Alan R.Liss, New York.

Olsen R.W., Bergman M.O., Van Ness P. C., Lummis S.C., Watkins A.E., Napias C. and Greenlee D.V. (1981). Gamma-aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites. *Mol. Pharmacol.* **19**: 217-227.

Olsen R.W., Bureau M.H. Endo S. and Smith G. (1991). The GABA<sub>A</sub> receptor family in the mammalian brain. *Neurochem. Res.* **16**: 317-325.

Olsen R.W. and Snowman A.M. (1982). Chloride-dependent enhancement by barbiturates of gamma-aminobutyric acid receptor binding. *J. Neurochem.* **2**: 1812-1823.

Olsen R.W. and Tobin A.J. (1990). Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB J.* **4**: 1469-1480.

Paxinos G. and Watson C. (1986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Academic Press, New York.

Pritchett D.B. and Seeburg P.H. (1990). Gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor alpha-5 subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. J. Neurochem. 54: 1802-1804.

Pritchett D.B., Luddens H. and Seeburg P.H. (1989). Type I and Type II GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. Science. 245: 1389-1392.

Pritchett D.B., Sontheimer H., Shivers B.D., Ymer S., Kettenmann H., Schofield P.R. and Seeburg P.H. (1989). Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. Nature. 338: 582-585.

Pulia G., Vicini S., Seeburg P.H. and Costa E. (1991). Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid gated Cl<sup>-</sup> currents. Mol. Pharmacol. 39: 691-696.

Purdy R.H., Morrow A.L., Moore Jr.P.H. and Paul S.M. (1991). Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 4553-4557.

Roth G.S., Henry J.M. and Joseph J.A. (1986). The striatal dopaminergic system as a model of altered neurotransmitter action during aging: effects of dietary and neuroendocrine manipulations. *Prog. Brain Res.* 70: 473-484.

Robbins T.W., Everitt B.J., Marston H.M. Wilkinson J., Jones G.H. and Page K.J. (1989). Comparative effects of ibotenic acid and quisqualic acid induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: Further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis on cognitive processes. *Behav. Brain Res.* 35: 221-240.

Sass K.J., Spencer D.D., Kim J.H., Westerveld M., Novelly R.A. and Lencz T. (1990). Verbal memory impairment correlates with hippocampal pyramidal cell density. *Neurology.* 40: 1694-1697.

Santi M.R., Cox D.H. and Guidotti A. (1988). Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine/beta-carboline receptor complex in rat spinal cord. *J. Neurochem.* 50: 1080-1086.

Sapolsky R.M. (1990). The Adrenocortical Axis. In *Handbook of the Biology of Aging*. Third edition. 330-346.

Sato T.N. and Neale J.H. (1987). The type I and type II gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor: 1. Purification and two-dimensional electrophoretic analysis of the receptor from cortex and cerebellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:568-574.



Sato T.N. and Neale J.H. (1989). Type I and Type II gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptors: Purification and analysis of novel receptor complex from neonatal cortex. *J. Neurochem.* **52**: 1114-1122.

Schoch P. and Möhler H. (1983). Purified benzodiazepine receptor retains modulation by GABA. *Eur. J. Pharmacol.* **95**: 323-324.

Schoemaker H., Bliss M. and Yamamura H.I. (1982). Specific high-affinity saturable binding of [<sup>3</sup>H] Ro 5-4864 to benzodiazepine binding sites in the rat cerebral cortex. *European J. Pharmacol.* **71**: 173.

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

Shenker A., Maayani S., Weinstein H. and Green J.P. (1987). Pharmacological characterization of two 5-Hydroxytryptamine receptors coupled to adenylate cyclase in guinea pig hippocampal membranes. *Mol. Pharmacol.* **31**: 357-367.

Shibuya H., Gale K. and Pert C.B. (1980). GABA's effect on benzodiazepine receptors develops after striatonigral lesions. *Eur.J.Pharmacol.* **62**: 243-244.

Sieghart W. (1989). Multiplicity of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors. *TIPS*. 10: 407-411.

Sieghart W. and Drexler G. (1983). Irreversible binding of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam to different proteins in various brain regions. 41: 47-55.

Sieghart W. (1983). Several new benzodiazepines selectively interact with a benzodiazepine receptor subtype. *Neurosc.Lett.* 38: 73.

Sieghart W. and Mayer A. (1982). Postnatal development of proteins irreversibly labeled by [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. *Neurosc. Lett.* 31: 71-74.

Sieghart W., Eichinger A., Richards J.G. and Möhler H. (1987). Photoaffinity labeling of benzodiazepine receptor proteins with the partial inverse agonist [<sup>3</sup>H]Ro-15-4513: a biochemical and autoradiographic study. *J. Neurochem.* 48: 46-52.

