

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ÁREA FARMACOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**“EFECTOS DE AGONISTAS GABAÉRGICOS Y BENZODIAZEPINAS
SOBRE LA FUNCIÓN RENAL”**

LILIANA ALICIA MONASTEROLO

Directora: Dra. María Mónica E. Elías

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA

AÑO 1998

*Al Dr. Augusto C. Raynald,
cuyo singular ejercicio de la docencia
me ha dejado la indeleble
y querida compañía de su guía
en todos mis proyectos.*

A Fernando

A mis padres

Parte de los resultados experimentales descriptos en este trabajo fueron publicados en las revistas y presentados en las reuniones científicas que se enuncian a continuación.

PUBLICACIONES

- "Evidence that diazepam elicits alterations on rat renal functions". Liliana Monasterolo, M. Mónica Elías. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 81 (1): 68-76, 1993.
- "Vascular and Tubular Actions of Diazepam in Isolated and Perfused Rat Kidney". Liliana A. Monasterolo, J. Elena Ochoa, Laura Trumper, M. Mónica Elías. *European Journal of Pharmacology* 276 (3): 201-205, 1995.
- "Effects of γ -aminobutyric acid agonists on the isolated perfused rat kidney". Liliana A. Monasterolo, Laura Trumper, M. Mónica Elías. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279 (2): 602-607, 1996.

REUNIONES CIENTÍFICAS Y COMUNICACIONES

- "Efectos de Diazepam sobre la función renal en la rata". Liliana Monasterolo, Adriana Peiretti, M. Mónica Elías. XXXV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 21 al 24 de noviembre de 1990. Resumen publicado en *Medicina* 50 (5) 471, 1990.
- "Efectos de Ro 5-4864 sobre la vasculatura del riñón aislado de rata". Liliana Monasterolo, J. Elena Ochoa, M. Mónica Elías. XXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mendoza, 30 de octubre al 2 de noviembre de 1991.
- "Efectos de diazepam (DZP) sobre la vasculatura del riñón aislado de rata en presencia de azul de metileno (AM)". Liliana Monasterolo, Elena Ochoa, María Mónica Elías. XXXVI Reunión Científica de la Sociedad

Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 14 al 17 de noviembre de 1991. Resumen publicado en *Medicina* 51 (5) 396, 1991.

- ♦ "Posible mecanismo de la diuresis inducida por la administración de diazepam en ratas". Liliana Monasterolo, M. Mónica Elías. XXXVI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 14 al 17 de noviembre de 1991. Resumen publicado en *Medicina* 51 (5) 406, 1991.
- ♦ "Posible rol del endotelio en la relajación inducida por diazepam sobre la vasculatura de riñón aislado de rata". L.A. Monasterolo, J.E. Ochoa, M.M. Elías. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Buenos Aires, 23 al 25 de noviembre de 1992.
- ♦ "Efectos de agonistas gabaérgicos sobre la función del riñón aislado de rata". Liliana Monasterolo, Laura Trumper, M. Mónica Elías. XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata, 13 al 17 de noviembre de 1993. Resumen publicado en *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* 43 (3/4) 82, 1993.
- ♦ "Evidencia de efectos de ácido γ -aminobutírico sobre la función del riñón aislado y perfundido de rata". Liliana Monasterolo, Laura Trumper, M. Mónica Elías. XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Montevideo, Uruguay, 12 al 16 de abril de 1994.
- ♦ "GABA_A and GABA_B receptors-mediated changes in isolated rat kidney function". Liliana Monasterolo, Laura Trumper, M. Mónica Elías. XII Congreso Internacional de Farmacología. Montreal, Canadá, 24 al 29 de julio de 1994. Resumen publicado en *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72 (supl 1) 566, 1994.
- ♦ "Efectos de bicuculina sobre la vasculatura del riñón aislado y perfundido de rata (RAPR)". L. A. Monasterolo, L. Trumper, M. M. Elías. XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Buenos Aires, 15 al 18 de noviembre de 1995. Resumen publicado en *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* 45 (4) 241, 1995.

- ♦ "Efectos de flumazenil sobre la relajación inducida por diazepam en la vasculatura renal de rata". L.A. Monasterolo, L. Trumper, M.M. Elías. XLI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Paraná, 1-4 de noviembre de 1996. Resumen publicado en *Medicina* 56 (5/2) 617, 1996.
- ♦ "Participación del sistema colinérgico en la diuresis inducida por muscimol en riñón aislado y perfundido de rata". L.A. Monasterolo, L. Trumper, M.M. Elías. XLI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Paraná, 1-4 de noviembre de 1996. Resumen publicado en *Medicina* 56 (5/2) 573, 1996.
- ♦ "Efectos de GABA sobre la vasculatura del riñón aislado y perfundido de rata (RAPR) pretratado con bicuculina". L.A. Monasterolo, L. Trumper, M.M. Elías. XLII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 28 de noviembre-1 de diciembre de 1997. Resumen publicado en *Medicina* 57 (4) 61, 1997

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. ÁCIDO γ-AMINO BUTÍRICO (GABA) Y DROGAS RELACIONADAS	1
1.1. GABA	1
1.2. RECEPTORES GABA	3
1.2.1. Receptores GABA _A	6
1.2.1.1. <i>Estructura molecular</i>	6
1.2.1.2. <i>Subtipos de receptores</i>	7
1.2.1.3. <i>Regulación</i>	8
1.2.1.4. <i>Agonistas y antagonistas</i>	8
1.2.1.5. <i>Agonistas endógenos</i>	10
1.2.1.6. <i>Moduladores alostéricos</i>	10
1.2.2. Receptores GABA _B	11
1.2.2.1. <i>Estructura molecular</i>	11
1.2.2.2. <i>Agonistas y antagonistas</i>	11
1.2.2.3. <i>Agonistas endógenos</i>	12
1.2.2.4. <i>Subtipos de receptores</i>	12
1.2.3. Receptores GABA _C	13
1.3. SISTEMA GABA EN LA PERIFERIA	14
1.3.1. Sistema gastrointestinal	14
1.3.2. Sistema endócrino	15
1.3.3. Sistema reproductor	16
1.3.4. Otros sistemas	17
1.4. UTILIDAD TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS CLÍNICAS	18
2. BENZODIAZEPINAS	20
2.1. RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS	20
2.1.1. Receptores centrales	20
2.1.1.1. <i>Agonistas, antagonistas y agonistas inversos</i>	23
2.1.2. Receptores periféricos	25
2.1.2.1. <i>Estructura molecular</i>	25
2.1.2.2. <i>Ligandos sintéticos</i>	26
2.1.2.3. <i>Distribución tisular y subcelular</i>	27
2.1.3. Ligandos endógenos	28
2.2. EFECTOS PERIFÉRICOS DE BENZODIAZEPINAS	29

2.2.1. Sistema endócrino	29
2.2.2. Sistema cardiovascular	31
2.2.3. Otros sistemas	32
2.3. UTILIDAD TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS CLÍNICAS	33
3. ESTUDIO DE SISTEMAS INVOLUCRADOS EN LA FUNCIÓN RENAL	34
3.1. MECANISMOS RENALES: BLANCOS EN EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	34
3.1.1. Diuréticos	34
3.1.2. Vasopresina y fármacos relacionados	35
3.1.3. Óxido nítrico	37
3.2. SISTEMA GABA EN RIÑÓN	39
3.3. RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS EN RIÑÓN	40
4. OBJETIVOS	42
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. TÉCNICAS DE CLEARANCE	43
1.1. CONCEPTO DE CLEARANCE	43
1.2. CLEARANCE RENAL	44
1.3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL MEDIANTE TÉCNICAS DE CLEARANCE	45
1.3.1. Consideraciones generales	45
1.3.2. Aplicaciones de las técnicas de clearance	46
1.3.2.1. <i>Consideraciones técnicas</i>	46
1.3.2.2. <i>Méritos y limitaciones de las técnicas de clearance</i>	47
1.3.2.3. <i>Estimación de la velocidad de filtración glomerular</i>	48
1.3.2.4. <i>Estimación del flujo plasmático renal</i>	49
1.3.2.5. <i>Estimación de la fracción de filtración</i>	50
1.3.2.6. <i>Estimación del manejo renal de agua y electrolitos</i>	50
2. ANIMALES Y TRATAMIENTOS GENERALES	51

3. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL ANIMAL INTACTO	51
3.1. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE CLEARANCE	51
3.1.1. Preparación de los animales	51
3.1.2. Diseño experimental	52
3.1.3. Tratamientos	53
3.1.3.1. <i>Estudios de los efectos de diazepam sobre la función renal "in vivo"</i>	53
3.1.3.2. <i>Estudios de los efectos de diazepam en presencia de desmopresina</i>	53
3.2. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL	54
3.2.1. Parámetros hemodinámicos	54
3.2.1.1. <i>Velocidad de filtración glomerular</i>	54
3.2.1.2. <i>Flujo plasmático renal</i>	54
3.2.1.3. <i>Fracción de filtración</i>	55
3.2.2. Parámetros tubulares	55
4. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO	56
4.1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO	56
4.1.1. Consideraciones generales	56
4.1.2. Características hemodinámicas	56
4.1.3. Características tubulares	58
4.2. PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES	59
4.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS	60
4.3.1. Estudios realizados en condiciones basales	60
4.3.1.1. <i>Estudio de la viabilidad y estabilidad de la función del riñón aislado y perfundido</i>	61
4.3.1.2. <i>Estudio de los efectos de distintos agonistas GABAérgicos</i>	61
4.3.1.3. <i>Estudio de los efectos del antagonista GABA_A bicuculina</i>	62
4.3.1.4. <i>Estudio de los efectos de GABA en presencia de bicuculina</i>	63
4.3.1.5. <i>Estudios de los efectos de muscimol en presencia de atropina</i>	63
4.3.1.6. <i>Estudios de los efectos de distintas benzodiazepinas</i>	64

4.3.2. Estudios realizados en presencia de distintos vasoconstrictores	64
4.3.2.1. <i>Consideraciones generales</i>	64
4.3.2.2. <i>Diseño experimental</i>	66
4.3.2.3. <i>Estudios de la respuesta vascular a agonistas GABAérgicos y benzodiazepinas en riñones pretratados con noradrenalina</i>	66
4.3.2.3.1. <i>Curva concentración-respuesta para noradrenalina</i>	66
4.3.2.3.2. <i>Estabilidad de la respuesta contráctil a noradrenalina durante el tiempo experimental</i>	67
4.3.2.3.3. <i>Estudios de la respuesta vascular a agonistas GABAérgicos en riñones pretratados con noradrenalina</i>	67
4.3.2.3.4. <i>Estudios de la respuesta vascular a benzodiazepinas en riñones pretratados con noradrenalina</i>	68
4.3.2.3.5. <i>Estudios de la respuesta vascular a diazepam y clonazepam en presencia de flumazenil</i>	68
4.3.2.3.6. <i>Estudios de la participación del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) en los efectos de diazepam sobre la vasculatura renal</i>	69
4.3.2.3.7. <i>Estudios de la participación del óxido nítrico en los efectos de diazepam sobre la vasculatura renal</i>	69
4.3.2.4. <i>Estudios de la respuesta vascular a diazepam en riñones pretratados con KCl</i>	70
4.4. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL	71
4.4.1. Filtrado glomerular	71
4.4.2. Parámetros tubulares	72
4.4.3. Respuestas vasculares	72
5. TÉCNICAS ANALÍTICAS	73
5.1. DETERMINACIÓN DE INULINA	73
5.2. DETERMINACIÓN DE CREATININA	73
5.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO P-AMINOHIPÚRICO	73
5.4. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	73
5.5. OTRAS TÉCNICAS	74
6. DROGAS Y REACTIVOS	74
6.1. PROCEDENCIA	74

6.2. DISOLUCIÓN	75
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
7.1. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL ANIMAL INTACTO	75
7.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO	76
CAPÍTULO III: FUNCIÓN RENAL <i>IN VIVO</i> Y EN ÓRGANO AISLADO	77
1. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL EN EL ANIMAL INTACTO	77
2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO	80
2.1. CONDICIONES BASALES	80
2.2. RESPUESTA DE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO A DISTINTOS VASOCONSTRICTORES	83
2.2.1. Respuesta contráctil a noradrenalina	83
2.2.2. Respuesta contráctil a altas concentraciones de KCl	85
CAPÍTULO IV: EFECTOS DE AGONISTAS GABAÉRGICOS	87
1. EFECTOS DE GABA	88
1.1. EFECTOS DE GABA SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN CONDICIONES BASALES	88
1.1.1. Tratamientos	88
1.1.2. Resultados	88
1.1.3. Discusión	90
1.2. EFECTOS DE GABA SOBRE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO PERFUNDIDO CON NORADRENALINA	91
1.2.1. Tratamientos	91
1.2.2. Resultados	91

1.2.3. Discusión	92
2. EFECTOS DEL AGONISTA GABA_A MUSCIMOL	92
2.1. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN CONDICIONES BASALES	93
2.1.1. Tratamientos	93
2.1.2. Resultados	93
2.1.3. Discusión	96
2.2. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN PRESENCIA DE ATROPINA	97
2.2.1. Tratamientos	97
2.2.2. Resultados	98
2.2.3. Discusión	99
2.3. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO PERFUNDIDO CON NORADRENALINA	101
2.3.1. Tratamientos	102
2.3.2. Resultados	102
2.3.3. Discusión	103
3. EFECTOS DEL ANTAGONISTA GABA_A BICUCULINA	103
3.1. TRATAMIENTOS	103
3.2. RESULTADOS	104
3.3. DISCUSIÓN	105
4. EFECTOS DEL AGONISTA GABA_B BACLOFEN	106
4.1. TRATAMIENTOS	106
4.2. RESULTADOS	107
4.3. DISCUSIÓN	110
5. EFECTOS DE GABA SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN PRESENCIA DE BICUCULINA	111
5.1. TRATAMIENTOS	112
5.2. RESULTADOS	112
5.3. DISCUSIÓN	114

CAPÍTULO V: EFECTOS DE BENZODIAZEPINAS	116
1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE DIAZEPAM SOBRE LA FUNCIÓN RENAL <i>IN VIVO</i>	116
1.1. EFECTOS DE DIAZEPAM	116
1.1.1. Animales y Tratamientos	116
1.1.2. Resultados	117
1.1.3. Discusión	125
1.2. EFECTOS DE DIAZEPAM EN PRESENCIA DE DESMOPRESINA	127
1.2.1. Animales y tratamientos	128
1.2.2. Resultados	129
1.2.3. Discusión	131
2. ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE DIAZEPAM Y OTRAS BENZODIAZEPINAS SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO	132
2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN CONDICIONES BASALES	132
2.1.1. Efectos de diazepam	133
2.1.1.1. <i>Tratamientos</i>	133
2.1.1.2. <i>Resultados</i>	134
2.1.1.3. <i>Discusión</i>	134
2.1.2. Efectos de clonazepam y Ro 5-4864	136
2.1.2.1. <i>Tratamientos</i>	137
2.1.2.2. <i>Resultados</i>	137
2.1.2.3. <i>Discusión</i>	137
2.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN PRESENCIA DE DISTINTOS VASOCONSTRICTORES	140
2.2.1. Efectos de diazepam	141
2.2.1.1. <i>Tratamientos</i>	141
2.2.1.2. <i>Resultados</i>	142
2.2.1.3. <i>Discusión</i>	144
2.2.2. Participación del GMPc en los efectos mediados por diazepam sobre la vasculatura renal	146
2.2.2.1. <i>Tratamientos</i>	146
2.2.2.2. <i>Resultados</i>	147
2.2.2.3. <i>Discusión</i>	147

2.2.3. Participación del NO en los efectos mediados por diazepam sobre la vasculatura renal	148
2.2.3.1. <i>Tratamientos</i>	149
2.2.3.2. <i>Resultados</i>	149
2.2.3.3. <i>Discusión</i>	150
2.2.4. Efectos de clonazepam y Ro 5-4864	151
2.2.4.1. <i>Tratamientos</i>	151
2.2.4.2. <i>Resultados</i>	151
2.2.4.3. <i>Discusión</i>	152
2.2.5. Efectos de flumazenil	154
2.2.5.1. <i>Tratamientos</i>	154
2.2.5.2. <i>Resultados</i>	154
2.2.5.3. <i>Discusión</i>	154
2.2.6. Efectos de diazepam y clonazepam en presencia de flumazenil	155
2.2.6.1. <i>Tratamientos</i>	156
2.2.6.2. <i>Resultados</i>	156
2.2.6.3. <i>Discusión</i>	158
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	160
1. CONCLUSIONES GENERALES	160
1.1. AGONISTAS GABAÉRGICOS	160
1.2. BENZODIAZEPINAS	165
CAPÍTULO VII: RESUMEN	172
Agradecimientos	177
Referencias bibliográficas	178

ABREVIATURAS

- ADH: hormona antidiurética
- AMPC: monofosfato cíclico de adenosina
- C_{osm} : clearance osmolar
- C_{PAH} : clearance de PAH
- DDAVP: desmopresina
- EF_{Glu} : excreción fraccional de glucosa
- $EF_{\text{H}_2\text{O}}$: excreción fraccional de agua
- EF_{K} : excreción fraccional de potasio
- EF_{Na} : excreción fraccional de sodio
- GABA-T: GABA transaminasa
- GABA: ácido γ -aminobutírico
- GAD: ácido glutámico decarboxilasa
- GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
- i.p.: intraperitoneal
- i.v.: intravenosa
- L-NNA: N^G -nitro-L-arginina
- NA: noradrenalina
- NO: óxido nítrico
- PAH: ácido p-aminohipúrico
- P_{osm} : osmolalidad plasmática
- RCB: receptor central a benzodiazepinas
- RPB: receptor periférico a benzodiazepinas
- $T^c_{\text{H}_2\text{O}}$: reabsorción de agua libre
- U_{osm} : osmolalidad urinaria
- VFG: velocidad de filtración glomerular

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1. ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA) Y DROGAS RELACIONADAS

1.1. GABA

La presencia de GABA en el sistema nervioso central de mamíferos fue descrita por primera vez por Roberts y Frankel en 1950. Aunque en un primer momento se consideró que esta sustancia era un mero producto metabólico, numerosos estudios revelaron la importancia de GABA como neurotransmisor. El hallazgo de este rol funcional para GABA fue crucial para el desarrollo del concepto general de la transmisión mediada por aminoácidos (1).

La mayor parte del GABA encontrado en el cerebro deriva del ácido glutámico. La conversión de glutamato a GABA es catalizada por la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD); y el GABA es convertido a semialdehído succínico por la acción de la GABA transaminasa (GABA-T). Ambas enzimas se encuentran asociadas a células GABAérgicas. El producto de transaminación es oxidado a succinato en una reacción catalizada por la semialdehído succínico deshidrogenasa (2). Otras líneas de evidencias indican que la decarboxilación de glutamato no es la única vía para la formación de GABA. Se ha informado una significativa formación de GABA *in vivo* a partir de putrescina. El primer paso de este camino biosintético es catalizado por la diamino oxidasa, que convierte putrescina (1,4-

diaminobutano) en GABA aldehído (aldehído 4-aminobutírico). Una aldehído deshidrogenasa forma GABA a partir del precursor (3). El esquema de las rutas biosintéticas alternativas y la principal vía catabólica se muestran en la Figura I-1.

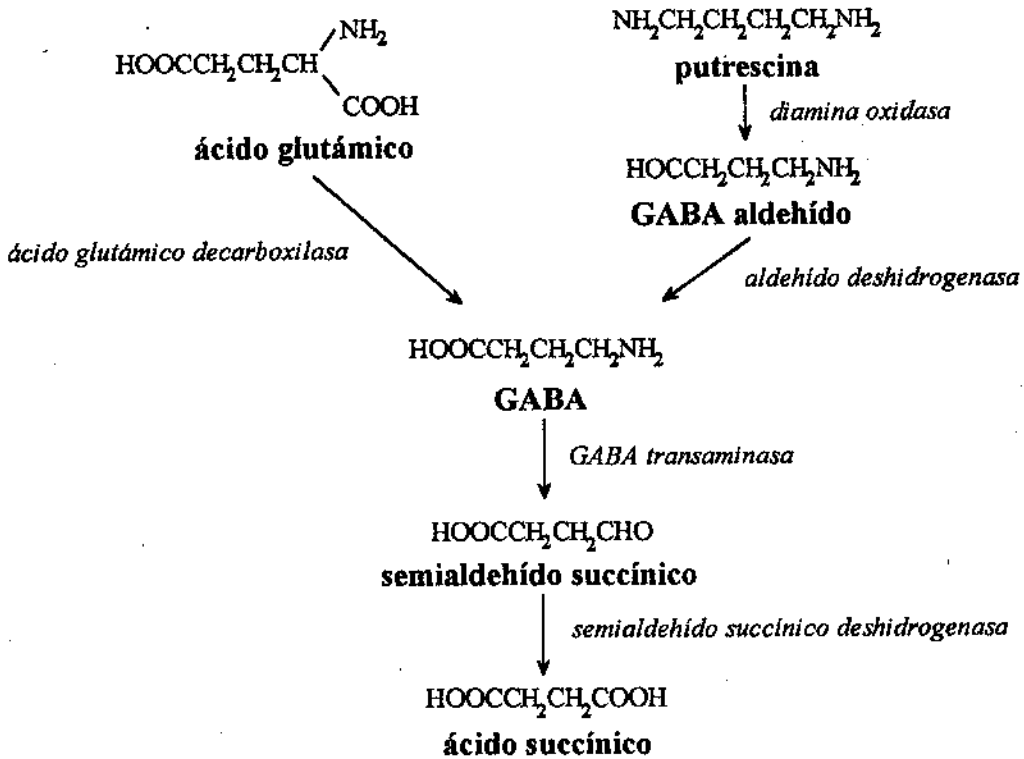


Figura I-1: Rutas metabólicas de GABA. Las enzimas involucradas se indican en letra itálica.

Una cantidad significativa de GABA es almacenada en los terminales nerviosos (1). Recientemente se ha caracterizado la proteína transportadora de GABA vesicular (4).

Numerosos estudios han demostrado que el GABA es liberado por un proceso dependiente de calcio (1, 5). La modulación del influjo de calcio (6) y de la liberación de GABA (7) parece estar mediada por receptores GABA_B presinápticos acoplados a una proteína G.

Como ocurre con otros neurotransmisores, la mayor parte del GABA liberado es reacumulado en el terminal nervioso por un proceso de transporte activo, aunque una cantidad significativa también puede ser transportada dentro de la glía (1). El GABA es depurado de la hendidura sináptica por transportadores específicos de alta afinidad dependientes de sodio y cloruro, que se localizan en los terminales presinápticos y células gliales vecinas. Este transporte presenta una gran heterogeneidad, revelada por el hallazgo de genes para cuatro transportadores distintos de GABA, denominados GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1 (8). Se han encontrado evidencias de que el óxido nítrico (NO) puede disminuir la velocidad de captación de GABA, probablemente debido a un colapso parcial de los gradientes iónicos de los terminales nerviosos (9).

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central de vertebrados. Las primeras descripciones de los efectos inhibitorios de GABA fueron realizadas por Hayashi y Nagai en 1956, quienes demostraron que el GABA aplicado tópicamente inhibía la actividad eléctrica de la corteza motora (10). Uno de los hallazgos más importantes en el estudio de la transmisión GABAérgica fue el descubrimiento de picrotoxina y bicuculina, agentes que fueron capaces de bloquear, de manera considerablemente selectiva, las acciones electrofisiológicas de GABA. Estas observaciones indicaron la presencia de receptores fisiológicamente activos en neuronas de mamíferos (1).

1.2. RECEPTORES GABA

La clasificación de receptores GABA define al receptor GABA_A como sensible al antagonismo por bicuculina e insensible a baclofen, mientras que el receptor GABA_B es insensible al antagonismo por bicuculina y es activado

por baclofen (10, 11). En la Figura I-2 se presenta la estructura química de GABA y de distintos agonistas y antagonistas de receptores GABA.

Los receptores GABA_A y GABA_B no sólo difieren en su farmacología, sino también en su función. Los receptores GABA_A son ionotrópicos y operan canales de cloruro. El incremento en la conductancia a cloruro, y la consecuente hiperpolarización, inducido por GABA en la membrana postsináptica representa el principal evento sináptico inhibitorio en el sistema nervioso central (12). También se ha descrito una respuesta despolarizante a GABA, menos estudiada y que podría ser el resultado del eflujo de cloruro (1). Actualmente se propone que la movilización del anión bicarbonato también sería responsable de esta respuesta, y que el canal involucrado podría ser el mismo que media la respuesta hiperpolarizante u otro con mayor permeabilidad a bicarbonato (13). En el caso de receptores GABA_B, el sitio de reconocimiento de GABA está ligado a un sistema metabotrópico, el cual, vía segundos mensajeros, modula la operación de canales de calcio y de potasio (14). Ambos subtipos de receptores, GABA_A y GABA_B, presentan localización pre y postsináptica en neuronas (11, 14).

Actualmente se cuenta con evidencia suficiente para considerar que GABA activa receptores que no se ajustan a la clasificación de receptores GABA_{A/B}, ya que estos receptores son insensibles a los efectos de baclofen y de bicuculina. Estos receptores GABA se han denominado receptores GABA_C, y pueden representar una forma relativamente simple de canales de iones activados por ligando. La farmacología de este subtipo de receptores GABA parecería ser más simple que la de receptores GABA_A, y existen diferencias sustanciales en cuanto a la especificidad de agonistas y antagonistas. Los receptores GABA_A, más complejos, podrían haber evolucionado de los receptores más simples, GABA_C (15).

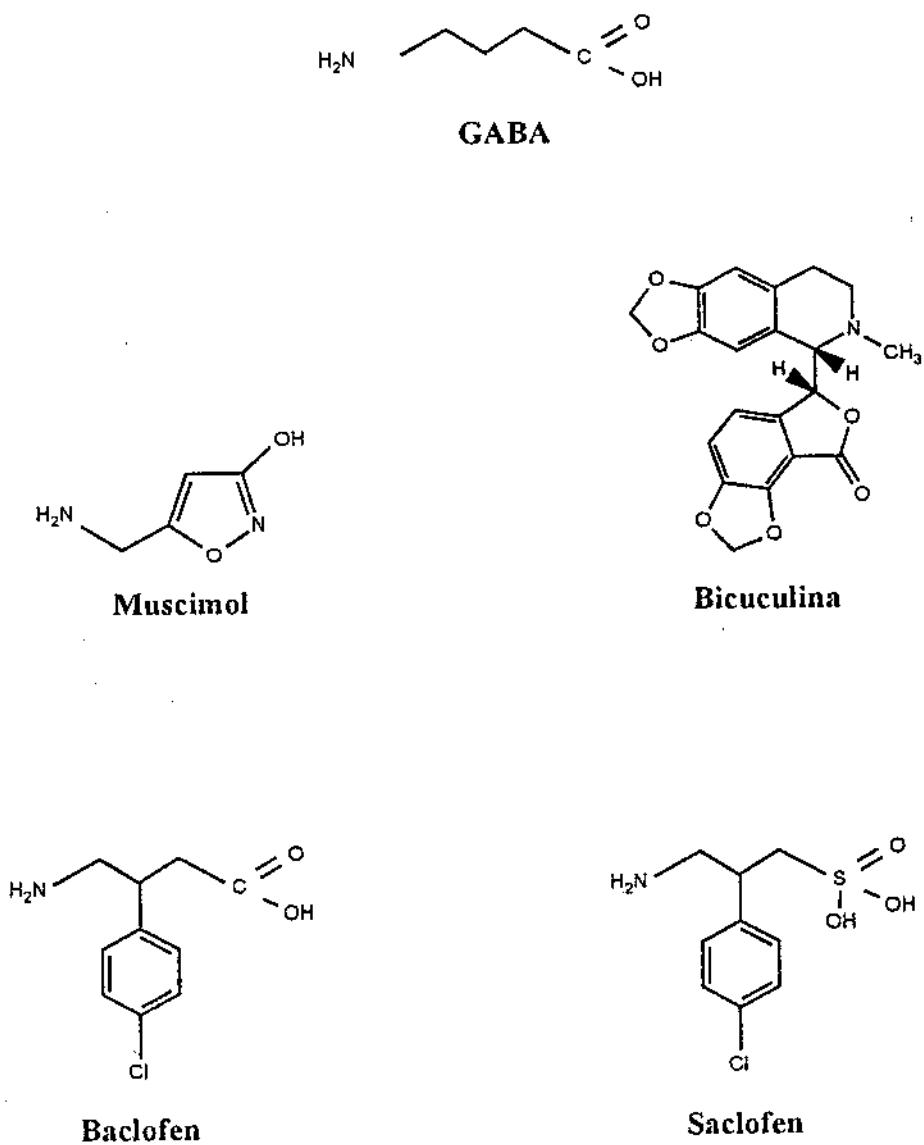


Figura I-2: Fórmulas estructurales de distintos agonistas y antagonistas de receptores GABA. GABA: agonista GABA_A y GABA_B; muscimol: agonista GABA_A; bicuculina: antagonista GABA_A; baclofen: agonista GABA_B; saclofen: antagonista GABA_B.

1.2.1. Receptores GABA_A

1.2.1.1. Estructura molecular

El receptor GABA_A es un complejo receptor heterooligomérico en el que se encuentran el sitio de reconocimiento para GABA de alta afinidad y un canal cloruro, operado por GABA. En este complejo también están presente sitios de unión para moduladores endógenos que aumentan o disminuyen la eficacia de GABA mediante mecanismos moleculares alostéricos específicos (11).

Como miembro de la superfamilia de canales iónicos activados por transmisores, el receptor GABA_A presenta una estructura pentamérica constituida por subunidades transmembrana y un poro central. Cada subunidad está compuesta por un dominio extracelular N-terminal, que se presume media las interacciones entre ligando y canal, cuatro dominios transmembrana y un dominio intracelular que contiene sitios para fosforilación en la mayoría de las subunidades (16). La mayoría de los receptores GABA_A presentan tres tipos de subunidades: α , β y γ , con una estequiometría que probablemente corresponda a $2\alpha:1\beta:2\gamma$ (17). Otros autores proponen la estequiometría $2\alpha:2\beta:1\gamma$ (18). Se ha encontrado que dos dominios homólogos de la subunidad β son esenciales para la activación del canal por GABA (17). El sitio de unión a GABA también recibe contribución de la subunidad α (19). La heterogeneidad de receptores GABA_A radica en la existencia de al menos 17 subunidades, que pueden ser agrupadas por el grado de homología de secuencia en: 6 α , 4 β , 4 γ , 1 δ y 2 ρ . La combinación de estas subunidades resulta en diversos subtipos de receptores (16). Esta heterogeneidad provee flexibilidad en la transducción de señales, contribuye a la plasticidad mediante el intercambio de subunidades regulado genéticamente y ofrece el potencial para el desarrollo de drogas específicas con acción sobre determinado tipo de células (20-22).

1.2.1.2. Subtipos de receptores

Receptores GABA_A sensibles a benzodiazepinas: Aproximadamente el 80 % de los receptores GABA_A contienen el clásico sitio de unión a benzodiazepinas, y son los de mayor relevancia farmacológica. Estos subtipos de receptores se caracterizan por las combinaciones de subunidades: $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ó $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (16).

La combinación de subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ constituye el 60 % de los receptores GABA_A sensibles a benzodiazepinas en el cerebro. Este tipo de receptor no sólo es el principal componente de la transducción de señal GABAérgica, sino que también media el espectro farmacológico de los ligandos clásicos de sitios de unión a benzodiazepinas de alta afinidad. Los receptores que presentan las subunidades $\alpha 2$ ó $\alpha 3$ representan aproximadamente el 25 % de los receptores sensibles a benzodiazepinas; y se encuentran en áreas del cerebro donde la subunidad $\alpha 1$ está ausente o se expresa en niveles bajos. A diferencia de los receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, que presentan alta afinidad por zolpidem, los receptores con subunidades $\alpha 2$ ó $\alpha 3$ presentan baja afinidad para este ligando (16).

Otros receptores GABA_A sensibles a benzodiazepinas, pero considerablemente menos abundantes, son los que contienen las combinaciones $\alpha 5\beta x\gamma 2$ ó $\alpha x\beta x\gamma 2\delta$. La subunidad $\alpha 5$ parecería conferir insensibilidad a zolpidem, mientras que la presencia de la subunidad δ resulta en una afinidad particularmente alta para ciertos ligandos (diazepam, β CCM) (16).

Receptores GABA_A insensibles a benzodiazepinas: Estos receptores no prevalecen en el cerebro, aunque pueden expresarse considerablemente en ciertas neuronas en particular. Presentan las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$ ó ρ . Los receptores con subunidades $\alpha 4$ ó $\alpha 6$ son insensibles a diazepam, pero responden a ciertos ligandos no clásicos, como Ro 15-4513 ó bretazenil. Los

receptores que contienen la subunidad ρ se encuentran principalmente en retina y se denominan receptores GABA_C (16, 19).

1.2.1.3. Regulación

Dentro de los requerimientos de adaptación en el sistema GABA, las neuronas son capaces de modificar la función del receptor GABA_A por diferentes mecanismos. Durante la ontogenia, resulta particularmente evidente la regulación por el intercambio de subunidades. También se ha demostrado que, bajo distintas condiciones (tratamientos farmacológicos, estrés, estímulos sensoriales), se produce un cambio en el número de receptores GABA_A (16). En la modulación funcional por fosforilación de este receptor se han encontrado involucradas las siguientes cinasas: protein cinasa dependiente de AMPc (PKA) (23, 24), protein cinasa dependiente de Ca²⁺/fosfolípidos (PKC) (25) y protein tirosin cinasa (PTK) (26, 27).

1.2.1.4. Agonistas y antagonistas

Agonistas: Uno de los agonistas exógenos de receptores GABA_A más ampliamente usado es el isoxazol de origen natural, muscimol, que se encuentra en el hongo *Amanita muscaria* y puede contribuir a las propiedades psicoactivas de este hongo. Es una sustancia prototipo para el diseño y desarrollo de un importante rango de isoxazoles con distintas actividades sobre el sistema GABA (incluyendo al inhibidor de captación de GABA, ácido nipecótico). El sistema neuronal de captación de GABA reconoce la unidad 3-hidroxiisoxazol del muscimol, lo que le confiere una débil actividad inhibidora sobre este transporte; pero no es inhibidor ni sustrato de la GABA-T. El S-(+)-dihidromuscimol es el agonista GABA_A más potente conocido hasta el momento. Otro isoxazol, conformacionalmente análogo de muscimol pero menos potente es el 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol [5,4-c]piridin-3-ol (THIP). La isoguvacina (ácido 1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-carboxílico)

presenta una estructura molecular en la que el grupo isoxazol del THIP se ha reemplazado por un grupo carboxilo; y es equipotente con muscimol (10).

Antagonistas: Es probable que los antagonistas competitivos de los receptores GABA_A actúen en sitios de reconocimiento de GABA. Existen evidencias que señalan diferencias termodinámicas en la unión de agonistas y antagonistas. El antagonista GABA_A competitivo, bicuculina, es un alcaloide que se aisló por primera vez de la planta *Dicentra cucullaria*. Otros alcaloides con propiedades antagonistas GABA_A son la corlumina y la (+)-hidrastina. Una serie de piridazinil derivados de GABA son potentes antagonistas de receptores GABA_A, entre ellos el SR95531 (gabazina). El esteroide RU5135 es el antagonista GABA_A competitivo más potente descrito hasta el momento (10).

Se ha descrito que la ciprofloxacina y el ácido difenilacético son antagonistas selectivos del receptor GABA_A, una acción que puede contribuir a sus efectos excitatorios *in vivo* (28). Recientemente, se han encontrado evidencias de que la colchicina sería un antagonista GABA_A competitivo, lo que podría explicar las acciones neurotóxicas de esta droga (29).

El antagonista GABA_A no competitivo más conocido es la picrotoxina. Esta sustancia es una mezcla equimolar de picrotoxinina y picrotina, aislada de la *Anamirta cocculus*. Existen evidencias de que el sitio de unión de picrotoxina estaría asociado a una conformación "cerrada" del canal cloruro (10).

El diurético inhibidor del transporte de cloruro, furosemida, antagoniza selectivamente los receptores recombinantes expresados en oocitos que contienen la combinación de subunidades $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$, típica de células granulosas de cerebelo. Se ha encontrado que furosemida actúa sobre un sitio de reconocimiento que regula alostéricamente al canal cloruro. Por lo

tanto, este diurético podría ser un modulador alostérico negativo, más que un antagonista (10).

1.2.1.5. Agonistas endógenos

GABA es el agonista endógeno más importante, pero se han descrito otros compuestos agonistas GABA_A. El ácido imidazol-4-acético es un potente agonista GABA sensible a bicuculina (30), que se forma en la periferia (31) y en cerebro (32) a partir de la oxidación de histamina. Este compuesto también es agonista parcial de receptores GABA_C (10). La taurina y la β-alanina son capaces de activar receptores GABA_A. El ácido γ-amino-β-hidroxi-butírico (GABOB) es otro agonista GABA_A que puede formarse en cerebro a partir de 2-hidroxi-putrescina (10).

1.2.1.6. Moduladores alostéricos

Los receptores GABA_A poseen una variedad de sitios independientes del sitio de unión a agonistas, y la activación de dichos sitios puede modular alostéricamente la actividad de los agonistas. El sitio modulador alostérico más estudiado es el sitio de unión a benzodiazepinas. La respuesta a GABA puede ser aumentada o reducida por la acción de agonistas o agonistas inversos, respectivamente, sobre este sitio modulador (sección 2.1.1.1. de este capítulo). Los agonistas, agonistas inversos y antagonistas de este sitio de unión de benzodiazepinas también han sido denominados moduladores alostéricos positivos, negativos y neutralizantes, respectivamente, del receptor GABA_A. Según esta clasificación, las β-carbolinas se han descrito como agentes moduladores negativos del receptor GABA_A (10, 33), aunque algunos agentes de este grupo se comportan como moduladores alostéricos positivos, en el caso del abecarnil, o como moduladores alostéricos neutralizantes, tratándose de ZK 93426 (10).

Otro sitio de modulación alostérica es el sitio de unión a barbitúricos. Estos agentes aumentan la función del receptor GABA_A mediante el incremento en el tiempo medio de apertura del canal cloruro (10). Distintos esteroides naturales y sintéticos potencian las respuestas a GABA actuando sobre un sitio diferente del de barbituratos (17). Este sitio de unión a esteroides puede revestir particular significado fisiológico, ya que la función del receptor GABA_A puede ser afectada por neuroesteroides sintetizados en cerebro (17) o por los niveles circulantes de progesterona (34). El etanol (10, 35) y diversas drogas anestésicas (10) potencian las respuestas a GABA mediadas por receptores GABA_A.

1.2.2. Receptores GABA_B

1.2.2.1. Estructura molecular

Las evidencias disponibles hasta el momento sugieren que los receptores GABA_B pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, que se caracterizan por presentar siete dominios transmembrana. Estos receptores aún no han sido clonados; y por lo tanto, su heterogeneidad sólo puede ser inferida indirectamente sobre las bases de las diferencias en potencia de agonistas y antagonistas, así como también por las distintas vías de transducción (14).

1.2.2.2. Agonistas y antagonistas

Agonistas: El agonista GABA_B prototipo es el β-p-clorofenil derivado de GABA, baclofen, que presenta una afinidad 1000 veces mayor por receptores GABA_B que por receptores GABA_A. Baclofen reduce la liberación de GABA en tejido cerebral (14). Se ha sugerido que una proteína G sería el factor que vincula a los receptores GABA_B con los canales de

calcio dependientes de voltaje asociados a la exocitosis de GABA (6, 7). Otros agonistas GABA_B son el ácido 3-aminopropilfosfónico (3-APA), su metil homólogo y el análogo ácido fosfónico (14).

Antagonistas: El baclofen es un β-p-clorofenil derivado del ácido 3-aminopropilfosfónico, que ha sido utilizado con éxito en la evaluación del rol de receptores GABA_B en los potenciales postsinápticos inhibitorios dependientes de potasio en distintas áreas del sistema nervioso central. El baclofen, y su derivado más potente, 2-hidroxi-baclofen, resultaron de cambios estructurales en la molécula de baclofen. Otros antagonistas GABA_B, CGP35348 y CGP55845A, fueron sintetizados a partir de 3-APA (14).

1.2.2.3. Agonistas endógenos

El GABA no es el único ligando endógeno para receptores GABA_B. El γ-hidroxibutirato, un producto de degradación del GABA, presenta características que satisfacen los criterios de un neurotransmisor. Este compuesto no tiene efectos sobre receptores GABA_A y se une selectivamente a receptores GABA_B. La hiperpolarización inducida por γ-hidroxibutirato es bloqueada por el antagonista GABA_B, CGP35348 (14).

1.2.2.4. Subtipos de receptores

Existen numerosos datos experimentales que sugieren la heterogeneidad de los receptores GABA_B, pero los hallazgos descriptos hasta el momento en la bibliografía no permiten adoptar una clasificación general aplicable. La localización de receptores pre y postsinápticos puede sugerir que pertenecen a subtipos diferentes, como ocurre en otros sistemas de neurotransmisores. Dentro de las evidencias farmacológicas, se ha descrito que baclofen, pero no otros antagonistas más potentes, es capaz de diferenciar entre receptores GABA_B pre y postsinápticos. En base a algunos estudios de

liberación de neurotransmisores se ha propuesto un esquema de clasificación para receptores presinápticos. Se han diferenciado dos grupos principales de receptores presinápticos, los sensibles y los insensibles a baclofen. También se ha sugerido una diferenciación farmacológica entre auto y heteroreceptores (14).

Los receptores GABA_B pueden diferir con respecto a las señales de transducción asociadas. Distintos experimentos señalaron que el acople de receptores GABA_B a canales de K⁺ o de Ca²⁺ estaría mediado por una proteína G. Los receptores presinápticos también pueden estar acoplados a canales de K⁺ o de Ca²⁺, pero no hay un consenso de la participación de una proteína G en estas vías de transducción (14).

Los receptores GABA_B acoplados a adenilato ciclasa también median sus acciones vía proteína G (14). Se ha sugerido la existencia de subtipos farmacológicamente diferentes en la producción de AMPc en cerebro (36).

1.2.3. Receptores GABA_C

El receptor GABA_C es un receptor homooligomérico formado por subunidades ρ que constituye un canal cloruro insensible a bicuculina, pero sensible a picrotoxina. El agonista selectivo prototipo de este receptor es el ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA) (37). No se han encontrado hasta el momento antagonistas selectivos GABA_C, ya que los compuestos que presentan esta propiedad también tienen importantes acciones sobre receptores GABA_A y (o) GABA_B; sin embargo sus estructuras pueden conducir al desarrollo de agentes más selectivos (37, 38). El receptor GABA_C no presenta sitios de modulación alostérica (15, 37).

Se han acumulado evidencias convincentes del rol funcional del receptor GABA_C en retina, donde participa en la regulación del proceso visual (15, 37). Recientemente se ha sugerido la existencia de una diversidad

de subtipos de receptores GABA_C en células bipolares de retina de mamíferos (39).

1.3. SISTEMA GABA EN LA PERIFERIA

En los últimos años se han acumulado evidencias de la relevancia funcional de GABA en distintos órganos periféricos.

1.3.1. Sistema gastrointestinal

Se ha demostrado la presencia de neuronas GABAérgicas en el plexo mientérico, cuya presencia tiene importantes implicancias para el control neuronal intrínseco de la función gastrointestinal (40). En otros estudios se encontraron sitios de captación de GABA de alta afinidad en nervios vasculares y plexos de la capa submucosa, lo que indica que el sistema GABAérgico podría estar involucrado en el control del flujo sanguíneo y los reflejos secretomotores (41). También se ha informado la presencia de receptores GABA_A (42) y GABA_B (43) en el tracto gastrointestinal; y se demostró la expresión de ARNm para la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A en neuronas mientéricas (44). Recientemente se ha descrito que el modulador alostérico negativo, furosemida, inhibe las acciones de GABA en íleon de cobayo (10).

La contractilidad de la musculatura gastrointestinal puede ser influenciada tanto por agonistas GABA_A como por agonistas GABA_B (45-48). Algunos autores propusieron la participación de GABA en la regulación de los componentes ascendente y descendente del reflejo peristáltico (49). Se han encontrado distintos mediadores en los efectos inducidos por agonistas GABA sobre el músculo liso gastrointestinal, entre ellos: acetilcolina (49), péptido intestinal vasoactivo (49) y NO (50). El hallazgo de la localización de receptores GABA_A en neuronas mientéricas que contienen NO sintasa

(51) brindó las bases anatómicas para la vía GABA-nitrérgica identificada farmacológicamente.

La participación del sistema GABAérgico también se ha sugerido en la regulación de la secreción ácida (52) y del transporte epitelial de iones (53).

1.3.2. Sistema endócrino

La secreción hormonal de la hipófisis puede ser influenciada significativamente por GABA y drogas relacionadas (3). Se ha demostrado la presencia de GABA, GAD (54) y receptores GABA_A (55) en hipófisis anterior. Algunos estudios sugirieron que la activación de receptores GABA_A inhibe la secreción de prolactina y hormona del crecimiento (3) y estimula la liberación de hormona luteinizante (56).

En la glándula pineal se ha descrito la presencia de GABA en pinealocitos (54). Se ha sugerido que GABA participa en la modulación de la sensibilidad a la luz en los procesos de adaptación luz-oscuridad y que esta acción es mediada por receptores GABA_A (57).

En células cromafines de la médula adrenal se ha logrado visualizar GAD y GABA-T, y se ha demostrado la captación y liberación de GABA (54, 58) y la presencia de receptores GABA_A (58, 59). Se ha propuesto que GABA podría jugar un rol modulador en la secreción adrenal de catecolaminas (60-62).

En células neuroendócrinas pancreáticas se ha demostrado la secreción de GABA por una exocitosis regulada comparable a la de neuronas (63). En células β se describió un transportador de GABA dependiente de H⁺/ATPasa (64). La caracterización de la estructura molecular del receptor GABA_A en células α y β pancreáticas, demostró que éste es potencialmente sensible a la modulación alostérica (65). La activación de receptores GABA_A conduce a una despolarización de membrana y aumento de calcio citosólico (66). Por lo

tanto, se ha propuesto que la estimulación de receptores GABA_A por el GABA liberado podría modular la secreción hormonal pancreática (63, 66). Wan y col. (67) describieron un aumento por traslocación en el número de receptores GABA_A postsinápticos funcionales inducido por insulina, indicando su potencial relevancia fisiológica en el sistema nervioso central y en la periferia.

GABA estimula la liberación de gastrina, pero inhibe la secreción de somatostatina en la mucosa antral, mediante la activación de receptores GABA_A. Se podría asumir que los mecanismos GABAérgicos intrínsecos en el estómago pueden modular la función endócrina del órgano (54).

1.3.3. Sistema reproductor

Se ha identificado la presencia de GABA y actividad de GAD en trompa de Falopio y en ovario de rata. Distintos experimentos señalaron la posibilidad de una inervación GABAérgica extrínseca en oviducto pero no en ovario (68).

La administración local de GABA en ovario provocó un aumento en la liberación de estradiol y una disminución en la secreción de progesterona, lo que sugiere la participación del sistema GABAérgico local en la regulación de la secreción hormonal ovárica (69). A su vez, los esteroides ováricos provocan un aumento, sensible a atropina, en la actividad de GAD en oviducto de rata (70).

Se ha descrito que GABA estimula la contractilidad espontánea en oviducto y útero (3). Otros estudios mostraron que GABA induce un aumento en la respuesta a acetilcolina en trompa de Falopio y que esta acción depende de las condiciones hormonales del animal (71). Las células epiteliales del oviducto pueden acumular y liberar GABA (54), regulando sus niveles en el fluido luminal. En este sentido, los autores que describieron la presencia de

receptores GABA_A en la membrana de espermatozoides (72), sugirieron que los niveles de GABA en el tracto reproductor femenino podrían modular algunas funciones de los espermatozoides durante la fertilización.

Recientemente se ha demostrado que el aminoácido excitatorio L-glutamato modula las contracciones de vas deferens, mediante la conversión enzimática a GABA. El GABA formado puede actuar sobre receptores GABA_B e inhibir las contracciones a través de un mecanismo presináptico (73).

1.3.4. Otros sistemas

El sistema respiratorio puede ser modulado por GABA vía receptores GABA_A o GABA_B en distintos niveles de la vía refleja (3, 74-76). Se ha descrito que la activación de receptores GABA_B periféricos inhibe la broncoconstricción, lo que señala un posible rol modulador para estos receptores en las vías aéreas (77).

En tejido cardíaco se ha detectado una significativa actividad de GAD (3). Matsuyama y col. (78) sugirieron que GABA ejercería un rol neuromodulador en nodo sinusal mediante la inhibición de la actividad de neuronas adrenérgicas, debido a la estimulación de neuronas colinérgicas vía receptores GABA_A.

El mantenimiento de la presión arterial puede verse influenciado por mecanismos GABAérgicos en distintas estructuras del sistema nervioso central (79-82). También se informó la participación de GABA en la regulación periférica del tono vascular (3). Se ha demostrado la inhibición de la liberación de catecolaminas mediante la activación de receptores GABA_B en vasos de resistencia (83,84). La administración local de GABA en ovario provocó un aumento en el flujo sanguíneo (69). La participación del sistema

GABAérgico en la modulación del tono basal también se ha demostrado en vasos sanguíneos cerebrales (85).

1.4. UTILIDAD TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS CLÍNICAS

Debido a la presencia de circuitos GABAérgicos en el cerebro, varios trastornos mentales y neurológicos podrían estar relacionados con este sistema de neurotransmisión. En la fisiopatología de la epilepsia se ha sugerido un déficit en la transmisión sináptica inhibitoria GABAérgica, dada la eficacia de drogas anticonvulsivantes que potencian la sinapsis GABAérgica (17). El efecto anticonvulsivante de la vigabatrina se debe a su capacidad de inhibir irreversiblemente a la GABA-T (86). Recientemente se ha revelado que el sitio de acción del anticonvulsivante, tiagabina, es el transportador GAT-1. La caracterización del rol de cada transportador de GABA en la regulación de la transmisión GABAérgica podría ser la base para el diseño de inhibidores específicos que servirían como nuevos agentes terapéuticos (8). Actualmente se están desarrollando drogas precursoras de GABA con potencial utilidad anticonvulsivante (87).

Distintas investigaciones señalaron que alteraciones en los receptores GABA_A pueden ser de relevancia para la fisiopatología de las enfermedades de Huntington y de Angelman (17).

El agonista GABA_B, baclofen, es el fármaco más eficaz para el tratamiento de la espasticidad (88). Actualmente se está investigando la potencial utilidad de baclofen en el tratamiento de distonía (89), hipo intratable (90), y como antitusivo (91-93).

Un hallazgo reciente de particular interés fue la capacidad de furosemida de antagonizar selectivamente ciertos subtipos de receptores GABA_A. Las acciones de GABA fueron antagonizadas por furosemida en distintas preparaciones, incluyendo ganglio cervical superior de raya,

sinaptosomas cerebrales de rata e ileon de cobayo (10). La furosemida atraviesa pobremente la barrera hematoencefálica, y por lo tanto sus acciones no son prominentemente centrales. Sin embargo, se alienta la idea de que futuras investigaciones, basadas en las propiedades de furosemida, puedan encontrar compuestos de importancia clínica, con acciones más selectivas sobre subtipos de receptores GABA_A, mediadas por sitios de unión diferentes a los de benzodiazepinas y barbitúricos (94). Desde otro punto de vista, dada la relevancia del sistema GABA en la periferia, podría considerarse la ventaja de furosemida u otros compuestos con acciones selectivas sobre subtipos de receptores GABA_A que no presentan efectos centrales significativos. En este sentido, se ha propuesto que el mayor conocimiento de la composición de subunidades del receptor GABA_A en el sistema nervioso entérico puede proveer las bases para el desarrollo de drogas más específicas que podrían modular la actividad gastrointestinal (44). Por otro lado, la incapacidad de ZAPA (ácido Z-3-[(aminoiminometil)tio]propil-2-enoico) de atravesar la barrera hematoencefálica resulta ventajoso, ya que este agente tiene una potente acción GABA-agonista en nematodos. Estas propiedades postularon al ZAPA para el liderazgo en el diseño de nuevos compuestos antihelmínticos (10).

El estudio de los mecanismos GABAérgicos en la periferia también ha dado lugar a la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos. En los últimos años se han acumulado evidencias de la posible participación del sistema GABAérgico en la regulación de la función endócrina del páncreas (63-66). En base al hallazgo de que GAD es un autoantígeno en la diabetes mellitus dependiente de insulina (95), se está investigando la potencial utilidad de la respuesta a GAD67 (aa 208-404) como marcador de diabetes en la fase preclínica (96).

2. BENZODIAZEPINAS

2.1. RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS

Los sitios de unión a benzodiazepinas se han observado en distintos tejidos y tipos celulares y se han separado en dos clases principales. El sitio de unión llamado receptor central a benzodiazepinas (RCB) está presente casi exclusivamente en el sistema nervioso central, localizado en neuronas, y media los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas (97). El otro sitio de unión se denomina receptor periférico a benzodiazepinas (RPB), ya que se descubrió en tejidos periféricos, cuando Braestrup y Squires (98) informaron la unión de la benzodiazepina [^3H]diazepam en riñón, hígado y pulmón de rata. Posteriormente se demostró la presencia de RPB en sistema nervioso central. Estos sitios de unión se distinguen de los RCB en cuanto a su perfil farmacológico, localización subcelular y localización regional en cerebro (99). En la tabla I-1 se resumen las características diferenciales de los RPB y RCB; y la Figura I-3 muestra la estructura química de distintos compuestos que actúan sobre RCB y RPB.

Además de los RCB y RPB, se informó la existencia de otro sitio de unión de benzodiazepinas. Este receptor de afinidad micromolar a benzodiazepinas se ha identificado en sinaptosomas de tejido cerebral de rata, y media la inhibición de la captación de Ca^{2+} inducida por benzodiazepinas (101).

2.1.1. Receptores centrales

El receptor a benzodiazepinas es un sitio modulador alostérico intrínseco del complejo receptor GABA_A /canal cloruro que media las principales acciones del neurotransmisor inhibitorio GABA (secciones

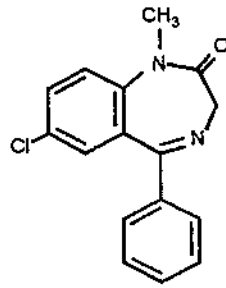
Tabla I-1 : Características de los receptores periféricos a benzodiazepinas y de los receptores centrales a benzodiazepinas

	Receptores periféricos	Receptores centrales
Distribución tisular	Distribución ubicua en tejidos periféricos; y en glía del sistema nervioso central	Neuronal
Localización subcelular	Membrana mitocondrial externa y membrana plasmática	Membrana plasmática
Ligandos sintéticos	Isoquinolinas (PK11195), Benzodiazepinas (R0 5-4864, diazepam), aril-in-dolacetamidas (FGIN 1-27)	Benzodiazepinas (clonazepam, flumazenil, diazepam)
Ligandos endógenos	DBI y porfirinas	DBI
Mecanismos efectores	Transporte de colesterol, modulación del sistema inmune, proliferación celular	Regula el flujo de cloruro modulando la unión de GABA al receptor GABA _A

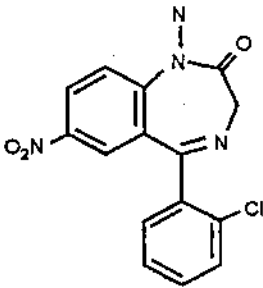
DBI= inhibidor de la unión de diazepam (*diazepam binding inhibitor*)

Tomado de referencia 100.

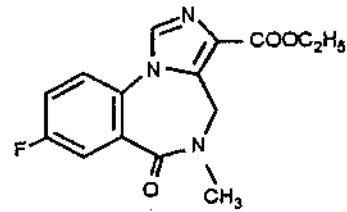
1.2.1.1. y 1.2.1.2. de este capítulo). La subunidad $\alpha 1$ es la principal subunidad a la que se une la benzodiazepina [^3H]flunitrazepam. Además, se requiere la presencia de una subunidad γ para la modulación funcional del canal mediante benzodiazepinas (18). Recientemente se han identificado los residuos aminoácidos de las subunidades $\alpha 1$ (18, 102) y $\gamma 2$ (103, 104) que afectan la unión de ligandos al sitio de unión a benzodiazepinas. Se ha postulado que la región de unión a benzodiazepinas sería homóloga a la



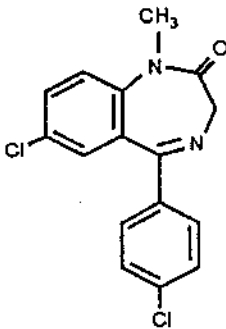
Diazepam



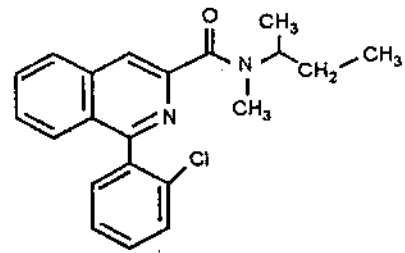
Clonazepam



Flumazenil



Ro 5-4864



PK 11195

Figura I-3: Fórmulas estructurales de distintos agonistas y antagonistas de receptores a benzodiazepinas. Diazepam: agonista RCB y RPB; clonazepam: agonista RCB; flumazenil: antagonista RCB; Ro 5-4864: agonista RPB; PK 11195: antagonista RPB.

región de unión a GABA, pero situada en la superficie de interacción de subunidades diferentes. El sitio de unión a GABA se encontraría entre las subunidades β y α , mientras que el sitio de unión a benzodiazepinas se encontraría entre las subunidades α y γ . Ambos sitios de unión se localizan en el extremo extracelular N-terminal de las subunidades (18).

2.1.1.1. Agonistas, antagonistas y agonistas inversos

El RCB tiene una singular importancia farmacológica debido al rango de eficacias que se observa. Además de agonistas totales y parciales, algunos compuestos que actúan como agonistas inversos disminuyen la función del canal, mientras que los antagonistas bloquean los efectos de los agonistas y de los agonistas inversos. Los dominios para la unión de agonistas y agonistas inversos sólo llegan a superponerse parcialmente, y los aminoácidos involucrados en la unión dependen del ligando utilizado (19).

Los agonistas totales, como diazepam y midazolam, son ligandos de RCB con actividad intrínseca positiva máxima. Son moduladores positivos del complejo receptor $GABA_A$ /canal cloruro y su acción básica es aumentar la frecuencia, sin alterar el tiempo medio, de apertura del canal (97). Los valores de actividad intrínseca de los agonistas parciales se encuentran entre los de los agonistas totales y los antagonistas puros. El agonista parcial prototipo es el Ro 166028 ó bretazenil. Clonazepam, flurazepam y clordiazepóxido también son agonistas parciales (105). Otros compuestos no benzodiazepínicos, incluyendo las imidazopiridinas, como alpidem y zolpidem, y las ciclopirrolonas, como zopiclona, se unen a RCB y tienen efectos similares a las benzodiazepinas clásicas (106).

El Ro 15-1788 ó flumazenil es el primer antagonista de RCB utilizado en la clínica. El antagonismo que ejerce es de tipo competitivo. Este compuesto presenta una muy débil actividad agonista parcial que contribuye a la seguridad de su uso en la reversión de los efectos de agonistas (107).

Los agonistas inversos tienen alta afinidad por los RCB, pero su actividad intrínseca adquiere valores negativos (entre 0 y -1), y producen efectos que podrían ser considerados la "imagen especular" de los efectos de las benzodiazepinas clásicas. Los primeros compuestos descubiertos con tal actividad fueron las β -carbolicinas. La benzodiazepina Ro 19-4603 es un agonista inverso total y Ro 15-4513, un agonista inverso parcial. Estos ligandos reducen la unión de GABA y, recíprocamente, GABA reduce la unión de ellos. Al deprimir la función del receptor GABA_A, los agonistas inversos inhiben la transmisión sináptica GABAérgica (108).

En la Tabla I-2 se resumen algunas características de los agonistas, antagonistas y agonistas inversos de RCB.

Tabla I-2 : Clasificación de ligandos a receptores centrales a benzodiazepinas

Propiedad	Agonistas	Antagonistas	Agonistas inversos
Perfil farmacológico	Tranquilizante, anticonvulsivante	Sin actividad intrínseca, bloqueo de efectos de agonistas y agonistas inversos	Ansiogénico, convulsivante, estimulante
Efecto de GABA	Potenciación	No se afecta	Depresión
Unión en presencia de GABA	Aumentada	No se afecta	Reducida

Tomado de referencia 109.

2.1.2. Receptores periféricos

Se han asignado distintos nombres a los RPB: "receptores a benzodiazepinas mitocondriales", debido a que se localizan predominantemente en membrana mitocondrial; "receptores ω ", siguiendo una clasificación propuesta para todos los receptores a benzodiazepinas ; y "receptores mitocondriales al inhibidor de la unión de diazepam", debido a que el polipéptido DBI se ha identificado como ligando endógeno para los RPB (100). Sin embargo las denominaciones que más comúnmente se encuentran en la literatura para estos receptores son: "receptores de tipo periférico a benzodiazepinas" o "receptores periféricos a benzodiazepinas", siendo esta última la adoptada en este trabajo.

2.1.2.1. Estructura molecular

El primer componente molecular asociado a RPB identificado fue una proteína de 18 kDa, que fue específicamente marcada por la isoquinolina PK 14105 (110). Esta proteína se denominó proteína de unión a isoquinolina (IBP= *isoquinoline binding protein*). En base al perfil hidropático de la IBP, se ha propuesto una topología de membrana que consiste en: cinco dominios transmembrana, un terminal carboxílico citosólico con dos sitios potenciales de fosforilación por protein cinasa, y una importante región citosólica entre los dominios I y II transmembrana, que parecería contener el sitio de interacción con isoquinolinas (111).

En preparaciones mitocondriales de riñón de rata se demostró que la proteína de 18 kDa está asociada a dos proteínas, de 32 y 30 kDa, las que se identificaron como el canal aniónico dependiente de voltaje y el transportador de nucleótido de adenina, respectivamente. El canal aniónico se localiza en membrana mitocondrial externa y el transportador de nucleótido, en membrana interna; y el contacto de ambos constituiría un canal para sustratos (112). La composición propuesta para el RPB incluye a la proteína de 18

kDa, el canal aniónico y el transportador de nucleótido. En este complejo ternario, el sitio de unión a isoquinolinas se encuentra en la subunidad de 18 kDa, mientras que la expresión del sitio de unión a benzodiazepinas requiere de ambas subunidades, la proteína de 18 kDa y el canal aniónico dependiente de voltaje (100, 113). Estudios más recientes han identificado otra proteína de 10 kDa que parecería estar asociada al RPB (100).

2.1.2.2. Ligandos sintéticos

Distintos compuestos sintéticos, incluyendo quinolinas, imidazopiridinas y benzodiazepinas, interactúan con RPB. Las benzodiazepinas presentan baja afinidad (micromolar) en muchas especies, con excepción de la mayoría de los roedores. El orden característico de potencias de unión de benzodiazepinas a RPB de rata es: Ro 5-4864 (4'-clorodiazepam) > diazepam ≥ flunitrazepam >>> clonazepam; y los valores de constantes de disociación varían entre 6 nM para Ro 5-4864 y > 10 μM para clonazepam. El orden de potencias es opuesto para RCB, siendo clonazepam la benzodiazepina que tiene mayor afinidad por este tipo de receptores (111).

Las isoquinolinas carboxamidas difieren estructuralmente de las benzodiazepinas y tienen mucha mayor selectividad por RPB que por RCB. Este descubrimiento fue uno de los mayores avances en la caracterización molecular y farmacológica de los RPB. El derivado PK 11195 es uno de los ligandos más utilizados en la investigación de RPB (99). El PK 14105 es un p-fluoronitrofenil análogo del PK 11195, que se une de manera irreversible y no competitiva al RPB y marca específicamente a la proteína de 18 kDa (111). El AHN 683 es un ligando fluorescente, estructuralmente relacionado con PK 14105, que resulta adecuado en la caracterización de RPB (114).

Las imidazopiridinas se unen tanto a RPB como RCB. A este grupo pertenece el alpidem, uno de los ligandos a RPB de mayor afinidad, cuya

constante de disociación se encuentra en el rango picomolar. La imidazopiridina zolpidem posee una constante de disociación significativamente mayor (99). En un estudio reciente se ha descrito la alta selectividad por RPB en una nueva serie de ligandos pertenecientes a este grupo (115).

En base a la estructura química de las imidazopiridinas se ha desarrollado una serie de compuestos, las 2-aril-3-indolacetamidas. El prototipo de esta serie es el FGIN-1-27, que exhibe alta afinidad por RPB y no se une a otros receptores (116).

Recientemente se ha sintetizado una nueva clase de ligandos RPB selectivos, derivados de la pirrolobenzoxazepina (117).

Además de todos estos ligandos a RPB, muchos otros compuestos, especialmente aquellos que contienen anillos aromáticos, se unen a estos receptores con afinidad variable. Dentro de estos compuestos se encuentran: insecticidas piretroides, dipiridamol, carbamazepina (99), dihidropiridinas (118), lidocaína (119), diuréticos tiazídicos (120), y lindano (121).

La benzodiazepina Ro 5-4864 y la isoquinolina carboxamida PK 11195 son los dos ligandos a RPB más estudiados. Termodinámicamente, PK 11195 fue clasificado como un antagonista, mientras que la benzodiazepina Ro 5-4864, como un agonista. El significado funcional de esta clasificación termodinámica resulta ambigua, ya que PK 11195 y Ro 5-4864 tienen efectos similares en algunos modelos fisiológicos (111).

2.1.2.3. Distribución tisular y subcelular

El cerebro contiene niveles relativamente bajos de RPB, y su localización parecería corresponder a las células de la glía (100, 108, 122), donde se ha sugerido la existencia de subtipos de estos receptores (122). Entre otros tejidos, los RPB se han identificado en músculo liso vascular (123, 124), músculo liso de estómago (124), páncreas (125), vejiga (126) y

tracto genital masculino (127-131) y femenino (124, 132). También se han identificado RPB en células del sistema inmune, como linfocitos (133-136) y monocitos (136). Aunque los RPB se han encontrado en casi todos los tejidos periféricos estudiados, el nivel de expresión puede variar ampliamente y se ha encontrado una distribución discreta dentro de algunos órganos (100).

Distintos estudios sugirieron que los RPB están asociados a la membrana mitocondrial externa (100, 137). Sin embargo, se ha informado la localización de estos receptores en la membrana interna de mitocondria en pulmón de cobayo (100). En subpoblaciones de células hepáticas se describió la presencia de RPB en mitocondrias de hepatocitos y en una fracción no mitocondrial de células del epitelio biliar. Este hallazgo de una localización no mitocondrial de RPB coincide con la descripción de la presencia de estos receptores en glóbulos rojos, células que carecen de mitocondrias (100). En distintos estudios se identificó una localización en membrana plasmática para estos receptores (135, 138, 139). También se ha demostrado la existencia de RPB a nivel nuclear (133, 140).

2.1.3. Ligandos endógenos

El cerebro y otros tejidos contienen un polipéptido de 11 kDa que presenta la capacidad de inhibir la unión de [³H]diazepam. Por lo tanto, este polipéptido se denominó inhibidor de la unión de diazepam (DBI= *diazepam binding inhibitor*) (141). En el sistema nervioso central y en distintos órganos periféricos el DBI genera, por clivaje proteolítico, péptidos biológicamente activos (142). Este polipéptido de 86 aminoácidos presenta la misma afinidad (micromolar) por RCB y RPB. Distintos fragmentos de DBI, TTN (fragmento 17-50) y ODN (fragmento 33-50), presentan selectividad por RPB y RCB, respectivamente (100). Un estudio reciente demostró la síntesis y liberación

de péptidos relacionados a ODN, que mediarían la movilización de calcio por un mecanismo dependiente de proteína G, en células de la glía (143).

Rothstein y col (144) identificaron seis o siete moléculas similares a benzodiazepina en cerebro humano y de rata. Dos de estas moléculas desplazan competitivamente a Ro 5-4864 en fracciones mitocondriales. Estos autores indicaron que estas moléculas podrían sintetizarse *in vivo* o provenir de la dieta. Simultáneamente, Piva y col. (145) demostraron la síntesis de sustancias similares a benzodiazepinas en cerebro de rata.

Se ha informado que distintas porfirinas naturales, entre ellas: protoporfirina IX, mesoporfirina IX, deuteroporfirina IX y hemina, presentan afinidad nanomolar por RPB. Se ha sugerido que el complejo RPB mitocondrial media el transporte intracelular de porfirinas (146). Sin embargo, las consecuencias funcionales de la interacción entre RPB y estos sustratos endógenos dependerían del estado energético de la mitocondria (147).

2.2. EFECTOS PERIFÉRICOS DE BENZODIAZEPINAS

2.2.1. Sistema endócrino

La administración de benzodiazepinas puede alterar la secreción de prolactina (148) y de las hormonas adrenocorticotrófica (99), del crecimiento y luteinizante (149). El ligando Ro 5-4864 estimula la función hipotálamica-pituitaria-adrenal actuando principalmente sobre el componente central de este eje, aumentando la liberación de la hormona liberadora de corticotrofina; mientras que PK 11195 actúa fundamentalmente a nivel hipofisario (150). Se ha informado que los ligandos RPB inhiben la producción de aldosterona en células adrenales aisladas (151).

A estos efectos sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal se han asociado evidencias que señalan la participación de RPB en la esteroidogénesis. Los RPB se localizan primordialmente en la membrana externa mitocondrial, y son extremadamente abundantes en células esteroidogénicas (99, 152). Distintos estudios demostraron que la unión de ligandos selectivos a RPB estimula la esteroidogénesis en diversos tipos celulares (153, 154) y en mitocondrias aisladas (154). La formación endógena de TTN a partir de DBI, estimula la esteroidogénesis vía RPB (155). Se ha sugerido que la estimulación de formación de pregnenolona en células adrenocorticales se debe a la translocación de colesterol mediada por RPB desde la membrana externa hacia la membrana interna de la mitocondria (99). Recientemente se ha desarrollado un modelo tridimensional de la proteína de 18 kDa del RPB, utilizando simulación de dinámica molecular. Este modelo teórico mostró que el RPB puede acomodar la molécula de colesterol y funcionar como un canal (156). La expresión de esta proteína de 18 kDa en fibroblastos aumentó la captación mitocondrial de colesterol, sugiriendo que se trata de una proteína transportadora/canal de colesterol (156). Algunos autores sugirieron que mecanismos similares regularían la síntesis de neuroesteroides en células de la glía (157, 158).

La regulación hormonal de RPB sugiere una estrecha relación entre estos receptores y el sistema endócrino. La densidad de RPB en ovario humano y de rata aumenta proporcionalmente con el grado de maduración y diferenciación celular. En machos, la administración de testosterona previene la reducción de RPB en el tracto genital inducida por castración (159). También se ha informado que la administración crónica de tiroxina en ratas resulta en una regulación en más de los RPB en corazón, riñón y testículos (160).

Algunos autores estudiaron los efectos de diazepam sobre la función de la glándula pineal. Los resultados obtenidos sugirieron que el efecto

inhibitorio de diazepam sobre la síntesis de melatonina resultaría de la acción directa de la droga sobre la glándula pineal (161). Tanto mecanismos GABAérgicos como RPB podrían estar involucrados en este efecto de diazepam (162).

Petit y col. (163) demostraron que el ligando RPB, 4'-clordiazepam (Ro 5-4864), inhibe la secreción de insulina inducida por glucosa por un mecanismo independiente de la vía adenilato ciclasa-AMPC. Otros autores informaron que la hiperglicemia inducida por clonazepam no estaría mediada por endorfinas (164). También se ha descrito que la secreción de insulina estimulada por glucosa es inhibida por DBI; y se ha sugerido un rol modulador local para este péptido (165).

2.2.2. Sistema cardiovascular

Los efectos de benzodiazepinas sobre la función cardíaca ha despertado interés en distintos grupos de investigación. Los resultados obtenidos por Bolger y col. (166) sugirieron una asociación funcional entre los RPB y los canales de calcio operados por voltaje en aurícula de cobayo. Se ha descrito que Ro 5-4864 y diazepam provocan una disminución de la respuesta cronotrópica a noradrenalina en aurícula aislada de rata, probablemente por interacción con la cadena de eventos ligada a AMPC que resulta de la activación de receptores β (167). Distintos experimentos han indicado que diazepam afecta la contractilidad cardíaca, aunque existe cierta controversia respecto a este efecto. Esta benzodiazepina provoca un efecto inotrópico negativo en el músculo ventricular (168); sin embargo, potencia el efecto inotrópico positivo inducido por isoprenalina, probablemente por aumento en la producción de AMPC (169). También se ha informado que diazepam ejerce un efecto bifásico sobre la fuerza de contracción del corazón aislado de rata (170), cuyo componente positivo sería antagonizado por PK

11195 (171). En otros estudios, los ligandos RPB, Ro 5-4864 y PK 11195, exhibieron una actividad inotrópica negativa (172, 173). Recientemente se ha demostrado el efecto depresor de diazepam y midazolam sobre la actividad contráctil de miocitos ventriculares cultivados (174).

El efecto vasodilatador de benzodiazepinas fue observado en distintas especies y en diferentes modelos experimentales. Ro 5-4864 y PK 11195 provocaron un aumento del flujo coronario en preparaciones de corazón aislado de rata (175). Concentraciones micromolares de benzodiazepinas fueron capaces de inhibir las contracciones inducidas por diversos vasoconstrictores en preparaciones de aorta de rata (118, 176). Efectos similares fueron descritos para compuestos derivados de isoquinolina carboxamida (118, 176) y β -carbolinas (177). La relajación de la vasculatura umbilical humana inducida por benzodiazepinas fue descrita por Elgoyhen y col. (178). Entre los mecanismos propuestos para estos efectos mediados por benzodiazepinas se encuentran la inhibición del canal de calcio operado por voltaje (118) y la inhibición de actividad de fosfodiesterasas (176).

2.2.3. Otros sistemas

Además del efecto vasodilatador descrito en la sección anterior, las benzodiazepinas son capaces de relajar otros músculos lisos, como vas deferens (179, 180), duodeno (180), vejiga (181) y útero (182). Se ha demostrado que el pretratamiento con hormonas sexuales femeninas puede modular el efecto de benzodiazepinas sobre la actividad contráctil del útero aislado de rata (183).

Distintas líneas de investigación han evaluado la capacidad de benzodiazepinas de afectar la proliferación celular (99, 100, 184), la respiración mitocondrial (99, 100, 185) y las respuestas inmunes (100, 186).

2.3. UTILIDAD TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS CLÍNICAS

Los efectos terapéuticos de las benzodiazepinas se producen por acciones de estos fármacos en el sistema nervioso central, y están mediados por RCB. Los más relevantes son sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada y actividad anticonvulsiva. Aunque las distintas benzodiazepinas ejercen efectos cualitativamente semejantes, las diferencias cuantitativas importantes en sus espectros farmacodinámicos y sus propiedades farmacocinéticas han originado diversos patrones de aplicación terapéutica (187). Otros compuestos no benzodiazepínicos, que comparten algunas de las aplicaciones terapéuticas de las benzodiazepinas, incluyen a las imidazopiridinas, como alpidem y zolpidem, y las ciclopirrolonas, como la zopiclona (106). La benzodiazepina flumazenil es un antagonista competitivo de RCB y es capaz de prevenir y revertir todos los efectos de las benzodiazepinas clásicas (107). Estas propiedades farmacológicas han dado lugar al uso de flumazenil en el tratamiento de sobredosificaciones de benzodiazepinas y para revertir los efectos producidos por estos agentes durante la anestesia (187).

En los últimos años se han desarrollado distintas líneas de investigación sobre los potenciales efectos terapéuticos de drogas relacionadas con receptores a benzodiazepinas que no son mediados por acciones centrales. Recientemente se ha descrito que el extracto de *Ginkgo biloba* deprime la expresión de RPB adrenocorticales y, por lo tanto, disminuye los niveles circulantes de glucocorticoides, lo que justificaría los efectos "antiestrés" y neuroprotector del extracto (188, 189).

La modificación en la densidad de RPB se ha visto asociada a distintas patologías, como encefalopatía hepática (190-195), neurotoxicidad (196) y distintos tipos de tumores (197-201). Algunos autores señalaron la potencial utilidad de los RPB como biomarcadores para el desarrollo de métodos diagnósticos (195, 196, 202). También se sugirió que la síntesis de ligandos

con determinadas propiedades farmacológicas podría resultar en nuevas alternativas terapéuticas (199, 200).

El diazepam se utiliza comúnmente para aliviar la ansiedad en el tratamiento de pacientes con síndromes de isquemia aguda. Sin embargo, se ha descrito que diazepam exhibe un efecto antiisquémico, probablemente mediado por una reducción en el consumo de oxígeno en miocardio (203). Recientemente se ha señalado la potencial utilidad terapéutica del agonista parcial de RCB, PNU-101017, en el tratamiento de la isquemia cerebral (204).

3. ESTUDIO DE SISTEMAS INVOLUCRADOS EN LA FUNCIÓN RENAL

El estudio de los efectos de distintos agentes sobre la función del riñón es uno de los pilares en la comprensión de la fisiología de este órgano, y en el desarrollo de nuevos diuréticos u otras drogas con diferentes aplicaciones terapéuticas.

3.1. MECANISMOS RENALES: BLANCOS EN EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

3.1.1. Diuréticos

Dentro de las drogas que afectan la función renal, los diuréticos son las de más amplio uso. Son agentes que aumentan las tasas de flujo urinario y de excreción de sodio. Además, modifican el manejo renal de otros cationes, aniones y ácido úrico. Estos fármacos se clasifican en: inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos del asa, tiazidas y diuréticos conservadores de

potasio. Actualmente, se entiende razonablemente bien el mecanismo de acción de cada grupo. Los diuréticos son medicamentos relevantes en el tratamiento de diversas situaciones clínicas, entre ellas: hipertensión, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal (205).

Uno de los principales desafíos en el desarrollo de nuevos agentes es el descubrimiento de diuréticos verdaderamente isocaliuréticos. En estudios realizados con antagonistas de receptores de adenosina A₁ se observó la inducción de natriuresis, con efectos mínimos sobre la excreción de potasio. Se ha descrito que la adenosina endógena, vía receptores A₁, inhibe la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc; como consecuencia, aumenta la actividad del simporte Na⁺-HCO₃⁻ basolateral. Este hallazgo brinda las bases para la búsqueda de diuréticos con la ventaja, sobre los disponibles en la actualidad, de no alterar la homeostasis del potasio (205).

Recientemente, se ha logrado clonar y expresar los canales de agua de túbulos proximales y conductos colectores, denominados acuaporín-CHIP y acuaporín-CD, respectivamente. Este logro es un aporte importante en la comprensión de la homeostasis del agua, y alienta la búsqueda de inhibidores específicos de estos canales. Los inhibidores de acuaporín-CHIP resultarían diuréticos natriuréticos, y los inhibidores de acuaporín-CD evitarían la reabsorción de agua en los conductos colectores y serían diuréticos acuaréticos (205, 206).

3.1.2. Vasopresina y fármacos relacionados

La arginina vasopresina (hormona antidiurética en seres humanos) es la principal hormona involucrada en la homeostasis del agua. El sistema hipotalámico-hipofisario controla el componente central del mecanismo antidiurético. El principal estímulo fisiológico para la liberación de vasopresina es un aumento en la osmolalidad plasmática, pero distintos

mediadores endógenos, fármacos y situaciones clínicas pueden modificar la secreción de la hormona. El componente anatómico periférico de la antidiuresis está constituido, fundamentalmente, por el sistema de túbulo colectores renales que responden a la vasopresina aumentando su permeabilidad al agua (207).

Los receptores a vasopresina son receptores acoplados a proteína G, y se clasifican en: V_{1a} , ampliamente distribuidos en la periferia y en el sistema nervioso central; V_{1b} , localizados en adenohipófisis; y V_2 , ubicados predominantemente en células principales de conductos colectores renales. Cuando la vasopresina se une a receptores V_1 , sobreviene la activación de distintas fosfolipasas unidas a membrana, y los efectos biológicos resultantes incluyen: vasoconstricción, glucogenólisis, agregación plaquetaria, liberación de hormona adrenocorticotrófica y crecimiento de células de músculo liso vascular. La unión de vasopresina a receptores V_2 estimula a la adenilato ciclasa, lo que aumenta los niveles intracelulares de AMPc. La activación de la protein cinasa dependiente de AMPc media los efectos hidrosmóticos de la vasopresina. La fosforilación de proteínas induce un rápido aumento en la permeabilidad al agua en células epiteliales del conducto colector, mediante la fusión de vesículas que contienen canales de agua (acuaporín-CD) a la membrana apical (206, 207).

La respuesta antidiurética a la vasopresina puede verse modificada por distintos fármacos. Se ha descrito que los antiinflamatorios no esteroides, la carbamazepina y la clorpropamida aumentan los efectos antidiuréticos de vasopresina. La respuesta a esta hormona puede verse inhibida por litio y el antibiótico demeclociclina (207).

La síntesis de péptidos análogos de la vasopresina ha logrado la obtención de agonistas selectivos. El agonista de receptores V_2 , desmopresina, introdujo la alternativa terapéutica de disponer de una droga que ejerce el efecto antidiurético de vasopresina despojado de su actividad

presora. Actualmente, la búsqueda de antagonistas selectivos es alentada por la idea de que los antagonistas V_1 resulten beneficiosos en situaciones clínicas donde la resistencia periférica total se halla aumentada, como insuficiencia cardíaca congestiva e hipertensión. Mientras que los antagonistas V_2 serían útiles cuando exista una excesiva reabsorción de agua libre de solutos, como en el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (207).

3.1.3. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una molécula endógena, sintetizada a partir de L-arginina, responsable de la estimulación de guanilato ciclasa soluble en distintos tejidos. Además, el NO es un factor citotóxico liberado por macrófagos activados por estímulo inmunológico. Estas propiedades biológicas diferentes derivan de la acción de distintas clases de NO sintasas. Una NO sintasa, constitutiva, es dependiente de Ca^{2+} -calmodulina y media la comunicación intercelular; otra NO sintasa, inducible, es independiente de Ca^{2+} e inhibible por glucocorticoides, y está involucrada en la citotoxicidad (208).

Los nitrovasodilatadores se han utilizado durante más de un siglo para el tratamiento de la angina, y aún son empleados en distintas situaciones clínicas. Estos compuestos se comportan como prodrogas, que ejercen sus acciones farmacológicas luego de ser metabolizados a NO. El NO liberado activa la guanilato ciclasa en el músculo liso y aumenta la síntesis de GMPc que promueve la relajación de la vasculatura (209). Si bien el NO fue identificado como el factor liberador dependiente de endotelio, que media los efectos de distintos vasodilatadores, existen líneas de investigación que cuestionan esta conclusión (210).

Los estudios regionales de lechos vasculares en perros, ratas, conejos y humanos, entre otras especies, mostraron que la inhibición del NO endógeno induce un incremento en el tono vascular, especialmente en riñón (211). Los efectos de inhibidores de la NO sintasa sobre la hemodinamia renal indicaron que el NO puede jugar un importante rol en la regulación local del flujo (212-214) y en la modulación de la reactividad vascular (215). También se ha sugerido que, durante la reducción de la presión arterial renal, el NO participa en la autorregulación del flujo sanguíneo de este órgano (216). En investigaciones dirigidas a evaluar los mecanismos de acción de drogas vasodilatadoras, se encontró que los efectos renales de acetilcolina (211) y bradiquinina (217) estarían mediados, al menos en parte, por NO.

Además de su participación en la modulación de los procesos hemodinámicos, el NO desempeña un rol en la facilitación de la excreción de sodio, y este efecto es parcialmente independiente de su acción vasodilatadora. Respecto al NO, Moncada y col. (218) hipotetizaron la existencia de dos clases de hipertensión. En una, el aumento de actividad de vasoconstrictores incrementaría la generación de NO como mecanismo compensador; en esta situación la excreción de sodio estaría normal o aumentada. En la otra clase de hipertensión, habría un déficit en la síntesis de NO y estaría acompañada por un manejo renal de sodio alterado. En ambas situaciones, una alternativa que aumente la disponibilidad de NO resultaría un tratamiento antihipertensivo. Una estrategia sería el desarrollo de compuestos que causen una activación de larga duración de la vía L-arginina:NO. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina activan indirectamente esta vía al prevenir la degradación de bradiquinina. En este sentido, los inhibidores de la NO sintasa reducen el efecto antihipertensivo de los inhibidores de la enzima convertidora (218).

Otros estudios señalaron que el incremento en la síntesis de NO, por la administración de L-arginina, sería potencialmente útil en la prevención de la insuficiencia renal crónica (219) y la toxicidad por ciclosporina A (220).

3.2. SISTEMA GABA EN RIÑÓN

Numerosos estudios demostraron la presencia de distintos elementos constitutivos del sistema GABA en el riñón. La presencia de GABA fue detectada en tejido renal, predominantemente a nivel tubular, incluyendo la parte ascendente del túbulo distal y del asa de Henle, túbulos colectores (células principales) y túbulos conectores (221). Una parte de este GABA se forma a partir de putrescina, y otra parte provendría de la descarboxilación de glutamato, en base al hallazgo de actividad de GAD en riñón. Estudios inmunoquímicos y bioquímicos revelaron que distintos tipos de GAD se encontrarían en neuronas cerebrales y en riñón (3). También se ha demostrado actividad de GABA-T a nivel renal (3).

Erdö y col. (221) estudiaron la capacidad del tejido renal de liberar GABA endógeno. La liberación basal de GABA resultó más intensa en médula que en corteza. Tanto el inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ , ouabaína, como las altas concentraciones de potasio, provocaron un marcado aumento en el eflujo de GABA en ambas regiones renales. Estos autores propusieron que la liberación de GABA inducida por estímulos señala una función extramural para el GABA renal, por ejemplo la modulación de la motilidad de vejiga. En este sentido, se ha demostrado que GABA inhibe la motilidad de la vejiga mediante la activación de receptores GABA_A ubicados en nervios colinérgicos (3).

En un estudio realizado por Sidhu y Wood (222) se encontró, en vesículas de membranas lumbales de corteza renal de rata, dos sistemas de captación de GABA, uno de alta y otro de baja afinidad. Las características

de estos sistemas de captación renal difirieron de las de los sistemas de transporte de GABA en tejido cerebral. En un trabajo posterior se caracterizó al transportador GABA/betaina (BGT-1) de riñón humano. Este transporte de GABA estaría acoplado a Na^+ y Cl^- con una estequiometría $3\text{Na}^+:2\text{Cl}^-:1$ GABA (223).

Mediante la combinación de técnicas autorradiográficas y de unión de radioligandos, se ha demostrado la presencia de receptores GABA_A en túbulos contorneados corticales y en túbulos colectores de riñón de rata (224). Los receptores GABA_B se encontraron concentrados en la corteza renal (225).

3.3. RECEPTORES A BENZODIAZEPINAS EN RIÑÓN

La localización de receptores a benzodiazepinas en riñón de rata se realizó mediante técnicas autorradiográficas, utilizando [^3H]flunitrazepam como marcador. En los autorradiogramas, la marca se concentró en elementos tubulares de la médula externa y la corteza, identificados por morfología y distribución como la rama ascendente gruesa del asa de Henle y el túbulo contorneado distal. La identidad de los túbulos marcados se confirmó por localización inmunofluorescente de la proteína de Tamm-Horsfall, marcador específico de estos segmentos tubulares. El orden de potencias de distintas benzodiazepinas para desplazar [^3H]flunitrazepam demostró que los receptores identificados son RPB (226). En un estudio comparativo, Awad y Gavish (227) mostraron que en membranas de riñón de rata la unión de [^3H]PK 11195 es inhibida por PK 11195, Ro 5-4864 y clonazepam con valores de CI_{50} de: 0.018, 0.027 y $> 10 \mu\text{M}$, respectivamente.

Se ha informado que, en riñón de rata, los RPB se localizan en la membrana externa de una subpoblación mitocondrial. Aquellas mitocondrias que presentan altos niveles de RPB serían más susceptibles al daño osmótico

que las mitocondrias en las que los RPB están ausentes o en bajos niveles (137).

En un estudio de Calvo y Medina (228) se demostró que la preincubación de membranas de riñón de rata con Ca^{2+} a 37°C inhibe la unión de [^3H]Ro 5-4864. Estos autores sugirieron la presencia de un sitio de reconocimiento del catión acoplado al RPB.

Con el objetivo de investigar el rol de los RPB en riñón de rata, se examinó el efecto de distintas clases de diuréticos sobre la unión de [^3H]Ro 5-4864 y [^3H]PK 11195 en preparaciones de membranas. Los compuestos tiacídicos desplazaron a estos ligandos con un orden de potencias similar al correspondiente a sus efectos natriuréticos *in vivo*. Estos autores sugirieron que el RPB sería, o estaría en estrecha asociación con el sitio de acción de estos diuréticos (120). En otro trabajo se demostró que los haluros también son capaces de desplazar radioligandos de RPB en preparaciones de membranas de riñón de rata (229).

La administración crónica de diuréticos (230) o de benzodiazepinas (231) provoca un incremento en la densidad de RPB en diferentes regiones del riñón de rata. La densidad de los RPB en riñón también puede verse alterada por tratamiento con progesterona, en hipertensión inducida por uninefrectomía asociada a la administración de sal y acetato de desoxicorticosterona, en ratas espontáneamente hipertensas y en ratas Brattleboro, con deficiencia de vasopresina. La adrenalectomía reduce la densidad de RPB, y esta disminución se revierte por la administración de aldosterona (160). Se ha descrito que distintos modelos de estrés alteran la densidad de RPB en riñón de rata (152). Algunos estudios sugirieron que la angiotensina II podría ser un factor endógeno responsable de la regulación de RPB durante el estrés (232, 233).

4. OBJETIVOS

Actualmente, la utilidad terapéutica de las benzodiazepinas y de las drogas relacionadas con el sistema GABAérgico se deben, fundamentalmente, a los efectos de estos agentes mediados por acciones sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, los esfuerzos dirigidos en los últimos años hacia la investigación del rol en la periferia del sistema GABA y de los receptores a benzodiazepinas, como así también de los efectos de drogas relacionadas, han logrado expandir las perspectivas clínicas de estos agentes.

Los distintos elementos constitutivos del sistema GABAérgico descritos en riñón, y la existencia de receptores a benzodiazepinas sensibles a la modulación farmacológica y hormonal, sugieren la participación de estos sistemas en la regulación de la función renal, y colocan a este órgano en un blanco probable para las acciones de drogas GABAérgicas y benzodiazepinas.

Los objetivos de este trabajo de tesis fueron:

- Caracterizar los efectos de agonistas GABAérgicos y benzodiazepinas sobre la función renal.
- Evaluar algunos de los probables mecanismos involucrados en tales efectos.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TÉCNICAS DE CLEARANCE

1.1. CONCEPTO DE CLEARANCE

Debido a sus usos multidisciplinarios y aplicación a una amplia variedad de situaciones, el término "clearance" o "aclaramiento" ha sido empleado en diferentes contextos con ligeras diferencias en su significado. La definición más general de clearance es la que lo considera como una constante de proporcionalidad que describe la relación entre: la velocidad de transferencia de una sustancia x, en cantidad por unidad de tiempo, y su concentración (C_x) en un fluido de referencia adecuado.

$$\text{Clearance}_x = \text{velocidad de transferencia} / C_x$$

El clearance, entonces, posee la unidad de velocidad de volumen (v.g. ml/min), y esto se expresa a menudo por el concepto de un volumen virtual de fluido desde el cual la sustancia es completamente removida por unidad de tiempo. Usualmente, el clearance se refiere más a la eliminación que a la transferencia intercompartamental. La eliminación puede llevarse a cabo como resultado de procesos que ocurren en el riñón, el hígado, el pulmón, y otros órganos. El clearance total es igual a la suma de todos los clearances individuales que ocurren simultáneamente (234).

1.2. CLEARANCE RENAL

Según los principios de balance de masa, en estado estacionario, la velocidad instantánea de eliminación de una sustancia x por riñón es igual a la diferencia entre la velocidad de entrada de x al riñón en el influjo arterial y su velocidad de salida en el eflujo venoso. Esta diferencia se iguala al producto de la velocidad de perfusión renal (Q) por la diferencia de concentración arteriovenosa ($A_x - V_x$). Dado que la diferencia arteriovenosa "normalizada" a la concentración de influjo es igual a la fracción de x que entra en riñón y es removida durante su tránsito, o sea la fracción de extracción (E); el clearance renal es equivalente al producto de la velocidad de perfusión por la fracción de extracción. Entonces, el clearance renal (C_R) podría expresarse como:

$$C_R = Q \cdot (A_x - V_x) / A_x = Q \cdot E$$

Si bien es posible estudiar el clearance renal mediante la determinación de los parámetros de la ecuación anterior, los problemas prácticos involucrados en estas metodologías generalmente excluyen su uso, especialmente para estudios *in vivo*.

El clearance renal puede determinarse directamente porque la velocidad de excreción ($\Delta E_x / \Delta t$) se obtiene a partir de datos urinarios. Entonces:

$$C_R = (\Delta E_x / \Delta t) / P_x,$$

donde Δ indica un incremento finito de cambio; E_x , la cantidad de x excretada en orina; y P_x , la concentración de x en plasma en el punto medio del intervalo de recolección de orina. Los fisiólogos renales generalmente expresan esta relación como:

$$C_R = V_o \cdot O_x / P_x,$$

donde V_o es la velocidad del flujo urinario y O_x es la concentración de x en orina (234).

Conceptualmente, la definición descriptiva más empleada es la propuesta por Homer W. Smith, que expresa: "el clearance renal de una sustancia es el volumen de plasma requerido para proveer la cantidad de esa sustancia que aparece en orina por unidad de tiempo". Es decir, que el valor de clearance renal de una sustancia brinda información cuantitativa de la capacidad del riñón para excretar esa sustancia en relación a su concentración plasmática a un tiempo dado.

1.3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL MEDIANTE TÉCNICAS DE CLEARANCE

1.3.1. Consideraciones generales

El concepto de comparar simultáneamente las concentraciones en orina y en plasma de un marcador dado como índice de función renal, parece haber sido introducido por Gréhant en 1904. Las investigaciones desarrolladas por numerosos autores, en los años siguientes, abrieron el camino para arribar al concepto actual de clearance, cuya fórmula fue sugerida por primera vez por Thomas Addis en 1917. La idea de que los estudios de clearance podrían ser usados para medir funciones discretas del riñón, tal como la velocidad de filtración glomerular, debe ser acreditada a publicaciones realizadas por Rehberg en 1926 (235).

Durante las décadas siguientes, las técnicas de clearance se han aplicado a una amplia variedad de sistemas *in vivo* e *in vitro*, involucrando tanto compuestos endógenos como exógenos. Cuando los resultados obtenidos en estos estudios se interpretan adecuadamente, resultan útiles en la evaluación de los efectos de factores sistémicos (presión arterial, activación neural, estado de hidratación, niveles hormonales, etc.) o sustancias exógenas sobre la función integral del riñón.

El advenimiento de técnicas más directas a nivel tubular, celular y molecular, tendió a desplazar el empleo de las técnicas de clearance. Sin embargo, estas últimas siguen brindando valiosa utilidad, basada en su capacidad de integrar la información obtenida con los estudios más directos en una descripción coherente de la función renal total (236, 237).

1.3.2. Aplicaciones de las técnicas de clearance

1.3.2.1. Consideraciones técnicas

La exactitud de los métodos de clearance depende de la atención cuidadosa de diversos detalles técnicos, tales como la recolección de las muestras de sangre y orina, y la infusión de las sustancias de referencia.

El clearance renal generalmente se mide durante el mantenimiento de una concentración constante del material de referencia en plasma. Tanto las consideraciones teóricas, como las evidencias experimentales, indican que las técnicas de infusión continua son más exactas y precisas que los métodos que dependen del decaimiento de las concentraciones plasmáticas después de una inyección única de la sustancia de referencia. Cuando la concentración plasmática se mantiene constante, la recolección de la muestra de sangre puede llevarse a cabo en cualquier momento durante el período de clearance, ya que la orina se habrá formado a partir de un filtrado glomerular idéntico. Sin embargo, la mayoría de los investigadores utilizan la concentración plasmática del punto medio del período de recolección para eludir posibles variaciones. La recolección de sangre arterial, en lugar de sangre venosa, es un factor que también contribuye a la precisión del método.