Sigel E., Stephenson F.A., Mamalaki C., and Barnard E.A. (1983). A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 258: 6965-6971.

Sigel E. and Barnard E.A. (1984). A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex: improved purification with preservation of regulatory sites and their interactions. *J. Biol. Chem.* 259: 7219-7223.

Sigel E., Baur R., Trube G., Möhler H and Malherbe P. (1990). The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function. *Neuron*. 5: 703-711.

Squires R.F., Benson D.I., Braestrup C., Coupet J. Klepner C.A. Myers V. and Beer B. (1979). Some properties of brain specific benzodiazepine receptor: new evidence for multiple receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 825-830.

Squires R.F. (1984). Benzodiazepine receptors. In *Handbook of Neurochemistry*. 6 ed by A. Lajtha. 261-306. Plenum, New York.

Study R.E. and Barker J.L. (1981). Diazepam and (-)-pentobarbital: Fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured spinal cord neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 7180-7184.

Stephenson F.A., Mamalaky C., Casalotti S.O. and Barnard E.A. (1986). The GABA<sub>A</sub> receptor and its antibodies. *Biochem. Soc. Symp.* 52: 33-40.

Stephenson F.A. (1988). Understanding the GABA<sub>A</sub> receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem. J.* 249: 21-32.

Turner A.J. and Whittle S.R. (1983). Biochemical dissection of the gamma-aminobutyrate synapse. *Biochem. J.* 209: 29-41.

Tallman J.F. and Gallager F. (1985). The GABAergic system: A locus of benzodiazepine action. *Ann. Rev. Neurosci.* 8: 21-44.

Unnersterall J.R., Kuhar M.J., Niehoff D.L. and Palacios J.M. (1981). Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors: evidence from a quantitative autoradiographic study. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 218: 797-804.

Villiger J.W. (1984). Cl<sup>218,872</sup> binding to benzodiazepine receptors in rat spinal cord: modulation by gamma-aminobutyric acid and evidence for receptor heterogeneity. *J. Neurochem.* 43: 903-905.

Vitorica J., Machado a. and Satrustegui J. (1984). Age-dependent variations in peroxide-utilizing enzymes from rat brain mitochondria and cytoplasm. *J. Neurochem.* 42: 351-356.

Vitorica J. and Satrustegui J. (1985). The role of ADP in the modulation of the calcium-efflux pathway in the rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 255: 41-49.

Vitorica J., Park D., Chin G. and de Blas A.L. (1988). Monoclonal antibodies and conventional antisera to the GABA<sub>A</sub> receptor/benzodiazepine receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex. *J. Neurosci.* 8: 615-622.

Vitorica J., Park D., Chin G. and de Blas A.L. (1990). Characterization with antibodies of the gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub>/benzodiazepine

receptor complex during development of the rat brain. *J. Neurochem.* **54**: 187-194.

Waddington J.L. and Cross A.J. (1978). Denervation supersensitivity in the striatonigral GABA pathway. *Nature.* **276**: 618-620.

Wenk G.L., Markowska A.L. and Olton D.S. (1989). Basal forebrain lesions and memory: Alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia. *Behav. Neurosci.* **103**: 765-769.

Wigstrom H. and Gustafsson B. (1983). *ibid.* **301**: 601.

Wilkin G.P., Hudson A.L., Hill D.R. and Bowery N.G. (1981). *Nature.* **294**: 584-587.

Wong E.H.F., Snowman A.M., Leeb-Lundberg L.M.F., and Olsen R.W. (1984). Barbiturates inhibit GABA antagonist and benzodiazepine inverse agonist binding. *Eur. J. Pharmacol.* **102**: 205-212.

Ymer S., Draguhn A., Wisden W., Werner P., Keinänen K., Schofield P.R., Sprengel R., Pritchett D.B. and Seeburg P.H. (1990). Structural and functional characterization of the gamma-1 subunit of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptors. *EMBO J.* **9**: 3261-3267.

Zhou H., Brian L.K., Kazimierz A.K., Errol B.D. and Roth G.S. (1986). Effect of aging on concentrations of D<sub>2</sub>-receptor-containing neurons in the rat striatum. *Brain Research.* **498**: 299-307.

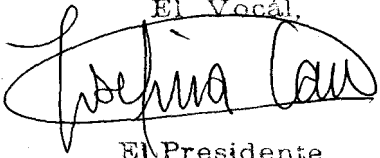
X

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Diego Ruano Cabalero  
titulada Caracterización Farmacológica de la proteína  
receptora GABA A en el sistema nervioso de  
la rata: Efecto del envejecimiento  
acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 12 de Febrero 1993

El Vocal,



El Presidente

El Vocal,



El Secretario,

El Vocal,



El Doctorado,