Los cambios rápidos en el flujo urinario durante la recolección pueden introducir errores significativos en la estimación del clearance. Estos errores se deben, en parte, a la retención en la vejiga, al comienzo de cada período de

clearance, de un volumen residual de orina en el cual la concentración de la sustancia en estudio difiere de aquella de la orina formada con la nueva velocidad de flujo urinario (235). Esta fuente de error es salvada, en prácticas realizadas en animales de experimentación, cuando la recolección de orina se realiza mediante canulación de vejiga o cateterización de uréteres.

1.3.2.2. Méritos y limitaciones de las técnicas de clearance

La aplicación de estos métodos resulta técnica y analíticamente simple y precisa. Este hecho permite que los experimentos sean fácilmente reproducibles, y logra una importante concordancia entre los resultados obtenidos por investigadores de diferentes laboratorios.

Además, estas técnicas pueden practicarse en sujetos no anestesiados ni sometidos a cirugía, por lo que pueden evaluar la función renal sin alterar su estado fisiológico basal. En estas condiciones resultan métodos inocuos y adecuados para la evaluación clínica. Estos estudios son lo suficientemente seguros como para continuarse durante períodos prolongados y repetirse en el mismo individuo.

Las técnicas de clearance son los únicos métodos que logran la cuantificación de ciertos aspectos de la función del riñón como un todo; y esta información es relevante en el análisis de las actividades excretoras y reguladoras del riñón en el organismo.

El uso de estas técnicas no permite distinguir las diferencias funcionales entre los nefrones. Sin embargo, cuando se combinan con estudios de micropunción de superficie, permite inferir información sobre los nefrones más profundos.

Dentro de las limitaciones de los métodos de clearance debe considerarse la imprecisión o imposibilidad de la localización de la función a un sitio específico del nefrón. Además, si bien estas técnicas pueden describir el mecanismo global de excreción de una sustancia, no posibilitan la

separación de la reabsorción y secreción de sustancias que sufren ambos procesos. Tampoco son capaces de definir los mecanismos de transporte.

Estas técnicas resultan apropiadas para la evaluación de los efectos renales de nuevas drogas (235, 237).

1.3.2.3. Estimación de la velocidad de filtración glomerular

La información que brinda la velocidad de filtración glomerular (VFG) no sólo es importante para evaluar la función renal, sino también para poder interpretar el mecanismo por el cual una sustancia es excretada.

La estimación de la VFG depende de la capacidad de la sustancia marcadora de: ser fisiológicamente inerte y no tóxica; no ligarse a proteínas plasmáticas y filtrarse libremente a nivel glomerular; no ser reabsorbida ni secretada; no estar sujeta a destrucción, síntesis ni almacenamiento dentro del riñón; permanecer químicamente incólume durante su paso por riñón; tener un clearance constante dentro de un amplio rango de concentraciones plasmáticas. La concentración en plasma y orina de este marcador debe poder medirse con precisión. La velocidad de filtración de esta sustancia será, entonces, igual a su velocidad de excreción; y por lo tanto, su clearance será una medida de VFG (235).

La inulina es un polímero de fructosa de peso molecular 5.200 daltons que cumple con los requisitos anteriormente enumerados. Por lo tanto, el clearance de inulina representa un índice adecuado de VFG. Usualmente, se administra una dosis de carga de inulina que determina una concentración plasmática de trabajo adecuada, y mediante infusión continua se mantiene dicho nivel. Una vez alcanzado el estado estacionario (generalmente, 30 min), se comienzan los períodos de recolección de orina.

Otras sustancias que pueden ser utilizadas como marcadores de velocidad de filtración glomerular, son la creatinina y la urea. Actualmente se dispone de sustancias marcadas con isótopos radioactivos (yodotalamato-

^{125}I , $\text{DPTA-}^{99\text{m}}\text{T}$ y $\text{EDTA-}^{51}\text{Cr}$) que permiten medir con precisión el filtrado glomerular (238).

1.3.2.4. Estimación del flujo plasmático renal

La determinación del flujo plasmático renal (FPR) mediante las técnicas convencionales de clearance se basa en la aplicación del principio de Fick a la desaparición de una sustancia indicadora del plasma, su tránsito por el riñón y subsecuente aparición en orina. Si el indicador no es sintetizado ni metabolizado por el riñón, su velocidad de aparición en orina se igualará a su velocidad de extracción desde el plasma. La velocidad de extracción es igual a la diferencia entre la concentración arterial y la venosa de la sustancia, multiplicada por la velocidad del flujo plasmático renal. Esta relación se expresa matemáticamente por:

$$O_x \cdot V_o = (A_x - V_x) \cdot \text{FPR} \quad \Rightarrow \quad \text{FPR} = (O_x \cdot V_o) / (E \cdot A_x),$$

donde V_o es el volumen minuto de orina, E es la fracción de extracción, O_x es la concentración urinaria del marcador, A_x es su concentración en plasma arterial y V_x , en plasma venoso.

Un indicador comúnmente usado para la estimación del FPR es el ácido *p*-aminohipúrico (PAH). Como esta sustancia se secreta activamente por los túbulos, la fracción de extracción en humanos varía entre 0.7 y 0.9. En la rata este valor es próximo a 0.8. En la práctica, la fracción de extracción se asume igual a la unidad, y la concentración plasmática del indicador se mantiene constante por medio de infusión continua de PAH. Bajo estas condiciones, el clearance de PAH (C_{PAH}) brinda un método relativamente simple para estimar el FPR. Esta técnica se ha usado ampliamente tanto en la clínica como en estudios experimentales. Sin embargo, debe considerarse que como la fracción de extracción es menor que la unidad, este método subestima el flujo plasmático renal verdadero (239).

1.3.2.5. Estimación de la fracción de filtración

La fracción de filtración (FF) se define como:

$$FF = VFG / C_{PAH}$$

Esta relación representa la fracción del flujo plasmático renal total que es sometida al proceso de filtración glomerular. Normalmente este parámetro adquiere valores próximos a 0.2.

1.3.2.6. Estimación del manejo renal de agua y electrolitos

La capacidad tubular de reabsorber agua y electrolitos puede ser evaluada sencillamente por el empleo de técnicas de clearance. Con este propósito se determinan los siguientes parámetros:

- Excreción fraccional de sodio: Se calcula como la relación entre el clearance de sodio y la VFG; y representa la fracción de la masa de sodio filtrada que se excreta en orina. Normalmente, el túbulo es capaz de reabsorber prácticamente el 99 % de la carga filtrada.
- Excreción fraccional de potasio: Se calcula como la relación entre el clearance de potasio y la VFG. El potasio filtrado es reabsorbido en casi su totalidad antes de alcanzar el túbulo distal. El potasio excretado en orina resulta, principalmente, de su secreción en el nefrón distal.
- Excreción fraccional de glucosa: Se calcula como la relación entre el clearance de glucosa y la VFG. En condiciones normales la glucosa filtrada se reabsorbe completamente en el túbulo proximal.
- Excreción fraccional de agua: Se calcula como la relación entre el volumen minuto de orina (V_o) y la VFG.
- Relación entre las osmolalidades urinaria y plasmática (U_{osm} / P_{osm}): Brinda información sobre la capacidad de concentración de la orina.
- Clearance osmolar (C_{Osm}): Se define como el volumen de plasma que contiene la misma cantidad de solutos osmóticamente activos excretados en orina por unidad de tiempo.

- Reabsorción de agua libre ($T^{\circ}H_2O$): La reabsorción neta de agua se lleva a cabo en el túbulo colector, y se calcula como la diferencia entre C_{Osm} y V'_{o} .

2. ANIMALES Y TRATAMIENTOS GENERALES

En este estudio se utilizaron ratas Wistar adultas, hembras en los estudios *in vivo* y machos en los experimentos de riñón aislado. Los animales fueron mantenidos con dieta estándar (alimento rata-ratón Cargill), agua ad libitum y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas hasta el momento de su utilización.

En los experimentos realizados *in vivo*, los animales fueron sometidos a 16 hs de ayuno, pero con libre acceso al agua de bebida.

3. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL ANIMAL INTACTO

3.1. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE CLEARANCE

3.1.1. Preparación de los animales

Los animales fueron anestesiados en una campana de vidrio con atmósfera saturada en éter etílico. Durante la cirugía se mantuvo la anestesia mediante un bozal conteniendo un trozo de algodón embebido en éter. Se cateterizó la arteria femoral mediante un catéter PE 40 (Intramedic, USA) para la recolección de muestras de sangre. La vena femoral fue cateterizada con un catéter PE 50 (Intramedic, USA) para la administración de drogas y soluciones. Ambos catéteres fueron cargados previamente con heparina diluída en solución fisiológica (500 U/ml). Para la recolección de muestras de

orina, mediante una incisión suprapúbica, se insertó una cánula de 3 mm de diámetro interno en vejiga, y se la afirmó mediante un lazo de hilo. Los animales fueron ubicados en jaulas de restricción, en decúbito ventral para favorecer el drenaje de orina. Durante todo el período experimental se midió la presión arterial mediante un manómetro conectado al catéter inserto en la arteria femoral; y se brindó calor a los animales mediante una lámpara (tipo spot).

3.1.2. Diseño experimental

Luego de la preparación quirúrgica, y una vez recuperados de la anestesia, los animales recibieron una dosis de carga de inulina y PAH mediante la administración intravenosa de 2 ml/rata de solución fisiológica conteniendo 9 mg/ml de inulina y 3 mg/ml de PAH. Inmediatamente se comenzó la infusión, a través del catéter dispuesto en la vena femoral, de una solución de D-manitol (5 g/100 ml), a una velocidad de 5 ml/h mediante una bomba de infusión continua (Unita Braun Melsungen, Alemania). Estas condiciones de infusión fueron utilizadas por otros autores para la evaluación de efectos de drogas diuréticas (240). La solución de infusión también contuvo inulina (0.9 g/100 ml) y PAH (0.3 g/100 ml). Luego de una hora de infusión, las concentraciones plasmáticas de inulina y PAH se mantuvieron constantes, dentro de los límites de detección de los métodos de dosaje utilizados. Finalizado este período de equilibración se procedió a la recolección de orina durante dos períodos de 20 min cada uno. Se recolectaron muestras de sangre, en el punto medio de cada período de clearance, por medio del catéter dispuesto en arteria femoral.

3.1.3. Tratamientos

3.1.3.1. Estudios de los efectos de diazepam sobre la función renal

"in vivo"

Estos experimentos se llevaron a cabo para evaluar los efectos de distintas dosis únicas de diazepam sobre la función renal en el animal intacto. En estos estudios, las dosis ensayadas fueron 0.1, 0.3, 3 y 10 mg/kg peso corporal. Otros autores utilizaron la dosis de 3 mg/kg en la evaluación de distintos efectos *in vivo* provocados por el tratamiento agudo con diazepam (161, 241). Cada dosis única fue administrada, mediante el catéter inserto en la vena femoral, inmediatamente antes de comenzar el período de equilibración de una hora. Transcurrido este período, como se describió en el ítem anterior, se recolectaron dos períodos de clearance de 20 min cada uno.

En otra serie de experimentos, se realizaron los controles correspondientes. En un grupo se evaluaron los efectos del vehículo de diazepam. En otro grupo se estudió la función renal sin la administración de fármaco ni vehículo.

3.1.3.2. Estudios de los efectos de diazepam en presencia de desmopresina

Estos estudios se llevaron a cabo para evaluar la posibilidad de que el tratamiento con diazepam altere la respuesta de estructuras tubulares a la vasopresina.

Se evaluaron los efectos de diazepam en presencia del análogo de vasopresina, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina (DDAVP), desmopresina. La sustitución de la L-arginina por D-arginina reduce mucho la actividad vasopresora sin reducir la antidiurética. Así, la proporción entre ambas actividades para la desmopresina es unas 3.000 veces mayor que para vasopresina (207). La dosis de desmopresina utilizada en estos estudios fue de 0.4 µg/rata, i.v.. En otra serie de experimentos se duplicó la dosis, sin

encontrarse diferencias en las relaciones U_{osm}/P_{osm} entre ambos grupos. Estos datos indican que la dosis de desmopresina seleccionada es capaz de lograr la máxima capacidad de concentrar la orina en ratas sometidas a diuresis osmótica (manitol 5 %, 5 ml/h).

En un grupo experimental, luego de 15 min de administrada la desmopresina, se inyectó la dosis de diazepam y se comenzó la infusión continua, según se describió en el ítem anterior. La dosis de diazepam seleccionada para este experimento fue de 0.3 mg/kg, dosis intermedia de las ensayadas en el estudio anterior que fue capaz de manifestar todas las alteraciones observadas sobre la función renal. En otro grupo, se evaluaron los efectos de desmopresina en ausencia de diazepam.

3.2. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL

3.2.1. Parámetros hemodinámicos

3.2.1.1. Velocidad de filtración glomerular

Como índice de VFG se estimó el clearance de inulina mediante la fórmula:

$$C_{in} = O_{in} \cdot V_o / P_{in}$$

donde C_{in} es el clearance de inulina expresado en $ml \cdot min^{-1} \cdot 100g^{-1}$

O_{in} es la concentración urinaria de inulina

P_{in} es la concentración plasmática de inulina

V_o es el volumen minuto de orina

3.2.1.2. Flujo plasmático renal

El FPR se estimó mediante el clearance de PAH, utilizando la fórmula:

$$C_{PAH} = O_{PAH} \cdot V_o / P_{PAH}$$

donde C_{PAH} es el clearance de PAH expresado en $ml \cdot min^{-1} \cdot 100g^{-1}$

O_{PAH} es la concentración urinaria de PAH

P_{PAH} es la concentración plasmática de PAH

3.2.1.3. Fracción de filtración

La fracción de filtración se calculó como la relación entre el C_{in} y el C_{PAH} .

3.2.2. Parámetros tubulares

La excreción fraccional de agua (EF_{H_2O}) se expresó en % y se calculó como :

$$EF_{H_2O} = 100 \cdot V_o / C_{in}$$

Las excreciones fraccionales de sodio, potasio y glucosa se calcularon mediante la fórmula:

$$EF_x = 100 \cdot C_x / C_{in}$$

donde x es Na^+ , K^+ o glucosa, y EF_x es la fracción de excreción expresada en %.

También se midieron las osmolalidades en las muestras de plasma y orina para calcular la relación U_{osm}/P_{osm} .

Se calculó el clearance osmolar según la fórmula:

$$C_{osm} = V_o \cdot U_{osm}/P_{osm}$$

y la reabsorción de agua libre:

$$T^{cH_2O} = C_{osm} - V_o$$

4. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

4.1. DESCRIPCIÓN DEL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

4.1.1. Consideraciones generales

El modelo de riñón aislado y perfundido ha resultado adecuado en numerosos estudios para la evaluación de los efectos de drogas sobre ciertos parámetros de la función renal y el estudio de interacciones entre drogas a este nivel (242). El órgano aislado preserva importantes características anatómicas, bioquímicas y funcionales del riñón intacto (236). En esta preparación se circunscriben factores extrarrenales, que influyen en la información obtenida en experimentos *in vivo*. Por lo tanto, las respuestas observadas son específicas del riñón y la interpretación de los datos es más precisa (243). Además, la utilización del órgano aislado permite el estudio de la función renal bajo condiciones en las que las variables (v.g. composición de la solución nutritiva, flujo o presión de perfusión) pueden modificarse de manera controlada (236). El riñón aislado se perfunde, generalmente, con una solución Ringer-Krebs a la que se adiciona albúmina bovina como agente oncótico y una mezcla de aminoácidos para mejorar la estabilidad de la preparación. En la Tabla II-1 se presentan los parámetros funcionales de preparaciones controles perfundidas, en óptimas condiciones, con albúmina 5%. Algunos autores han reportado el uso del polímero sintético dextrán como agente oncótico (243).

4.1.2. Características hemodinámicas

Este preparado se caracteriza por un alto flujo de perfusión que se debe, principalmente, a la baja viscosidad del medio de perfusión comparada

Tabla II-1: Parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido de rata

Presión de perfusión (mmHg)	92 ± 8
Flujo de perfusión (ml . min ⁻¹)	32 ± 6
Velocidad de filtración glomerular (μl . min ⁻¹)	567 ± 89
Flujo de orina (μl . min ⁻¹)	610 ± 210
Excreción fraccional de sodio (%)	8.6 ± 2.6
Reabsorción fraccional de glucosa (%)	94.8 ± 2.5

Estos valores representan la media ± error estándar de 110 determinaciones para cada parámetro (10 riñones aislados, 11 determinaciones por riñón).

Tomado de referencia: 243.

con la de la sangre, y a la ausencia de inervación y/o sustancias vasoconstrictoras circulantes. El flujo elevado es fundamental para el adecuado mantenimiento de la oxigenación del preparado. Sin embargo, debe considerarse que en estas condiciones se somete al órgano a un importante lavado medular, lo que disminuye su capacidad para concentrar la orina. El alto flujo de perfusión, asociado a una VFG disminuída respecto a la del animal intacto, resulta en una FF excesivamente baja, que no permite el adecuado aumento de la presión oncótica peritubular, con la consecuente disminución en la capacidad reabsortiva del nefrón proximal. Algunos investigadores salvaron esta dificultad aumentando la presión oncótica del medio de perfusión, mediante el incremento de la concentración de albúmina (236). En estas condiciones se logra una mejoría en la reabsorción proximal de agua y electrolitos, asociada a una disminución en la VFG. Debe considerarse, además, que la baja VFG en este modelo puede deberse, en parte, a la ausencia de sustancias de circulación sistémica con actividad sobre la dinámica glomerular.

El modelo de riñón aislado y perfundido resulta particularmente útil para acceder a un conocimiento, al menos inicial, a cerca de los sitios y mecanismos globales de acción de sustancias vasoactivas. La simplicidad con que puede manipularse experimentalmente el tono vascular renal inicial, permite la evaluación de efectos vasculares de una sustancia sobre un amplio rango de resistencias vasculares renales (236). En la literatura, se encuentran numerosos trabajos en los que se ha estudiado la reactividad de la vasculatura renal mediante el empleo del modelo de riñón aislado y perfundido (244-247).

4.1.3. Características tubulares

En el riñón aislado y perfundido, la reabsorción de glucosa es prácticamente completa, lo que explica la utilidad de este modelo en los estudios de reabsorción y captación de solutos orgánicos. La presión intratubular proximal se encuentra dentro de los límites normales, pero la presión tubular distal está significativamente elevada. Este fenómeno se debe, probablemente a una disminución en la capacidad reabsortiva del Asa de Henle (236). Alcorn y col. reportaron que la principal anomalía morfológica del riñón aislado reside en la rama ascendente gruesa del Asa de Henle, con signos claros de anoxia y degeneración celular (248). A pesar de estas anomalías, el transporte activo de NaCl en la rama ascendente gruesa no está completamente inhibido, ya que los diuréticos del Asa son capaces de provocar una respuesta natriurética en esta preparación (236, 249). Además, la depleción de los niveles de glutatión durante la perfusión podría contribuir a las anomalías morfológicas y funcionales del Asa de Henle (248, 250, 251). En este sentido, se ha reportado que el agregado de aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión, al medio de perfusión, estabiliza la función del riñón aislado (252). El túbulo distal es capaz de

compensar, al menos en parte, la reabsorción deficiente del Asa de Henle; y conserva la capacidad de secretar potasio.

En base a las características descriptas para este preparado, se puede concluir que el modelo de riñón aislado y perfundido es adecuado para el estudio de las propiedades funcionales del túbulo contorneado proximal. Aunque la evaluación de las funciones del nefrón distal son más problemáticas, no se excluye la utilización de esta preparación para tal propósito (236).

4.2. PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) o tiopental ($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.), según la disponibilidad de anestésico. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la función renal *in vivo* no difiere, según se utilice uno u otro barbitúrico para lograr la anestesia del animal (253). Se cateterizó la vena femoral para la administración de 2.5 ml de una solución de manitol al 5%, para aumentar la diuresis y así facilitar la posterior cateterización del uréter. Mediante una incisión se expuso la cavidad abdominal y se procedió a la disposición de un catéter PE-10 en el uréter derecho. En la vena cava inferior, por debajo de la vena renal derecha, se insertó una cánula PE-100 cargada con solución fisiológica heparinizada (500 U/ml). En la arteria renal derecha se dispuso una aguja metálica, vía arteria mesentérica superior y pasando por aorta abdominal. Inmediatamente se comenzó la perfusión del riñón y se mató al animal mediante la apertura del tórax. Se ligó, con un lazo de hilo, la vena cava inferior por encima de la vena renal derecha, para forzar al efluente renal a seguir la dirección de la canulación. Luego de permitir el lavado del órgano se comenzó el drenaje en el reservorio del medio de perfusión, lográndose así un sistema de circulación cerrado. El medio de perfusión se mantuvo constantemente burbujeado con

una mezcla O₂-CO₂ (19:1). El volumen de perfusato recirculante fue de 100 ml. La perfusión *in situ* se llevó a cabo mediante una bomba peristáltica (Masterflex, USA), manteniendo una velocidad de flujo constante que fue medida por un flujímetro (Gilmont Instrument Inc, USA) dispuesto en la vía arterial. La presión de perfusión se midió constantemente en la salida arterial mediante un transductor de presión (Gould P23 ID, USA) y fue registrada por un registrador (Rikadenki, Japón). El medio de perfusión consistió en una solución Ringer-Krebs (pH 7.4, 300 mosmoles/kg) conteniendo dextrán (2%), glucosa (10 mM), piruvato de sodio (5 mM), lactato de sodio (5 mM) y creatinina (400 mg/l). En algunos experimentos, también se adicionó inulina (300 mg/l). El medio fue enriquecido con cisteína (0.5 mM), ácido glutámico (0.5 mM) y glicina (2.3 mM) para prevenir la pérdida de glutatión de regiones específicas del riñón (252).

4.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS

4.3.1. Estudios realizados en condiciones basales

Finalizado el procedimiento quirúrgico, se comenzó la perfusión. La estabilidad en los valores de presión y flujo de perfusión se alcanzó luego de aproximadamente 20 min. En estas condiciones se continuó la perfusión durante 10-15 min adicionales, lo que correspondió a un período de equilibración de 30-35 minutos. Desde este momento, y hasta finalizar el tiempo experimental, el flujo de perfusión se mantuvo constante. Luego del período de equilibración, se procedió a la recolección de orina durante períodos consecutivos de 5 minutos cada uno. El máximo tiempo de recolección fue de ocho períodos (40 min). En el punto medio de cada período se obtuvo una muestra del perfusato mediante una vía permisiva,

colateral a la arterial. Al finalizar el experimento se extrajo el riñón, se lo secó con papel de filtro y se lo pesó.

Los parámetros funcionales evaluados fueron: presión de perfusión, velocidad de filtración glomerular y excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa.

El promedio de los valores obtenidos en los dos primeros períodos, para cada parámetro estudiado, fue considerado el valor control para cada preparación.

4.3.1.1. Estudio de la viabilidad y estabilidad de la función del riñón aislado y perfundido

Luego del período de equilibración, se evaluó la función renal durante 8 períodos consecutivos de 5 min cada uno, en un grupo de riñones que no recibieron tratamiento farmacológico.

4.3.1.2. Estudio de los efectos de distintos agonistas GABAérgicos

En estos estudios se realizó una serie de experimentos para la evaluación de cada agonista. Luego del tiempo de equilibración, se recolectó orina durante dos períodos controles de clearance. En los períodos subsiguientes se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes del agonista GABA. Estas concentraciones se lograron mediante el agregado de cantidades acumulativas de la droga en estudio al medio de perfusión, al inicio de cada período de recolección de orina.

Los agonistas GABAérgicos estudiados fueron:

- ♦ GABA, agonista GABA_A y GABA_B, en las concentraciones: 0.05, 0.5, 5, 50, 500 y 1000 μ M
- ♦ Muscimol, agonista GABA_A, en las concentraciones: 0.1, 1, 25, 50 y 75 μ M.

- ♦ Baclofen, agonista GABA_B, en las concentraciones: 0.05, 0.5, 10, 50, 200 y 500 μM .

Las concentraciones de agonistas ensayadas en estos experimentos se encuentran dentro del rango de concentraciones utilizadas por otros investigadores en preparaciones de distintos órganos aislados (45, 47, 48, 52, 71).

Los efectos de las concentraciones más altas de muscimol y baclofen empleadas en este trabajo, 75 y 500 μM , respectivamente, fueron evaluados en otros grupos experimentales. En estos experimentos, luego de la recolección de los períodos controles, se agregó al medio de perfusión la cantidad necesaria del agonista en estudio para alcanzar la concentración correspondiente. Los parámetros de función renal fueron evaluados, entonces, durante tres períodos consecutivos de clearance. Estos estudios se llevaron a cabo para testear la influencia que podría tener el procesamiento renal de estas drogas, como así también la probabilidad de desensibilización o taquifilaxia, en los ensayos de efectos de concentraciones acumulativas. La preincubación con agonistas GABA provocó desensibilización específica y cruzada en preparados de intestino aislado (45, 254).

4.3.1.3. Estudios de los efectos del antagonista GABA_A bicuculina

En estos experimentos, luego de la recolección de los dos primeros períodos, se agregó bicuculina al medio de perfusión para alcanzar una concentración 50 μM . Después de 15 min de perfusión con bicuculina, se evaluó la función renal durante tres períodos consecutivos.

La concentración de bicuculina ensayada se encuentra dentro del rango de concentraciones consideradas efectivas en el antagonismo de los efectos mediados por receptores GABA_A en otros estudios realizados en órganos aislados (45, 53, 255). Generalmente, para la evaluación de la función de la preparación aislada en presencia de bicuculina (46, 255) u otros

antagonistas no GABAérgicos (254), se permite un período de preincubación (5-15 min) con el antagonista estudiado.

4.3.1.4. Estudios de los efectos de GABA en presencia de bicuculina

Los efectos de concentraciones crecientes de GABA fueron evaluadas según se describió en el ítem 4.3.1.2.. En esta serie de experimentos, la bicuculina fue adicionada al perfusato, para alcanzar una concentración 50 μM , en el momento de iniciar la perfusión.

4.3.1.5. Estudios de los efectos de muscimol en presencia de atropina

La participación del sistema colinérgico en las respuestas inducidas por el estímulo de receptores GABA_A fue descrita en otros órganos periféricos (49, 71, 78). Para evaluar la posibilidad de esta interacción a nivel renal, se estudiaron los efectos del agonista GABA_A muscimol en presencia del antagonista colinérgico atropina.

La atropina fue agregada al perfusato para lograr una concentración 1 μM en el momento de iniciar la perfusión. Luego del tiempo de equilibración y de la recolección de los dos primeros períodos de clearance, se agregó muscimol al medio de perfusión, obteniéndose una concentración 75 μM . En estas condiciones, se evaluó la función renal durante tres períodos consecutivos. Los resultados de estos experimentos se compararon con los obtenidos en otro grupo de riñones que recibieron idéntico tratamiento con muscimol, pero en ausencia de atropina.

Los efectos de atropina sobre la función renal fueron evaluados en una serie de preparaciones perfundidas con atropina 1 μM desde el inicio de los experimentos. Luego del tiempo de equilibración se recolectaron cinco períodos consecutivos de clearance. La concentración de atropina utilizada en estos experimentos se encuentra dentro del rango de concentraciones

empleadas en otros estudios para lograr el bloqueo de receptores muscarínicos en distintas preparaciones aisladas (49, 53, 78).

4.3.1.6. Estudios de los efectos de distintas benzodiazepinas

Estos estudios se llevaron a cabo para evaluar los efectos de concentraciones crecientes de benzodiazepinas que difieren en sus selectividades para RCB y RPB. Se realizó una serie de experimentos para cada benzodiazepina estudiada, según se describió para agonistas GABAérgicos en la sección 4.3.1.2..

Se evaluaron las respuestas a las siguientes benzodiazepinas:

- ♦ Diazepam, benzodiazepina de acción mixta sobre RCB y RPB, en las concentraciones: 0.05, 2, 54 y 230 μM .
- ♦ Clonazepam, benzodiazepina agonista de RCB, en las concentraciones: 2, 25, 54, 100, 230 y 500 μM .
- ♦ Ro 5-4864, benzodiazepina que se liga selectivamente a RPB, en las concentraciones: 4, 20 y 40 μM .

En una serie de experimentos se evaluaron los efectos del solvente de benzodiazepinas, utilizando el rango de volúmenes correspondiente al empleado en los experimentos descriptos.

Las concentraciones de benzodiazepinas utilizadas en estos experimentos se encuentran dentro del rango de concentraciones que provocaron distintos efectos en otros órganos aislados (173, 180, 182, 256).

4.3.2. Estudios realizados en presencia de distintos vasoconstrictores

4.3.2.1. Consideraciones generales

Como se ha discutido en la sección 4.1.2., el riñón aislado y perfundido se caracteriza por un importante estado de vasodilatación,

respecto al riñón intacto. Estas condiciones experimentales resultan adecuadas para poner en evidencia las propiedades vasoconstrictoras de diversos agentes. Sin embargo, las respuestas a vasodilatadores se manifiestan mediante la inhibición de la contracción del músculo liso vascular inducida por vasoconstrictores, tales como NA o altas concentraciones de K^+ (257). Por este motivo, para profundizar el estudio de las respuestas vasculares a las drogas que son objeto de este trabajo, se evaluaron los efectos de las mismas sobre la vasculatura renal previamente contraída.

En este trabajo, la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con riñones pretratados con NA. Las respuestas a diazepam fueron evaluadas tanto en presencia de NA como de altas concentraciones de K^+ .

La contracción del músculo liso vascular, provocada por altas concentraciones de K^+ , resulta del aumento del influjo de calcio mediado por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje. La NA es un agonista adrenérgico. En el riñón de rata, la vasoconstricción adrenérgica está mediada exclusivamente por el adreno-receptor α_1 , principalmente el subtipo α_{1A} (258). Blue y col. (259) reportaron que este receptor α_{1A} se encuentra acoplado a canales de calcio sensibles a dihidropiridina, un bloqueador de canales de calcio sensibles a voltaje tipo L (260). La contracción del músculo liso vascular se debe principalmente al aumento en las concentraciones de calcio citosólico, seguido por el aumento en la fosforilación de la cadena liviana de miosina. Sin embargo, la NA también es capaz de aumentar la sensibilidad al calcio de los elementos contráctiles. En contraste, las altas concentraciones de K^+ sólo pueden activar el aumento de la fosforilación de la cadena liviana de miosina dependiente de calcio, sin modificar la sensibilidad al calcio de este proceso (261). Tanto la NA, como las altas concentraciones de K^+ inducen una contracción sostenida en el músculo liso vascular (262).

4.3.2.2. Diseño experimental

En estos estudios, se perfundieron los riñones en condiciones basales durante 40 min. Desde este momento, y hasta finalizar el experimento, el flujo de perfusión se mantuvo constante. Luego del período basal, la perfusión se continuó en presencia del vasoconstrictor seleccionado hasta el final del experimento. La estabilidad de la presión de perfusión se reestableció dentro de los 5-7 min posteriores al agregado del vasoconstrictor. Transcurrido un período de 15 min de perfusión en presencia del vasoconstrictor, se evaluaron los efectos sobre la presión de perfusión de concentraciones crecientes del agente en estudio. Estas concentraciones se lograron mediante el agregado de cantidades acumulativas del agente al medio de perfusión, cada 5 min. Este tiempo resultó suficiente para que la presión de perfusión, alcanzada con cada concentración, logre un estado estable. El máximo tiempo de evaluación de efectos relajadores, en estos experimentos, fue de ocho períodos (40 min).

4.3.2.3. Estudios de la respuesta vascular a agonistas GABAérgicos y benzodiazepinas en riñones pretratados con noradrenalina

4.3.2.3.1. Curva concentración-respuesta para noradrenalina

En estos experimentos, luego del período basal de 40 min, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de NA (0.1-10 μ M) sobre la presión de perfusión a flujo consante. Estas concentraciones se lograron por el agregado, al medio de perfusión, de cantidades acumulativas de NA a intervalos que permitieron la estabilización de la respuesta inducida por la concentración anterior (5-7 min).

La concentración de trabajo seleccionada fue de 1 μM , que provocó un 70-85% de la respuesta contráctil máxima. Esta situación experimental resultó adecuada para el estudio de los efectos de vasodilatadores sobre las respuestas contráctiles a diversos agentes (118, 263, 264). Otros autores utilizaron esta concentración de NA, con propósitos similares a los de este trabajo, en el modelo de riñón aislado (265) y en arterias aisladas (266, 267).

4.3.2.3.2. Estabilidad de la respuesta contráctil a noradrenalina durante el tiempo experimental

Se realizó una serie de experimentos para comprobar la estabilidad de la presión de perfusión lograda con NA durante el tiempo en que se evaluaron los efectos de las drogas en estudio.

Según el diseño experimental descrito en la sección 4.3.2.2., luego del período basal, se perfundieron las preparaciones durante 15 min en presencia de NA, agregada al medio de perfusión para alcanzar una concentración 1 μM . La perfusión se continuó en estas condiciones durante 40 min adicionales, correspondientes al máximo tiempo de estudio de relajación. Se logró una adecuada estabilidad de la presión de perfusión durante el tiempo experimental mediante el agregado, al medio de perfusión, de una solución de NA 0.2 mM con una bomba de infusión continua (Harvard, USA), a una velocidad de 2 ml/h. Estos ajustes experimentales se realizaron en forma empírica.

4.3.2.3.3. Estudios de la respuesta vascular a agonistas GABAérgicos en riñones pretratados con noradrenalina

Siguiendo el esquema experimental descrito en la sección 4.3.2.2., se evaluaron las potenciales respuestas relajadoras de la vasculatura renal a los siguientes agonistas GABAérgicos:

- ♦ GABA, en las concentraciones: 0.05, 0.5, 5, 50, 500 y 1000 μM .

- ♦ Muscimol, en las concentraciones: 0.1, 1, 10, 25, 50 y 75 μM .

4.3.2.3.4. *Estudios de la respuesta vascular a benzodiazepinas en riñones pretratados con noradrenalina*

Según el diseño experimental descrito en la sección 4.3.2.2., se estudiaron las propiedades vasorrelajadoras de las siguientes benzodiazepinas:

- ♦ Diazepam, en las concentraciones: 0.5, 2, 10, 25, 54, 230 y 580 μM . En otro grupo de riñones se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam, también alcanzadas de manera acumulativa en el medio de perfusión, siguiendo el esquema: 2, 54, 230 y 580 μM .
- ♦ Clonazepam, en las concentraciones: 2, 25, 54, 100, 230 y 500 μM .
- ♦ Ro 5-4864, en las concentraciones: 5, 25, 50, 100 y 150 μM .
- ♦ Flumazenil, en las concentraciones: 0.2, 2, 10, 25, 50, 200 y 500 μM .

En una serie de experimentos se evaluaron los efectos del solvente de benzodiazepinas, utilizando el rango de volúmenes correspondiente al empleado en los experimentos descritos.

4.3.2.3.5. *Estudios de la respuesta vascular a diazepam y clonazepam en presencia de flumazenil*

Estos experimentos se llevaron a cabo para testear la posible influencia de la benzodiazepina antagonista RCB, flumazenil, sobre los efectos vasculares producidos por benzodiazepinas clásicas. Con este objetivo, se evaluaron las respuestas a diazepam y clonazepam en presencia de flumazenil.

En estos estudios se siguió el diseño experimental descrito en la sección 4.3.2.2.. Flumazenil fue agregado al medio de perfusión, para alcanzar una concentración 10 μM , 10 min antes del agregado de NA. Esta

concentración de flumazenil fue utilizada por otros autores (178) con propósitos similares a los de estos estudios.

Las concentraciones de clonazepam ensayadas fueron similares a las descritas en el ítem anterior. En el caso de diazepam, se adicionó un último período en presencia de una concentración 1200 μM de esta droga.

4.3.2.3.6. Estudios de la participación del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) en los efectos de diazepam sobre la vasculatura renal

El efecto vasodilatador de distintos compuestos se debe a un aumento en los niveles de GMPc (257, 268, 269). El incremento de GMPc activa la protein cinasa dependiente de GMPc y se promueve la fosforilación de distintas proteínas, que resulta en la inhibición de la maquinaria contráctil (257). Se ha descrito que el azul de metileno inhibe los efectos de este tipo de agentes, ya que inhibe la actividad de la guanilato ciclasa soluble y la consecuente formación de GMPc (257, 270).

Con el objetivo de evaluar la posible participación de GMPc en la vasodilatación renal producida por diazepam, se evaluaron los efectos de diazepam: 2, 54 y 230 μM , en presencia de azul de metileno. Estos experimentos se realizaron según el diseño descrito en el ítem 4.3.2.3.4.. El azul de metileno fue agregado al medio de perfusión, para alcanzar una concentración 10 μM , 20 min previo a la administración de NA. Este tiempo de pretratamiento y esta concentración de azul de metileno fueron utilizadas por otros autores (264), con propósitos similares a los de este estudio, en el modelo de riñón aislado y perfundido.

4.3.2.3.7. Estudios de la participación del óxido nítrico en los efectos de diazepam sobre la vasculatura renal

El NO es un compuesto endógeno capaz de modular la actividad contráctil de las células del músculo liso. Esta acción se desarrolla por

estimulación de la guanilato ciclasa soluble (208, 270). Además de su participación en distintos mecanismos homeostáticos (218), incluyendo la regulación de la hemodinamia renal (212, 215, 271), se ha demostrado la mediación del NO en las acciones vasodilatadoras de distintos fármacos y agentes endógenos (270, 272). El propósito de los experimentos que se describen a continuación fue investigar la posible participación del NO en la relajación de la vasculatura renal inducida por la benzodiazepina diazepam.

En estos estudios se evaluaron los efectos de diazepam: 2, 54 y 230 μM , según el diseño descrito en el ítem 4.3.2.3.4., en presencia de N^{G} -nitro-L-arginina (L-NNA). La L-NNA es un inhibidor de la síntesis de NO (208). Se ha demostrado que este compuesto es capaz de inhibir la síntesis basal de NO en riñón de perro (213). En estos experimentos, la L-NNA fue adicionada al medio de perfusión, para lograr una concentración 30 μM , 20 min previo al agregado de NA. Esta concentración de L-NNA se encuentra dentro del rango de concentraciones consideradas efectivas, por otros autores, en la inhibición de la síntesis de NO en preparados de riñón (215, 217) y aorta (273) aislados de rata y corazón (274) aislado de conejo. El tiempo de pretratamiento con L-NNA en el presente estudio fue similar al informado por los mismos autores.

4.3.2.4. Estudios de la respuesta vascular a diazepam en riñones pretratados con KCl

Para lograr la despolarización de la membrana celular del músculo liso, pueden utilizarse dos tipos de soluciones conteniendo altas concentraciones de K^+ . Las soluciones hiperosmóticas, con el agregado de KCl a una solución fisiológica normal, inducen pérdida de volumen celular, inhibición de las contracciones y atenuación de los efectos de los bloqueadores de canales de calcio. Las soluciones isoosmóticas, con reemplazo de NaCl por KCl en la solución fisiológica, inducen aumento de

volumen celular, deficiencia de ATP y modificación de la relajación muscular. Se ha reportado que las soluciones isoosmóticas, conteniendo concentraciones de KCl de hasta 60 mM, inducen una contracción sostenida en aorta aislada de conejo, sin suscitar los inconvenientes descritos anteriormente (257).

En estos estudios de la respuesta vascular a diazepam, los riñones fueron pretratados con KCl 40 mM. Luego del período basal, según se describió en la sección 4.3.2.2., se continuó la perfusión con solución Ringer-Krebs, conteniendo KCl 40 mM en reemplazo equimolar de NaCl. Esta concentración de KCl fue utilizada por otros autores en estudios de las propiedades vasorrelajadoras de benzodiazepinas sobre distintos vasos aislados (118, 178). Las concentraciones de diazepam ensayadas fueron: 2, 54, 230 y 580 μM .

En una serie de experimentos, se comprobó la estabilidad de la presión de perfusión lograda con KCl 40 mM durante el período de estudio de relajación.

4.4. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL

4.4.1. Filtrado glomerular

La velocidad de filtración glomerular se evaluó mediante el clearance de creatinina. En algunos experimentos, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con ambos marcadores, también se estimó el clearance de inulina. En ambos casos, los clearance se calcularon según se describió en el ítem 3.2.1.1..

4.4.2. Parámetros tubulares

Las excreciones fraccionales de agua (EF_{H_2O}), sodio (EF_{Na}) y glucosa (EF_{Glu}) se calcularon según se ha descrito en el ítem 3.2.2..

4.4.3. Respuestas vasculares

Los efectos de los agentes estudiados sobre el tono de la vasculatura renal fueron evaluados mediante el análisis de los cambios de la presión de perfusión, mientras el flujo de perfusión se mantuvo constante. En estas condiciones, los cambios en la presión de perfusión reflejan variaciones en la resistencia vascular renal. Este método de evaluación de las respuestas vasculares del riñón aislado y perfundido fue utilizado por otros autores (244-246, 275).

En los experimentos destinados a estudiar la capacidad vasorrelajadora de distintas drogas, en riñones pretratados con NA o altas concentraciones de KCl, se consideró 100 % de relajación a la inhibición completa de la respuesta vasoconstrictora. En estos estudios se calculó la concentración necesaria del agente ensayado para lograr una inhibición del 35 % de la respuesta vasoconstrictora, CE_{35} . Se seleccionó este porcentaje de inhibición, ya que se encontró incluido en el rango comprendido entre el 20 y el 80 % del efecto máximo de todas las drogas ensayadas. Las CE_{35} fueron calculadas a partir de la curva dosis-respuesta gradual mediante el programa Pharmacologic Calculation System - Version 4.0.

5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1. DETERMINACIÓN DE INULINA

La inulina fue determinada por el método de Roe (276). La fructosa, producto de la hidrólisis de inulina en medio ácido y caliente, reacciona con resorcinol dando un compuesto coloreado que se determina por lectura espectrofotométrica a 490 nm.

5.2. DETERMINACIÓN DE CREATININA

La creatinina se determinó utilizando un equipo comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina), fundamentado en el método de Jaffé. La creatinina reacciona con ácido pícrico en medio alcalino dando un complejo coloreado que se cuantifica mediante lectura espectrofotométrica a 510 nm.

5.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO P-AMINOHIPÚRICO

El PAH se dosó mediante el método de Brun modificado por Waugh y Beall (277). El PAH, en solución etanólica ácida, reacciona con el p-dimetilamino benzaldehído generando un compuesto coloreado detectable a 450 nm.

5.4. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La glucosa se determinó con un equipo comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y agua oxigenada. El agua oxigenada en presencia de peroxidasa produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-

aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno con absorbancia máxima a 505 nm.

5.5. OTRAS TÉCNICAS

Las concentraciones de electrolitos se determinaron por fotometría de llama (Wayers 2000).

Las osmolalidades de plasma y orina se determinaron utilizando un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5100c, USA).

El volumen de orina se determinó por gravimetría.

6. DROGAS Y REACTIVOS

6.1. PROCEDENCIA

Ro 5-4864 se obtuvo de Hoffman-La Roche (Basel, Suiza), y clonazepam y flunitrazepam, de Productos Roche S.A. (Buenos Aires, Argentina). El diazepam provino de Productos Roche S.A. y de Laboratorios Northia (Argentina). No se observaron diferencias en las respuestas renales entre los grupos tratados con diazepam proveniente de una u otra fuente; por lo tanto estos resultados fueron incluidos en el mismo grupo experimental.

GABA, muscimol, baclofen, yoduro de N-metil bicuculina, clorhidrato de noradrenalina y sulfato de atropina fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St. Louis Mo, USA). Las demás drogas y reactivos utilizados en este trabajo provinieron de la misma fuente, o fueron de la mejor calidad disponible en el mercado.

6.2. DISOLUCIÓN

Todas las drogas fueron disueltas inmediatamente antes de ser utilizadas.

En los experimentos *in vivo*, la disolución de diazepam (10 mg/ml) se comenzó con alcohol etílico y se continuó con el agregado de propilenglicol (alcohol 1: propilenglicol 4), con intervalos de agitación y reposo hasta disolución completa. Esta solución fue diluida con el mismo vehículo, según fue necesario para cada dosis, de manera de administrar un volumen constante de 100 μ l/100 g de peso corporal.

En los experimentos de riñón aislado, el baclofen (4 mg/ml) se preparó en agua bidestilada llevada a pH 7.6 con OHNa, y el muscimol (0.5 mg/ml), en agua bidestilada con el agregado de una alícuota de HCl 0.01 M. Las benzodiazepinas diazepam (15 mg/ml), clonazepam (7 mg/ml, con el agregado de una gota de OHNa 0.1 N), Ro 5-4864 (5 mg/ml) y flumazenil (10 mg/ml), se disolvieron en alcohol etílico. Las drogas restantes se disolvieron en agua bidestilada o solución Ringer-Krebs. En estos experimentos, se comprobó que el agregado de las soluciones de drogas no modificó el pH final del medio de perfusión.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos los valores presentados corresponden a la media \pm el error estándar del grupo experimental.

7.1. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL ANIMAL INTACTO

En estos estudios los datos fueron comparados mediante el test *t*-Student, o mediante un ANOVA y las técnicas de contrastes múltiples de Newman Keuls, según resultó apropiado.

7.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS CON EL MODELO DE RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

Los datos fueron analizados mediante el test *t*-Student, o mediante un ANOVA y las técnicas de contrastes múltiples de Tukey, según resultó apropiado.

Capítulo III

FUNCIÓN RENAL *IN VIVO* Y EN ÓRGANO AISLADO

En este capítulo se discutirá la viabilidad, según las características funcionales, de las preparaciones logradas en este laboratorio para el estudio de los efectos renales de las drogas que son objeto de este trabajo.

1. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL EN EL ANIMAL INTACTO

Estos estudios se llevaron a cabo para evaluar la función renal *in vivo*, mediante técnicas convencionales de clearance en ratas sometidas a infusión continua con manitol 5% a una velocidad de 5 ml/h, como se describió en el Capítulo II, 3.1.2.. Luego de una hora de infusión se recolectó orina durante dos períodos de clearance de 20 min cada uno.

En una serie de experimentos se evaluaron los efectos de la infusión sobre la composición plasmática de los animales (Tabla III-1). La osmolalidad plasmática no se vió alterada por la infusión, mientras que el hematocrito y las concentraciones plasmáticas de sodio y potasio sufrieron una disminución estadísticamente significativa, indicando que la infusión provocó una expansión isoosmótica del volumen plasmático. El grado de expansión no resultó lo suficientemente importante como para inducir cambios en la presión arterial de los animales.

Tabla III-1: Parámetros plasmáticos y presión arterial antes y después de una hora de infusión

	Basal		Infusión
Presión arterial (mmHg)	133 ± 5		134 ± 4
[Na] _p (meq/l)	144.8 ± 0.6	*	142.0 ± 0.4
[K] _p (meq/l)	3.9 ± 0.2	**	3.7 ± 0.2
P _{osm} (mosm/Kg)	299 ± 4		301 ± 3
Hematocrito (%)	44.0 ± 1.1	**	39.8 ± 0.6

En cada rata se determinaron los parámetros plasmáticos y se midió la presión arterial antes (Basal) y después de una hora de infusión (Infusión). Las medias se compararon por *t*-Test para datos apareados.

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4-5 observaciones.

[Na]_p= concentración plasmática de sodio; [K]_p= concentración plasmática de potasio;

P_{osm}= osmolalidad plasmática.

* p < 0.05 comparado con el Basal.

** p < 0.01 comparado con el Basal.

En la Tabla III-2 se presentan los parámetros de función renal evaluados mediante técnicas de clearance durante infusión continua. El valor de VFG se encuentra dentro del rango de valores informados por otros autores (278-280) que evaluaron la función renal en ratas intactas. La fracción de filtración observada en estos experimentos es la descrita en la bibliografía (281). Estos animales presentan una diuresis superior a la descrita para animales normohidratados, debido a los efectos de las condiciones de infusión. La capacidad de concentrar la orina, reflejada por la relación U_{osm}/P_{osm} , fue similar a la descrita en la bibliografía para ratas sometidas a diuresis por manitol (282). La diferencia entre clearance osmolar y volumen minuto de orina (T^cH_2O) indicó que, en estas condiciones

experimentales, los animales tienen capacidad de reabsorber agua libre de solutos.

Tabla III-2: Parámetros de función renal en ratas intactas sometidas a técnicas de clearance

Clearance de PAH (ml/min . 100g)	3.42 ± 0.36
Velocidad de filtración glomerular (ml/min . 100g)	0.66 ± 0.16
Fracción de filtración	0.22 ± 0.03
Volumen minuto de orina (ml/min . 100g)	0.018 ± 0.002
Excreción fraccional de agua (%)	3.01 ± 0.29
Excreción fraccional de sodio (%)	0.57 ± 0.13
Excreción fraccional de potasio (%)	11.76 ± 1.24
Excreción fraccional de glucosa (%)	0.20 ± 0.009
U_{osm} / P_{osm}	1.93 ± 0.09
Clearance osmolar (ml/min . 100g)	0.042 ± 0.004
Reabsorción de agua libre (ml/min . 100g)	0.028 ± 0.002

Luego de una hora de infusión, se recolectó orina durante dos períodos de clearance. Para cada parámetro, se promediaron los valores obtenidos en ambos períodos.

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4-6 observaciones.

De la evaluación de la función renal en estos experimentos controles se concluyó que la preparación de los animales y las técnicas experimentales aplicadas resultan adecuadas para realizar los estudios *in vivo* propuestos en

este trabajo, ya que los valores de los parámetros funcionales concuerdan con los informados en la bibliografía.

2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

2.1. CONDICIONES BASALES

El modelo de riñón aislado y perfundido brinda la posibilidad de evaluar la función del órgano excluyendo las influencias extrarrenales. Para estudiar la viabilidad y estabilidad de este preparado, un grupo de riñones fue perfundido con solución Ringer-Krebs, como se describió en el Capítulo II, 4.3.1.. Luego de un período de 30-35 min de equilibración, se estudiaron ocho períodos consecutivos de clearance de 5 min cada uno.

En la Tabla III-3 se presenta, para cada parámetro funcional evaluado, el valor promedio de los dos primeros períodos de clearance.

Los valores encontrados para los parámetros funcionales evaluados se encuentran dentro del rango de valores informados por otros autores (283-285). En la Tabla III-3 se reflejan las características funcionales descritas anteriormente para el riñón aislado y perfundido (Capítulo II, 4.1.2., 4.1.3.). Se puede observar un alto flujo de perfusión, asociado a una VFG disminuída respecto a los valores encontrados en el animal intacto. El valor de excreción fraccional de glucosa, comparado con el referente de la bibliografía (243), indica un adecuado mantenimiento de estos procesos de transporte en el túbulo proximal. La elevada excreción fraccional de agua y sodio, en comparación con la excreción fraccional de glucosa, probablemente refleja el daño selectivo de los nefrones distales durante la perfusión, descrito por Alcorn y col. (248). Ante la concordancia entre los resultados

Tabla III-3: Parámetros funcionales en el riñón aislado y perfundido

Flujo de perfusión (ml/min)	24 ± 1
Presión de perfusión (mmHg)	127 ± 4
Velocidad de filtración glomerular (ml/min . g)	0.29 ± 0.05
Excreción fraccional de agua (%)	22.7 ± 3.6
Excreción fraccional de sodio (%)	20.8 ± 3.1
Excreción fraccional de glucosa (%)	6.9 ± 1.5

Los riñones fueron perfundidos con solución Ringer-Krebs. Luego de 30-35 min de equilibración se estudió la función renal durante ocho periodos consecutivos de clearance. Para cada parámetro se calculó el valor promedio de los dos primeros periodos. Cada valor representa el promedio ± error estándar de 7 experimentos.

obtenidos de estos experimentos controles y los informes de la bibliografía, se concluyó que la viabilidad de este preparado resulta adecuada para el estudio de los efectos directos de distintos agentes sobre la función renal.

En los distintos grupos experimentales que se describirán en este trabajo, los valores promediados de los dos primeros periodos, para los parámetros estudiados, no difirieron de los presentados en la Tabla III-3.

Para analizar la estabilidad del preparado se calculó para cada parámetro, durante el tiempo de perfusión, el porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los dos primeros periodos. En la Figura III-1 se puede observar que la función del riñón aislado y perfundido no sufrió modificaciones significativas durante el tiempo experimental.

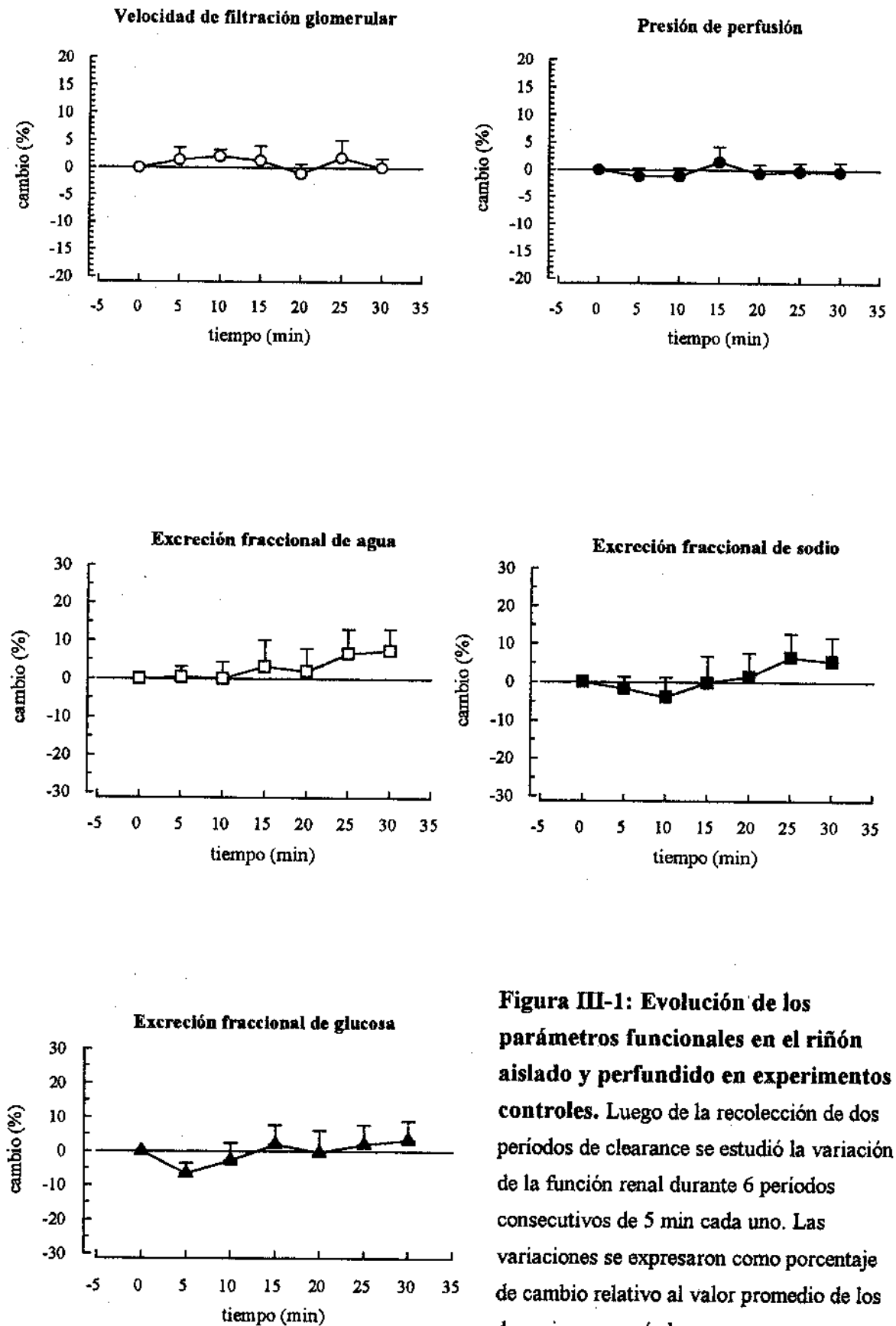


Figura III-1: Evolución de los parámetros funcionales en el riñón aislado y perfundido en experimentos controles. Luego de la recolección de dos períodos de clearance se estudió la variación de la función renal durante 6 períodos consecutivos de 5 min cada uno. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los dos primeros períodos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 7 experimentos.

En todos los experimentos realizados en este trabajo, luego de la recolección de los dos primeros períodos de clearance, se agregó al medio de perfusión la droga en estudio, cuyos efectos sobre los parámetros funcionales fueron evaluados a partir del porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los dos primeros períodos. Dada la estabilidad de la función renal en los experimentos controles descritos en este capítulo, se puede concluir que las variaciones en los parámetros funcionales que se informan en los capítulos siguientes son consecuencia de los efectos de las drogas ensayadas, y no del tiempo de perfusión.

2.2. RESPUESTA DE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO A DISTINTOS VASOCONSTRICTORES

Para evaluar las potenciales propiedades vasodilatadoras de las drogas ensayadas en este trabajo, se estudiaron sus efectos sobre la vasculatura renal previamente contraída con NA o altas concentraciones de KCl. En los experimentos que se describen a continuación se evaluaron las respuestas de la vasculatura del riñón aislado y perfundido a dichos vasoconstrictores.

2.2.1. Respuesta contráctil a noradrenalina

En un grupo de riñones ($n=3$) se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes de NA sobre la presión de perfusión del riñón aislado perfundido a flujo constante, como fue descrito en el Capítulo II, 4.3.2.3.1.. Luego de un período de estabilización de 40 min, se agregaron cantidades acumulativas de NA al medio de perfusión para lograr las concentraciones deseadas (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μM). Estos agregados se realizaron a intervalos que permitieron la estabilización de la respuesta

inducida por la concentración anterior (5-7 min). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura III-2.

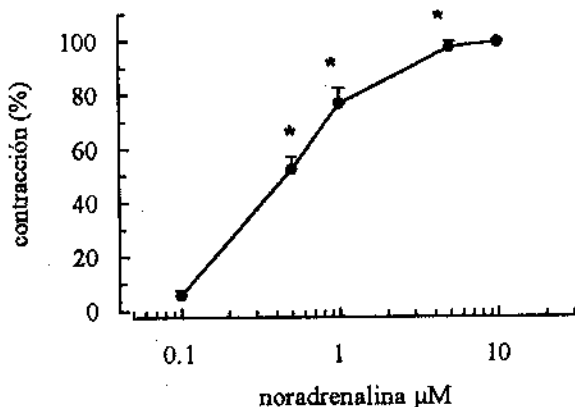


Figura III-2: Respuesta de la vasculatura del riñón aislado a noradrenalina. Luego de 40 min de estabilización, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de NA sobre la presión de perfusión a flujo constante. En cada experimento, los resultados se expresaron como porcentaje de la máxima contracción alcanzada con NA. La presión de

perfusión basal fue 126 ± 4 mmHg, y la alcanzada con NA $10 \mu\text{M}$ fue 288 ± 2 mmHg.

* $p < 0.05$ comparado con la concentración anterior.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 3 experimentos.

La concentración de trabajo de NA seleccionada fue de $1 \mu\text{M}$, con la que se alcanzó una presión de perfusión de 237 ± 16 mmHg, provocando un 77 ± 6 % de la respuesta contráctil máxima. Esta situación experimental resultó adecuada para el estudio de los efectos de vasodilatadores sobre las respuestas contráctiles a diversos agentes (118, 263, 264).

La estabilidad de la respuesta contráctil a NA durante el tiempo experimental se evaluó según fue descrito en el Capítulo II, 4.3.2.3.2.. En un grupo de riñones ($n=4$), luego de 40 min de perfusión en condiciones basales, se agregó NA al medio de perfusión para alcanzar una concentración $1 \mu\text{M}$, y se permitió un tiempo de estabilización de 15 min. Se continuó la perfusión en presencia de NA durante 40 min, correspondiendo este tiempo a la máxima duración de los estudios de relajación con las drogas ensayadas. La estabilidad de la presión de perfusión durante este tiempo se logró mediante el agregado al medio de perfusión, por infusión continua, de una solución de NA 0.2 mM a una velocidad de 2 ml/h . En la Figura III-3 se

observa la estabilidad de los valores de presión de perfusión en presencia de NA durante el tiempo experimental.

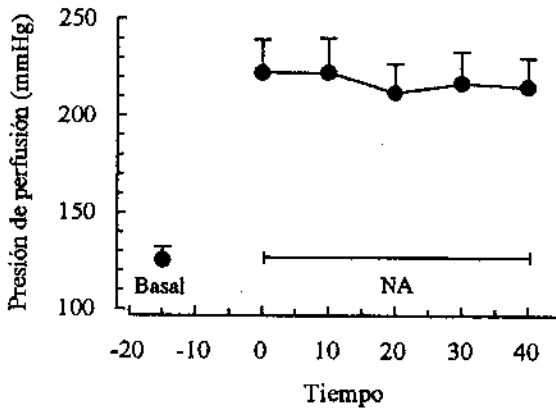


Figura III-3: Estabilidad de la respuesta contráctil a noradrenalina. Luego del período basal, se comenzó la perfusión con NA 1 μ M. Se permitieron 15 min de estabilización, y se evaluó la estabilidad de la presión de perfusión durante 40 min. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos.

La presión de perfusión alcanzada con NA 1 μ M en estos experimentos (222 ± 17 mmHg) no difirió significativamente de los valores observados (237 ± 16 mmHg) con esta concentración de NA en los estudios de concentración-respuesta descritos anteriormente.

2.2.2. Respuesta contráctil a altas concentraciones de KCl

En un grupo de riñones ($n=3$), luego de un período de 40 min de perfusión en condiciones basales, se comenzó a perfundir solución Ringer-Krebs conteniendo KCl 40 mM, en reemplazo equimolar de NaCl, como fue descrito en Capítulo II, 4.3.2.4.. Se permitió un tiempo de estabilización de 15 min, y luego se evaluó la presión de perfusión durante un período de 30 min, correspondiente al tiempo de estudios de relajación. En estos experimentos la presión de perfusión basal fue 124 ± 8 mmHg, y la alcanzada con KCl 40 mM fue 233 ± 14 mmHg. En la Figura III-4 se observa que la presión de perfusión en presencia de KCl 40 mM se mantuvo estable durante el tiempo de perfusión.

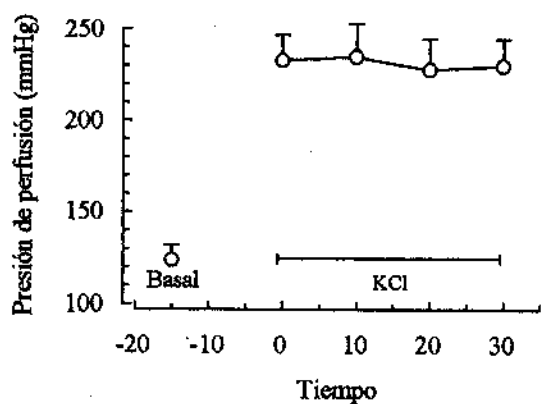


Figura III-4: Estabilidad de la respuesta contráctil a KCl. Luego del período basal, se comenzó la perfusión con KCl 40 mM. Se permitieron 15 min de estabilización, y se evaluó la estabilidad de la presión de perfusión durante 30 min. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 3 experimentos.

De los resultados presentados en las Figuras III-3 y III-4, puede concluirse que la relajación de la vasculatura renal pretratada con NA o KCl que se describe en los siguientes capítulos, ante el agregado de las drogas estudiadas, es consecuencia de las acciones de dichas drogas, y no del tiempo de perfusión.

Capítulo IV

EFFECTOS DE AGONISTAS GABAÉRGICOS

Los efectos de distintos agonistas GABAérgicos sobre la función renal fueron evaluados utilizando el modelo de riñón aislado y perfundido, que permite obviar la influencia de efectos extrarrenales.

Los estudios realizados en condiciones basales se llevaron a cabo según fue descrito en el Capítulo II, 4.3.1.2.. Luego del tiempo de equilibración y de dos períodos controles de clearance, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de la droga en estudio. Los parámetros analizados en estos experimentos fueron: presión de perfusión, velocidad de filtración glomerular y excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa. El promedio de los valores obtenidos en los dos primeros períodos, para cada parámetro estudiado, fue considerado el valor control para cada preparación. Los efectos de las drogas ensayadas se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor control.

Para algunos agonistas se estudiaron los efectos sobre la vasculatura del riñón perfundido con NA. Este diseño experimental fue descrito en el Capítulo II, 4.3.2.3.3.. Luego de un período basal, se agregó NA al medio de perfusión para alcanzar una concentración 1 μM , y se permitió la estabilización de la presión de perfusión manteniendo el flujo constante. En estas condiciones se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes del agonista sobre la presión de perfusión.

1. EFECTOS DE GABA

En una primera etapa se estudiaron los efectos de GABA exógeno sobre los parámetros funcionales del riñón aislado perfundido en distintas condiciones experimentales.

1.1. EFECTOS DE GABA SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN CONDICIONES BASALES

1.1.1. Tratamientos

En un grupo de riñones (n= 5) se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de GABA, según se describió en el Capítulo II, 4.3.1.2.. Las concentraciones ensayadas fueron: 0.05, 0.5, 5, 50, 500 y 1000 μM .

1.1.2. Resultados

Cuando se analizaron los parámetros hemodinámicos se observó que el tratamiento con GABA provoca un aumento concentración-dependiente de la presión de perfusión renal. Este efecto vasoconstrictor de GABA sobre el riñón aislado no se asoció a cambios estadísticamente significativos en la velocidad de filtración glomerular. Estos resultados se presentan en la Figura IV-1.

La función tubular también se vió alterada por el agregado de GABA al medio de perfusión. En la Figura IV-1 se observa que GABA induce un aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa de manera dependiente de la concentración.

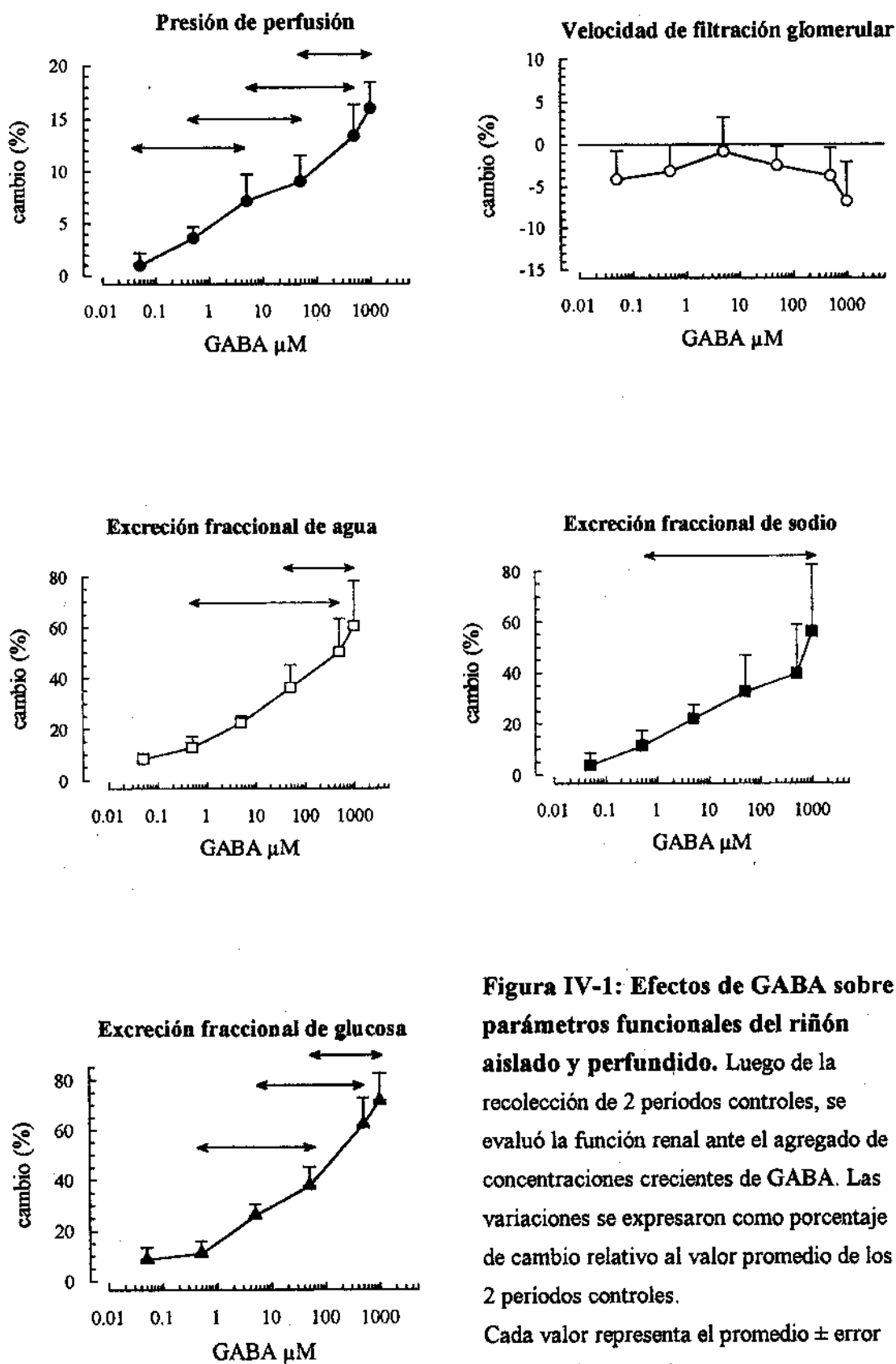


Figura IV-1: Efectos de GABA sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 periodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de GABA. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 5 experimentos.

$\leftrightarrow p < 0.05$ entre las medias señaladas.

1.1.3. Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que GABA, agonista común GABA_A y GABA_B, provoca modificaciones significativas en la función del riñón aislado y perfundido.

Los efectos hemodinámicos de GABA sobre el riñón aislado se caracterizaron por un aumento en la resistencia vascular. En otros lechos se ha observado que GABA modifica el tono vascular, interaccionando directamente con receptores localizados en la vasculatura o influenciando la liberación de intermediarios neuronales (3, 85).

Los resultados obtenidos en el análisis de la función tubular indican una significativa disminución en la capacidad reabsortiva de agua y sodio. Estos efectos podrían ser secundarios al aumento inducido por GABA sobre la presión de perfusión renal. Sin embargo, no pueden descartarse efectos directos sobre estructuras tubulares. El incremento en la excreción fraccional de glucosa señala al túbulo contorneado proximal como blanco probable de las acciones de GABA.

En la bibliografía se describe la existencia de receptores GABA_A (224) y GABA_B (225) y de distintos elementos del sistema GABA (54) en riñón de rata. La información obtenida en el presente estudio, debido a las características del modelo utilizado, indica que los efectos de GABA estarían mediados por acciones directas sobre estructuras renales (por activación de receptores localizados en el tejido blanco o mediante la liberación de intermediarios endógenos). Estas evidencias, tomadas en conjunto, sugieren la posibilidad de que GABA desempeñe un rol en la modulación local de la función renal.

1.2. EFECTOS DE GABA SOBRE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO PERFUNDIDO CON NORADRENALINA

En los experimentos realizados en condiciones basales, en los que los riñones presentan una resistencia vascular disminuída respecto al riñón intacto, se ha demostrado el efecto vasoconstrictor de GABA. En su análisis de las técnicas de perfusión del riñón aislado, Maack (236) describió la capacidad de algunos agentes de contraer la vasculatura del riñón perfundido en condiciones basales, y de contrarrestar el efecto de distintos vasoconstrictores. Para testear la probabilidad de que GABA relaje la vasculatura renal precontraída, se estudiaron sus efectos sobre el riñón aislado perfundido con NA.

1.2.1. Tratamientos

Se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de GABA sobre la presión de perfusión de riñones pretratados con NA 1 μM (n= 3), según fue descrito en Capítulo II, 4.3.2.3.3.. Las concentraciones de GABA utilizadas fueron: 0.05, 0.5, 5, 50, 500 y 1000 μM .

1.2.2. Resultados

En la Tabla IV-1 se observa que el tratamiento con GABA no modifica significativamente la presión de perfusión del riñón aislado perfundido con NA.

Tabla IV-1: Efectos de GABA sobre la presión de perfusión del riñón aislado pretratado con noradrenalina

	Control	NA	GABA (μM) ^a					
			0.05	0.5	5	50	500	1000
Presión de perfusión (mmHg)	133	226	227	228	230	232	228	229
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	7	8	7	4	4	5	5	4

Luego de un período basal, se permitió la estabilización de la presión de perfusión a flujo constante en presencia de NA 1 μM . En estas condiciones se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de GABA sobre la presión de perfusión.

Los valores representan la media \pm error estándar de 3 experimentos.

1.2.3. Discusión

En los experimentos presentados en la sección anterior se demostró la acción constrictora de GABA sobre la vasculatura renal relajada. En el presente estudio se ha observado que la vasculatura renal precontraída no responde a la presencia de GABA. Estos datos indican que la vasoactividad renal de GABA se caracteriza por un aumento en la resistencia vascular que depende del tono basal.

2. EFECTOS DEL AGONISTA GABA_A MUSCIMOL

Para profundizar el estudio de los efectos renales inducidos por GABA, se evaluaron las respuestas mediadas por receptores GABA_A utilizando el agonista selectivo muscimol.

2.1. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN CONDICIONES BASALES

2.1.1. Tratamientos

Estos experimentos se llevaron a cabo según se describió en el Capítulo II, 4.3.1.2.. En un grupo de riñones (condición I, n= 5) se estudiaron los efectos de las siguientes concentraciones de muscimol: 0.1, 1, 25, 50 y 75 μM . En otro grupo experimental (condición II, n= 4), luego del período de equilibración y de los dos períodos controles, se agregó muscimol al medio de perfusión para alcanzar una concentración 75 μM . En estas condiciones se estudiaron tres períodos consecutivos de clearance.

2.1.2. Resultados

En el grupo experimental, en el que se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de muscimol (condición I), se observó un incremento concentración-dependiente en las excreciones fraccionales de agua y sodio. La mínima concentración de muscimol ensayada, 0.1 μM , fue capaz de provocar un aumento significativo en estos parámetros tubulares, respecto de los controles. No se encontraron cambios en la excreción fraccional de glucosa. Las alteraciones observadas en la reabsorción tubular no se asociaron a modificaciones en los parámetros hemodinámicos evaluados. Estos resultados se presentan en la Figura IV-2.

Cuando se agregó muscimol luego de los dos períodos controles al medio de perfusión, para alcanzar una concentración 75 μM (condición II), se observó que los parámetros funcionales evaluados no presentan diferencias significativas entre los tres períodos de clearance analizados en presencia de

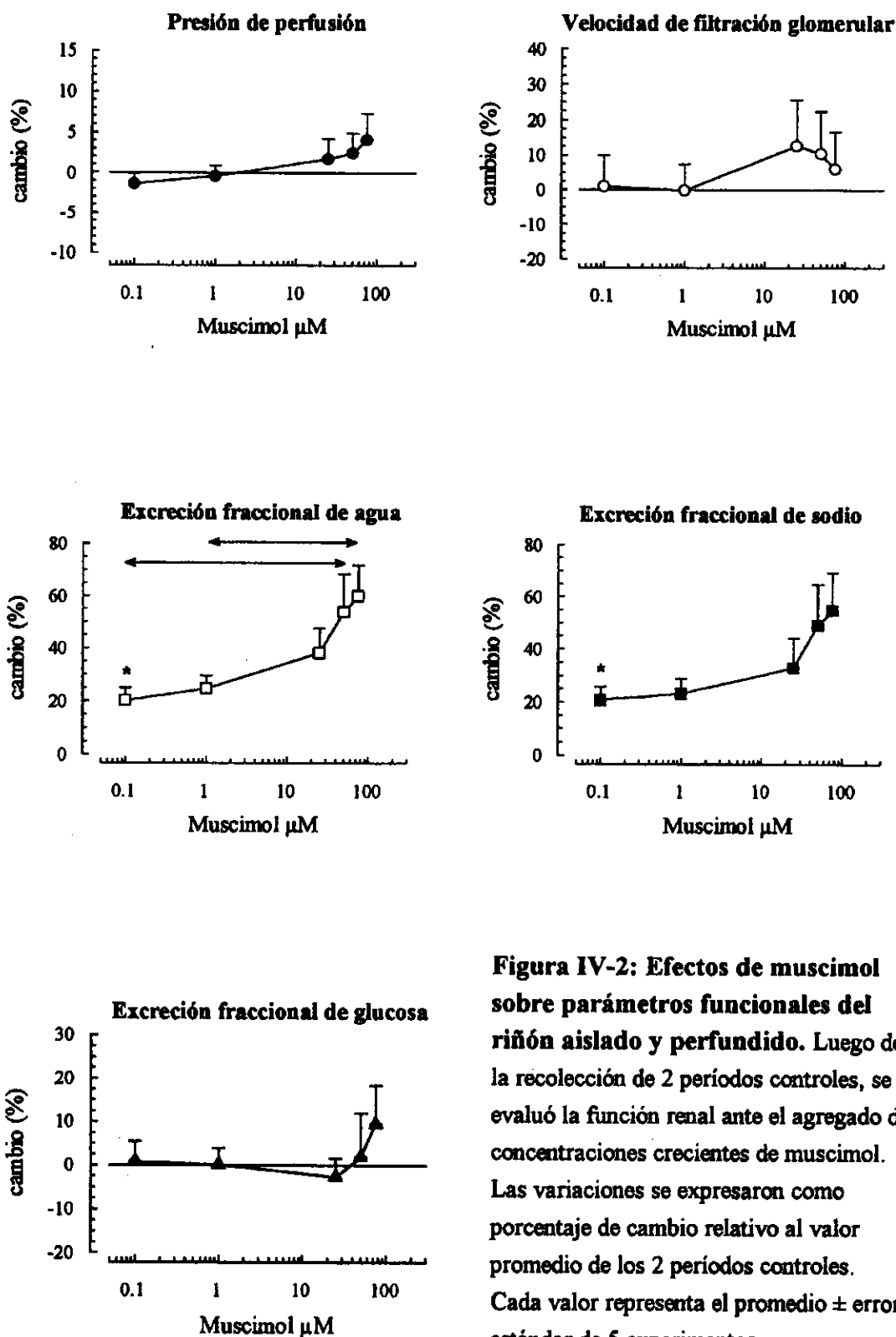


Figura IV-2: Efectos de muscimol sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 períodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de muscimol. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 5 experimentos.

\leftrightarrow $p < 0.05$ entre las medias señaladas.

* $p < 0.05$ comparado con cero.

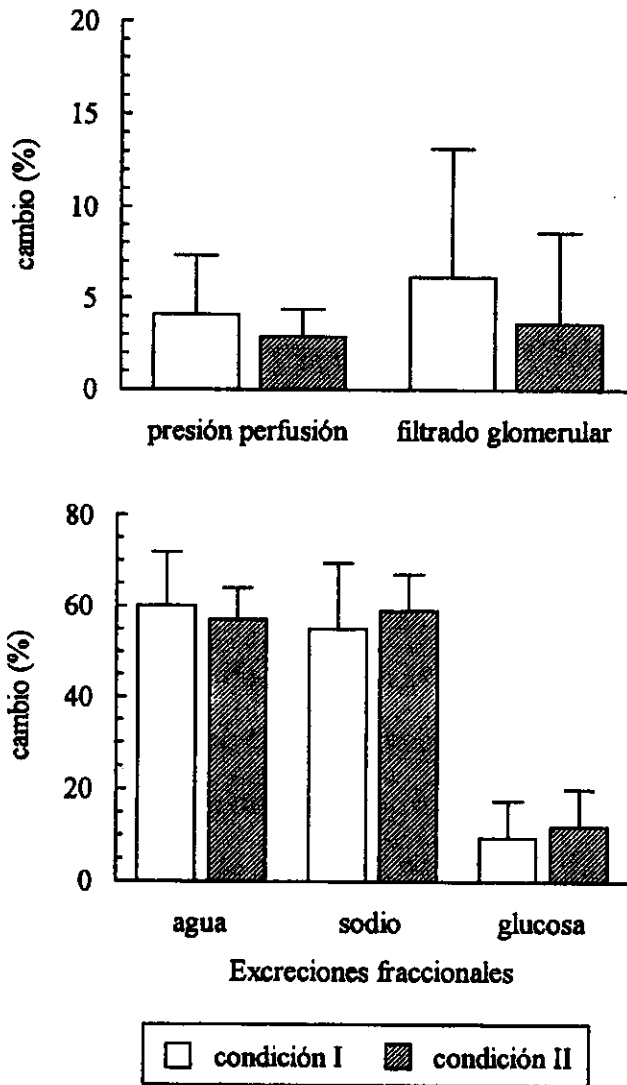


Figura IV-3: Efectos de muscimol 75 μM sobre parámetros funcionales del riñón aislado en distintas condiciones de agregado al medio de perfusión. Luego de dos periodos controles se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de muscimol. Se agregaron cantidades acumulativas de muscimol al medio de perfusión, cada 5 min, para lograr las concentraciones 0.1, 1, 25, 50 y 75 μM (Condición I, n= 5). En otro grupo, luego de dos periodos controles se agregó muscimol al medio de perfusión para lograr una concentración 75 μM y se evaluaron 3 periodos consecutivos de clearance de 5 min cada uno (Condición II, n= 4). En ambos grupos las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles. Para cada parámetro se promediaron los valores de los 3 periodos de clearance estudiados en condición II. Estos datos fueron comparados con los de muscimol 75 μM en condición I. Los valores representan la media \pm error estándar.

esta droga. Para cada parámetro evaluado, se promediaron los valores de los tres períodos de clearance. Estos resultados fueron comparados con los encontrados con muscimol 75 μM en condición I (experimentos concentración-respuesta). En la Figura IV-3 se puede observar que los efectos de muscimol 75 μM sobre la función del riñón aislado no presentan diferencias entre la condición I y la condición II de agregado de la droga al medio de perfusión.

2.1.3. Discusión

Los resultados obtenidos en estos experimentos demuestran que el agonista GABA_A, muscimol, es capaz de inducir cambios en la función tubular del riñón aislado. La magnitud de los efectos observados con las concentraciones ensayadas de muscimol no fue modificada por la exposición previa a la droga, ni por el tiempo que la droga se mantuvo en recirculación (condición I vs. condición II). Estos datos sugieren que el sistema en estudio no sufre desensibilización a esta droga; y que el procesamiento renal de la misma, durante el tiempo experimental, no condicionaría la magnitud de sus efectos.

Los efectos tubulares de muscimol, que fueron caracterizados como diuresis y natriuresis, no serían secundarios a cambios hemodinámicos, en base a los datos de presión de perfusión y filtrado glomerular. Estos resultados indican que es probable que las acciones de muscimol se ejerzan directamente sobre los procesos involucrados en el transporte tubular. Se han observado efectos similares de muscimol sobre el transporte intestinal. En estudios *in vivo* se encontró que la administración intraperitoneal de este agonista GABA_A inhibe la absorción neta de agua (286).

En riñón de rata se ha descrito la existencia de receptores GABA_A localizados en túbulo contorneado de la corteza y en túbulo colector

(224). En base al hallazgo de niveles significativos de GABA y sus enzimas relacionadas en túbulo cortical y de sistemas de transporte para GABA en vesículas de membrana luminal, Erdö y Wolff (54) propusieron la localización de un sistema GABA no neuronal en el epitelio tubular renal. Estas evidencias, asociadas a la información obtenida en el presente estudio sugieren la posibilidad de que GABA, vía receptores GABA_A, podría estar involucrado en los mecanismos de control de transporte epitelial en riñón.

2.2. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN PRESENCIA DE ATROPINA

Estos experimentos se llevaron a cabo para testear la posible participación del sistema colinérgico en los efectos renales mediados por muscimol.

2.2.1. Tratamientos

Los grupos experimentales estudiados fueron descritos en el Capítulo II, 4.3.1.5.. Los riñones se perfundieron con atropina 1 μ M desde el inicio de los experimentos. Transcurrido el período de estabilización, los dos períodos controles y el agregado de muscimol al medio de perfusión para alcanzar una concentración 75 μ M, se evaluó la función renal durante tres períodos consecutivos de clearance (n= 5). Los resultados de este grupo fueron comparados con los del respectivo control en ausencia de atropina (n= 4, datos presentados en el ítem 2.1. de este capítulo: muscimol, condición II).

Un grupo de preparaciones se perfundió con atropina desde el inicio de los experimentos (n= 3) y luego del período de equilibración, se estudiaron cinco períodos consecutivos de clearance.

2.2.2. Resultados

En la Tabla IV-2 se presentan los valores de los parámetros funcionales de los períodos controles del riñón aislado perfundido con atropina.

Tabla IV-2: Parámetros funcionales durante períodos controles del riñón aislado perfundido con atropina y porcentaje de cambio relativo luego del agregado de muscimol al medio de perfusión

	Control ^(a)	Cambio (%) ^(b)
Presión de perfusión (mmHg)	125 ± 2	1.2 ± 0.8
Velocidad de filtración glomerular (ml/min . g)	0.24 ± 0.06	7.7 ± 4.5
Excreción fraccional de agua (%)	22.9 ± 1.8	13.9 ± 6.5
Excreción fraccional de sodio (%)	22.0 ± 1.9	11.1 ± 6.3
Excreción fraccional de glucosa (%)	9.5 ± 2.8	13 ± 6

Los riñones fueron perfundidos con atropina 1 μM desde el inicio de los experimentos con un flujo estabilizado a 22 ± 2 ml/min. Luego del período de equilibración se evaluaron los parámetros funcionales durante dos períodos de clearance, cuyos valores promedios fueron considerados como controles^(a). Inmediatamente después de estos dos primeros períodos, se agregó muscimol al medio de perfusión para alcanzar una concentración 75 μM y se estudiaron 3 períodos consecutivos de clearance. Para cada parámetro, se promediaron los valores de los 3 períodos. Los efectos de muscimol fueron expresados como porcentaje de cambio relativo al valor control^(b).

Los valores representan la media \pm error estándar de 5 experimentos.

Luego de estos primeros períodos controles, se agregó muscimol al medio de perfusión para lograr una concentración 75 μM . Los valores de los parámetros estudiados no presentaron diferencias significativas entre los tres

períodos de clearance analizados luego del agregado de muscimol. Para cada parámetro, se promediaron los valores de los tres períodos. En estos experimentos realizados en presencia de atropina, los cambios porcentuales relativos a los valores de los períodos controles no adquirieron significado estadístico con el agregado de muscimol al medio de perfusión (Tabla IV-2). Estos datos fueron comparados con los obtenidos para muscimol en ausencia de atropina (muscimol, condición II). En la Figura IV-4 se observa que el pretratamiento con atropina previene del aumento en las excreciones fraccionales de agua y sodio inducidas por muscimol.

En las preparaciones controles perfundidas con atropina desde el inicio de los experimentos, los valores correspondientes a los períodos controles no difirieron de los presentados en la Tabla IV-2, y se mantuvieron sin cambios significativos durante los tres períodos de clearance siguientes.

2.2.3. Discusión

En el presente estudio se ha demostrado que atropina resulta efectiva en bloquear la disminución de la reabsorción de agua y sodio inducida por muscimol.

A pesar de que no se han encontrado evidencias de inervación parasimpática a nivel renal, se ha descrito un sistema de captación de colina de alta afinidad y la capacidad de convertir colina en acetilcolina vía colina acetiltransferasa. Dado que estas funciones no son afectadas por la denervación renal, pueden atribuirse a las células epiteliales del túbulo renal (258). Se ha informado la existencia de receptores muscarínicos en células tubulares (258, 287). También se ha demostrado que, en el riñón denervado, acetilcolina provoca un aumento en el volumen de orina, en la excreción fraccional de sodio y en el clearance de agua libre; y estos efectos fueron

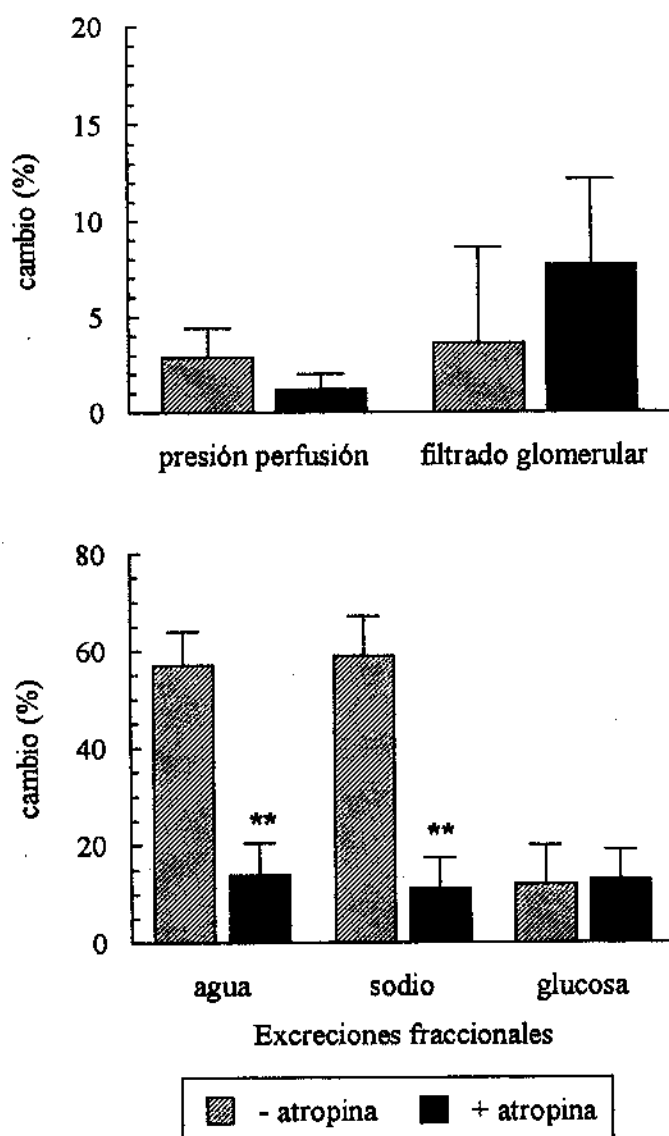


Figura IV-4: Efectos de muscimol sobre parámetros funcionales del riñón aislado perfundido en ausencia y en presencia de atropina. En un grupo experimental, luego de dos periodos controles se agregó muscimol al medio de perfusión para alcanzar una concentración $75 \mu\text{M}$ y se evaluaron los parámetros funcionales durante 3 periodos consecutivos de clearance (- atropina, $n=4$), cuyos valores fueron promediados. Otro grupo de riñones recibió idéntico tratamiento pero en presencia de atropina $1 \mu\text{M}$ desde el inicio de la perfusión (+ atropina, $n=5$). En ambos grupos las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles. Los valores representan la media \pm error estándar.

** $p < 0.01$ comparado con los respectivos valores en ausencia de atropina.

antagonizados por el antagonista muscarínico, atropina (288). Ante estas evidencias, el hallazgo de que atropina bloquea la diuresis y natriuresis inducida por muscimol, sugiere que en los efectos tubulares del agonista GABA_A podría encontrarse involucrado algún mecanismo colinérgico.

En otros órganos periféricos también se han descrito resultados que indican la participación del sistema colinérgico en las respuestas mediadas por receptores GABA_A. En vesícula biliar (3), en músculo liso de colon (49) y en nódulo sinusal (78) se ha encontrado que la estimulación de receptores GABA_A promueve la liberación de acetilcolina. Fernández y col. (71) sugirieron que el aumento en las acciones de acetilcolina inducido por GABA en oviducto de rata podría ser considerado un efecto modulador postsináptico mediado por receptores GABA_A. Se ha descrito que el antagonista GABA_A, bicuculina, es capaz de modificar el transporte de iones en preparaciones de intestino aislado, interaccionando con mecanismos colinérgicos en el plexo mientérico (53). Este hallazgo resulta particularmente interesante en lo que respecta a esta discusión, debido a las características similares de los sistemas de transporte en enterocitos y en células del epitelio tubular renal.

Ante estas evidencias puede proponerse la participación del sistema colinérgico en la modulación, vía receptores GABA_A, de los mecanismos de transporte tubular.

2.3. EFECTOS DE MUSCIMOL SOBRE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN

AISLADO PERFUNDIDO CON NORADRENALINA

En los estudios realizados en condiciones basales no se encontraron efectos sobre la resistencia vascular renal con las concentraciones de muscimol ensayadas. Para testear las potenciales acciones vasorrelajadoras de

muscimol, se evaluaron sus efectos sobre la vasculatura de riñones pretratados con noradrenalina.

2.3.1. Tratamientos

Se analizaron los efectos de concentraciones crecientes de muscimol sobre la presión de perfusión de riñones perfundidos con NA 1 μM ($n=3$), según fue descrito en Capítulo II, 4.3.2.3.3.. Las concentraciones de muscimol ensayadas fueron: 0.1, 1, 10, 25, 50 y 75 μM .

2.3.2. Resultados

El tratamiento con muscimol no provoca cambios estadísticamente significativos en la presión de perfusión del riñón aislado pretratado con NA. Estos resultados se presentan en la Tabla IV-3.

Tabla IV-3: Efectos de muscimol sobre la presión de perfusión del riñón aislado pretratado con noradrenalina

	Control	NA	Muscimol (μM)					
			0.1	1	10	25	50	75
Presión de perfusión (mmHg)	127 \pm 3	232 \pm 18	236 \pm 15	237 \pm 13	237 \pm 12	232 \pm 12	232 \pm 12	235 \pm 14

Luego de un período basal, se permitió la estabilización de la presión de perfusión a flujo constante en presencia de NA 1 μM . En estas condiciones se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de muscimol sobre la presión de perfusión.

Los valores representan la media \pm error estándar de 3 experimentos.

2.3.3. Discusión

En este estudio se ha demostrado que muscimol es incapaz de modificar la resistencia vascular del riñón aislado perfundido con noradrenalina. Cuando se evaluaron los efectos de este agonista GABA_A en experimentos anteriores, realizados con riñones perfundidos en condiciones basales, tampoco se detectó vasoactividad. Estos datos indican que, independientemente del tono basal, la vasculatura del riñón aislado no responde al agregado de muscimol.

3. EFECTOS DEL ANTAGONISTA GABA_A BICUCULINA

En secciones anteriores de este capítulo se ha demostrado que el GABA exógeno y el agonista GABA_A selectivo, muscimol, son capaces de provocar respuestas en el riñón aislado y perfundido de rata. El objetivo del presente estudio fue evaluar la posibilidad de que la activación endógena de receptores GABA_A contribuya a la función basal del riñón.

3.1. TRATAMIENTOS

Estos experimentos se llevaron a cabo como se describió en el Capítulo II, 4.3.1.3.. En un grupo de riñones (n= 5), luego de los dos periodos controles, se adicionó bicuculina al medio de perfusión para lograr una concentración 50 μ M. Se continuó la perfusión en presencia de bicuculina durante 15 min y, seguidamente, se analizaron tres periodos consecutivos de clearance.

3.2. RESULTADOS

Cuando se evaluaron los parámetros funcionales en presencia de bicuculina no se encontraron diferencias significativas entre los tres períodos estudiados. Para cada parámetro, se promediaron los valores de los tres períodos.

En la Figura IV-5 se observa que el tratamiento con bicuculina aumenta significativamente la presión de perfusión y las excreciones fraccionales de agua y sodio.

La velocidad de filtrado glomerular y la excreción fraccional de glucosa (valores absolutos controles: 0.26 ± 0.02 ml/min.g y 10.3 ± 2.2 %, respectivamente) no sufrieron cambios significativos luego de la perfusión con bicuculina.

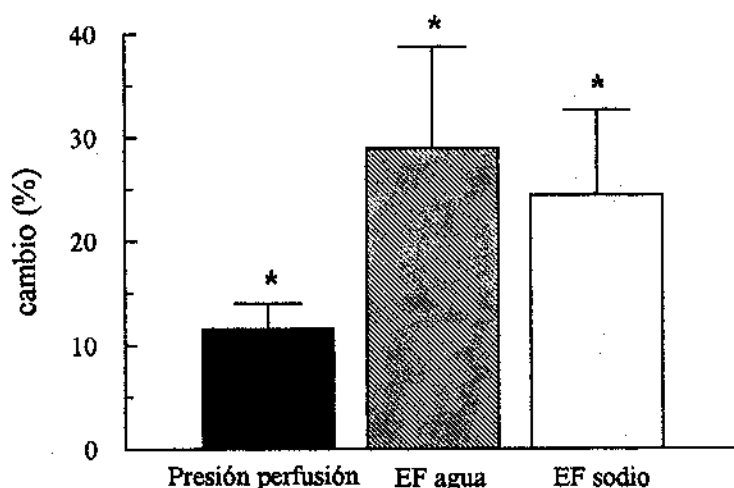


Figura IV-5: Efectos de bicuculina sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de dos períodos controles se agregó bicuculina al medio de perfusión para alcanzar una concentración $50 \mu\text{M}$. Se continuó la perfusión durante 15 min y se evaluaron los parámetros funcionales durante 3 períodos consecutivos de clearance, cuyos valores fueron promediados. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles.

Los valores representan la media \pm error estándar.

* $p < 0.05$ comparado con cero.

3.3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio revelan la capacidad del antagonista GABA_A, bicuculina, de alterar la función del riñón aislado perfundido en condiciones basales. Este hallazgo sugiere la participación del GABA endógeno en la modulación de la función basal de estas preparaciones.

El tratamiento con bicuculina provocó un incremento en la presión de perfusión y en las excreciones fraccionales de agua y sodio. Es probable que la natriuresis observada sea una respuesta a la presión de perfusión aumentada.

El aumento en la resistencia vascular renal encontrado durante la perfusión con bicuculina sugiere una acción vasodilatadora mediada por receptores GABA_A. Sin embargo, en los experimentos dirigidos a evaluar los efectos del agonista GABA_A, muscimol, no se detectaron respuestas vasculares en condiciones basales, ni en presencia de noradrenalina (secciones 2.1. y 2.3. de este Capítulo). Hardcastle y col.(53) observaron respuestas a bicuculina en preparaciones de intestino delgado de rata, aunque GABA no fue capaz de provocar efectos. Como sugirieron estos autores ante tales evidencias, es probable que la incapacidad de demostrar acciones directas de los agonistas sea atribuible a que la presencia de GABA endógeno resultaría en la activación máxima de estos procesos GABAérgicos. En este sentido, se ha demostrado la liberación espontánea de GABA en epitelio tubular de riñón de rata (221).

Mediante técnicas autorradiográficas se ha demostrado que el ³H-muscimol no se une específicamente a elementos vasculares del riñón de rata (224). Por lo tanto, en las respuestas de la vasculatura renal mediadas por la activación endógena de receptores GABA_A propuesta en esta discusión, se encontraría involucrado un mecanismo intermediario. Esta hipótesis resulta congruente, dada la capacidad de acetilcolina de relajar la vasculatura renal

(211, 269), con la participación de mecanismos colinérgicos en efectos inducidos por el estímulo de receptores GABA_A descrita en este capítulo (2.2.). En base a estos datos podría especularse que la inhibición de las acciones de acetilcolina, por el antagonismo GABA_A ejercido por bicuculina, contribuiría a la vasoconstricción observada.

El efecto vasoconstrictor de bicuculina también fue descrito por otros autores que investigaron las respuestas de la microvasculatura cerebral (85), proponiéndose un rol para el GABA endógeno en la regulación del tono vascular. Estas evidencias, asociadas a las del presente estudio, sugieren la participación de mecanismos GABAérgicos en el control tónico local de distintos lechos vasculares.

4. EFECTOS DEL AGONISTA GABA_B BACLOFEN

Este estudio se llevó a cabo para evaluar las respuestas del riñón aislado y perfundido mediadas por el estímulo de receptores GABA_B. Con este propósito se utilizó el agonista selectivo baclofen.

4.1. TRATAMIENTOS

Estos experimentos se realizaron según se describió en el Capítulo II, 4.3.1.2.. En un grupo experimental (condición I, n= 4) se evaluaron los efectos de las siguientes concentraciones de baclofen: 0.05, 0.5, 10, 50, 200 y 500 μ M. En otro grupo de riñones (condición II, n= 3), luego del período de estabilización y de los dos períodos controles, se adicionó baclofen al medio de perfusión para lograr una concentración 500 μ M y se estudiaron tres períodos consecutivos de clearance. En este grupo se calculó el clearance de

inulina, además del de creatinina, como índice de velocidad de filtración glomerular.

4.2. RESULTADOS

El análisis de la función hemodinámica en el grupo tratado en condición I mostró un incremento en la presión de perfusión renal asociado a una disminución en la velocidad de filtración glomerular. La función tubular también sufrió alteraciones, caracterizadas como aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa. Todos los parámetros evaluados se modificaron de manera dependiente de la concentración de baclofen en el medio de perfusión. Estos resultados se presentan en la Figura IV-6.

En el otro grupo experimental, luego de los períodos controles se evaluaron los efectos de baclofen 500 μM (condición II). Los parámetros funcionales evaluados no presentaron diferencias significativas entre los tres períodos estudiados en presencia de esta droga. Para cada parámetro, se promediaron los valores de los tres períodos de clearance. Estos datos se compararon con los obtenidos con baclofen 500 μM en condición I (experimentos concentración-respuesta). Los efectos de baclofen 500 μM sobre la función del riñón aislado y perfundido no presentan diferencias entre la condición I y la condición II de agregado del agonista al medio de perfusión. Estos resultados se presentan en la Figura IV-7.

En el grupo tratado con baclofen en condición II, mediante la determinación del clearance de inulina, se corroboró la disminución de la velocidad de filtración glomerular estimada a partir del clearance de creatinina. En la Figura IV-7 se observa que los cambios porcentuales de depuración de creatinina y de inulina no difieren entre sí.

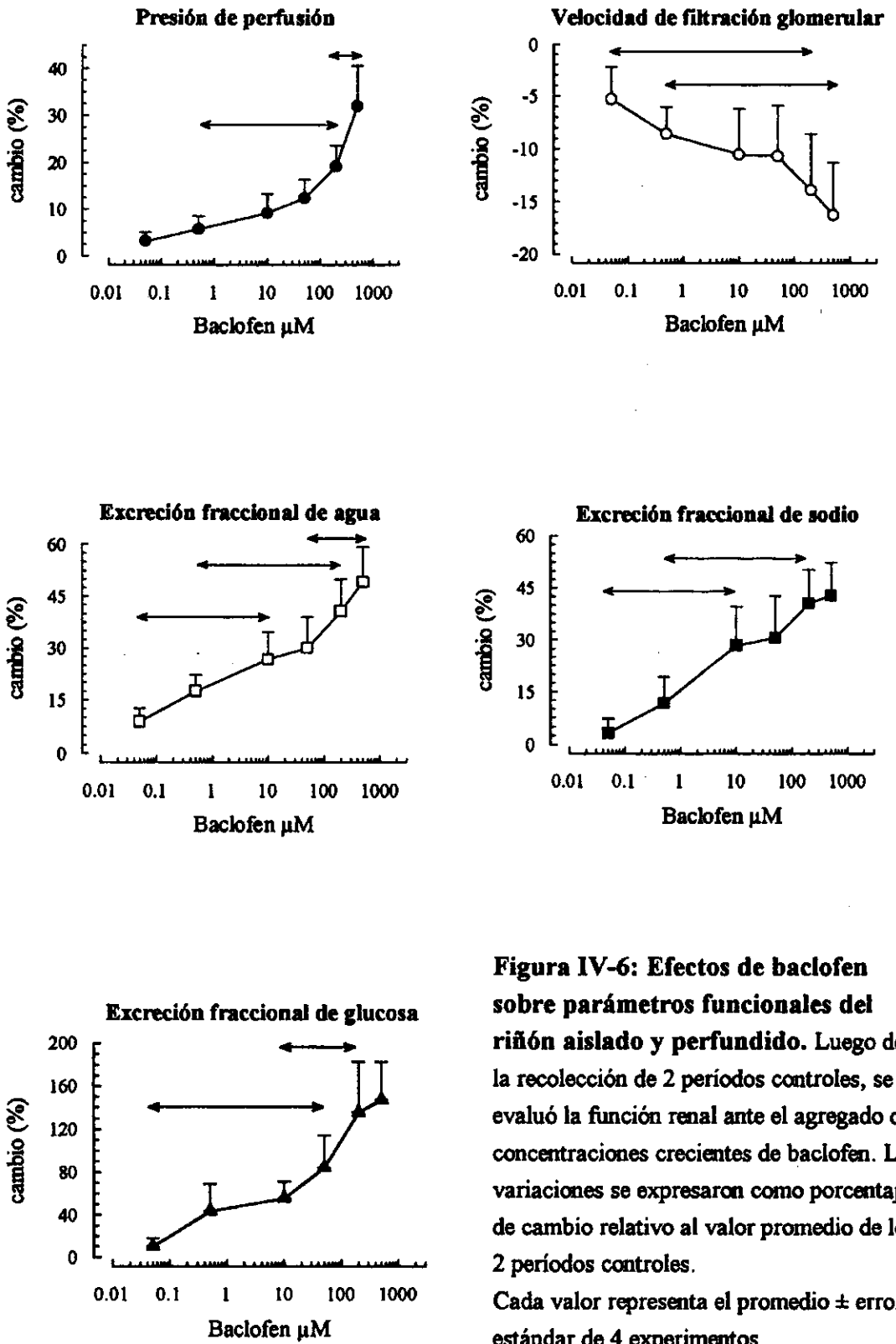


Figura IV-6: Efectos de baclofen sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 períodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de baclofen. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos.

$\leftrightarrow p < 0.05$ entre las medias señaladas.

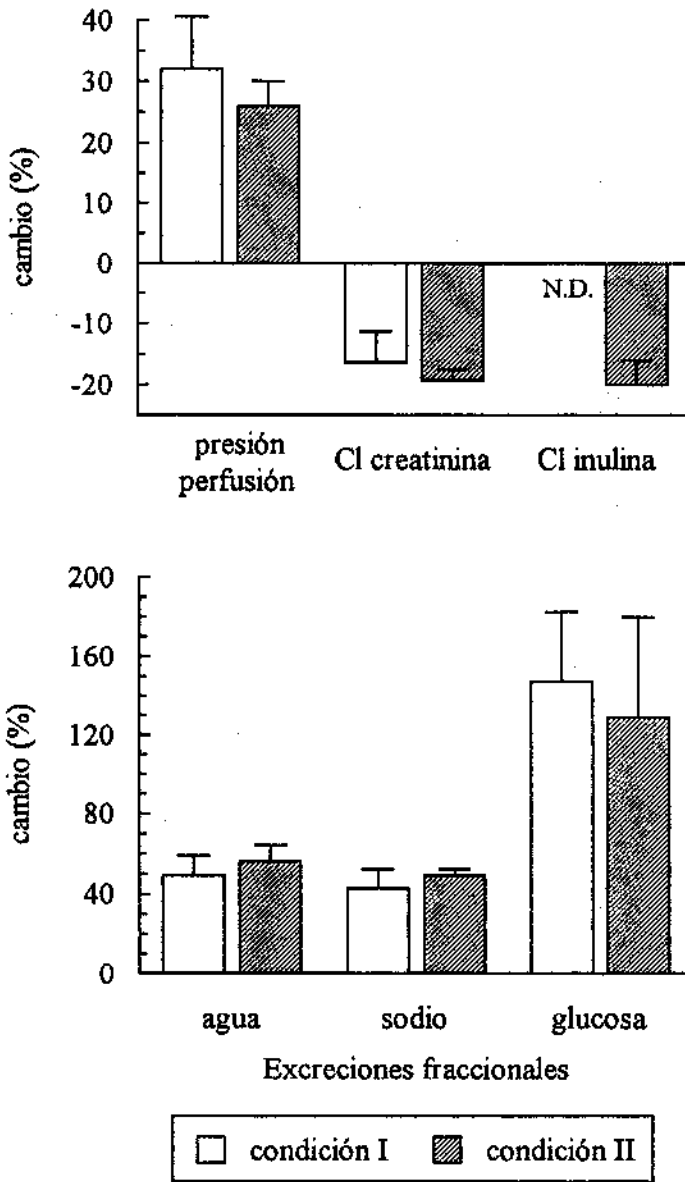


Figura IV-7: Efectos de baclofen 500 μM sobre parámetros funcionales del riñón aislado en distintas condiciones de agregado al medio de perfusión. Luego de dos periodos controles se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de baclofen. Se agregaron cantidades acumulativas de baclofen al medio de perfusión, cada 5 min, para lograr las concentraciones 0.05, 0.5, 10, 50, 200 y 500 μM (Condición I, n= 4). En otro grupo, luego de dos periodos controles se agregó baclofen al medio de perfusión para lograr una concentración 500 μM y se evaluaron 3 periodos consecutivos de clearance de 5 min cada uno (Condición II, n= 3). En ambos grupos las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles. Para cada parámetro se promediaron los valores de los 3 periodos de clearance estudiados en condición II. Estos datos fueron comparados con los de baclofen 500 μM en condición I. Los valores representan la media \pm error estándar. N.D.= no determinado

4. 3. DISCUSIÓN

Estos experimentos demuestran que la activación de receptores GABA_B provoca modificaciones en la función basal del riñón aislado y perfundido. La magnitud de los efectos observados con baclofen 500 μ M no depende de la exposición previa a la droga, ni del tiempo que la droga se mantiene recirculando en el sistema (condición I vs. condición II). Estos resultados indican que con baclofen no se desarrollarían fenómenos de desensibilización en el sistema estudiado; y que el procesamiento renal de la droga, en el tiempo experimental, no condiciona la magnitud de sus efectos.

El tratamiento con baclofen provocó un incremento en la resistencia vascular renal. En la microvasculatura cerebral también se han observado acciones vasoconstrictoras mediadas por este agonista (85). En la bibliografía se han acumulado evidencias de efectos contráctiles mediados por receptores GABA_B sobre otros tipos de músculos lisos, como íleon aislado de gato (45) y oviducto de coneja (3). Sin embargo se ha demostrado que la activación de receptores GABA_B induce relajación en colon distal de cobayo (48) y en intestino humano (47). La aparente disparidad de estas observaciones podría ser interpretada como una consecuencia de las diferencias entre las especies y tejidos estudiados; y (o) las acciones mediadas por receptores GABA_B sobre la liberación de distintos neurotransmisores, como se ha demostrado en algunos órganos periféricos (3).

El aumento en la presión de perfusión renal inducido por baclofen se encontró asociado a una disminución en la velocidad de filtración glomerular. Estos resultados indican una acción preferencial sobre la vasculatura preglomerular, glomerular, o estructuras funcionalmente relacionadas. Los resultados obtenidos en estudios autorradiográficos sugirieron la posible localización de receptores GABA_B a nivel glomerular en riñón de rata (225).

Los cambios hemodinámicos descritos podrían postularse como la causa de la disminución en la capacidad reabsortiva tubular observada durante la perfusión con baclofen. Sin embargo, no pueden descartarse acciones directas de la droga sobre células tubulares. Se ha descrito la existencia de sitios de unión a baclofen en corteza de riñón de rata, localizados en estructuras tubulares (225). El aumento en la excreción fraccional de glucosa, también descrito en este capítulo (ítem 1.1.) para el tratamiento con GABA, sugiere un compromiso de la función del túbulo contorneado proximal.

En secciones anteriores de este capítulo (1.1.) se ha descrito que el agonista común GABA induce un aumento en la resistencia vascular del riñón perfundido en condiciones basales, mientras que con el agonista GABA_A, muscimol, no se detectaron respuestas vasculares (2.1., 2.3.). Estas evidencias, asociadas a los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la vasoconstricción inducida por GABA estaría mediada por la activación de receptores GABA_B.

5. EFECTOS DE GABA SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN PRESENCIA DE BICUCULINA

Estos experimentos se dirigieron a profundizar el estudio de la participación de los receptores GABA_A y GABA_B en los efectos renales inducidos por GABA. Con este objetivo se evaluaron las respuestas del riñón aislado a GABA en presencia del antagonista GABA_A, bicuculina.

5.1. TRATAMIENTOS

Estos estudios se llevaron a cabo según fue descrito en el Capítulo II, 4.3.1.4.. Se comenzaron las perfusiones en presencia de bicuculina 50 μM y luego del período de equiibración y de los dos períodos controles, se evaluaron los efectos de las siguientes concentraciones de GABA: 0.05, 0.5, 5, 50, 500 y 1000 μM ($n= 4$). En este grupo se calculó el clearance de inulina, además del de creatinina, como índice de velocidad de filtración glomerular.

Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron comparados con los del grupo tratado con GABA en ausencia de bicuculina ($n= 5$, presentados en la sección 1.1. de este capítulo).

5.2. RESULTADOS

El tratamiento con GABA en presencia de bicuculina provocó un aumento sobre la presión de perfusión, mientras que se encontró un decremento en la velocidad de filtración glomerular. El análisis de la función tubular mostró un incremento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa. Todos los parámetros evaluados se modificaron de manera dependiente de la concentración de GABA.

Cuando se compararon los efectos de GABA en ausencia y en presencia de bicuculina, se encontró que el incremento en la presión de perfusión es mayor en los riñones pretratados con el antagonista GABA_A. El tratamiento con GABA solo no modificó la velocidad de filtrado glomerular, mientras que la perfusión previa con bicuculina disminuyó este parámetro de manera concentración-dependiente, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. Los efectos de GABA sobre los parámetros tubulares evaluados no presentaron diferencias

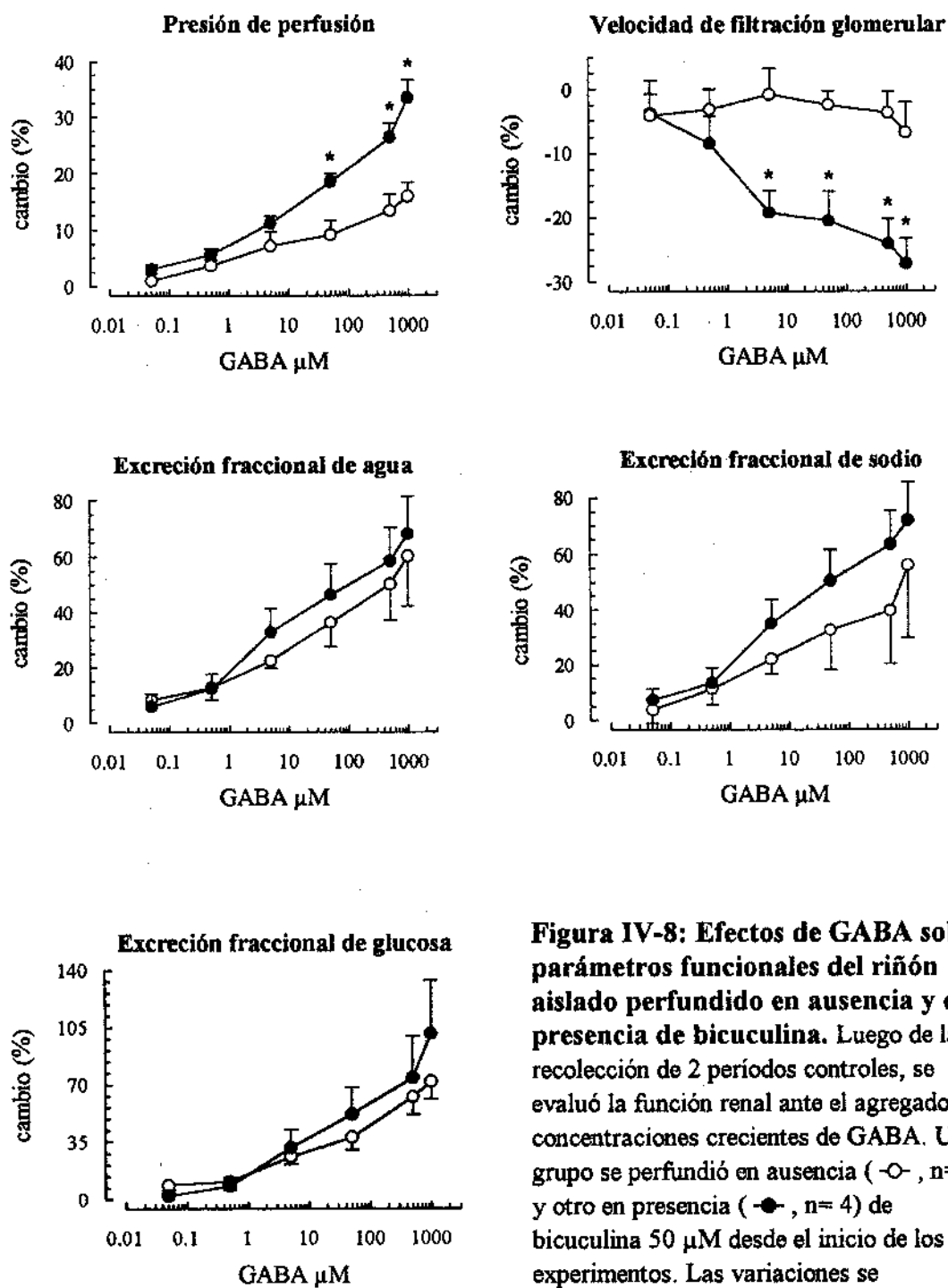


Figura IV-8: Efectos de GABA sobre parámetros funcionales del riñón aislado perfundido en ausencia y en presencia de bicuculina. Luego de la recolección de 2 períodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de GABA. Un grupo se perfundió en ausencia (\circ , $n=5$) y otro en presencia (\bullet , $n=4$) de bicuculina $50 \mu\text{M}$ desde el inicio de los experimentos. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar.

* $p < 0.05$ comparado con la respectiva concentración en ausencia de bicuculina.

significativas entre la ausencia y la presencia de bicuculina. Los resultados descriptos se muestran gráficamente en la Figura IV-8.

En la tabla IV-4 se observa que los efectos de GABA en presencia de bicuculina sobre la velocidad de filtración glomerular no difieren según este parámetro se haya estimado a partir del clearance de creatinina o de inulina .

Tabla IV-4: Efectos de GABA en presencia de bicuculina sobre el clearance de creatinina y el clearance de inulina en el riñón aislado y perfundido

GABA (μM)	cambio (%)	
	clearance de creatinina	clearance de inulina
0.05	-3.9 ± 5.2	-6.3 ± 4.8
0.5	-8.5 ± 4.2	-9.5 ± 4.8
5	-19.3 ± 3.5	-14.5 ± 2.4
50	-20.6 ± 4.6	-14.5 ± 2.0
500	-24.2 ± 3.9	-25.5 ± 5.2
1000	-27.2 ± 3.8	-22.5 ± 4.1

Los riñones se perfundieron con bicuculina 50 μM desde el inicio de los experimentos. Luego de la recolección de 2 periodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de GABA. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos.

5.3. DISCUSIÓN

El pretratamiento con el antagonista GABA_A, bicuculina, modifica significativamente los efectos de GABA sobre los parámetros hemodinámicos evaluados en este estudio. El bloqueo de receptores GABA_A indujo un mayor aumento de la presión de perfusión y una disminución concentración-dependiente de la velocidad de filtración, no observada con el tratamiento con GABA solo. Estos datos y las respuestas de la vasculatura renal a

baclofen (presente Capítulo, sección 4), en conjunto, refuerzan la hipótesis de que la vasoconstricción inducida por GABA estaría mediada por receptores GABA_B.

La influencia del pretratamiento con bicuculina sobre los efectos vasculares de GABA sugieren que la activación de receptores GABA_A contrarrestaría, en parte, la vasoconstricción previniendo de la caída de velocidad de filtrado glomerular en los riñones perfundidos con GABA solo. La suposición de este rol para los receptores GABA_A concuerda con los resultados obtenidos con el tratamiento con bicuculina (sección 3. de este Capítulo), a partir de los cuales se sugirió una acción vasodilatadora mediada por la activación endógena de estos receptores.

La información obtenida en este estudio acumula evidencias de la posible participación del sistema GABA en la modulación local del tono del lecho vascular renal.

Capítulo V

EFFECTOS DE BENZODIAZEPINAS

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE DIAZEPAM SOBRE LA FUNCIÓN RENAL *IN VIVO*

La benzodiazepina prototipo diazepam es una droga ampliamente utilizada en la clínica con distintos fines terapéuticos. En una primera etapa de este estudio, resultó de interés evaluar sus efectos sobre la función renal *in vivo*. Estos trabajos se llevaron a cabo mediante técnicas convencionales de clearance durante infusión continua. Este modelo permite someter a los animales a una diuresis adecuada para lograr el estudio de efectos tempranos de una droga sobre distintos parámetros funcionales durante períodos cortos. En estos experimentos se evaluaron los efectos sobre la función renal luego de una hora de la administración de diferentes dosis de diazepam.

1.1. EFECTOS DE DIAZEPAM

1.1.1. Animales y Tratamientos

En estos experimentos los animales recibieron una dosis única i.v. de diazepam una hora antes de comenzar la recolección de dos períodos de clearance, como se describió en el Capítulo II, 3.1.3.1.. En cada experimento se promediaron los valores obtenidos en ambos períodos para cada parámetro

estudiado. Las dosis de diazepam ensayadas fueron 0.1, 0.3, 3 y 10 mg/Kg de peso corporal. Simultáneamente se evaluó la función renal en un grupo control; y en una serie de experimentos se analizaron los efectos del vehículo de diazepam. En cada grupo experimental se estudiaron 4-6 ratas.

1.1.2. Resultados

En la Tabla V-1 se comprueba que el vehículo de diazepam no modifica los parámetros funcionales evaluados en este trabajo.

En la Tabla V-2 se presentan los valores de algunos parámetros plasmáticos en ratas controles y en ratas tratadas con diazepam. Los niveles plasmáticos de sodio y de potasio no fueron modificados por la administración de las distintas dosis de diazepam utilizadas en este estudio, respecto a los valores encontrados en los animales controles. Tampoco se observaron diferencias en la concentración plasmática de glucosa. La inducción de hiperglicemia por la administración de benzodiazepinas ha sido descrita en ratón (164). Sin embargo, en estos experimentos, a pesar de que en algunos animales tratados se observaron niveles de glicemia superiores a los valores controles, la comparación de las medias no arrojó diferencias significativas entre los grupos. Los valores de osmolalidad plasmática y hematocrito de las ratas que recibieron diazepam no fueron diferentes de los hallados en los controles.

Por lo tanto los efectos de diazepam sobre la función renal que se describen a continuación no serían secundarios a la modificación de ninguna de las variables presentadas en la Tabla V-2.

Tabla V-1: Parámetros de función renal en ratas controles y ratas que recibieron el volumen correspondiente del vehículo de diazepam

	Control	Vehículo
Clearance de PAH (ml/min . 100g)	3.42 ± 0.36	3.10 ± 0.19
Velocidad de filtración glomerular (ml/min . 100g)	0.66 ± 0.16	0.72 ± 0.06
Fracción de filtración	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.01
Volumen minuto de orina (ml/min . 100g)	0.018 ± 0.002	0.021 ± 0.003
Excreción fraccional de agua (%)	3.01 ± 0.29	3.10 ± 0.14
Excreción fraccional de sodio (%)	0.57 ± 0.13	0.66 ± 0.20
Excreción fraccional de potasio (%)	11.76 ± 1.24	13.80 ± 1.70
Excreción fraccional de glucosa (%)	0.20 ± 0.009	0.21 ± 0.01
U_{osm} / P_{osm}	1.93 ± 0.09	2.06 ± 0.03
Clearance osmolar (ml/min . 100g)	0.042 ± 0.004	0.047 ± 0.005
Reabsorción de agua libre (ml/min . 100g)	0.028 ± 0.002	0.024 ± 0.003

En un grupo de ratas (Control), luego de un período de estabilización de una hora, se recolectaron dos períodos de clearance y, para cada parámetro, se promediaron los valores obtenidos en ambos períodos. En otro grupo (Vehículo), antes de comenzar el período de estabilización, los animales recibieron el volumen correspondiente del vehículo de diazepam por vía i.v..

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4-6 observaciones.

Tabla V-2: Parámetros plasmáticos a la hora de la administración de distintas dosis de diazepam

	Control	Diazepam (mg/Kg)			
		0.1	0.3	3	10
[Na] _p (meq/l)	138 ± 10	135 ± 4	133 ± 4	134 ± 4	128 ± 1
[K] _p (meq/l)	3.45 ± 0.16	4.35 ± 0.29	3.69 ± 0.23	3.48 ± 0.26	3.83 ± 0.28
[Glucosa] _p (g/l)	1.08 ± 0.06	1.22 ± 0.14	N.D.	N.D.	1.16 ± 0.13
P _{osm} (mosm/Kg)	301 ± 3	297 ± 1	294 ± 3	296 ± 2	303 ± 1
Hematocrito (%)	39.8 ± 0.6	38.8 ± 0.9	N.D.	N.D.	40.5 ± 0.9

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4-6 observaciones.

[Na]_p= concentración plasmática de sodio; [K]_p= concentración plasmática de potasio;

[Glucosa]_p= concentración plasmática de glucosa; P_{osm}= osmolalidad plasmática;

N.D.= no determinado.

Como se observa en la Tabla V-3, el tratamiento con diazepam provocó una disminución estadísticamente significativa de la presión arterial con todas las dosis ensayadas.

Tabla V-3: Presión arterial a la hora de la administración de distintas dosis de diazepam

	Control	Diazepam (mg/Kg)			
		0.1	0.3	3	10
Presión arterial (mmHg)	134 ± 4	109 ± 4 **	117 ± 6 *	116 ± 2 *	105 ± 5 **

Los valores representan el promedio ± error estándar de 4-6 observaciones.

* p < 0.05 comparado con el control

** p < 0.01 comparado con el control

La hemodinamia renal no resultó afectada por la variación de presión arterial, según los parámetros evaluados en este trabajo. En la Figura V-1 se observa que la VFG, el C_{PAH} y la fracción de filtración no se modificaron con el tratamiento con diazepam, comparados con los datos de los animales controles.

Cuando se evaluaron los parámetros tubulares se encontró un significativo aumento en las excreciones fraccionales de agua y sodio con las dosis de diazepam ensayadas. La excreción fraccional de potasio también se vió aumentada, alcanzándose significado estadístico en el grupo que recibió 0.3 mg/Kg de diazepam, comparado con el grupo control. Estos datos se presentan en la Figura V-2.

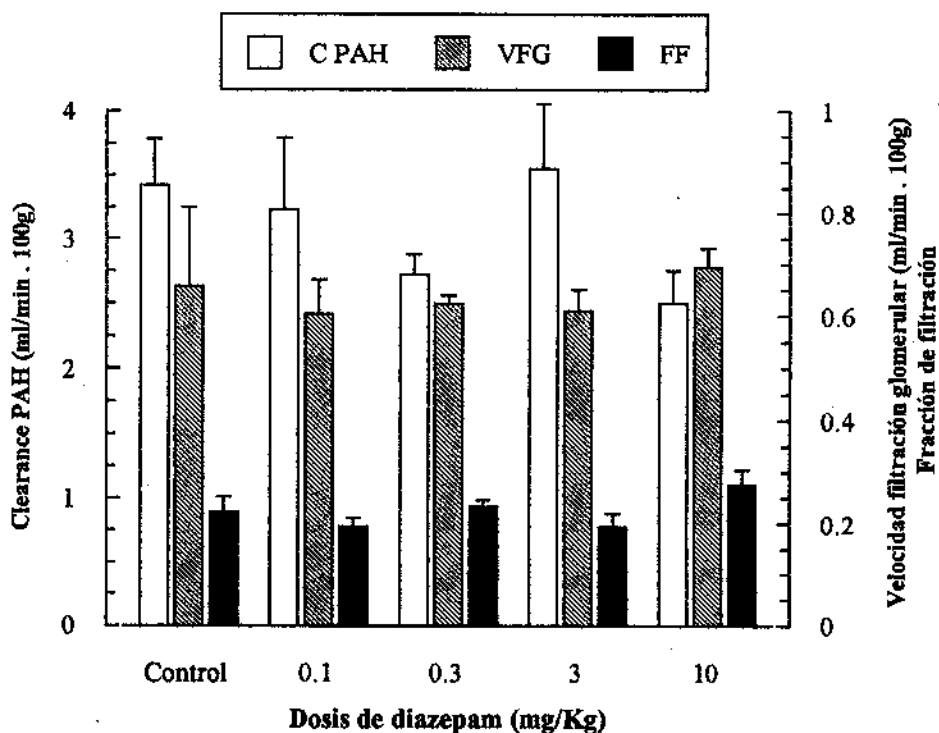


Figura V-1: Efectos de diazepam sobre la función hemodinámica renal *in vivo*

Diazepam fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-6 observaciones.

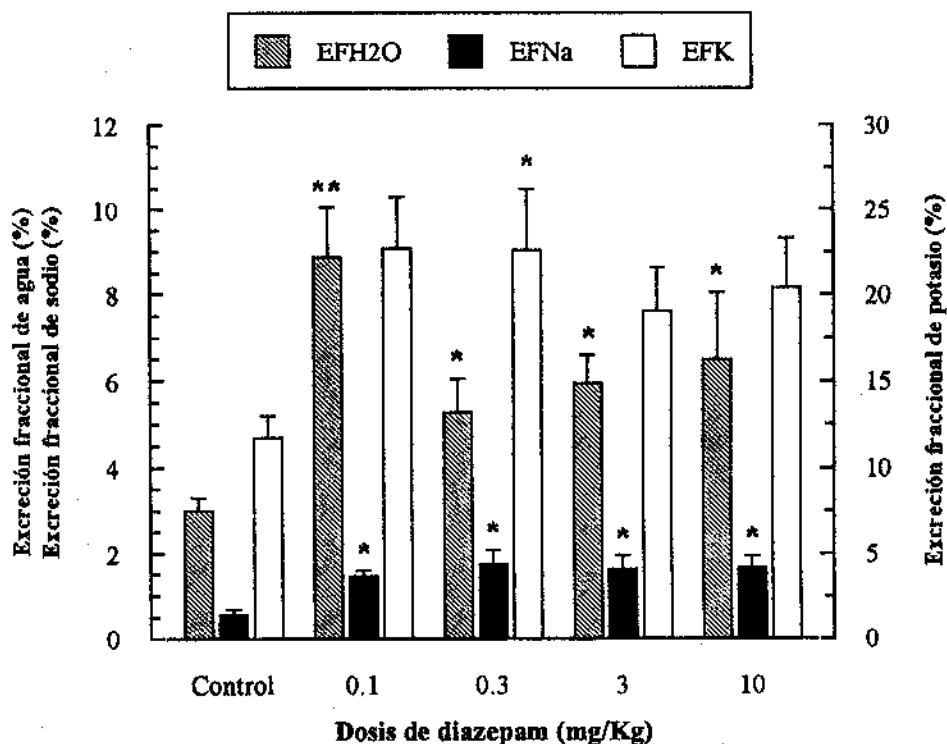


Figura V-2: Efectos de diazepam sobre la función tubular *in vivo*

Diazepam fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-6 observaciones.

* $p < 0.05$ comparado con el control.

** $p < 0.01$ comparado con el control.

En los grupos experimentales que recibieron 0.1 y 10 mg/Kg de diazepam, también se calculó la excreción fraccional de glucosa. Los resultados presentados en la Tabla V-4 indican que la administración de diazepam no modifica la reabsorción tubular de glucosa.

Tabla V-4: Excreción fraccional de glucosa en ratas controles y en ratas tratadas con diazepam

	Control	Diazepam (mg/Kg)	
		0.1	10
EF glucosa (%)	0.20 ± 0.009	0.16 ± 0.015	0.20 ± 0.036

Diazepam fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance.

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4 observaciones.

En la tabla V-5 se puede observar que la relación entre EF_K y EF_{Na} no presenta diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

Tabla V-5: Relación entre la excreción fraccional de potasio y la excreción fraccional de sodio en ratas controles y en ratas tratadas con diazepam

	Control	Diazepam (mg/Kg)			
		0.1	0.3	3	10
EFpotasio / EFsodio	19.5 ± 2.5	16.0 ± 2.8	18.6 ± 3.9	15.5 ± 2.1	14.9 ± 3.3

Diazepam fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance.

Cada valor representa el promedio ± error estándar de 4-6 observaciones.

El aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y potasio, observado con la administración de diazepam, fue acompañado por una disminución en la capacidad de concentrar la orina, según fue reflejado por el decremento en la relación U_{Osm}/P_{Osm} . Además, todas las dosis de diazepam ensayadas provocaron una disminución en la reabsorción de agua libre, comparada con los valores controles. El C_{Osm} no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados. Estos resultados se muestran en la Figura V-3.

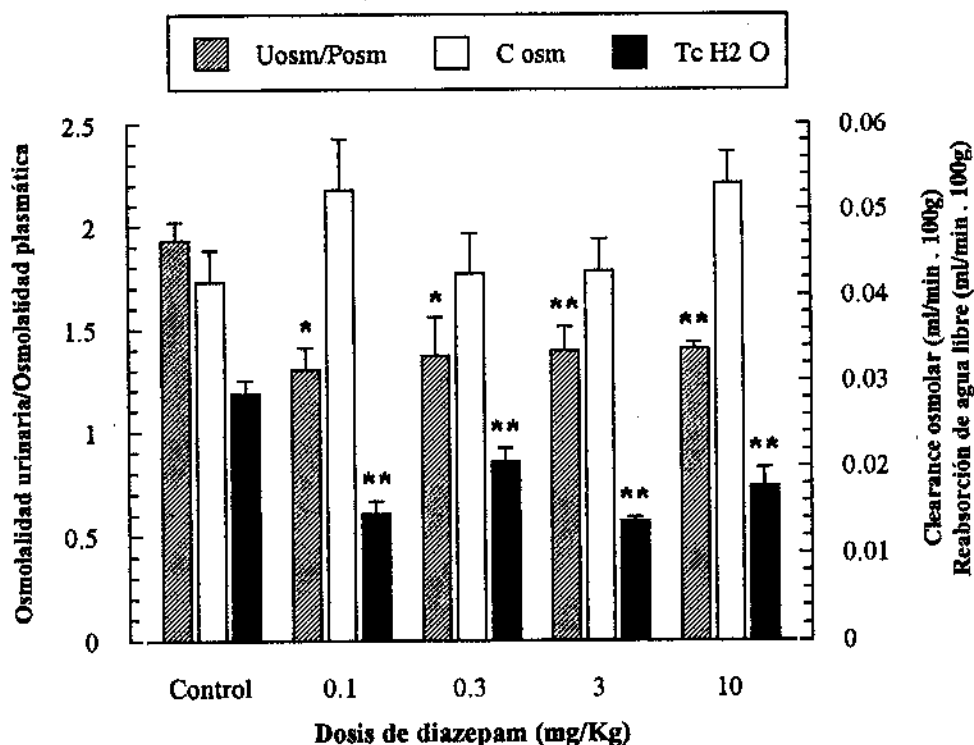


Figura V-3: Efectos de diazepam sobre la capacidad de concentrar la orina
Diazepam fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-6 observaciones.

* $p < 0.05$ comparado con el control.

** $p < 0.01$ comparado con el control

1.1.3. Discusión

La administración intravenosa de diazepam (0.1-10 mg/Kg) provocó una significativa disminución de la presión arterial en los animales estudiados. Este efecto también se ha descrito en humanos, luego de la administración de dosis preanestésicas (0.1 a 1 mg/Kg) de diazepam, y se atribuye a la disminución del trabajo del ventrículo izquierdo y del gasto cardíaco (187).

Los valores de C_{PAH} y de VFG en las ratas que recibieron diazepam no fueron diferentes de los valores controles. Estos datos indican que la hemodinamia renal no estaría afectada por acciones directas de la droga ni por la caída de la presión arterial. Respecto a estos resultados, cabe mencionar que la presión arterial entre los grupos experimentales varió dentro del rango en el cual el riñón conserva su capacidad de autorregulación de flujo sanguíneo y filtrado glomerular (239, 289).

En los animales tratados con diazepam se observó un aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y potasio, mientras que la excreción fraccional de glucosa no presentó diferencias respecto a los valores hallados en los animales controles. Estos resultados sugieren que la disminución en la reabsorción de agua y electrolitos podría atribuirse a alteraciones en la función del nefrón distal, dado que se preserva el manejo tubular de glucosa.

La relación EF_K/EF_{Na} no fue afectada por la administración de diazepam, de lo que se infiere que el aumento de la EF_K podría deberse a un incremento en la secreción de potasio ante la mayor liberación de sodio al túbulo distal y conducto colector.

Estos efectos de diazepam se encontraron asociados a una disminución en la relación U_{osm}/P_{osm} , indicando una pérdida en la capacidad de concentrar la orina. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que las estructuras distales estarían comprometidas en las acciones de diazepam.

Los valores de C_{osm} en los animales tratados no difirieron de los encontrados en los controles. Por lo tanto, la carga de osmoles emergente del asa ascendente de Henle no estaría modificada por la administración de la droga, indicando que es poco probable que los efectos tubulares descritos se deban a alteraciones en la función de este segmento del nefrón. En tanto que la disminución en la reabsorción de agua libre provocada por diazepam sugiere que el túbulo colector podría ser blanco de las acciones de esta benzodiazepina.

Estos resultados, en conjunto, brindan evidencia de que diazepam provoca alteraciones en el manejo de agua y electrolitos en el nefrón distal, no asociadas a cambios en la hemodinamia renal. Por lo tanto, es probable que diazepam ejerza sus efectos actuando directamente sobre estructuras tubulares. En estudios autorradiográficos realizados por otros autores (226) se describió que el riñón de rata presenta una alta densidad de receptores a benzodiazepinas, concentrados principalmente en la rama ascendente gruesa del asa de Henle y en el túbulo contorneado distal. Además se ha demostrado que distintos diuréticos, derivados del ácido fenoxiacético y tiazidas, son capaces de inhibir la unión de ligandos específicos de RPB; en el caso de las tiazidas, con un orden de potencias similar al descrito para sus efectos natriuréticos *in vivo* (120). Estos hallazgos concuerdan con la propuesta de que diazepam actuaría directamente sobre los túbulos renales. Sin embargo, debe considerarse que la función renal en el animal intacto está influenciada por diversos factores sistémicos no evaluados en este trabajo, los cuales podrían estar condicionados por las acciones de la droga. Dentro de las variables estudiadas en estos experimentos, la presión arterial sufrió una disminución que puede liberar mecanismos reguladores con importantes consecuencias sobre la función renal. Además, las técnicas de clearance sólo brindan la posibilidad de estudiar la respuesta global del riñón. Considerando la heterogeneidad horizontal y vertical de la circulación renal, es probable

que diazepam provoque cambios territoriales de flujo no detectables por la estimación de C_{PAH} y VFG, que podrían afectar la función de ciertos segmentos tubulares.

Otra observación a los resultados obtenidos en estos estudios es que la magnitud de los efectos descritos con la administración de diazepam no fue dependiente de la dosis empleada. Este hecho podría deberse, en parte, a la complejidad del estudio de las respuestas renales en el animal intacto y a los posibles mecanismos moduladores intervinientes, como se comentó anteriormente. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que se esté trabajando con dosis supramáximas para los efectos evaluados. Otros autores utilizaron la dosis de 3 mg/Kg en estudios realizados *in vivo* (161). Las menores dosis ensayadas en este trabajo (0.1 y 0.3 mg/Kg) son dosis administradas corrientemente a humanos, cuando se utiliza diazepam para la inducción de anestesia (290). En medicina veterinaria se emplean dosis que varían entre 0.1 y 10 mg/Kg, según la especie tratada (291). Por lo tanto, se consideró que el rango de dosis estudiadas en el presente trabajo fue adecuado para obtener información en este modelo *in vivo*.

1.2. EFECTOS DE DIAZEPAM EN PRESENCIA DE DESMOPRESINA

La disminución de la capacidad de concentrar la orina observada con la administración de diazepam podría ser consecuencia de acciones directas sobre estructuras renales o de acciones indirectas de la droga. Se ha descrito que, en ratas, la administración intraventricular del agonista $GABA_A$, muscimol, reduce la concentración plasmática de hormona antidiurética (ADH), tanto en condiciones basales como luego de la estimulación de liberación de ADH por administración de solución hipertónica de sodio. Estos efectos, que fueron prevenidos por el antagonista $GABA_A$, bicuculina, indican la existencia de receptores $GABA_A$ en los

axones del tracto hipotálamo-neurohipofisario (55). El receptor a benzodiazepinas, en el sistema nervioso central, es un sitio modulador del complejo receptor GABA_A-canal Cl⁻ que media las acciones del neurotransmisor GABA (292). Recientemente se ha descrito que la benzodiazepina clordiazepóxido bloquea la liberación de ADH (293). Ante estas evidencias, cabe suponer que los efectos de diazepam sobre la concentración de la orina podrían deberse a acciones sobre la liberación de vasopresina.

Sin embargo, también debe contemplarse la probabilidad de que las acciones de diazepam modifiquen la respuesta renal a dicha hormona. Con el objetivo de testear esta posibilidad, se estudiaron los efectos de la benzodiazepina en presencia del análogo de vasopresina, desmopresina.

1.2.1. Animales y tratamientos

Estos experimentos se llevaron a cabo como fue descrito en el Capítulo II, 3.1.3.2.. En un grupo de animales se administró una dosis de desmopresina de 0.4 µg/rata, por vía i.v. (DDAVP, n= 4). Luego de 15 min se comenzó la infusión con manitol al 5%, a una velocidad de 5ml/h, y al término de una hora se estudiaron dos períodos de clearance de 20 min cada uno. En otro grupo (n= 3) se duplicó la dosis de desmopresina y se siguió el mismo diseño experimental.

En una serie de experimentos, luego de 15 min de la administración i.v. de 0.4 µg/rata de desmopresina, se inyectaron 0.3 mg/Kg, i.v., de diazepam (DZ+DDAVP, n= 4) y se comenzó la infusión continua.

En este estudio se calcularon los valores de C_{osm} y T^cH₂O y se compararon con los resultados obtenidos en experimentos anteriores para animales controles y animales tratados con diazepam (0.3 mg/Kg) solo (sección 1.1. de este Capítulo).

1.2.2. Resultados

En las ratas tratadas con 0.4 $\mu\text{g/rata}$ de desmopresina los valores de $U_{\text{osm}}/P_{\text{osm}}$ (4.27 ± 0.17 , $n= 4$) fueron significativamente mayores a los encontrados en animales controles (1.93 ± 0.09 , $n= 5$, $p < 0.001$). Con la administración de 0.8 $\mu\text{g/rata}$ de desmopresina, la relación $U_{\text{osm}}/P_{\text{osm}}$ (4.44 ± 0.13 , $n= 3$) no presentó diferencias significativas respecto al grupo que recibió 0.4 $\mu\text{g/rata}$. Estos datos indican que con la dosis 0.4 $\mu\text{g/rata}$ de desmopresina se alcanza la máxima capacidad de concentrar la orina, en las condiciones de hidratación y expansión a las cuales se encuentran sometidos los animales en estos experimentos.

Como se observa en la Tabla V-6, la administración de desmopresina no provocó modificaciones significativas de la presión arterial, ya sea en ausencia o en presencia de diazepam, cuando se realizó la comparación con los controles respectivos.

Tabla V-6: Presión arterial en ratas controles y tratadas con desmopresina, en ausencia y en presencia de diazepam

	Control	DZ	DDAVP	DZ + DDAVP
Presión arterial (mmHg)	134 ± 4	117 ± 6 *	142 ± 6	125 ± 5 *

Diazepam (DZ) 0.3 mg/Kg fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance. Desmopresina (DDAVP) 0.4 $\mu\text{g/rata}$ fue administrada 15 min antes de la inyección de diazepam.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-5 observaciones.

* $p < 0.05$ comparado con su respectivo control en ausencia de diazepam.

En la Figura V-4 se presentan los valores de C_{osm} y T^cH_2O encontrados en los animales controles y tratados con diazepam, en ausencia y en presencia de desmopresina.

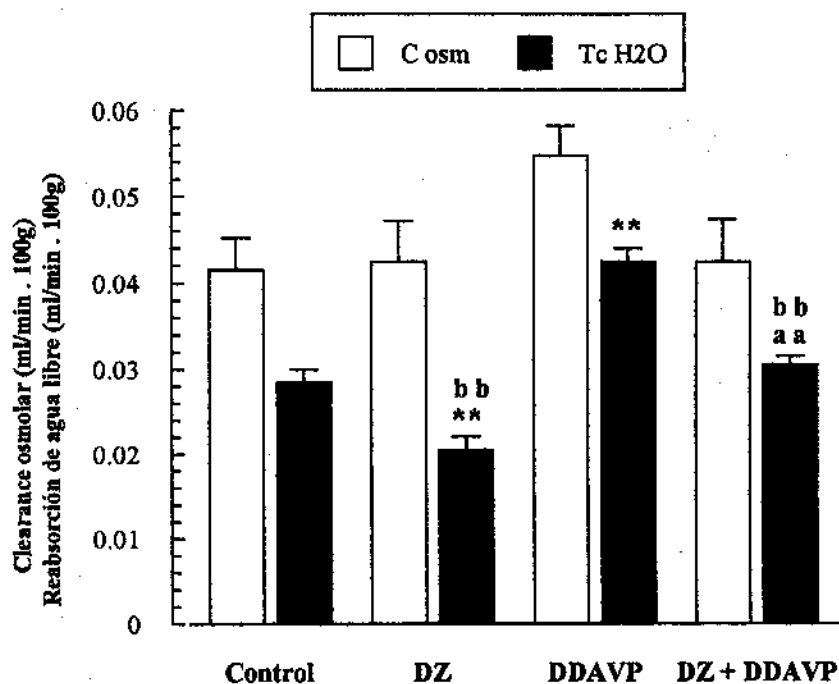


Figura V-4: Clearance osmolar y reabsorción de agua libre en ratas controles y tratadas con diazepam, en ausencia y en presencia de desmopresina

Diazepam (DZ) 0.3 mg/Kg fue administrado por vía i.v. una hora antes de comenzar los estudios de clearance. Desmopresina (DDAVP) 0.4 μ g/rata fue administrada 15 min antes de la inyección de diazepam.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-6 observaciones.

** $p < 0.01$ comparado con grupo control.

aa $p < 0.01$ comparado con grupo DZ.

bb $p < 0.01$ comparado con grupo DDAVP.

Los valores de C_{osm} no presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Como se había descrito en experimentos anteriores, la administración de diazepam provocó una significativa disminución en la reabsorción neta de agua, respecto a los animales controles. El tratamiento con desmopresina aumentó significativamente el

T^cH_2O cuando se comparó con el grupo control. En las ratas que recibieron diazepam en presencia de desmopresina, el T^cH_2O aumentó respecto a los animales tratados con diazepam solo, pero este valor fue significativamente menor al hallado en el grupo que recibió sólo desmopresina.

1.2.3. Discusión

En estos estudios, los animales sometidos a infusión continua con manitol 5%, a una velocidad de 5 ml/h, alcanzaron su máxima capacidad de concentrar la orina mediante la administración de desmopresina 0.4 μ g/rata. Estos efectos de desmopresina no se vieron asociados a un aumento significativo de la presión arterial. Esta propiedad de este análogo de vasopresina, de inducir antidiuresis sin manifestar importante actividad vasopresora, ha sido descripta anteriormente (207).

En las ratas tratadas con desmopresina 0.4 μ g/rata, que recibieron diazepam 0.3 mg/Kg, se encontró una disminución en la reabsorción de agua libre, respecto al grupo DDAVP. El valor de T^cH_2O observado en los animales tratados con DZ + DDAVP fue mayor que el hallado en animales a los que sólo se les administró diazepam. De la información obtenida en este estudio resulta impreciso discutir acerca de los efectos potenciales de diazepam sobre la liberación de ADH. Sin embargo, es evidente que la administración exógena de una dosis máxima (para su efecto antidiurético en estas condiciones experimentales) del análogo de vasopresina no previno la alteración en la reabsorción neta de agua, inducida por diazepam. Estos resultados indican que, si bien no se puede descartar una posible alteración en la liberación de ADH, es probable que las acciones de diazepam modifiquen la capacidad de respuesta de las estructuras tubulares a dicha hormona.

2. ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE DIAZEPAM Y OTRAS BENZODIAZEPINAS SOBRE LA FUNCIÓN DEL RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO

En secciones anteriores de este capítulo se han descripto los efectos de diazepam sobre la función renal en el animal intacto. Estos estudios han brindado evidencias de la capacidad de diazepam de alterar las funciones reabsortivas del túbulo renal. En los experimentos *in vivo* los parámetros evaluados pueden ser influenciados por efectos extrarrenales de la droga. En los estudios que se describen a continuación se ha empleado el modelo de riñón aislado y perfundido, que resulta adecuado para el análisis de los efectos directos de diazepam y otras benzodiazepinas sobre la función renal.

2.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN CONDICIONES BASALES

En estos experimentos, luego de la recolección de dos períodos controles, se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes de la benzodiazepina ensayada, como se ha descripto en el Capítulo II, 4.3.1.6.. Los parámetros evaluados en estos estudios fueron: presión de perfusión, velocidad de filtración glomerular y excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa. El promedio de los valores obtenidos en los dos primeros períodos, para cada parámetro estudiado, fue considerado el valor control para cada preparación. Los efectos de la benzodiazepina estudiada se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor control.

En una serie de experimentos (n= 4) se evaluaron los efectos de los volúmenes del vehículo de benzodiazepinas utilizados en estos estudios. La estabilidad de la función renal durante el tiempo de perfusión no fue

alterada por el agregado del vehículo de benzodiazepinas al medio de perfusión (Figura V-5).

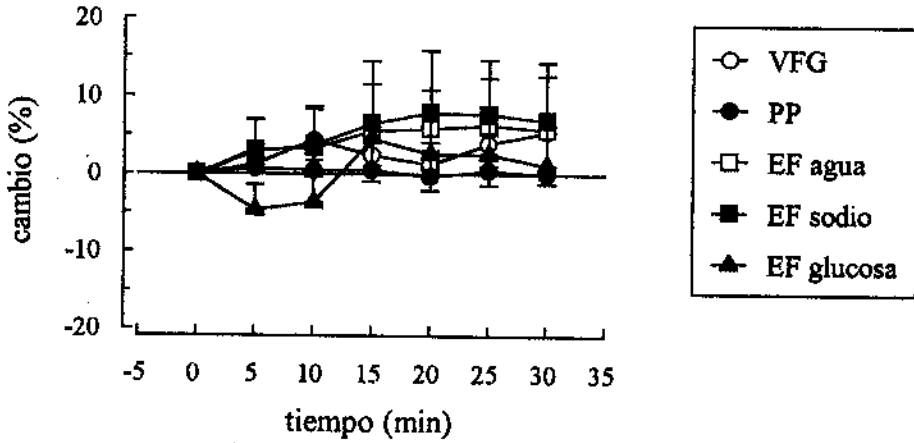


Figura V-5: Efectos del vehículo de benzodiazepinas sobre la estabilidad de parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de dos períodos controles se agregó al medio de perfusión, cada cinco minutos, cantidades crecientes del vehículo de benzodiazepinas, cubriendo el rango de volúmenes utilizados en los estudios de los efectos de benzodiazepinas. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los dos primeros períodos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos.

VFG= velocidad de filtración glomerular; PP= presión de perfusión; EF agua= excreción fraccional de agua; EF sodio= excreción fraccional de sodio; EF glucosa= excreción fraccional de glucosa.

2.1.1. Efectos de diazepam

2.1.1.1. Tratamientos

Estos experimentos se llevaron a cabo como se ha descrito en el punto 2.1. de este capítulo. En un grupo de riñones ($n=6$) se estudiaron los efectos de las siguientes concentraciones de diazepam: 0.05, 2, 54 y 230 μM .

El rango de concentraciones 0.05-54 μM de diazepam incluye al rango de concentraciones plasmáticas alcanzadas con la administración de las distintas dosis utilizadas en los estudios *in vivo*, según cálculos teóricos asumiendo un coeficiente de distribución de 1.1 l/Kg (294).

2.1.1.2. Resultados

En la Figura V-6 se presentan los efectos de diazepam sobre los parámetros funcionales evaluados en el riñón aislado y perfundido a flujo constante.

La resistencia vascular renal no fue afectada por el agregado de diazepam al medio de perfusión, ya que la presión de perfusión se mantuvo estable durante todo el experimento. La velocidad de filtración glomerular tampoco sufrió variaciones estadísticamente significativas.

En cuanto a la función tubular, se observó un aumento concentración-dependiente de las excreciones fraccionales de agua y sodio, mientras que la excreción fraccional de glucosa no se modificó significativamente con el tratamiento.

2.1.1.3. Discusión

Estos resultados brindan evidencia de efectos de diazepam sobre la función renal que, debido a las características de modelo experimental, no serían consecuencia de acciones extrarrenales de la droga.

En estos experimentos, donde el órgano se perfundió a flujo constante, la presión de perfusión no sufrió cambios por el agregado de diazepam al medio de perfusión, por lo que se puede concluir que esta benzodiazepina no modifica la resistencia vascular basal del riñón aislado. El

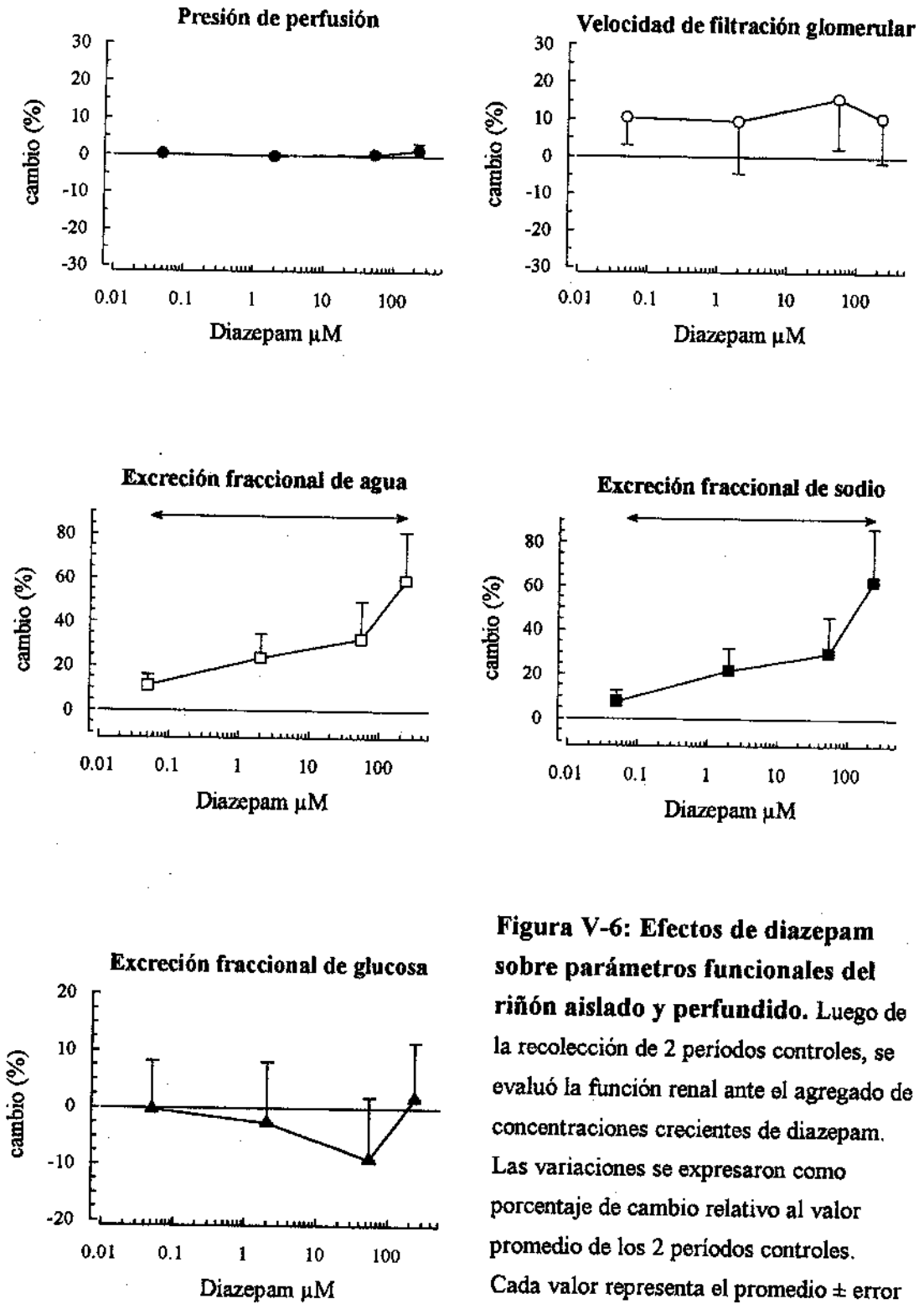


Figura V-6: Efectos de diazepam sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 periodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de diazepam. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 6 experimentos.

$\leftrightarrow p < 0.05$ entre las medias señaladas.

tratamiento con diazepam tampoco provocó modificaciones significativas sobre la velocidad de filtración glomerular. Como se ha discutido para los estudios *in vivo*, en estos experimentos se analizó la función global del órgano, y es probable que no se pongan de manifiesto posibles alteraciones territoriales de la hemodinamia renal. Sin embargo, el modelo de riñón aislado presenta la ventaja de lograr una medida directa de la presión de perfusión renal; y este parámetro no se encuentra sometido a las influencias de los cambios de presión arterial y los mecanismos reguladores asociados, que pueden condicionar la función renal en el modelo *in vivo*.

Los efectos tubulares de diazepam se caracterizaron como un aumento concentración-dependiente de la diuresis y de la natriuresis. Coincidentemente con los resultados encontrados en el animal intacto, tales defectos en la reabsorción de agua y sodio no fueron acompañados por alteraciones en el manejo tubular de glucosa.

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis, propuesta en secciones anteriores, de que las alteraciones en la función tubular no responderían a cambios hemodinámicos y se localizarían, principalmente, en estructuras distales del nefrón.

2.1.2. Efectos de clonazepam y Ro 5-4864

El diazepam, cuyos efectos renales se han descrito en secciones anteriores de este capítulo, es una benzodiazepina de acción mixta sobre RCB y RPB. Para profundizar el estudio de los efectos mediados por benzodiazepinas, se evaluó la respuesta del riñón aislado y perfundido a benzodiazepinas selectivas. En este sentido se estudiaron los efectos de clonazepam, agonista RCB, y de Ro 5-4864, ligando selectivo RPB.

2.1.2.1. Tratamientos

Estos experimentos se llevaron a cabo según se ha descrito en el ítem 2.1. del presente capítulo. En un grupo de riñones ($n=4$) se estudiaron los efectos de las siguientes concentraciones de clonazepam: 2, 25, 54, 100, 230 y 500 μM ; y en otro grupo ($n=4$), las siguientes concentraciones de Ro 5-4864: 4, 20 y 40 μM .

2.1.2.2. Resultados

Los efectos de clonazepam y Ro 5-4864, sobre los parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido, se presentan en las Figuras V-7 y V-8, respectivamente.

La presión de perfusión y la VFG no sufrieron cambios significativos por el agregado de clonazepam o Ro 5-4864 al medio de perfusión.

Ambas benzodiazepinas provocaron un aumento concentración-dependiente de las excreciones fraccionales de agua y sodio, sin modificar significativamente la excreción fraccional de glucosa. En la Figura V-9 se presentan, simultáneamente, los efectos de diazepam, clonazepam y Ro 5-4864 sobre las excreciones fraccionales de agua y sodio.

2.1.2.3. Discusión

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que las benzodiazepinas clonazepam y Ro 5-4864 son capaces de alterar la función tubular del riñón aislado y perfundido. Estas alteraciones, que se caracterizaron como aumento de la diuresis y de la natriuresis, no se asociaron a cambios en los parámetros hemodinámicos evaluados. Además, dada la conservación en el manejo de glucosa, se estima que tales efectos tubulares se deberían a acciones sobre el nefrón distal.

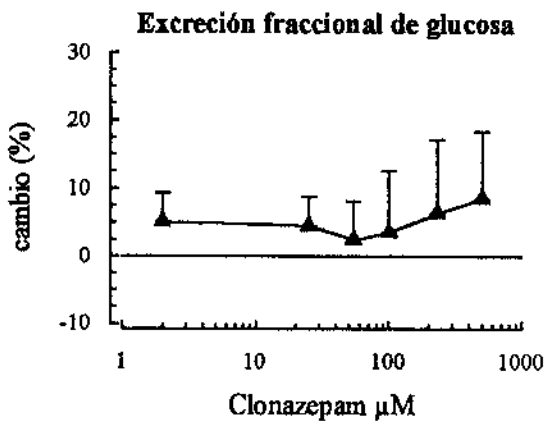
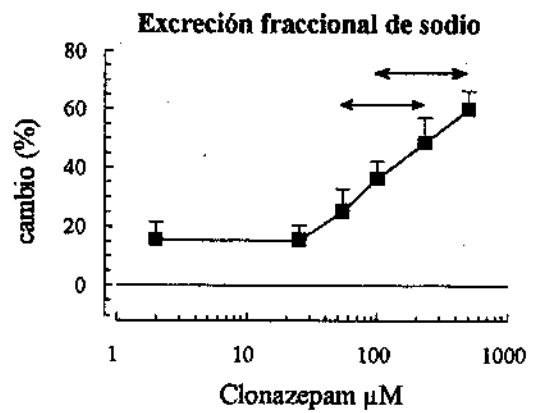
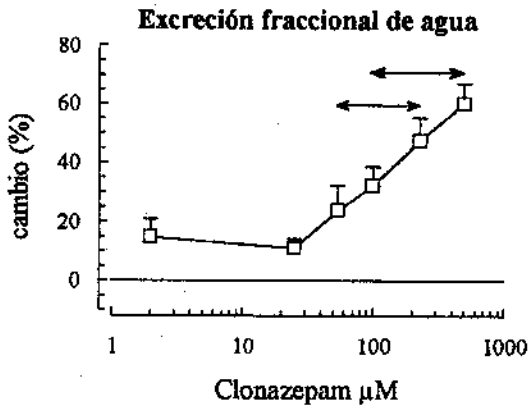
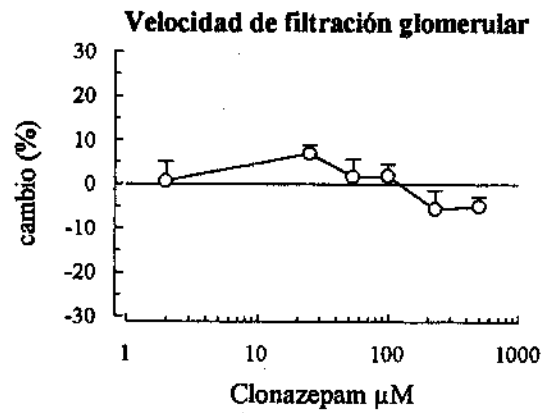
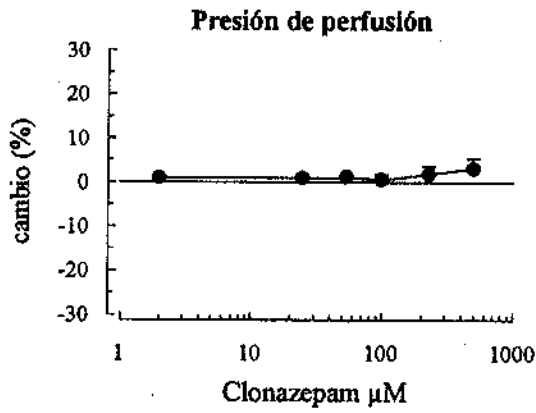


Figura V-7: Efectos de clonazepam sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 períodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de clonazepam. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos.

$\leftrightarrow p < 0.05$ entre las medias señaladas.

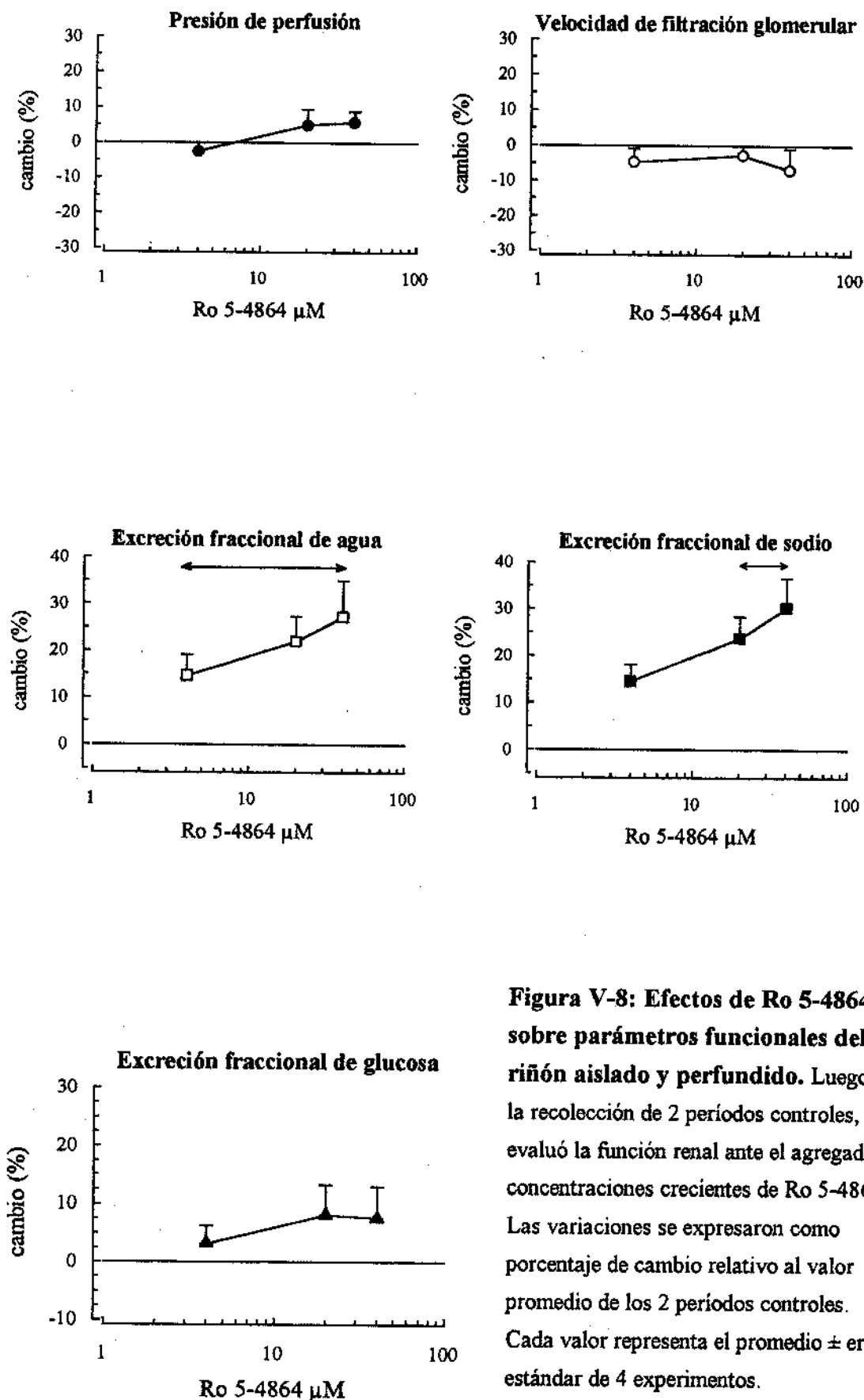


Figura V-8: Efectos de Ro 5-4864 sobre parámetros funcionales del riñón aislado y perfundido. Luego de la recolección de 2 períodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de Ro 5-4864. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 períodos controles. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4 experimentos. $\leftrightarrow p < 0.05$ entre las medias señaladas.

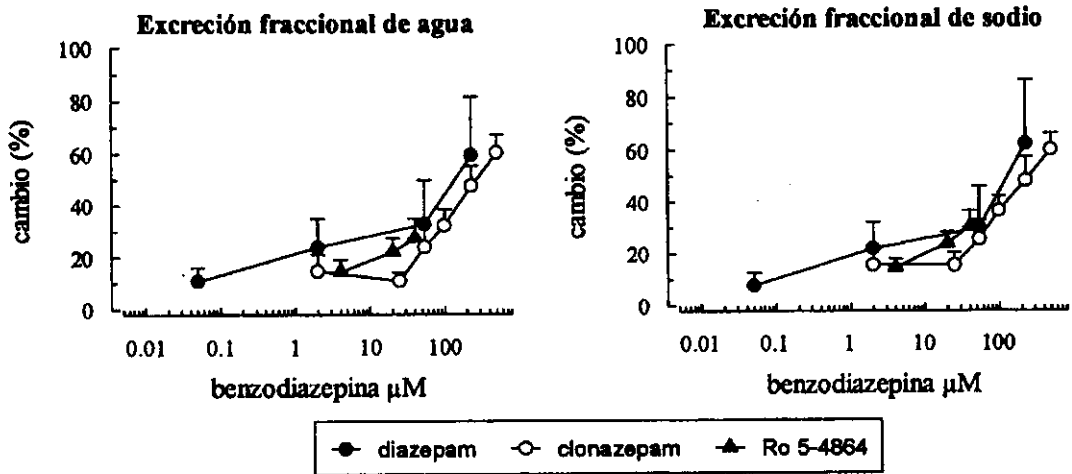


Figura V-9: Efectos de diazepam, clonazepam y Ro 5-4864 sobre las excreciones fraccionales de agua y sodio en el riñón aislado y perfundido. Luego de 2 periodos controles, se evaluó la función renal ante el agregado de concentraciones crecientes de la benzodiazepina en estudio. Las variaciones se expresaron como porcentaje de cambio relativo al valor promedio de los 2 periodos controles.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-6 experimentos.

Los efectos de diazepam sobre la función del riñón aislado son mimetizados tanto por el agonista RCB, clonazepam, como por el ligando selectivo RPB, Ro 5-4864. Este hecho sugiere la participación de RCB y RPB en los efectos mediados por diazepam. Otros autores informaron que Ro 5-4864 induce un aumento de flujo urinario *in vivo*; y este efecto es bloqueado por el antagonista RPB, PK 11195 (295). Estos resultados refuerzan la idea de la mediación de RPB en los efectos tubulares observados en el presente estudio.

2.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN PRESENCIA DE DISTINTOS VASOCONSTRIC- TORES

En las secciones anteriores se ha demostrado que las benzodiazepinas ensayadas no modifican la resistencia vascular del riñón

perfundido en condiciones basales. Para profundizar el estudio de las potenciales propiedades vasoactivas de distintas benzodiazepinas, se evaluaron sus efectos sobre la vasculatura de riñones pretratados con agentes vasoconstrictores.

Estos experimentos se llevaron a cabo según fue descrito en el Cap. II, 4.3.2.2.. La vasoconstricción fue inducida con NA 1 μ M o KCl 40 mM. Luego del período de estabilización en presencia del vasoconstrictor, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de la benzodiazepina. Para esto, se agregaron cantidades acumulativas de la benzodiazepina al medio de perfusión cada 5 min.

En grupos controles adecuados se evaluaron los efectos de los correspondientes volúmenes del vehículo de benzodiazepinas en presencia de NA o KCl.

Los efectos vasculares de las drogas se evaluaron a partir de los cambios inducidos sobre la presión de perfusión, manteniendo el flujo constante. Se consideró 100% de relajación a la inhibición completa de la respuesta vasoconstrictora.

2.2.1. Efectos de diazepam

En este estudio se evaluaron los efectos de la benzodiazepina prototipo, diazepam, sobre la vasculatura del riñón aislado, perfundido con NA o KCl.

2.2.1.1. Tratamientos

Los efectos de concentraciones crecientes de diazepam sobre la vasculatura renal pretratada con NA 1 μ M fueron evaluados en dos grupos experimentales. En un grupo (condición I, n= 7) se agregaron cantidades acumulativas de diazepam al medio de perfusión cada 5 min para lograr las

concentraciones: 0.5, 2, 10, 25, 54, 230 y 580 μM . En otro grupo (condición II, $n=7$), el agregado de diazepam alcanzó las concentraciones: 2, 54, 230 y 580 μM . En el último esquema de agregados, respecto al grupo anterior, se lograron las mayores concentraciones de diazepam luego de un menor tiempo de exposición a la droga.

En otra serie de experimentos ($n=4$), se analizaron los efectos de diazepam sobre la vasculatura de riñones pretratados con KCl 40 mM. Las concentraciones ensayadas fueron: 2, 54, 230 y 580 μM .

2.2.1.2. Resultados

El tratamiento con diazepam provocó una relajación concentración-dependiente de la vasculatura renal precontraída con NA 1 μM . En la Figura V-10 se presenta un registro típico de los efectos de diazepam sobre la presión de perfusión de un riñón pretratado con NA.

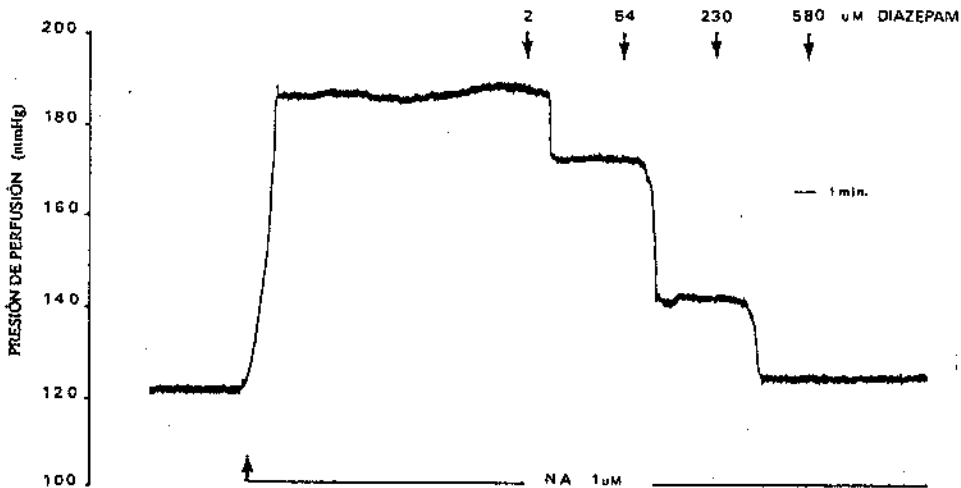


Figura V-10: Registro de los efectos de diazepam sobre la presión de perfusión de un riñón aislado perfundido con noradrenalina. Luego de registrar la presión basal, se permitió un período de estabilización en presencia de NA 1 μM . Se agregaron cantidades acumulativas de diazepam al medio de perfusión, cada 5 min, para lograr las concentraciones 2, 54, 230 y 580 μM y se evaluaron sus efectos sobre la presión de perfusión a flujo constante.

La Figura V-11 presenta la curva de relajación de la vasculatura renal en función de la concentración de diazepam. El efecto máximo logrado con diazepam correspondió a la completa inhibición de la vasoconstricción inducida por NA (Figuras V-10 y V-11).

La relajación de la vasculatura renal, lograda con las concentraciones ensayadas de diazepam, no presentó diferencias estadísticamente significativas según se haya seguido la condición I o la condición II de agregado al medio de perfusión (Figura V-11).

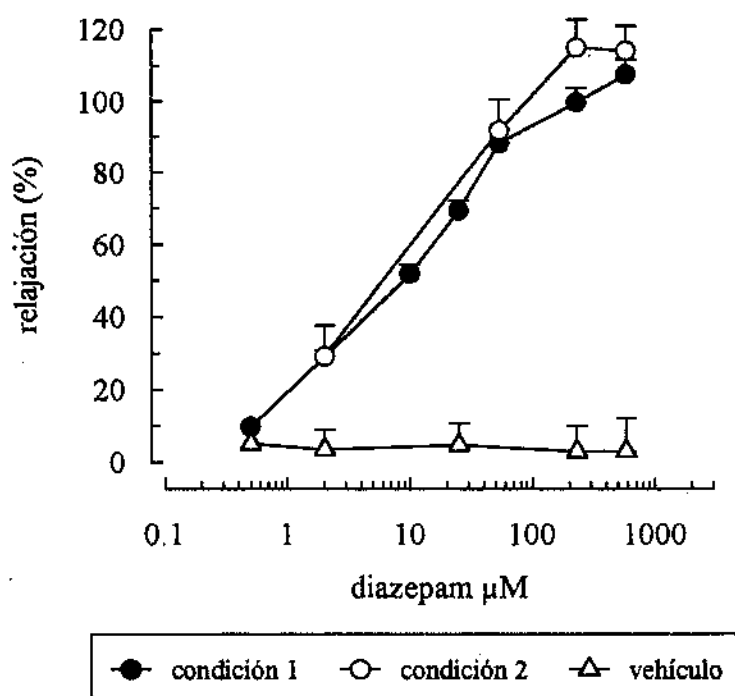


Figura V-11: Efectos de diazepam sobre la vasculatura del riñón aislado pretratado con noradrenalina. Luego de un período de estabilización en presencia de NA 1 µM, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam sobre la presión de perfusión a flujo constante. Se agregaron cantidades acumulativas de diazepam al medio de perfusión, cada 5 min, para lograr las concentraciones 0.5, 2, 10, 25, 54, 230 y 580 µM (Condición I, n= 7) ó 2, 54, 230 y 580 µM (Condición II, n= 7). Se estudiaron los efectos del vehículo (n= 4). La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con NA se consideró 100 % relajación.

Los valores representan la media \pm error estándar.

En los riñones pretratados con KCl 40 mM, la adición de diazepam al medio de perfusión también provocó disminución de la resistencia vascular de manera dependiente de la concentración. Estos resultados se presentan en la Figura V-12.

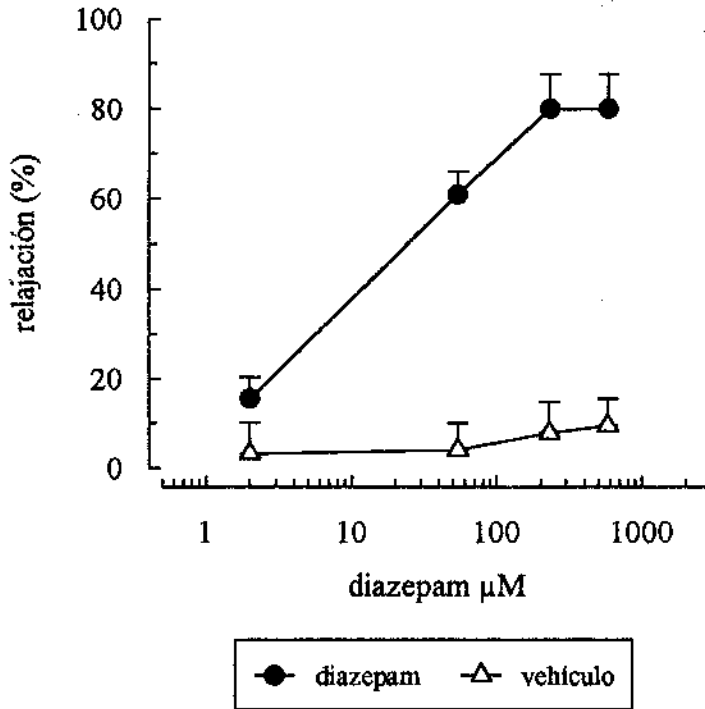


Figura V-12: Efectos de diazepam sobre la vasculatura del riñón aislado pretratado con KCl. Luego de un período de estabilización en presencia de KCl 40 mM, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam sobre la presión de perfusión a flujo constante. Se agregaron cantidades acumulativas de diazepam al medio de perfusión, cada 5 min, para lograr las concentraciones 2, 54, 230 y 580 µM (n= 4). Se estudiaron los efectos de los correspondientes volúmenes de vehículo (n= 3). La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con KCl se consideró 100 % relajación. Los valores representan la media \pm error estándar.

2.2.1.3. Discusión

La información obtenida en estos estudios demuestra que concentraciones micromolares de la benzodiazepina mixta, diazepam, ejercen

una marcada acción relajadora sobre la vasculatura renal precontraída por distintos mecanismos.

En la vasculatura perfundida con NA, la magnitud de la relajación lograda con las concentraciones ensayadas de diazepam no fue modificada por la exposición previa a la droga, ni por el tiempo que la droga se mantuvo en recirculación (condición I vs. condición II). Estos resultados, asociados a la generación de curvas concentración-respuesta, cuando se agregan cantidades acumulativas de diazepam, brindan evidencias de que en el sistema en estudio no se desarrollaría taquifilaxia a esta droga; y que el procesamiento renal de la misma, en el tiempo experimental, no modificaría significativamente la magnitud de sus efectos.

En investigaciones realizadas por otros autores se ha demostrado que concentraciones micromolares de benzodiazepinas son capaces de relajar anillos de aorta de rata pretratados con distintos vasoconstrictores (118, 176). Efectos similares se han observado con β -carbolinas (177). En preparaciones de corazón aislado y perfundido de rata se ha encontrado que la benzodiazepina Ro 5-4864 induce aumento del flujo coronario (175). La acción vasorrelajadora de benzodiazepinas también se ha demostrado en arterias y venas umbilicales humanas (178). Además del músculo liso vascular, las benzodiazepinas son capaces de relajar otros músculos lisos, como el de útero (182), vas deferens (179, 180) y duodeno (180).

En este estudio se ha observado que diazepam es capaz de relajar, en el mismo rango de concentraciones, la vasculatura del riñón aislado perfundido tanto con NA como con KCl. Estos resultados sugieren la existencia de más de un mecanismo de acción involucrado en la vasorelajación renal inducida por benzodiazepinas.

En estudios realizados por otros autores se han propuesto algunos mecanismos en la mediación de los efectos de benzodiazepinas sobre diferentes tipos de músculos lisos. Se ha sugerido que los efectos relajadores

de estos agentes en aorta aislada de rata podrían estar mediados por la inhibición de canales de calcio operados por voltaje (118). Otro grupo de investigación ha demostrado que distintos ligandos benzodiazepínicos de receptores periféricos disminuyen la actividad de fosfodiesterasas, y el consecuente aumento de nucleótidos cíclicos podría ser responsable de la inhibición de las contracciones provocadas por NA (176). Se ha descrito que, en vas deferens, las benzodiazepinas provocan inhibición del sistema de captación de adenosina (179) y reducción del influjo de calcio (180).

2.2.2. Participación del GMPc en los efectos mediados por diazepam sobre la vasculatura renal

En estos estudios se evaluó el posible rol de GMPc en la vasorrelajación renal inducida por diazepam.

2.2.2.1. Tratamientos

Estos estudios se llevaron a cabo según se describió en el Capítulo II, 4.3.2.3.6.. Luego del período basal y de la estabilización en presencia de NA 1 μM , se evaluaron los efectos sobre la presión de perfusión de las siguientes concentraciones de diazepam: 2, 54 y 230 μM . Durante el período basal, una vez estabilizados el flujo y la presión de perfusión y 20 min previo al agregado de NA, se adicionó azul de metileno ($n=4$) al medio de perfusión para alcanzar una concentración 10 μM .

Los resultados de este estudio fueron comparados con los obtenidos al evaluar los efectos de diazepam en ausencia de azul de metileno (sección 2.2.1. de este Capítulo, diazepam condición II, $n=7$).

2.2.2.2. Resultados

Durante la perfusión en condiciones basales, el agregado de azul de metileno provocó un significativo aumento en la presión de perfusión renal (Basal= 123 ± 8 ; Azul de metileno= 149 ± 12 mmHg; $p < 0.05$).

Los efectos de diazepam sobre la vasculatura precontraída del riñón perfundido en presencia de azul de metileno se presenta en la Figura V-13. El pretratamiento con este agente provocó una significativa disminución de la respuesta relajadora inducida por diazepam.

2.2.2.3. Discusión

El aumento de la presión de perfusión basal inducido por el agregado de azul de metileno podría considerarse como una evidencia de la inhibición de actividad de guanilato ciclasa.

El pretratamiento con azul de metileno provocó una inhibición parcial de la respuesta relajadora inducida por diazepam. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados con aorta de rata, en los cuales la presencia de azul de metileno disminuyó el efecto inhibitor de ligandos RPB sobre las contracciones inducidas por NA (176).

La información obtenida en este estudio sugiere que un sistema regulador dependiente de GMPc podría estar involucrado en la vasodilatación renal observada con diazepam.

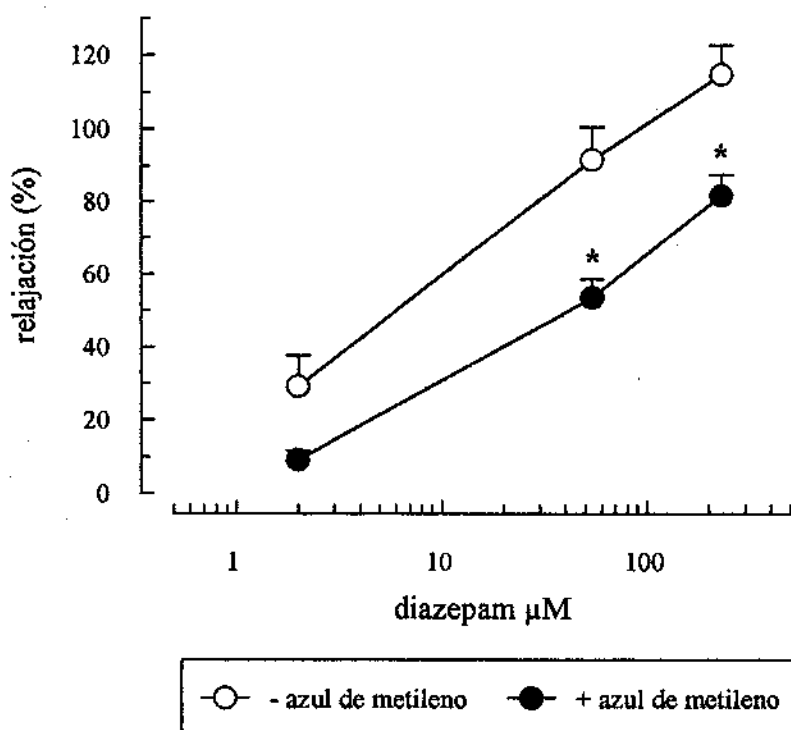


Figura V-13: Efectos de diazepam sobre la vasculatura del riñón aislado perfundido en ausencia y en presencia de azul de metileno. Durante el período basal, una vez estabilizados el flujo y la presión de perfusión y 20 min antes del agregado de NA, se adicionó azul de metileno (+ azul de metileno, n= 4) al medio de perfusión para alcanzar una concentración 10 μM. Luego del período de estabilización en presencia de NA 1 μM, se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam sobre la presión de perfusión a flujo constante. La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con NA se consideró 100 % relajación. Estos datos se compararon con los obtenidos en ausencia de azul de metileno (- azul de metileno, n= 7).

Los valores representan la media ± error estándar.

* p < 0.05 comparado con el respectivo valor en ausencia de azul de metileno.

2.2.3. Participación del NO en los efectos mediados por diazepam sobre la vasculatura renal

El NO media las acciones vasodilatadoras de distintas drogas y compuestos endógenos (270-272). Weissman y col. (296) informaron que el ³H-Ro 5-4864 es desplazado de RPB en membranas de corazón, riñón y

cerebro de cobayo por nitroprusiato de sodio, a temperaturas que liberan NO. Estas evidencias sugieren una posible interacción entre los sistemas benzodiazepinérgico y nitrérgico.

Estos experimentos se dirigieron a testear la posibilidad de que el NO desempeñe un rol en la vasodilatación renal inducida por diazepam. Con este propósito se evaluaron los efectos de diazepam sobre la vasculatura renal pretratada con NA en presencia de L-NNA, inhibidor de la síntesis de NO.

2.2.3.1. Tratamientos

Estos estudios se llevaron a cabo según se describió en el Capítulo II, 4.3.2.3.7.. Luego del período basal y de la estabilización en presencia de NA 1 μM , se evaluaron los efectos sobre la presión de perfusión de las siguientes concentraciones de diazepam: 2, 54 y 230 μM . Durante el período basal, una vez estabilizados el flujo y la presión de perfusión y 20 min previo al agregado de NA, se adicionó L-NNA (n= 4), para lograr una concentración 30 μM en el medio de perfusión.

Los resultados de este estudio fueron comparados con los obtenidos al evaluar los efectos de diazepam en ausencia de L-NNA (sección 2.2.1. de este Capítulo, diazepam condición II, n= 7).

2.2.3.2. Resultados

Durante el período basal, el agregado de L-NNA provocó un significativo aumento en la presión de perfusión (Basal= 125 ± 2 ; L-NNA= 141 ± 5 mmHg, $p < 0.05$).

La Figura V-14 muestra que la perfusión previa con L-NNA es capaz de disminuir el efecto relajador sobre la vasculatura renal mediado por diazepam.

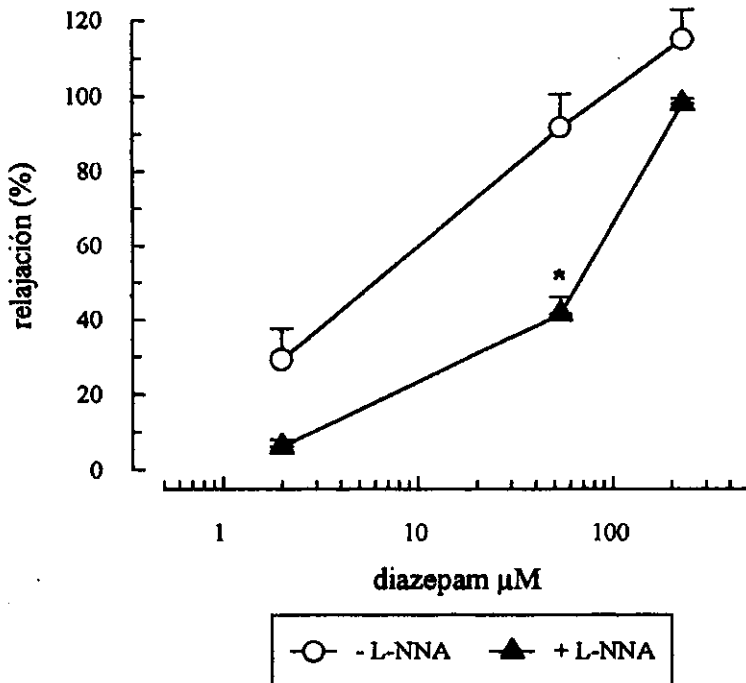


Figura V-14: Efectos de diazepam sobre la vasculatura del riñón aislado perfundido en ausencia y en presencia de L-NNA. Durante el período basal, una vez estabilizados el flujo y la presión de perfusión y 20 min antes del agregado de NA, se adicionó L-NNA (+ L-NNA, n= 4) al medio de perfusión para alcanzar una concentración 30 μM . Luego del período de estabilización en presencia de NA 1 μM , se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam sobre la presión de perfusión a flujo constante. La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con NA se consideró 100 % relajación. Estos datos se compararon con los obtenidos en ausencia de L-NNA (- L-NNA, n= 7).

Los valores representan la media \pm error estándar.

* $p < 0.05$ comparado con el respectivo valor en ausencia de L-NNA.

2.2.3.3. Discusión

En este estudio se ha evaluado la posible participación del vasodilatador endógeno, NO, en la relajación de la vasculatura renal inducida por diazepam. La herramienta farmacológica utilizada con este propósito, L-NNA, provocó un aumento de la resistencia vascular en los riñones perfundidos en condiciones basales. Estos resultados pueden interpretarse

como una evidencia indirecta de la inhibición de las acciones de NO en estas preparaciones.

Cuando se evaluó la respuesta de la vasculatura renal a diazepam en presencia de L-NNA, se encontró una disminución en la capacidad relajadora de esta benzodiazepina. Este hallazgo señala la probabilidad de que el NO desempeñe un rol en las acciones que median el efecto vasodilatador de diazepam sobre la vasculatura renal.

2.2.4. Efectos de clonazepam y Ro 5-4864

En estos estudios se evaluaron los efectos de las benzodiazepinas selectivas clonazepam, agonista RCB, y Ro 5-4864, agonista RPB.

2.2.4.1. Tratamientos

Se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes de clonazepam ($n = 4$) o Ro 5-4864 ($n = 4$) sobre la presión de perfusión de riñones pretratados con NA $1 \mu\text{M}$, según se describió en Capítulo II, 4.3.2.3.4.. Las concentraciones ensayadas fueron: 2, 25, 54, 100, 230 y $500 \mu\text{M}$ para clonazepam, y 5, 25, 50, 100 y $150 \mu\text{M}$ para Ro 5-4864. Los resultados obtenidos con clonazepam y Ro 5-4864 fueron comparados con los del agonista mixto diazepam.

2.2.4.2. Resultados

En la Figura V-15 se observa que ambas benzodiazepinas, clonazepam y Ro 5-4864, son capaces de provocar una relajación concentración-dependiente de la vasculatura del riñón aislado perfundido con NA. En la misma figura se incluye la curva de relajación lograda con diazepam.

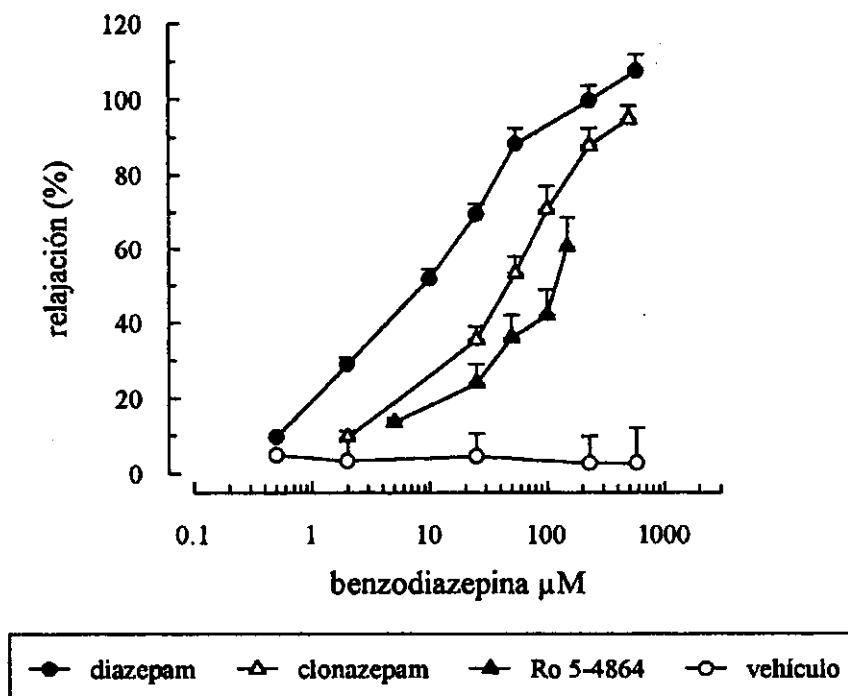


Figura V-15: Efectos de diazepam, clonazepam y Ro 5-4864 sobre la vasculatura del riñón aislado pretratado con noradrenalina. Luego de un período de estabilización en presencia de NA 1 μM , se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam ($n=7$), clonazepam ($n=4$) y Ro 5-4864 ($n=4$) sobre la presión de perfusión a flujo constante. Se estudiaron los efectos del vehículo ($n=4$). La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con NA se consideró 100 % relajación. Los valores representan la media \pm error estándar.

Cuando se compararon los $\log CE_{35}$, se encontró el siguiente orden de potencias para las benzodiazepinas estudiadas: diazepam > clonazepam > Ro 5-4864 (Tabla V-7).

2.2.4.3. Discusión

Estos estudios demuestran que el agonista central, clonazepam, y el agonista periférico, Ro 5-4864, son capaces de mimetizar, aunque con menor potencia, el efecto vasorrelajador del agonista mixto diazepam. Esta propiedad de las benzodiazepinas selectivas también se ha descrito para los

Tabla V-7: Potencias relativas de diazepam, clonazepam y Ro 5-4864 para relajar la vasculatura del riñón aislado pretratado con noradrenalina

	CE₃₅ (log μ M)
Diazepam	0.49 \pm 0.04
Clonazepam	1.39 \pm 0.05 **
Ro 5-4864	1.77 \pm 0.19 ** <i>f</i>

Las CE₃₅ fueron calculadas a partir de las curvas dosis-respuesta gradual mediante el programa Pharmacologic Calculation System 4.0.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-7 experimentos.

** p < 0.01 comparado con diazepam

f p < 0.05 comparado con clonazepam

efectos diurético y natriurético (2.1.2.). Estos resultados sugieren la posible participación de ambos tipos de receptores, RCB y RPB, en los efectos mediados por diazepam. En este sentido, se ha descrito la presencia de RPB en músculo liso vascular de rata (123, 124). La afinidad de los ligandos periféricos para estos sitios de unión se encuentra en el rango nanomolar, en tanto que los efectos vasorrelajadores descritos por otros autores (118, 176), y en este trabajo, se manifiestan en el rango micromolar de concentraciones. Una explicación a este fenómeno podría ser la diferencia en las condiciones experimentales entre los ensayos de unión de ligandos y los estudios fisiológicos. Gavish y Fares (297) demostraron que la congelación y descongelación o el tratamiento con detergentes aumenta la afinidad de los RPB en riñón de rata, sugiriendo un cambio conformacional de estos sitios de unión o la liberación de un ligando endógeno estrechamente unido a ellos. Además se ha descrito que las temperaturas fisiológicas reducen la afinidad de los RPB (298).

2.2.5. Efectos de flumazenil

La benzodiazepina flumazenil es el antagonista prototipo de RCB (299, 300). Sin embargo, en algunas situaciones experimentales, se ha descrito que este compuesto presenta actividad intrínseca positiva (301-303).

En este estudio se evaluó la respuesta a flumazenil de la vasculatura renal precontraída con NA.

2.2.5.1. Tratamientos

Se estudiaron los efectos de concentraciones crecientes de flumazenil ($n=4$) sobre la presión de perfusión de riñones tratados con NA $1\ \mu\text{M}$, según se describió en el Capítulo II, 4.3.2.3.4.. Las concentraciones ensayadas fueron: 0.2, 2, 10, 25, 50, 200 y $500\ \mu\text{M}$.

2.2.5.2. Resultados

En la Tabla V-8 se presenta la respuesta de la vasculatura renal en presencia de concentraciones crecientes de flumazenil. El tratamiento con este agente no provocó modificaciones significativas en la resistencia vascular del riñón pretratado con NA. La ausencia de efecto del vehículo puede observarse en las Figuras V-11 y V-15.

2.2.5.3. Discusión

En secciones anteriores de este capítulo se ha descrito el efecto vasorrelajador renal para distintas benzodiazepinas: diazepam, agonista mixto, clonazepam, agonista central, y Ro 5-4864, agonista periférico. En este estudio se demuestra que concentraciones micromolares de la benzodiazepina flumazenil, antagonista RCB, no es capaz de reducir la resistencia vascular en riñones pretratados con NA. En experimentos

Tabla V-8: Efectos de flumazenil sobre la vasculatura del riñón aislado pretratado con noradrenalina

	Control	NA	Flumazenil (μM)						
			0.2	2	10	25	50	200	500
Presión de perfusión (mmHg)	126 \pm 3	233 \pm 4	232 \pm 5	232 \pm 5	232 \pm 7	233 \pm 6	227 \pm 4	231 \pm 8	230 \pm 5

Luego de un periodo basal se permitió la estabilización en presencia de NA 1 μM . Se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de flumazenil ($n=4$) sobre la presión de perfusión a flujo constante.

Los valores representan la media \pm error estándar.

realizados con otros tejidos periféricos, se ha descrito la incapacidad de flumazenil para provocar los efectos observados con diazepam, Ro 5-4864 o clonazepam (168, 178, 182).

El hecho de que el antagonista central flumazenil, compuesto con núcleo benzodiazepínico en su estructura molecular, no mimetice los efectos de las benzodiazepinas agonistas, acumula evidencias de que en la vasorrelajación renal inducida por benzodiazepinas estarían involucrados sitios de unión específicos.

2.2.6. Efectos de diazepam y clonazepam en presencia de flumazenil

Ante la incapacidad de flumazenil de mimetizar los efectos de las benzodiazepinas agonistas sobre la vasculatura renal, resultó de interés evaluar la posible influencia de este antagonista RCB sobre las respuestas a diazepam y clonazepam.

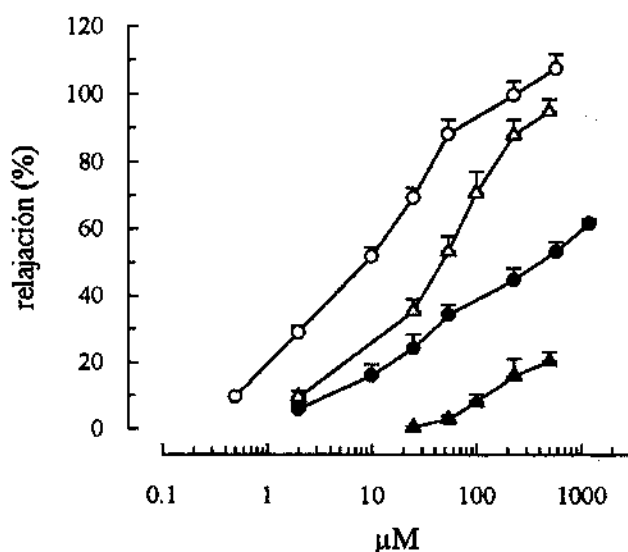
2.2.6.1. Tratamientos

Estos experimentos se realizaron según fue descrito en el Capítulo II, 4.3.2.3.5.. Se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam (n= 4) o clonazepam (n= 4) sobre la presión de perfusión de riñones pretratados con NA 1 μ M. En estos experimentos se agregó flumazenil al medio de perfusión, para alcanzar una concentración 10 μ M, 10 min antes del agregado de NA. Las concentraciones de diazepam ensayadas fueron: 0.5, 2, 10, 25, 54, 230, 580 y 1200 μ M; y las de clonazepam: 2, 25, 54, 100, 230 y 500 μ M. Los resultados de este estudio se compararon con los obtenidos en los experimentos realizados con diazepam y clonazepam en ausencia de flumazenil (secciones 2.2.1. y 2.2.4. de este capítulo, respectivamente).

2.2.6.2. Resultados

La presión de perfusión basal (123 ± 1 mmHg) de los riñones utilizados en estos experimentos (n= 8) no fue modificada por el agregado de flumazenil al medio de perfusión (122 ± 3 mmHg).

En la Figura V-16 se presentan las curvas concentración-respuesta para diazepam y clonazepam, en ausencia y en presencia de flumazenil. Se observa que el pretratamiento con flumazenil provoca un desplazamiento hacia la derecha de ambas curvas.



—○— diazepam —●— diazepam + flumazenil —△— clonazepam —▲— clonazepam + flumazenil

Figura V-16: Efectos de diazepam y clonazepam sobre la vasculatura renal en ausencia y en presencia de flumazenil. Luego de un período de estabilización en presencia de NA 1 μM , se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de diazepam ($n=7$) y clonazepam ($n=4$) sobre la presión de perfusión a flujo constante. En otra serie de experimentos se repitieron las curvas para diazepam ($n=4$) y clonazepam ($n=4$) en presencia de flumazenil. Flumazenil fue agregado al medio de perfusión, para alcanzar una concentración 10 μM , 10 min antes del agregado de NA. La ausencia de efectos del vehículo puede observarse en las Figuras V-11 y V-15. La inhibición completa de la vasoconstricción lograda con NA se consideró 100 % relajación.

Los valores representan la media \pm error estándar.

Cuando se calcularon los $\log \text{CE}_{35}$, para diazepam y clonazepam, se encontró un significativo aumento en los grupos pretratados con flumazenil (Tabla V-9).

Tabla V-9: Potencias relativas de diazepam y clonazepam para relajar la vasculatura del riñón aislado pretratado con noradrenalina, en ausencia y en presencia de flumazenil.

	CE₃₅ (log μ M)
Diazepam	0.49 \pm 0.04
Diazepam + Flumazenil	1.85 \pm 0.18 **
Clonazepam	1.39 \pm 0.05
Clonazepam + Flumazenil	> 3

Las CE₃₅ fueron calculadas a partir de las curvas dosis-respuesta gradual mediante el programa Pharmacologic Calculation System 4.0.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar de 4-7 experimentos.

** p < 0.01 comparado con diazepam

2.2.6.3. *Discusión*

Estos experimentos demuestran que el antagonista RCB, flumazenil, antagoniza la relajación de la vasculatura renal inducida por diazepam o clonazepam. En primera instancia este hallazgo sugeriría la participación de RCB en este efecto mediado por benzodiazepinas. Sin embargo, Beaumont y col. (226), mediante estudios de unión de ligandos a membranas de riñón de rata, demostraron la baja potencia de clonazepam para desplazar a ³H-flunitrazepam, indicando que los autorradiogramas obtenidos en ese trabajo representan la unión específica de RPB. En otras investigaciones se ha observado que, a pesar de la ausencia o baja densidad de RCB en tejidos periféricos (110), el efecto inotrópico negativo de diazepam es antagonizado tanto por PK 11195 como por flumazenil en preparados de ventrículos de rata (168). Estas evidencias parecerían señalar

una discrepancia entre los resultados obtenidos en los estudios farmacológicos y en los de caracterización de receptores. En la bibliografía se describen distintas situaciones experimentales, para ensayos de saturación y desplazamiento de radioligandos, que limitan la detección de poblaciones heterogéneas de receptores, o dificultan la estimación de la proporción real de los receptores existentes (304).

Además de los RCB y RPB, se ha descrito la existencia de otro tipo de sitio de unión a benzodiazepinas. Este receptor a benzodiazepinas de baja afinidad (micromolar), que se ha identificado en cerebro de rata, regula los canales de calcio sensibles a voltaje en preparaciones de sinaptosomas (101). Estas evidencias permiten especular que algún tipo de sitio de unión a benzodiazepinas, diferente de los RPB descritos en riñón (226), podría estar involucrado en la relajación de la vasculatura renal inducida por benzodiazepinas.

La metodología utilizada en este trabajo no permite testear esta posibilidad. Sin embargo, la información obtenida, respecto a la capacidad de flumazenil para antagonizar los efectos de diazepam y clonazepam sobre la vasculatura renal, refuerza la hipótesis de que las acciones de benzodiazepinas estarían mediadas por la interacción con un sitio receptor específico.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en estos estudios brindan evidencias que permiten incluir al riñón en la lista de órganos periféricos que son blanco para las acciones de drogas GABAérgicas y benzodiazepinas.

1.1. AGONISTAS GABAÉRGICOS

La evaluación de los efectos de agonistas GABAérgicos sobre la función renal se llevó a cabo mediante la utilización del modelo de riñón aislado y perfundido. Los agonistas estudiados fueron: GABA (0.05-1000 μ M), agonista común GABA_A y GABA_B; muscimol (0.1-75 μ M), agonista GABA_A; y baclofen (0.05-500 μ M), agonista GABA_B. Las concentraciones de muscimol y de baclofen ensayadas en este trabajo se encuentran dentro del rango de concentraciones utilizadas en otros estudios (45, 47, 48, 78), cuyos resultados fueron interpretados como efectos mediados por receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente. Además, se estudiaron los efectos del antagonista GABA_A, bicuculina (50 μ M).

El tratamiento con GABA provocó un aumento concentración-dependiente de la presión de perfusión del riñón aislado perfundido a flujo constante. El agonista selectivo GABA_B, baclofen, también indujo un incremento en la resistencia vascular, a la que se asoció una reducción en la

velocidad de filtración glomerular. El agonista GABA_A, muscimol, no modificó la hemodinamia renal en condiciones basales, ni en riñones pretratados con noradrenalina. Estos resultados indican que la vasoconstricción inducida por GABA estaría mediada por la activación de receptores GABA_B. El efecto de baclofen sobre la velocidad de filtración glomerular sugiere que la acción vasoconstrictora de este agente se ejerce preferencialmente sobre la vasculatura preglomerular o glomerular. La posible localización de receptores GABA_B a nivel glomerular en el riñón de rata (225) concuerda con esta sugerencia. El agonista común GABA no fue capaz de disminuir la velocidad de filtración glomerular, como lo hizo el agonista selectivo baclofen. Cuando se evaluaron los efectos de GABA en presencia del antagonista GABA_A, bicuculina, se observó un mayor incremento, respecto de la perfusión con GABA solo, en la presión de perfusión y una disminución concentración-dependiente en la velocidad de filtración glomerular. Este hallazgo refuerza la hipótesis de la participación de receptores GABA_B en el aumento de la resistencia vascular renal inducido por GABA. Además, sugiere que esta vasoconstricción estaría contrarrestada, en parte, por la activación de receptores GABA_A, lo que evitaría la disminución de velocidad de filtración glomerular cuando se perfunde con el agonista común GABA. Mediante técnicas autorradiográficas, no se localizaron receptores GABA_A en elementos vasculares de riñón de rata (224). Por lo tanto, es probable que esta influencia dilatadora de receptores GABA_A esté mediada por algún agente intermediario.

En una serie de experimentos realizados en condiciones basales, el agregado de bicuculina al medio de perfusión indujo un aumento en la resistencia vascular renal. La capacidad del riñón de responder al bloqueo de receptores GABA surge como evidencia de que el sistema GABAérgico podría estar involucrado en el mantenimiento de la función basal del órgano.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la activación endógena de receptores GABA_A tendría un rol en la modulación del tono basal de la vasculatura del riñón aislado.

De los resultados descriptos en los párrafos anteriores surge que el efecto vasoconstrictor de GABA sobre el riñón aislado y perfundido estaría mediado por la activación de receptores GABA_B. La estimulación de receptores GABA_A parece ejercer una acción moduladora que inhibiría parcialmente esa vasoconstricción. Este rol atribuible a los receptores GABA_A se pone en evidencia por el bloqueo con el antagonista selectivo bicuculina, en situaciones en que se encuentran activados ambos tipos de receptores, GABA_A y GABA_B, ya sea por acción del GABA endógeno o del adicionado al medio de perfusión. Sin embargo, cuando se produce la estimulación selectiva de receptores GABA_A, mediante el agregado de muscimol al medio de perfusión en condiciones basales o en presencia de NA, no se observan respuestas vasculares. El hecho de que muscimol no sea capaz de modificar la resistencia vascular renal probablemente se debe, como ha sido interpretado por otros autores (53) ante la obtención de resultados comparables a los del presente estudio, a que el GABA endógeno es capaz de alcanzar la estimulación máxima de estos procesos GABAérgicos. En base a esta hipótesis, si el GABA endógeno lograra la activación máxima de los receptores GABA_A, podría esperarse que las respuestas vasculares al GABA exógeno fueran comparables a las observadas con el agregado del agonista GABA_B, baclofen. Sin embargo, cuando se compara con los efectos de GABA, baclofen provoca un aumento más marcado de la resistencia vascular, al que se asocia una disminución en el filtrado glomerular. Estas evidencias señalan una influencia dilatadora mediada por receptores GABA_A cuando se perfunde con el agonista común, GABA. Los resultados obtenidos con baclofen y la incapacidad de la vasculatura renal de responder a muscimol indican que la acción vasodilatadora vía receptores GABA_A no se infiere de

las respuestas a agonistas selectivos. Estas evidencias, en conjunto, permiten especular que la modulación de la función vascular mediada por receptores GABA_A probablemente requiera la activación común de ambos subtipos de receptores, GABA_A y GABA_B.

En el presente estudio se han acumulado evidencias que señalan la posible participación del sistema GABAérgico en los mecanismos de modulación local del tono de la vasculatura renal.

Además de los efectos sobre la vasculatura del riñón aislado, los agonistas GABAérgicos provocaron modificaciones en los procesos de transporte tubular. La diuresis y natriuresis inducidas por el agonista común GABA y el agonista GABA_B, baclofen, podrían ser consideradas como respuesta a los efectos vasculares. Sin embargo, no se descartan probables efectos directos sobre estructuras tubulares, independientes de los cambios hemodinámicos provocados por estos agentes. Ambos agonistas, GABA y baclofen, inhiben la capacidad reabsortiva de glucosa de manera concentración-dependiente. Este transporte no es afectado por el agonista GABA_A, muscimol, lo que sugiere que la reabsorción proximal de glucosa estaría alterada por mecanismos mediados por receptores GABA_B. En este sentido, se ha informado la localización de receptores GABA_B en estructuras tubulares de la corteza de riñón de rata (225).

Los efectos tubulares de muscimol se caracterizaron por un aumento en las excreciones fraccionales de agua y sodio, sin alteraciones en el manejo de glucosa. El tratamiento con este agonista no modificó los parámetros hemodinámicos estudiados. Por lo tanto, es probable que la disminución de la capacidad reabsortiva se deba a acciones directas de muscimol sobre los mecanismos de transporte del nefrón distal. Debido a la presencia en células epiteliales de niveles significativos de GABA y sus enzimas relacionadas, y de sistemas de captación de GABA, se ha sugerido la existencia de un sistema GABA no neuronal a nivel tubular (54). Mediante técnicas

autorradiográficas se encontró que los receptores GABA_A se localizan en túbulos contorneados corticales y túbulos colectores del riñón de rata (224). Estas evidencias, en conjunto, permiten postular una posible participación del sistema GABAérgico en la modulación, vía receptores GABA_A, de los mecanismos de transporte en el epitelio tubular renal.

La disminución en la capacidad de reabsorber agua y sodio inducida por muscimol no se observó en los riñones pretratados con el antagonista muscarínico, atropina. Estos resultados sugieren la participación de un mecanismo colinérgico en la modulación del transporte tubular mediada por receptores GABA_A. En este sentido, se ha descrito que acetilcolina ejerce acciones diuréticas y natriuréticas (288). Otros autores (3, 49, 71, 78) han encontrado evidencias del posible rol del sistema colinérgico en distintos mecanismos periféricos dependientes de la activación de receptores GABA_A, incluyendo la alteración del transporte de iones en el epitelio intestinal (53). Además de diuresis y natriuresis (288), acetilcolina induce relajación de la vasculatura renal (211, 269). Estas evidencias permiten postular que acetilcolina también podría actuar como el hipotético agente intermediario en las acciones dilatadoras mediadas por estímulo GABA_A, puestas de manifiesto en los estudios realizados con bicuculina.

En los últimos años se han acumulado numerosas evidencias de la presencia de distintos elementos constitutivos del sistema GABAérgico a nivel renal (Capítulo I, 3.2.). La capacidad de respuesta del riñón ante distintos agonistas y antagonistas GABA, refuerza la idea de la participación del sistema GABAérgico en la regulación de la función renal. Los resultados de este trabajo, en conjunto, permiten sugerir la potencial relevancia del sistema GABAérgico ante estímulos fisiológicos (o fisiopatológicos) que pudieran aumentar la disponibilidad renal de GABA, con el consecuente incremento en la presión de perfusión renal, asociado a diuresis, natriuresis y preservación de la principal función glomerular. Un estudio más profundo de

los mecanismos involucrados en estos efectos, y su posible significado en distintas situaciones clínicas, podría brindar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas; o señalar posibles precauciones en la administración de agentes GABAérgicos cuando se encuentra comprometida la función renal.

1.2. BENZODIAZEPINAS

Las respuestas renales a benzodiazepinas se evaluaron mediante el empleo de distintos modelos experimentales. En una primera etapa se estudiaron los efectos *in vivo* de la benzodiazepina prototipo diazepam (0.1-10 mg/kg). La función renal se evaluó mediante técnicas convencionales de clearance durante infusión continua.

La administración i.v. de todas las dosis ensayadas de diazepam provocó una significativa disminución de la presión arterial. Este efecto, que también se observa en humanos luego de la administración i.v. de 0.1-1 mg/kg de diazepam, se ha atribuido a la disminución del trabajo del ventrículo izquierdo y del gasto cardíaco provocados por esta droga (187).

A pesar de la caída de la presión arterial, los valores de C_{PAH} y filtrado glomerular no resultaron modificados por el tratamiento con diazepam. Por lo tanto, los efectos de esta benzodiazepina sobre los parámetros de función tubular, manifestados como un aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y potasio, no serían consecuencia de cambios en la hemodinamia renal. Esta alteración en la reabsorción de agua y electrolitos parecería estar mediada por influencias de la droga sobre los mecanismos de transporte de estructuras distales, ya que se conserva la capacidad de reabsorber glucosa. Debido a que la administración de diazepam no afectó la relación entre excreción fraccional de potasio y excreción fraccional de sodio, podría interpretarse que el aumento en

excreción de potasio se debería a una mayor secreción del ion ante el aumento en la carga de sodio que alcanza la luz del túbulo distal y conducto colector.

Estas respuestas tubulares se encontraron acompañadas por un decremento en la relación U_{osm}/P_{osm} . Esta evidencia, que indica una disminución en la capacidad de concentrar la orina, brinda apoyo a la propuesta de que diazepam ejercería sus acciones, preferencialmente, sobre el nefrón distal. El tratamiento con esta benzodiazepina no modificó el C_{osm} , lo que sugiere que es poco probable que se encuentre alterado el transporte a nivel del asa ascendente de Henle. Sin embargo, la disminución en la reabsorción de agua libre observada indica que diazepam podría condicionar la función del túbulo colector. Este efecto podría ser consecuencia de acciones directas sobre estructuras renales o de acciones indirectas de la droga. Una línea de evidencias sugiere que las acciones centrales de benzodiazepinas inhiben la liberación de ADH (55, 293), lo que explicaría los efectos de diazepam sobre la concentración de la orina. Sin embargo, no puede descartarse la probabilidad de que diazepam modifique los efectos de vasopresina sobre el riñón. En una serie de experimentos realizados en el presente estudio, se evaluaron los efectos de diazepam en presencia de una dosis máxima del análogo de vasopresina, desmopresina. El pretratamiento de los animales con desmopresina no previno la disminución en la reabsorción de agua libre inducida por diazepam. Estos resultados sugieren que, independientemente de los probables efectos sobre la liberación de vasopresina, las acciones de diazepam modificarían la respuesta tubular a esta hormona.

Otros autores evaluaron los efectos *in vivo* de distintas benzodiazepinas sobre algunos parámetros de función renal. Hathaway y col. (305) informaron que clordiazepóxido disminuyó el volumen de orina, el filtrado glomerular y la excreción urinaria de electrolitos en el riñón

inervado. Flurazepam fue capaz de provocar estos efectos en el riñón denervado, sugiriendo una acción renal más directa para esta benzodiazepina. En otro estudio, realizado por Basile y col. (295), se estudiaron los efectos de la administración crónica de Ro 5-4864, PK 11195 y clonazepam. El tratamiento con Ro 5-4864 indujo un aumento en el volumen de orina, en la excreción de sodio y cloruro y en la densidad de RPB en tejido renal. PK 11195 y clonazepam no alteraron ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo la co-administración de PK 11195 bloqueó todos los efectos inducidos por Ro 5-4864, sugiriendo que dichos efectos requieren la ocupación de RPB. Mientras que clonazepam sólo suprimió parcialmente el aumento en volumen de orina producido por Ro 5-4864; probablemente, según sugirieron los autores, por interacción a nivel de sistema nervioso central de ambas benzodiazepinas.

Los resultados descriptos por estos autores, junto con la información obtenida en el presente estudio, indican que los efectos de benzodiazepinas sobre la función renal *in vivo* dependerían de las condiciones experimentales empleadas en los estudios. Sin embargo, cuando se ensayan los efectos de distintas benzodiazepinas en el mismo modelo experimental, se observa que la selectividad de las benzodiazepinas parecería ser un factor determinante en la inducción de cambios renales, lo que surge como evidencia de la participación de receptores a benzodiazepinas, probablemente RPB (295). Además, se advierte que las alteraciones en la función del riñón provocadas por benzodiazepinas serían consecuencia de mecanismos complejos, que involucran acciones extrarrenales de estas drogas.

Con el objetivo de estudiar los probables efectos directos de benzodiazepinas sobre la función renal, se utilizó el modelo de riñón aislado y perfundido. En estos experimentos se evaluaron las respuestas del órgano a diazepam (0.05-230 μM), clonazepam (2-500 μM) y Ro 5-4864 (4-40 μM). El tratamiento con diazepam provocó un aumento concentración-dependiente

en las excreciones fraccionales de agua y sodio, preservando la capacidad de reabsorber glucosa. Los efectos tubulares no se asociaron a cambios en la presión de perfusión, ni en la velocidad de filtración glomerular. Estos resultados, que concuerdan con los obtenidos en los estudios realizados en el animal intacto, brindan apoyo a la idea de que las acciones tubulares de diazepam no responderían a cambios hemodinámicos y se ejercerían sobre estructuras distales del nefrón. La localización de RPB en elementos tubulares del riñón de rata (226) refuerza la propuesta de acciones directas de la droga a este nivel. Los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* señalaron al túbulo colector, cuya principal función es la concentración de la orina, como blanco probable de las acciones de diazepam. Dentro de las características tubulares del riñón aislado y perfundido se encuentra la pérdida de la capacidad de concentrar la orina (236). Sin embargo, diazepam es capaz de aumentar la diuresis y natriuresis en este modelo, lo que sugiere que el túbulo colector no sería el único segmento tubular sensible a las acciones de diazepam.

El agonista RCB, clonazepam, y el agonista RPB, Ro 5-4864 provocaron efectos sobre la función del riñón aislado similares a los descritos para el agonista mixto, diazepam. Una interpretación de estos resultados, cuya confirmación requiere la evaluación de antagonistas selectivos, sería la participación de RPB y RCB en los efectos tubulares inducidos por diazepam. En concordancia con los resultados obtenidos en este estudio, Basile y col. (295) observaron que la administración *in vivo* de Ro 5-4864 provoca un aumento en el volumen de orina y en la excreción de electrolitos. Sin embargo, el tratamiento con clonazepam fue incapaz de modificar los parámetros de función renal. Estos resultados, comparados con la información obtenida en el presente estudio, señalan la relevante influencia de las acciones extrarrenales de benzodiazepinas sobre los efectos resultantes a nivel renal. Los efectos *in vivo* de Ro 5-4864, observados por estos autores,

fueron bloqueados por el antagonista RPB, PK 11195, lo que indirectamente brinda cierto apoyo a la propuesta de la participación de RPB en los efectos observados con diazepam sobre la función del riñón aislado.

Cuando se evaluaron los efectos de diazepam sobre la vasculatura del riñón aislado pretratado con vasoconstrictores, se encontró que esta benzodiazepina provoca una inhibición concentración-dependiente de las contracciones inducidas por NA $1 \mu\text{M}$ o KCl 40 mM. Estos resultados indican que diazepam es capaz de relajar la vasculatura renal previamente contraída por distintos mecanismos de acción. El efecto vasodilatador de concentraciones micromolares de benzodiazepinas también se ha observado en aorta de rata (118, 176) y en vasos umbilicales humanos (178).

En este estudio se evaluaron algunos mecanismos probablemente involucrados en la relajación de la vasculatura renal inducida por diazepam. En una primera etapa, se estudiaron los efectos de esta benzodiazepina en presencia de azul de metileno, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble. El pretratamiento de los riñones con este agente provocó una inhibición parcial del efecto relajador de diazepam. Estos resultados señalan la probabilidad de que en las acciones de diazepam se encuentre involucrado algún mecanismo dependiente de GMPc. Gimeno y col. (176) informaron que la presencia de azul de metileno inhibe el efecto relajador inducido por benzodiazepinas en anillos de aorta de rata. Estos autores también encontraron que las benzodiazepinas inhiben la actividad de fosfodiesterasas. Estas evidencias, tomadas en conjunto, sugieren que el aumento de los niveles de GMPc podría ser un mecanismo responsable de la relajación del músculo liso vascular inducida por benzodiazepinas.

En otra serie de experimentos se evaluó la respuesta de la vasculatura renal a diazepam en presencia de L-NNA, inhibidor de la síntesis de NO. En este estudio se observó que el pretratamiento con L-NNA induce una disminución del efecto relajador de diazepam, lo que sugiere una posible

contribución del NO en las acciones vasodilatadoras de la benzodiazepina. Estas evidencias, asociadas a los resultados descritos en presencia de azul de metileno, indican que la participación facilitadora de NO propuesta en el efecto vasorrelajador de diazepam estaría mediada, probablemente, por activación de la guanilato ciclasa y aumento de los niveles citosólicos de GMPc.

De la misma manera que fue descrito para sus efectos tubulares, la acción vasodilatadora de diazepam es mimetizada por clonazepam y Ro 5-4864. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el efecto relajador de diazepam esté mediado por RCB y RPB. Sin embargo, con la información disponible hasta el momento, no podría descartarse la posibilidad de , respuestas inespecíficas a benzodiazepinas.

En una serie de experimentos se evaluaron los efectos de flumazenil, compuesto con estructura benzodiazepínica pero que es antagonista RCB, en condiciones basales y en riñones pretratados con NA. Se observó que esta benzodiazepina fue incapaz de modificar la resistencia vascular renal en cualquiera de las condiciones experimentales ensayadas. El hecho de que la vasculatura renal responda selectivamente a benzodiazepinas agonistas, refuerza la idea de que la acción vasodilatadora inducida por benzodiazepinas requiere la ocupación de sitios receptores específicos. Las curvas relajación vs. concentración para el agonista mixto, diazepam, y el agonista RCB, clonazepam, fueron desplazadas significativamente hacia la derecha cuando los riñones se pretrataron con el antagonista RCB, flumazenil. Este hallazgo sugiere que la ocupación de RCB sería requerida para el efecto relajador de benzodiazepinas. Esta propuesta parecería discrepar con la información obtenida mediante técnicas autorradiográficas y de desplazamiento de radioligandos, que señala que los receptores localizados en riñón de rata serían de tipo periférico (226). Debe tenerse en cuenta que distintas situaciones experimentales, en estos ensayos de saturación y desplazamiento

de radioligandos, podrían limitar la detección de heterogeneidad de poblaciones y la estimación de la proporción de receptores (304). Además, podría presumirse la presencia en riñón de otro sitio de unión a benzodiazepinas diferente de RPB y RCB. En este sentido, se ha descrito la existencia de un receptor a benzodiazepinas de baja afinidad en cerebro de rata, que regula los canales de calcio sensibles a voltaje (101). Un estudio más profundo de las características de la población de receptores a benzodiazepinas en tejido renal podría contribuir a esclarecer este tópico. Aún así, la información obtenida en los estudios funcionales del presente trabajo brinda evidencias de que las acciones de benzodiazepinas sobre la vasculatura renal estarían mediadas por la interacción con un sitio receptor específico.

En el Capítulo I, sección 3.3., se describió cómo los receptores a benzodiazepinas existentes en riñón son modulados por estímulos farmacológicos y hormonales. En el presente estudio, y en trabajos realizados por otros autores (295), se obtuvieron resultados que indicaron la capacidad de respuesta selectiva del órgano ante distintas benzodiazepinas. Estas evidencias, asociadas a la presencia de inhibidores de RPB en orina (306), permiten suponer un rol fisiológico para los receptores renales a benzodiazepinas.

La información que surge de los estudios de efectos de benzodiazepinas realizados en este trabajo señala que estas drogas son capaces de disminuir la presión arterial, inhibir la reabsorción tubular de agua y electrolitos y relajar la vasculatura renal previamente contraída. La obtención de benzodiazepinas selectivas, que no atraviesen la barrera hematoencefálica, probablemente permitiría evaluar la potencial utilidad de estas drogas en el manejo farmacológico de situaciones clínicas que afecten la función renal o la presión arterial.

Capítulo VII

RESUMEN

La utilidad terapéutica de distintas drogas GABAérgicas, de las benzodiazepinas clásicas y de la benzodiazepina antagonista, flumazenil, se debe a las acciones de estos agentes a nivel del sistema nervioso central. Sin embargo, las evidencias acumuladas en los últimos años de la relevancia del sistema GABAérgico y de los receptores a benzodiazepinas en la periferia han ampliado las perspectivas clínicas de estos agentes.

El objetivo planteado en el presente trabajo fue caracterizar los efectos de agonistas GABAérgicos y benzodiazepinas sobre la función renal; y evaluar posibles mecanismos involucrados.

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar adultas. La función renal se evaluó mediante técnicas de clearance, en el animal intacto sometido a infusión continua o en el modelo de riñón aislado y perfundido. Los parámetros funcionales estudiados en los experimentos *in vivo* fueron: clearance de PAH, como índice de flujo plasmático renal; velocidad de filtración glomerular, estimada a partir del clearance de inulina; excreciones fraccionales de agua, sodio, potasio y glucosa; relación U_{osm}/P_{osm} , como estimación de la capacidad de concentrar la orina; clearance osmolar; y reabsorción de agua libre. En los experimentos realizados con el modelo de riñón aislado se evaluó la velocidad de filtración glomerular, mediante el clearance de creatinina o de inulina, y las excreciones fraccionales de agua, sodio y glucosa. Las perfusiones se realizaron manteniendo el flujo constante;

por lo tanto, los cambios observados en la presión de perfusión fueron considerados como variaciones en la resistencia vascular renal.

Las respuestas renales a agonistas GABAérgicos se estudiaron empleando el modelo de riñón aislado y perfundido, que permite evaluar los efectos directos de las drogas obviando las influencias extrarrenales. Los agonistas ensayados fueron: GABA (0.05-1000 μM), agonista GABA_A y GABA_B; muscimol (0.1-75 μM), agonista GABA_A; y baclofen (0.05-500 μM), agonista GABA_B. También se evaluaron los efectos del antagonista GABA_A, bicuculina (50 μM).

Cuando se evaluaron las respuestas vasculares, se observó que el tratamiento con GABA provocó un aumento concentración-dependiente en la presión de perfusión renal. Baclofen también indujo un incremento en la resistencia vascular, a la que se vió asociada una disminución en la velocidad de filtración glomerular. El agonista GABA_A, muscimol, no modificó los parámetros hemodinámicos en condiciones basales; tampoco provocó cambios en la resistencia vascular de los riñones pretratados con NA 1 μM . Estos resultados sugieren que el efecto vasoconstrictor inducido por GABA estaría mediado por la activación de receptores GABA_B. La disminución de la velocidad de filtración observada con el tratamiento con baclofen indica que la acción vasoconstrictora de este agente se ejercería, preferencialmente, a nivel preglomerular o glomerular. La perfusión con GABA en presencia de bicuculina provocó un mayor incremento, respecto del tratamiento con GABA solo, en la presión de perfusión, y una disminución en la velocidad de filtración. Estos resultados refuerzan la idea de la participación de receptores GABA_B en la vasoconstricción inducida por GABA y sugieren una posible acción vasodilatadora mediada por receptores GABA_A. El agregado de bicuculina al medio de perfusión, en condiciones basales, indujo un aumento en la presión de perfusión, lo que indicaría que la influencia dilatadora

mediada por la activación endógena de receptores GABA_A podría tener un rol modulador en el tono vascular renal.

Los agonistas GABAérgicos también provocaron alteraciones en los procesos de transporte tubular. GABA y baclofen indujeron un aumento en la diuresis y natriuresis que podría ser atribuido a las modificaciones observadas en la hemodinamia renal. Sin embargo, no pueden descartarse efectos directos sobre estructuras tubulares. Ambas drogas provocaron una disminución en la capacidad de reabsorber glucosa, que no fue observada con el tratamiento con el agonista GABA_A, muscimol. Estos resultados sugieren que los mecanismos de transporte del túbulo proximal podrían ser alterados por la activación de receptores GABA_B. La perfusión con muscimol provocó un aumento en las excreciones fraccionales de agua y sodio, sin cambios en la hemodinamia renal. Estas evidencias sugieren una acción directa de muscimol sobre los mecanismos de transporte tubular, probablemente a nivel distal, dada la conservación del manejo de glucosa. Los efectos tubulares de muscimol fueron bloqueados por el antagonista muscarínico, atropina (1 μ M), lo que señala la posibilidad de que el sistema colinérgico esté involucrado en las alteraciones del transporte tubular mediadas por receptores GABA_A.

En una primera etapa del estudio de respuestas renales a benzodiazepinas, se evaluaron los efectos de la benzodiazepina prototipo diazepam (0.1-10 mg/kg) en el animal intacto. Todas las dosis ensayadas provocaron una disminución en la presión arterial. El clearance de PAH y el filtrado glomerular no fueron modificados por el tratamiento con diazepam. Los efectos tubulares se caracterizaron por un aumento en las excreciones fraccionales de agua, sodio y potasio, sin cambios en la reabsorción de glucosa. Estos resultados sugieren una probable acción directa de la droga, independiente de cambios hemodinámicos, sobre estructuras distales del nefrón. También se observó una disminución en la relación U_{osm}/P_{osm} , lo

que indica una pérdida en la capacidad de concentrar la orina. Debido a que el clearance osmolar no fue modificado por diazepam, resulta poco probable que estén alterados los procesos de transporte en el asa ascendente de Henle. La disminución en la reabsorción de agua libre observada indica que podría estar comprometida la función del túbulo colector. El pretratamiento con una dosis máxima del análogo de vasopresina, desmopresina, no previno la disminución en la reabsorción neta de agua inducida por diazepam. Este hallazgo sugiere que el tratamiento con esta benzodiazepina podría alterar la capacidad de respuesta tubular a la vasopresina.

Los efectos directos de benzodiazepinas sobre la función renal se evaluaron utilizando el modelo de riñón aislado y perfundido. El tratamiento con diazepam (0.05-230 μM) no modificó la presión de perfusión, ni el filtrado glomerular. Los efectos tubulares se caracterizaron por un aumento concentración-dependiente en las excreciones fraccionales de agua y sodio, sin alteraciones en el manejo de glucosa. En concordancia con los resultados obtenidos *in vivo*, estos hallazgos sugieren una probable acción directa, independiente de influencias hemodinámicas, sobre estructuras distales del nefrón. El agonista RCB, clonazepam (2-500 μM), y el agonista RPB, Ro 5-4864 (4-40 μM), provocaron efectos sobre la función del riñón aislado similares a los descriptos para el agonista mixto, diazepam.

En riñones pretratados con NA (1 μM) o KCl (40 mM), el agregado de diazepam al medio de perfusión indujo una disminución concentración-dependiente de la resistencia vascular renal. El efecto relajador de diazepam sobre la vasculatura precontraída con NA fue inhibido por la presencia de azul de metileno (10 μM), inhibidor de la guanilato ciclasa soluble. Estos resultados sugieren que en las acciones vasodilatadoras de diazepam podría encontrarse involucrado algún mecanismo dependiente de GMPc. La relajación inducida por esta benzodiazepina también se encontró inhibida por el pretratamiento con L-NNA (30 μM), inhibidor de la síntesis de NO. Estas

evidencias, en conjunto, sugieren una participación facilitadora de NO en la vasorrelajación renal inducida por diazepam que estaría, probablemente, mediada por la activación de la guanilato ciclasa soluble y el consecuente aumento en los niveles de GMPc.

El efecto relajador del agonista mixto, diazepam, sobre la vasculatura renal pretratada con NA fue mimetizado por las benzodiazepinas selectivas, clonazepam y Ro 5-4864. Por el contrario, la benzodiazepina antagonista RCB, flumazenil, no fue capaz de relajar la vasculatura precontraída. En una serie de experimentos se observó que las curvas de relajación vs. concentración de las benzodiazepinas agonistas, diazepam y clonazepam, se desplazaron hacia la derecha cuando los riñones se pretrataron con flumazenil. Estas evidencias sugieren que la acción vasodilatadora inducida por benzodiazepinas requiere la ocupación de sitios receptores específicos.

La información obtenida en el presente estudio revela la capacidad de distintas drogas GABAérgicas y benzodiazepinas de provocar efectos directos sobre la función renal. Las respuestas del riñón a agonistas GABAérgicos y las evidencias de un posible rol para el GABA endógeno, puesto de manifiesto por el tratamiento con el antagonista, bicuculina, refuerzan la idea de la participación del sistema GABAérgico en la regulación de la función renal. Por otro lado, se ha demostrado que las benzodiazepinas provocan disminución de la presión arterial, diuresis, natriuresis y relajación de la vasculatura renal. La capacidad del riñón de responder selectivamente a benzodiazepinas agonistas alienta la investigación de la potencial utilidad clínica que pudieran tener drogas análogas que no atravesaran la barrera hematoencefálica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Mónica Elías, por la confianza depositada en este proyecto, su apoyo y su afecto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por los subsidios otorgados al proyecto global del cual este tema de investigación forma parte.

A Productos Roche S.A., Buenos Aires, Argentina, por la donación de las benzodiazepinas ensayadas en este trabajo.

A Wiener Lab, Rosario, Argentina, por la donación de los equipos para determinaciones analíticas utilizados en este trabajo.

A Laura Trumper, por su valiosa colaboración en la realización de estos experimentos, la revisión del manuscrito, sus críticas y, sobre todo, la incondicional presencia de su calidez.

A J. Elena Ochoa, por brindarme cordialmente sus conocimientos sobre las técnicas de riñón aislado y perfundido.

A Adriana Peiretti, por su colaboración en la realización de los experimentos en el animal intacto y el compañerismo que me ha brindado.

A las Est. Mercedes Leiva, Cristina Cuesta y M. Elena Passamonti por el valioso aporte en el análisis estadístico de los datos obtenidos en estos experimentos.

A mis compañeros de Farmacología, por haber facilitado, desde distintos aspectos, la realización de este trabajo.

A la Dra. Susana Nowicki, por la gentil donación de algunos de los materiales empleados en este trabajo.

A las Dras. María Nélica Martínez, Elsa Nadalín y Susana Lavaselli, por haber alentado mi iniciación a la investigación y el afecto que siempre me brindaron.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enna, S. J. (1983) GABA receptors. En: The GABA receptors. Editado por S. J. Enna. The Humana Press-Clifton, New Jersey, pag. 1-23.
2. Bradley, P. B. (1989) Introduction to Neuropharmacology. Butterworth & Co. Publishers. Hartnoll, Bodmin, Cornwall, pag. 127-174.
3. Erdö, S. L. (1985) Peripheral GABAergic mechanisms. Trends Pharmacol. Sci. 6(5), 205-208.
4. McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H., Jorgensen, E. M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. Nature 389, 870-876.
5. Poncer, J. C., McKinney, R. A., Gähwiler, B. H., Thompson S. M. (1997) Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. Neuron 18, 463-472.
6. Amico, C. Marchetti, C., Nobile, M. Usai, C. (1995) Pharmacological types of calcium channels and their modulation by baclofen in cerebellar granules. J. Neurosci. 15(4), 2839-2848.
7. Santos, A. E., Carvalho, C. M., Macedo, T. A., Carvalho, A. P. (1995) Regulation of intracellular $[Ca^{2+}]$ and GABA release by presynaptic GABA_B receptors in rat cerebrocortical synaptosomes. Neurochem. Int. 27(4/5), 397-406.
8. Borden, L. A. (1996) GABA transporter heterogeneity: Pharmacology and cellular localization. Neurochem. Int. 29(4), 335-356.
9. Cupello, A., Mainardi, P., Robello, M., Thellung, S. (1997) Effect of nitric oxide donors on GABA uptake by rat brain synaptosomes. Neurochemical Res. 22(12), 1517-1521.
10. Johnston, G. A. R. (1996) GABA_A receptor pharmacology. Pharmacol. Ther. 69(3), 173-198.
11. Costa, E. (1991) The allosteric modulation of GABA_A receptors. Neuropsychopharmacol. 4(4), 225-235.
12. Möhler, H. (1992) GABAergic synaptic transmission. Drug Res. 42(1), 211-214.

13. Perkins, K. L., Wong, R. K. S. (1997) The depolarizing GABA response. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 516-519.
14. Misgeld, U., Bijak, M., Jarolimek, W. (1995) A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 46, 423-462.
15. Cherubini, E., Strata, F. (1997) GABAC receptors: A novel receptor family with unusual pharmacology. *News Physiol. Sci.* 12, 136-141.
16. Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Rudolph, U., Fritschy, J. M. (1996) Diversity in structure, pharmacology, and regulation of GABA_A receptors. En: *The GABA receptors*. Eds.: S. J. Enna, N. G. Bowery. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pag. 11-36.
17. Möhler, H., Fritschy, J. M., Lüscher, B., Rudolph, U., Benson, J., Benke, D. (1996) The GABA_A receptors. From subunits to diverse functions. En: *Ion Channels. Volume 4*. Ed.: T. Narahashi, Plenum Press., New York, pag. 89-113.
18. Sigel, E., Buhr, A. (1997) The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 425-429.
19. Smith, G. B., Olsen, R. W. (1995) Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 162-168.
20. Wafford, K. A., Bain, C. J., Whiting, P. J., Kemp, J. A. (1993) Functional comparison of the role of γ subunit in recombinant human γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.* 44, 437-442.
21. Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Fritschy, J. M. (1995) GABA_A-receptor subtypes in vivo: cellular localization, pharmacology and regulation. En: *GABA_A receptors and anxiety: From neurobiology to treatment*. Eds.: G. Biggio, E. Sanna, E. Costa. Raven Press, New York, pag. 41-56.
22. Scholze, P., Ebert, V., Sieghart, W. (1996) Affinity to various ligands for GABA_A receptors containing $\alpha 4\beta 3\gamma 2$, $\alpha 4\gamma 2$, or $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ subunits. *Eur. J. Pharmacol.* 304, 155-162.
23. Moss, S. J., Smart, T. G., Blackstone, C. D., Hugnir, R. L. (1992) Functional modulation of GABA_A receptors by cAMP-Dependent protein phosphorylation. *Science* 257, 661-665.

24. Obrietan, K., van den Pol, A. N. (1997) GABA activity mediating cytosolic Ca^{2+} rises in developing neurons is modulated by cAMP-dependent signal transduction. *J. Neurosci.* 17(12), 4785-4799.
25. Macdonald, R. L. (1995) Ethanol, γ -aminobutyrate type A receptors, and protein kinase C phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3633-3635.
26. Valenzuela, C. F., Machu, T. K., McKernan, R. M., Whiting, P., VanRenterghem, B. B., McManaman, J. L., Brozowski, S. J., Smith, G. B., Olsen, R. W., Harris, R. A. (1995) Tyrosine kinase phosphorylation of GABA_A receptors. *Mol. Brain Res.* 31, 165-172.
27. Wan, Q., Ye Man, H., Braunton, J., Wang, W., Salter, M. W., Becker, L., Wang, Y. T. (1997) Modulation of GABA_A receptor function by tyrosine phosphorylation of β subunits. *J. Neurosci* 17(13), 5062-5069.
28. Green, M. A., Halliwell, R. F. (1997) Selective antagonism of the GABA_A receptor by ciprofloxacin and biphenylacetic acid. *Br. J. Pharmacol.* 122, 584-590.
29. Weiner, J. L., Buhler, A. V., Whatley, V. J., Harris, R. A., Dunwiddie, T. V. (1998) Colchicine is a competitive antagonist at human recombinant γ -aminobutyric acid A receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284(1), 95-102.
30. Krogsgaard-Larsen, P., Jacobse, P., Falch, E. (1983) Structure-activity requirements of the GABA receptor. En: *The GABA receptors*. Ed.: S. J. Enna, The Humana Press, Clifton, New Jersey, pag. 149-175.
31. Schmitt, H. (1985) Neurotransmisores y sistema nervioso vegetativo. En: *Fisiología Humana*. Ed.: Philippe Meyer. Salvat Editores S. A., Barcelona, España, pág. 953-975.
32. Boban, T., Prell, G. D. (1995) Imidazoleacetic acid, a γ -aminobutyric acid receptor agonist, can be formed in rat brain by oxidation of histamine. *J. Neurochem.* 65(2), 818-826.
33. Rogers, C. J., Twyman, R. E., Macdonald, R. L. (1994) Benzodiazepine and β -carboline regulation of single GABA_A receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* 475(1), 69-82.
34. Friedman, L., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1993) γ -aminobutyric acid $_A$ receptor regulation: chronic treatment with pregnanolone uncouples

- allosteric interactions between steroid and benzodiazepine recognition sites. *Mol. Pharmacol.* 44, 191-197.
35. Lewohl, J. M., Crane, D. Y., Dodd, P. R. (1996) Alcohol, alcoholic brain damage, and GABA_A receptor isoform gene expression. *Neurochem. Int.* 29(6), 677-684.
 36. Cunningham, M. D., Enna, S. J. (1996) Evidence for pharmacologically distinct GABA_B receptors associated with cAMP production in rat brain. *Brain Res.* 720, 220-224.
 37. Johnston, G. A. R. (1996) GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 319-323.
 38. Chebib, M., Vandenberg, R. J., Froestl, W., Johnston, G. A. R. (1997) Unsaturated phosphinic analogues of γ -aminobutyric acid as GABA_C receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 329, 223-229.
 39. Lukasiewicz, P. D., Wong, R. O. L. (1997) GABA_C receptors on ferret retinal bipolar cells: A diversity of subtypes in mammals? *Visual Neurosci.* 14, 989-994.
 40. Jessen, K. R., Mirsky, R., Hills, J. M. (1987) GABA as an autonomic neurotransmitter: studies on intrinsic GABAergic neurons in the myenteric plexus of the gut. *Trends Neurosci.* 10(6), 255-262.
 41. Krantis, A. (1990) Selective uptake of γ -[³H]aminobutyric acid by neural elements and vascular nerves of the rat intestinal submucosa. *Neurosci. Lett.* 109, 1-6.
 42. Napoleone, P., Cavallotti, C., de Vincentis, G., Amenta, F. (1991) Autoradiographic localization of the GABA-A-receptor agonist (³H)-muscimol in the rat intestinal musculature. *Pharmacology* 42, 103-110.
 43. Nakajima, K., Tooyama, Y., Kuriyama, K., Kimura, H. (1996) Immunohistochemical demonstration of GABA_B receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochem. Res.* 21(2), 211-215.
 44. Zeiter, D. K., Li, X., Broussard, D. L. (1996) Identification of the GABA_A receptor α -subunit mRNA in rat intestine. *Mol. Brain Res.* 39, 241-244.
 45. Pencheva, N., Venkova, K., Radomirov, R. (1990) GABA_B receptor-mediated contractile effects resistant to tetrodotoxin in isolated cat ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 182, 199-202.

46. Kristiansen, U., Fjalland, B. (1991) Ligand structural specificity of GABA_A receptors in guinea pig ileum. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 332-339.
47. Gentilini, G., Franchi-Micheli, S., Pantalone, D., Cortesini, C., Zilletti, L. (1992) GABA_B receptor-mediated mechanisms in human intestine in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 217, 9-14.
48. Minocha, A., Galligan, J. J. (1993) Excitatory and inhibitory responses mediated by GABA_A and GABA_B receptors in guinea pig distal colon. *Eur. J. Pharmacol.* 230, 187-193.
49. Grider, J. R., Makhlouf, G. M. (1992) Enteric GABA: mode of action and role in the regulation of the peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* 262, G690-G694.
50. Irie, K., Muraki, T., Furukawa, K., Nomoto, T. (1992) Effect of L-NG-nitro-arginine (L-NOARG) on the relaxation induced by γ -aminobutyric acid (GABA) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat isolated duodenum. *Japan. J. Pharmacol.* 58. (Supl.2), 317.
51. Krantis, A., Shabnavard, L., Nichols, K., de Blas, A. L., Staines, W. (1995) Localization of GABA_A receptor immunoreactivity in NO synthase positive myenteric neurones. *J. Auton. Nerv. Syst.* 53, 157-165.
52. Blandizzi, C., De Bona, M., Natale, G., Agen, C., Del Tacca, M. (1991) Effects of quinolone carboxylic acid derivatives on GABA_A receptor-mediated stimulation of gastric acid secretion and intestinal motility. *Eur. J. Pharmacol.* 201, 35-39.
53. Hardcastle, J., Hardcastle, P.T., Mathias, W. J. (1991) The influence of the γ -amino butyric acid (GABA) antagonist bicuculline on transport processes in rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 128-130.
54. Erdö, S. L., Wolff, J. R. (1990) γ -aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.* 54(2), 363-372.
55. Müller, E. E., Cocchi, D., Locatelli, V., Apud, J. A., Tappaz, M. L., Masotto, C., Novelli, A., Racagni, G. (1983) GABA receptor regulation of endocrine function. En: *The GABA receptors*. Ed: S. J. Enna, The Humana Press-Clifton, New Jersey, pag. 257-304.

56. Virmani, M. A., Stojilkovic, S. S., Catt, K. J. (1990) Stimulation of Luteinizing hormone release by γ -aminobutyric acid (GABA) agonists: mediation by GABA_A-type receptors and activation of chloride and voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology*. 126(5), 2499-2505.
57. Meissl, H., Ekström, P. (1991) Action of γ -aminobutyric acid (GABA) in the isolated photosensory pineal organ. *Brain Res.* 562, 71-78.
58. Kataoka, Y., Gutman, Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewske, J., Cosenza-Murphy, D., Wu, J. Y., Costa, E. (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3218-3222.
59. Parramón, M., Oset-Gasque, M. J., Gonzalez, M. P., Stephenson, F. A. (1994) Identification of GABA_A receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* 168, 243-246.
60. Kitayama, S., Morita, K., Dohi, t., Tsujimoto, A. (1990) GABA_A receptor-mediated increase of cytosolic Ca²⁺ in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1053, 189-194.
61. Oset-Gasque, M. J., Parramón, M., González, M. P. (1993) GABA_B receptors modulate catecholamine secretion in chromaffin cells by a mechanism involving cyclic AMP formation. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1586-1592.
62. Busik, J., Nakamura, M., Abe, Y., Shibuya, I., Kanno, T. (1996) Effects of GABA on spontaneous [Ca²⁺]_i dynamics and electrical properties of rat adrenal chromaffin cells. *Brain Res.* 739, 97-103.
63. Ahnert-Hilger, G., Stadtbäumer, A., Strübing, C., Scherübl, H., Schultz, G., Riecken, E. O., Wiedenmann, B. (1996) γ -aminobutyric acid secretion from pancreatic neuroendocrine cells. *Gastroenterol.* 110, 1595-1604.
64. Thomas-Reetz, A., Hell, J. W., Doring, M. J., Walch-Solimena, C., Jahn, R., de Camilli, P. (1993) A γ -aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic β cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5317-5321.
65. Borboni, P., Porzio, O., Fusco, A., Sesti, G., Lauro, R., Marlier, L. N. J. L. (1994) Molecular and cellular characterization of the GABA_A receptor in the rat pancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.* 103, 157-163.

66. von Blankenfeld, G., Turner, J., Ahnert-Hilger, G., John, M., Enkvist, M. O. K., Stephenson, F., Kettenmann, H., Widenmann, B. (1995) Expression of functional GABA_A receptors in neuroendocrine gastropancreatic cells. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 430, 381-388.
67. Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F., Wang, Y. T. (1997) Recruitment of functional GABA_A receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388, 686-690.
68. Apud, J. A., Tappaz, M. L., Celotti, F., Negri-Cesi, P., Masotto, C., Racagni, G. (1984) Biochemical and immunochemical studies on the GABAergic system in the rat Fallopian tube and ovary. *J. Neurochem.* 43(1), 120-125.
69. Erdö, S. L., Varga, B., Horváth, E. (1985) Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 111, 397-400.
70. Apud, J. A., Monasterolo, L. (1991) Acetylcholine modulates the effect of ovarian steroids on glutamic acid decarboxylase activity in the rat fallopian tube. *Eur. J. Pharmacol.* 205, 315-317.
71. Fernández, I., Orensanz, L. M., Ceballos, M. L. (1984) GABA modulation of cholinergic transmission in rat oviduct. *Life Sci.* 35, 357-364.
72. Erdö, S. L., Wekerle, L. (1990) GABA_A type binding sites on membranes of spermatozoa. *Life Sci.* 47, 1147-1151.
73. Kwan, Y. W., Ngan, M., Tsang, K., Lee, H., Chu, L. (1996) Presynaptic modulation by L-glutamate and GABA of sympathetic co-transmission in rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 118, 755-761.
74. Delpierre, S., Balzamo, E., Pugnât, C., Jammes, Y. (1996) Cardiorespiratory response to bicuculline during resistive loaded breathing in anesthetized rabbits. *Neurosci. Lett.* 213, 13-16.
75. Delpierre, S., Jammes, Y. (1997) GABA_B receptor blockade reduces resistive loading-induced hypoventilation in anesthetized rabbits. *Neurosci. Lett.* 226, 83-86.
76. Rao, R. S., Greenberg, H. E., Sica, A. L., Scharf, S. M. (1997) γ -aminobutyric acid contributes to modulation of cardiorespiratory control after chronic ventilatory loading. *Resp. Physiol.* 108, 35-44.

77. Chapman, R. W., Danko, G., del Prado, M., Egan, R. W., Kreutner, W., Rizzo, C. A., Hey, J. A. (1993) Further evidence for prejunctional GABA-B inhibition of cholinergic and peptidergic bronchoconstriction in Guinea pigs: studies with new agonists and antagonists. *Pharmacology* 46, 315-323.
78. Matsuyama, S., Saito, N., Shuntoh, H., Taniyama, K., Tanaka, C. (1993) GABA modulates neurotransmission in sinus node via stimulation of GABA_A receptor. *Am. J. Physiol.* 264, H1057-H1061.
79. Czyzewska-Szafran, H., Jastrzebski, Z., Remiszewska, M., Wutkiewicz, M. (1991) Effect of clonidine on blood pressure and GABAergic mechanisms in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 198, 115-120.
80. Roberts, K. A., Wright, J. W., Harding, J. W. (1993) GABA and bicuculline-induced blood pressure changes in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21, 156-162.
81. Amano, M., Kubo, T. (1993) Involvement of both GABA_A and GABA_B receptors in tonic inhibitory control of blood pressure at the dorsal ventrolateral medulla of the rat. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 348, 146-153.
82. Gören, Z., Aslan, N., Berkman, K., San, T., Sule, O., Onat, F. (1997) Role of paraventricular and dorsomedial nuclei of the hypothalamus and central nucleus of the amygdala on muscimol-induced cardiovascular responses. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 11, 408-415.
83. Kohlenbach, A., Schlicker, E. (1990) GABA_B receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 100, 365-369.
84. Li, Y., Duckles, S. P. (1991) GABA agonists and omega conotoxin GVIA modulate responses to nerve activation of the perfused rat mesentery. *Life Sci.* 48, 2331-2339.
85. Fergus, A., Lee, K. S. (1997) GABAergic regulation of cerebral microvascular tone in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (9), 992-1003.
86. Hammond, E. J., Wilder, B. J. (1985) Gamma-vinyl GABA. *Gen. Pharmacol.* 16(5), 441-447.

87. Palagiano, F., Bonina, F. P., Montenegro, L., Biondi, A., Sorrentino, L., Capasso, A., de Caprariis, P. (1997) Synthesis, stability and anticonvulsant activity of two new GABA prodrugs. *Pharmazie* 52, 272-276.
88. Standaert, D. G., Young, A. B. (1996) Tratamiento de los trastornos degenerativos del sistema nervioso central. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9a. ed.. Eds.: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Ineramericana, Méjico, volumen I, pag. 539-556.
89. Ford, B., Greene, P., Louis, E. D., Petzinger, G., Bressman, S. B., Goodman, R., Brin, M. F., Sadiq, S., Fahn, S. (1996) Use of intrathecal baclofen in the treatment of patients with dystonia. *Arch. Neurol.* 53, 1241-1246.
90. Mariën, K., Havlak, D. (1997) Baclofen with famotidine for intractable hiccups. *Eur. Respir. J.* 10, 2188.
91. Dicipinigaitis, P. V. (1996) Use of baclofen to suppress cough induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Ann. Pharmacother.* 30, 1242-1245.
92. Dicipinigaitis, P. V., Dobkin, J. B. (1997) Antitusive effect of the GABA-agonist baclofen. *Chest* 111, 996-999.
93. Dicipinigaitis, P. V., Dobkin, J. B., Rauf, K. (1997) Comparison of the antitusive effects of codeine and the GABA-agonist baclofen. *Clin. Drug Invest.* 14(4), 326-329.
94. Korpi, E. R., Mattila, M. J., Wisden, W., Lüddens, H. (1997) GABA_A-receptor subtypes: clinical efficacy and selectivity of benzodiazepine site ligands. *Ann. Med.* 29, 275-282.
95. De aizpurua, H. J., Wilson, Y. M., Harrison, L. C. (1992) Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in preclinical insulin-dependent diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9841-9845.
96. Honeyman, M. C., Stone, N., de Aizpurua, H., Rowley, M. J., Harrison, L. C. (1997) High T cell responses to the glutamic acid decarboxylase (GAD) isoform 67 reflect a hyperimmune state that precedes the onset of insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun.* 10, 165-173.
97. Haefely, W. E. (1990) The GABA_A-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. En: *Handbook of Anxiety*, volumen 3: The

neurobiology of anxiety. Eds.: G. D. Burrows, M. Roth, R. Noyes Jr. Elsevier Science Publishers B.V., pág. 165-188.

98. Baestrup, C., Squires, R. F. (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [³H]diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3805-3809.
99. Papadopoulos, V. (1993) Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: Biological role in steroidogenic cell function. *Endocr. Rev.* 14(2), 222-240.
100. Zisterer, D. M., Williams, D. C. (1997) Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen. Pharmac.* 29(3), 305-314.
101. Taft, W. C., DeLorenzo, R. J. (1984) Micromolar-affinity benzodiazepine receptors regulate voltage-sensitive calcium channels in nerve terminal preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3118-3122.
102. Amin, J., Brooks-Kayal, A., Weiss, D. S. (1997) Two tyrosine residues on the α subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of γ -aminobutyric acid_A receptors. *Mol Pharmacol.* 51, 833-841.
103. Buhr, A., Sigel, E. (1997) A point mutation in the γ 2 subunit of γ -aminobutyric acid type A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8824-8829.
104. Buhr, A., Baur, R., Sigel, E. (1997) Subtle changes in residue 77 of the γ subunit of α 1 β 2 γ 2 GABA_A receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site. *J. Biol. Chem.* 272 (18), 11799-11804.
105. Haefely, W. (1988) Partial agonists of the benzodiazepine receptor: from animal data to results in patients. En: Chloride channels and their modulation by neurotransmitters and drugs. Eds.: G. Biggio, E. Costa. Raven Press, New York, pag. 275-292.
106. Byrnes, J. J., Greenblatt, D. J., Miller, L. G. (1992) Benzodiazepine receptor binding of nonbenzodiazepine in vivo: Alpidem, zolpidem and zopiclone. *Brain Res. Bull.* 29, 905-908.
107. Haefely, W. (1988) The preclinical pharmacology of flumazenil. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2, 25-36.

108. Haefely, W. E. (1987) Structure and function of the benzodiazepine receptor. *CHIMIA* 41, 389-396.
109. Haefely, W. E. (1988) Benzodiazepines. *Int. Anesthesiol. Clin.* 26(4), 262-272.
110. Krueger, K. E. (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors: a second site of action for benzodiazepines. *Neuropsychopharmacol.* 4(4), 237-244.
111. Parola, A. L., Yamamura, H. Y., Laird, H. E. (1993) Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Life Sci.* 52(16), 1329-1342.
112. McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R., Snyder, S. H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3170-3174.
113. McEnery, M. W. (1992) The mitochondrial benzodiazepine receptor: Evidence for association with the voltage-dependent anion channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24(1), 63-69.
114. McCabe, R. T., Newman, A. H., Skolnick, P. (1992) AHN 683: A fluorescent ligand for peripheral-type benzodiazepine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262(2), 734-740.
115. Trapani, G., Franco, M., Ricciardi, L., Latrofa, A., Genchi, G., Sanna, E., Tuveri, F., Cagetti, E., Biggio, G., Liso, G. (1997) Synthesis and binding affinity of 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives for both central and peripheral benzodiazepine receptors. A new series of high-affinity and selective ligands for the peripheral type. *J. Med. Chem.* 40(19), 3109-3118.
116. Romeo, E., Auta, J., Kozikowski, A. P., Ma, D., Papadopoulos, V., Puia, G., Costa, E., Guidotti, A. (1992) 2-Aryl-3-indoleacetamides (FGIN-1): A new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor (MDR). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262(3), 971-978.
117. Campiani, G., Nacci, V., Fiorini, Y., de Filippis, M. P., Garofalo, A., Ciani, S. M., Greco, G., Novellino, E., Williams, D. C., Zisterer, D. M., Woods, M. J., Mihai, C., Manzoni, C., Mennini, T. (1996) Synthesis, biological activity, and SARs of pyrrolobenzoxazepine derivatives, a new class of specific "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligands. *J. Med. Chem.* 39(18), 3435-3450.

118. French, J. F., Rapoport, R. M., Matlib, M. A. (1989) Possible mechanism of benzodiazepine-induced relaxation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14, 405-411.
119. Clark, M., Post, R. M. (1990) Lidocaine binds with high affinity to peripheral-type benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 179, 473-475.
120. Lukeman, D. S., Fanestil, D. D. (1987) Interactions of diuretics with the peripheral-type benzodiazepine receptor in rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241(3), 950-955.
121. Zisterer, D. M., Williams, D. C. (1995) Identification of novel ligands for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 371.
122. Itzhak, Y., Baker, L., Norenberg, M. D. (1993) Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: Evidence for multiplicity. *Glia* 9, 211-218.
123. French, J. F., Matlib, M. A. (1988) Identification of a high-affinity peripheral-type benzodiazepine binding site in rat aortic smooth muscle membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247 (1), 23-28.
124. Cox, D. A., Ellinor, P. T., Kirley, T. L., Matlib, M. A. (1991) Identification of a 17-kDa protein associated with the peripheral-type benzodiazepine receptor in vascular and other smooth muscle types. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258 (2), 702-709.
125. Giusti, L., Trincavelli, L., Martini, C., Lucacchini, A. (1994) Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites from rat and pig pancreas. *Biochem. Pharmacol.* 48(3), 583-586.
126. Smyth, R. J., Uhlman, E. J., Ruggieri, M. R. (1994) Identification and characterization of a high-affinity peripheral-type benzodiazepine receptor in rabbit urinary bladder. *J. Urol.* 151, 1102-1106.
127. Katz, Y. Y., Amiri, Z., Weizman, A., Gavish, M. (1990) Identification and distribution of peripheral benzodiazepine binding sites in male rat genital tract. *Biochem. Pharmacol.* 40(4), 817-820.
128. Calvo, D. J., Ritta, M. N., Calandra, R. S., Medina, J. H. (1990) Peripheral-type benzodiazepine receptors are highly concentrated in mitochondrial membranes of rat testicular interstitial cells. *Neuroendocrinol.* 52, 350-353.

129. Camins, A., Sureda, F. X., Camarasa, J., Escubedo, E. (1992) Specific binding sites for [³H]Ro 5-4864 in rat prostate and seminal vesicle. *Gen. Pharmacol.* 23(3), 381-384.
130. Batra, S., Alenfall, J. (1992) Orchiectomy upregulates rabbit prostate peripheral benzodiazepine receptors. *Life Sci.* 51(15), 1211-1215.
131. Escubedo, E., Camins, A., Tresserra, F., Adzet, T., Camarasa, J. (1993) Peripheral-type benzodiazepine receptors in human prostate. *Pharmacology* 46, 115-120.
132. Bar-Ami, S., Amiri, Z., Fares, F., Gavish, M. (1994) Modulation of peripheral benzodiazepine receptors in female rat genital organs by various gonadal steroids. *Life Sci.* 54(25), 1965-1975.
133. Ragö, L., Adojaan, A., Masso, R. (1990) [³H]Ro 5-4864 binding sites in the nucleus of rat lymphocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 187, 561-562.
134. Alexander, B. E. E., Roller, E., Klotz, U. (1992) Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human lymphocytes and lymphoma cell lines and their role in cell growth. *Biochem. Pharmacol.* 44(2), 269-274.
135. Berkovich, A., Ferrarese, C., Cavaletti, G., Alho, H., Marzorati, C., Bianchi, G., Guidotti, A., Costa, E. (1993) Topology of two DBI receptors in human lymphocytes. *Life Sci.* 52(15), 1265-1277.
136. Cahard, D., Canat, X., Carayon, P., Roque, C., Casellas, P., Le Fur, G. (1994) Subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors on human leukocytes. *Laborat. Invest.* 70(1), 23-28.
137. O'Beirne, G. B., Williams, C. (1988) The subcellular location in rat kidney of the peripheral benzodiazepine acceptor. *Eur. J. Biochem.* 175, 413-421.
138. Oke, B. O., Suarez-Quian, C. A., Riond, J., Ferrara, P., Papadopoulos, V. (1992) Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 87, R1-R6.
139. Garnier, M., Boujrad, N., Oke, B. O., Brown, A. S., Riond, J., Ferrara, P., Shoyab, M., Suarez-Quian, C. A., Papadopoulos, V. (1993) Diazepam Binding Inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: Action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinol.* 132(1), 444-458.

140. Dalezios, Y., Matsokis, N. (1993) Nuclear benzodiazepine binding: possible interaction with thyroid hormone receptors. *Neurochem. Res.* 18(3), 305-311.
141. Barbaccia, M. L., Berkovich, A., Guarneri, P., Slobodyansky, E. (1990) DBI (Diazepam Binding Inhibitor): The precursor of a family of endogenous modulators of GABA_A receptor function. History, perspectives, and clinical implications. *Neurochem. Res.* 15(2), 161-168.
142. Rouet-Smih, F., Tonon, M. C., Pelletier, G., Vaudry, H. (1992) Characterization of endozepine-related peptides in the central nervous system and in peripheral tissues of the rat. *Peptides* 13, 1219-1225.
143. Lamacz, M., Tonon, M. C., Smih-Rouet, F., Patte, C., Gasque, P., Fontaine, M., Vaudry, H. (1996) The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol. Brain Res.* 37, 290-296.
144. Rothstein, J. D., Garland, W., Puia, G., Guidotti, A., Weber, R. J., Costa, E. (1992) Purification and characterization of naturally occurring benzodiazepine receptor ligands in rat and human brain. *J. Neurochem.* 58(6), 2102-2115.
145. Piva, M. A., Medina, J. H., de Blas, A. L., Peña, C. (1991) Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180(2), 972-981.
146. Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R. (1995) Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *J. Biochem.* 117, 875-880.
147. Pastorino, J. G., Simbula, G., Gilfor, E., Hoek, J. B., Farber, J. L. (1994) Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J. Biol. Chem.* 269(49), 31041-31046.
148. Järvinen, A., Ragö, L., Männistö, P. T. (1992) Effects of central and peripheral type benzodiazepine ligands on thyrotropin and prolactin secretion. *Neuropeptides* 21, 183-191.
149. Männistö, P. T., Laakso, M. L., Järvinen, A., Rågo, L. (1992) Effects of central and peripheral type benzodiazepine ligands on growth

- hormone and gonadotropin secretion in male rats. *Pharmacol. Toxicol.* 71, 75-80.
150. Calogero, A. E., Kamilaris, T. C., Bernardini, R., Johnson, E. O., Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1990) Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253(2), 729-737.
 151. Python, C. P., Rossieri, M. F., Vallotton, M. B., Capponi, A. M. (1993) Peripheral-type benzodiazepine inhibit calcium channels and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinol.* 132(4), 1489-1496.
 152. Gavish, M., Katz, Y., Bar-Ami, S., Weizman, R. (1992) Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* 58(5), 1589-1601.
 153. Mukhin, A. G., Papadopoulos, V., Costa, E., Krueger, K. E. (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9813-9816.
 154. Papadopoulos, V., Mukhin, A. G., Costa, E., Krueger, K. E. (1990) The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* 265(7), 3772-3779.
 155. Cavallaro, S., Korneyev, A., Guidotti, A., Costa, E. (1992) Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10598-10602.
 156. Papadopoulos, V., Amri, H., Boujard, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A. S., Reversa, J. L., Bernassau, J. M., Drieu, K. (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62, 21-28.
 157. Papadopoulos, V., Guarneri, P., Krueger, K. E., Guidotti, A., Costa, E. (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: Regulation by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5113-5117.
 158. Guarneri, P., Papadopoulos, V., Pan, B., Costa, E. (1992) Regulation of pregnenolone synthesis in C6-2B glioma cells by 4'-chlorodiazepam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5118-5122.

159. Gavish, M. (1995) Hormonal regulation of peripheral-type benzodiazepine receptors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53(1-6), 57-59.
160. Gavish, M., Bar-Ami, S., Weizman, R. (1992) The endocrine system and mitochondrial benzodiazepine receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 88, 1-13.
161. Wakabayashi, H., Shimada, K., Satoh, T. (1991) Effects of diazepam administration on melatonin synthesis in the rat pineal gland *in Vivo*. *Chem. Pharm. Bull.* 39(10), 2674-2676.
162. Wakabayashi, H., Shimada, K., Satoh, T. (1991) Effects of adrenergic blockers or bicuculline on diazepam induced changes in rat pineal melatonin synthesis *in Vivo* and *in Vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 39(10), 2677-2680.
163. Petit, P., Chapal, J., Manteghetti, M., Loubatières-Mariani, M. M. (1993) Recherche du mécanisme de l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par une benzidiazépine périphérique, le 4'-chlordiazépan. *C. R. Soc. Biol.* 187, 536-541.
164. Najim, R. A., Clor, K. M. (1993) Role of endorphins in benzodiazepine-induced hyperglycaemia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 995-997.
165. Östenson, C. G., Ahrén, B., Karlsson, S., Knudsen, J., Efendic, S. (1994) Inhibition by rat diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein of glucose-induced insulin secretion in the rat. *Eur. J. Endocrinol.* 131, 201-204.
166. Bolger, G. T., Abraham, S., Oz, N., Weissman, B. A. (1990) Interactions between peripheral-type benzodiazepine receptor ligands and an activator of voltage-operated calcium channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68, 40-45.
167. Elgoyhen, B., Adler-Graschinsky, E. (1989) Diminution by benzodiazepines of the chronotropic responses to noradrenaline in rat isolated atria. *Eur. J. Pharmacol.* 164, 467-478.
168. Hernández, J. (1991) The negative inotropic effect of diazepam in rat right ventricular strips. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 879-881.
169. Martínez, E., Peñafiel, R., Collado, M. C., Hernández, J. (1995) Diazepam potentiates the positive inotropic effect of isoprenaline in rat ventricle strips: role of cyclic AMP. *Eur. J. Pharmacol.* 282, 169-175.

170. Leeuwijn, R. S., Zeegers, A., van Wilgenburg, H. (1993) Actions of benzodiazepines on the inotropy of the perfused rat heart. *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 326(1/2), 5-12.
171. Leeuwijn, R. S., Zeegers, A., van Wilgenburg, H. (1996) PK 11195 antagonizes the positive inotropic response of the isolated rat heart to diazepam but not the negative inotropic response. *Eur. J. Pharmacol.* 299, 149-152.
172. Edoute, Y., Giris, J., Ben-Haim, S. A., Lochner, A., Weizman, A., Hayam, G., Katz, Y., Gavish, M. (1993) Ro 5-4864 and PK 11195, but not diazepam, depress cardiac function in an isolated working rat heart model. *Pharmacology* 46, 224-230.
173. Shany, E., Hochhauser, E., Halpern, P., Vidne, B., Gavish, M., Geller, E., Hasharoni, A., Barak, Y., Yakirevich, V. (1994) Ro 5-4864 has a negative inotropic effect on human atrial muscle strips that is not antagonized by PK 11195. *Eur. J. Pharmacol.* 253, 231-236.
174. Nakae, Y., Kanaya, N., Namiki, A. (1997) The direct effects of diazepam and midazolam on myocardial depression in cultured rat ventricular myocytes. *Anesth. Analg.* 85, 729-733.
175. Grupp, I. L., French, J. F., Matlib, M. A. (1987) Benzodiazepine Ro 5-4864 increases coronary flow. *Eur. J. Pharmacol.* 143, 143-147.
176. Gimeno, M., Pallás, M., Newman, A. H., Camarasa, J., Escubedo, E. (1994) The role of cyclic nucleotides in the action of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in rat aorta. *Gen. Pharmac.* 25(8), 1553-1561.
177. Elgoyhen, B., Lorenzo, P. S., Tellez-Iñón, M. T., Adler-Graschinsky, E. (1992) Relaxant effects of β -carboline on rat aortic rings. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261(2), 534-539.
178. Elgoyhen, A. B., Lorenzo, P. S., Rothlin, R. P., Scapavento, D., Adler-Graschinsky, E. (1993) Relaxant effects of benzodiazepines on isolated human umbilical arteries and veins. *J. Auton. Pharmacol.* 13, 373-379.
179. Escubedo, E., Camarasa, J., Pallas, M., Adzet, T. (1991) Peripheral benzodiazepines potentiate the effect of adenosine in rat vas deferens. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 49-50.

180. Escubedo, E., Pallas, M., Nuñez, C., Camarasa, J. (1992) Effects of Ro 5-4864 and PK 11195 in rat duodenum and vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 225, 15-20.
181. Schaufele, P., Schumacher, E., Acevedo, C. G., Contreras, E. (1995) Diazepam, adenosine analogues and calcium channel antagonists inhibit the contractile activity of the mouse urinary bladder. *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 329(3), 454-466.
182. Kazanietz, M. G., Elgoyhen, A. B. (1990) Relaxant effect of benzodiazepines on uterine rings isolated from estrogen-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 185, 231-234.
183. Yiu, M. K., Kwan, Y. W., Ngan, M. P. (1996) Hormonal modulation of benzodiazepines' actions on rat isolated uterus. *Eur. J. Pharmacol.* 302, 99-108.
184. Camins, A., Diez-Fernández, C., Pujadas, E., Camarasa, J., Escubedo, E. (1995) A new aspect of the antiproliferative action of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 272, 289-292.
185. Zisterer, D. M., Gorman, A. M. C., Williams, D. C., Murphy, M. P. (1992) The effects of the peripheral-type benzodiazepine acceptor ligands, Ro 5-4864 and PK 11195, on mitochondrial respiration. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 14(2), 85-90.
186. Camins, A., Diez-Fernández, C., Camarasa, J., Escubedo, E. (1995) Cell surface expression of heat shock proteins in dog neutrophils induced by mitochondrial benzodiazepine receptor ligands. *Immunopharmacol.* 29, 159-166.
187. Hobbs, W. R., Rall, T. W., Verdoorn, T. A. (1996) Hipnóticos y sedantes; etanol. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen I, pág. 385-422.
188. Amri, H., Ogwuegbu, S. O., Boujard, N., Drieu, K., Papadopoulos, V. (1996) *In Vivo* regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract Egb 761 and isolated ginkgolides. *Endocrinol.* 137(12), 5707-5717.
189. Amri, H., Drieu, K., Papadopoulos, V. (1997) *Ex Vivo* regulation of adrenal cortical cell steroid and protein synthesis, in response to

adrenocorticotrophic hormone stimulation, by the Ginkgo biloba extract Egb 761 and isolated ginkgolide B. *Endocrinol.* 138(12), 5415-5426.

190. Jones, E. A. (1991) Benzodiazepine receptor ligands and hepatic encephalopathy: Further unfolding of the GABA story. *Hepatology* 14(6), 1286-1290.
191. Giguère, J. F., Hamel, E., Butterworth, R. F. (1992) Increased densities of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* 585, 295-298.
192. Leong, D. K., Therrien, G., Swain, M. S., Butterworth, R. F. (1994) Densities of binding sites for the "Peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand ³H-PK 11195 are increased in brain 24 hours following portacaval anastomosis. *Metab. Brain Dis.* 9(3), 267-273.
193. Rao, V. L. R., Audet, R., Therrien, G., Butterworth, R. F. (1994) Tissue-specific alterations of binding sites for peripheral-type benzodiazepine receptor ligand [³H]PK 11195 in rats following portacaval anastomosis. *Digest. Dis. Sci.* 39(5), 1055-1063.
194. Desjardins, P., Bandeira, P., Rao, V. L. R., Ledoux, S., Butterworth, R. F. (1997) Increased expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor-isoquinoline carboxamide binding protein mRNA in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* 758, 255-258.
195. Macdonald, G. A., Frey, K. A., Agranoff, B. W., Minoshima, S., Koeppe, R. A., Kuhl, D. E., Shulkin, B. L., Lucey, M. R. (1997) Cerebral benzodiazepine receptor binding in vivo in patients with recurrent hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 26, 277-282.
196. Kuhlmann, A. C., Guilarte, T. R. (1997) The peripheral benzodiazepine receptor is a sensitive indicator of domoic acid neurotoxicity. *Brain Res.* 751, 281-288.
197. Takada, A., Mitsuka, S., Diksic, M., Yamamoto, Y. L. (1992) Autoradiographic study of peripheral benzodiazepine receptors in animal brain tumor models and human gliomas. *Eur. J. Pharmacol.* 228, 131-139.
198. Alenfall, J., Batra, S. (1994) Peripheral benzodiazepine receptor in androgen sensitive Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 5, 627-631.

199. Batra, S., Alenfall, J. (1994) Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in rat prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* 24, 269-278.
200. Kunert-Radek, J., Stepién, H., Pawlikowski, M. (1994) Inhibition of rat pituitary tumor cell proliferation by benzodiazepines in vitro. *Neuroendocrinology* 59, 92-96.
201. Swinnen, J. V., Esquenet, M., Rosseels, J., Claessens, F., Rombauts, W., Heyns, W., Verhoeven, G. (1996) A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein: Transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *DNA Cell. Biol.* 15(3), 197-208.
202. Leong, D. K., Oliva, L., Butterworth, R. F. (1996) Quantitative autoradiography using selective radioligands for central and peripheral-type benzodiazepine receptors in experimental Wenicke's encephalopathy: Implications for positron emission tomography imaging. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 20(3), 601-605.
203. Rossetti, E., Fragasso, G., Xuereb, R. G., Xuereb, M., Margonato, A., Chierchia, S. L. (1994) Antiischemic effects of intravenous diazepam in patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 24(1), 55-58.
204. Hall, E. D., Andrus, P. K., Fleck, T. J., Oostveen, J. A., Carter, D. B., Jacobsen, E. J. (1997) Neuroprotective properties of the benzodiazepine receptor, partial agonist PNU-101017 in the Gerbil forebrain ischemia model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17(8), 875-883.
205. Jackson, E. K. (1996) Diuréticos. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen I, pág. 735-765.
206. Harris, H. W., Zeidel, M. L. (1996) Cell Biology of Vasopressin. En: *The Kidney*, 5a. edición, Editado por B. M. Brenner, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, volumen I, pag. 516-531.
207. Jackson, E. K. (1996) Vasopresina y otros fármacos que afectan la conservación renal de agua. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen I, pág. 767-784.

208. Moncada, S. (1992) The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145, 201-227.
209. Robertson, R. M., Robertson, D. (1996) Fármacos usados en el tratamiento de la isquemia miocárdica. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen I, pág. 813-834.
210. Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Rev.* 43(2), 109-142.
211. Marsden, P. A., Hall, A. V., Brenner, B. M. (1996) Reactive nitrogen and oxygen intermediates and the kidney. En: *The Kidney*, 5a. edición, Editado por B. M. Brenner, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, volumen I, pag. 713-753.
212. Walder, C. E., Thiemermann, C., Vane, J. R. (1991) The involvement of endothelium-derived relaxing factor in the regulation of renal cortical blood flow in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 102, 967-973.
213. Naess, P. A., Kirkebøen, K. A., Christensen, G., Kiil, F. (1992) Inhibition of renal nitric oxide synthesis with N^G-monomethyl-L-arginine and N^G-nitro-L-arginine. *Am. J. Physiol.* 262, F939-F942.
214. Lockhart, J. C., Larson, T. S., Knox, F. G. (1994) Perfusion pressure and volume status determine the microvascular response of the rat kidney to N^G-monomethyl-L-arginine. *Circulation Res.* 75(5), 829-835.
215. Reid, J. J., Rand, M. J. (1992) Renal vasoconstriction is modulated by nitric oxide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 376-379.
216. Kiyomoto, H., Matsuo, H., Tamaki, T., Aki, Y., Hong, H., Iwao, H., Abe, Y. (1992) Effect of L-N^G-nitro-arginine, inhibitor of nitric oxide synthesis, on autoregulation of renal blood flow in dogs. *Japan. J. Pharmacol.* 58, 147-155.
217. Fulton, D., McGiff, J. C., Quilley, J. (1992) Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 107, 722-725.
218. Moncada, S., Higgs, E. A. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9, 1319-1330.

219. Ashab, Y., Peer, G., Blum, M., Wollman, Y., Chernihovsky, T., Hassner, A., Schwrtz, D., Cabili, S., Silverberg, D., Iaina, A. (1995) Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. *Kidney Int.* 47, 1515-1521.
220. Amore, A., Gianoglio, B., Ghigo, D., Peruzzi, L., Porcellini, M. G., Bussolino, F., Costamagna, C., Cacace, G., Picciotto, G., Mazzucco, G., Sena, L. M., Coppo, R. (1995) A possible role for nitric oxide in modulating the functional cyclosporine toxicity by arginine. *Kidney Int.* 47, 1507-1514.
221. Erdő, S. L., Dobó, E., Párducz, A., Wolff, J. R. (1991) Releasable GABA in tubular epithelium of rat kidney. *Experientia* 47, 227-229.
222. Sidhu, H. S., Wood, J. D. (1989) Gamma-aminobutyric acid uptake by rat kidney brush-border membrane vesicles. *Experientia* 45, 726-728.
223. Rasola, A., Galletta, L. J. V., Barone, V., Romeo, Giovanni, Bagnasco, S. (1995) Molecular cloning and functional characterization of a GABA/betaine transporter from human kidney. *FEBS Lett.* 373, 229-233.
224. Amenta, F., Cavallotti, C., Iacopino, L., Erdő, S. (1988) Autoradiographic localization of the GABA_A receptor agonist [³H]-muscimol within rat kidney. *Pharmacology* 36, 390-395.
225. Erdő, S. L. (1990) Baclofen binding sites in rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 184, 305-309.
226. Beaumont, K., Healy, D. P., Fanestil, D. D. (1984) Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 247, F718-F724.
227. Awad, M., Gavish, M. (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors in human cerebral cortex, kidney, and colon. *Life Sci.* 49, 1155-1161.
228. Calvo, D., J., Medina, J. H. (1993) Calcium induced modulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in rat kidney membranes. *J. Receptor Res.* 13(6), 975-987.
229. Lueddens, H. W. M., Skolnick, P. (1987) Peripheral-type benzodiazepine receptors in the kidney: regulation of radioligand binding by anions and DIDS. *Eur. J. Pharmacol.* 133, 205-214.

230. Lukeman, D. S., Vaughn, D. A., Fanestil, D. D. (1988) Selective pharmacological modulation of renal peripheral-type benzodiazepine binding by treatment with diuretic drugs. *Life Sci.* 42, 367-373.
231. Calvo, D. J., Medina, J. H. (1992) Regulation of peripheral-type benzodiazepine receptors following repeated benzodiazepine administration. *Functional Neurology* (7)3, 227-230.
232. Holmes, P. V., Drugan, R. C. (1992) Angiotensin II rapidly modulates the renal peripheral benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 226,189-190.
233. Holmes, P. V., Drugan, R. C. (1994) Stress-induced regulation of the renal peripheral benzodiazepine receptor: possible role of the renin-angiotensin system. *Psychoneuroendocrinol.* 19(1), 43-54.
234. Wilkinson, G.R. (1987). Clearance approaches in pharmacology. *Pharmacological Rev.* 39(1), 1-46.
235. Levinsky, N.G., Levy, M. (1973). Clearance Techniques, En: *Handbook of Physiology*, Ed. Orloff, J., Berliner, R.W., Washington, D.C. American Physiological Society, pp 103-117.
236. Maack, T. (1986). Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int.* 30, 142-151.
237. Schuster, V.L., Seldin, D.W. (1985). Renal Clearance. En: *The kidney: Physiology and Pathophysiology*, Eds. D. W. Seldin and G. Giebisch, Raven Press, New York, pag. 365-395.
238. Kasiske, B. L., Keane, W. F. (1996) Laboratory assessment of renal disease: clearance, urinalysis, and renal biopsy. En: *The Kidney*, 5a. edición, Editado por B. M. Brenner, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, volumen II, pag. 1137-1174.
239. Dworkin, L.D. , Brenner, B.M. (1996). The renal circulations. En: *The Kidney*, 5a. edición, Editado por B. M. Brenner, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, volumen I, pag. 247-285.
240. Bowman, R. H., Arnow, J., Weiner, I. M. (1978) The effects of 2,4,6-triaminopyrimidine (TAP) on sodium and potassium excretion by the rat kidney: comparison with amiloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206(1), 207-217.

241. Calvo, D. J., Campos, M. B., Calandra, R. S., Medina, J. H., Ritta, M. N. (1991) Effect of long term diazepam administration on testicular benzodiazepine receptors and steroidogenesis. *Life Sci.* 49, 519-525.
242. Bekersky, I. (1983) The isolated perfused kidney as a pharmacological tool. *Trends in Pharmacological Sciences* 4(1), 6-7.
243. Bekersky, I. (1983). Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies. *Drug Metab. Rev.* 14(5), 931-960.
244. Sehic, E., Malik, K. U. (1990) Effect of Protein kinase C inhibitors on the actions of phorbol esters on vascular tone and adrenergic transmission in the isolated rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253(2), 497-507.
245. Stephan, D. , Barthelmebs, M., Krieger, J. P., Decker, N., Rochat, C., Imbs, J. L. (1990) Effect of tertatolol and of its metabolites and structural analogues in isolated perfused rat kidney vasculature. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16, 338-346.
246. Musso, M. J., Barthelmebs, M., Imbs, J. L., Plante, M., Bollack, C., Helwig, J.J. (1989) The vasodilator action of parathyroid hormone fragments on isolated perfused rat kidney. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340, 246-251.
247. Frölich, J. C., Yoshizawa, M. (1987) Renal vascular effects of leukotriene C₄ in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 92, 311-318.
248. Alcorn, D., Emslie, K.R., Ross, B.D., Ryan, G.B., Tange, J.D. (1981). Selective distal nephron damage during isolated kidney perfusion. *Kidney Int.* 19, 638-647.
249. Nowicki, S., Ochoa, E. J., Levin, G., Elías, M.M. (1995) Intrarenal dopamine participation in diuretic and natriuretic responses to frusemide. *J. Auton. Pharmacol.* 15, 159-168.
250. Brezis, M., Rosen, S., Silva, P., Epstein, F.H. (1984). Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney Int.* 25, 65-72.
251. Torres, A. M., Rodriguez, J. V., Ochoa, E. J., Elías, M. M. (1986) Rat kidney function related to tissue glutathione levels. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3355-3358.

252. Epstein, F.H., Brosnan, J.T., Tange, J.D., Ross, B.D. (1982). Improve function with amino acids in isolated perfused kidney. *Am. J. Physiol* 243, F284-F292.
253. Trumper, L., Monasterolo, L., Elías, M.M. (1991). Influencia del uso de diversos anestésicos en los estudios de la función renal en ratas. *Medicina* 51(5), 405-406.
254. Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Rampart, M., Ruytjens, I. F., Verbeuren, T. J., Herman, A. G., Van Maercke, Y. M. (1990) GABA_A receptor-mediated stimulation of non-adrenergic non-cholinergic neurones in the dog ileocolonic junction. *Br. J. Pharmacol.* 101, 460-464.
255. Cutler, M. G., Turner, J. M., Moore, M. R. (1991) A comparative study of the effects of δ -aminolaevulinic acid and the GABA_A agonist, muscimol, in rat jejunal preparations. *Pharmacol. Toxicol.* 69, 52-55.
256. Chiou, L. C., Ling, J. Y., Chang, C. C. (1995) Enhancement by benzodiazepines of the inhibitory effect of adenosine on skeletal neuromuscular transmission. *Br. J. Pharmacol.* 116, 1870-1874.
257. Karaki, H. (1987) Use of tension measurements to delineate the mode of action of vasodilators. *J. Pharmacol. Meth.* 18, 1-21.
258. Kopp, U. C., DiBona, G. F. (1996) Effects of renal nerves and neurotransmitters on renal function. En: *The Kidney*, 5a. edición, Editado por B. M. Brenner, W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA, Vol. I, pag. 789-814.
259. Blue, D. R., Vimont, R. L., Clarke, D. E. (1992) Evidence for a noradrenergic innervation to α_{1A} -adrenoceptors in rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 107, 414-417.
260. Kuriyama, H., Kitamura, K., Nabata, H. (1995) Pharmacological and Physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol. Rev.* 47(3), 387-573.
261. Karaki, H. (1992) Mechanism of α -adrenoceptor-mediated contraction in vascular smooth muscle. En: *α -Adrenoceptors*, Excerpta Medica, Tokyo, pag. 84-97.
262. Karaki, H. (1990) The intracellular calcium-force relationship in vascular smooth muscle. *Am. J. Hypertension* 3, 253S-256S.

263. Kenkare, S. R., Benet, L. Z. (1993) Effect of ethacrynic acid, a glutathione-S-transferase inhibitor, on nitroglycerin-mediated cGMP elevation and vasorelaxation of rabbit aortic strips. *Biochem. Pharmacol.* 46(2), 279-284.
264. Ercan, Z. S., Soydan, A. S., Türker, R. K. (1990) Possible involvement of endothelium in the responses of various vasoactive agents in rabbit isolated perfused kidney. *Gen. Pharmacol.* 21, 205-209.
265. Malomvölgyi, B., Hadházy, P., Magyar, K. (1988) Vasodilator responses in perfused rabbit kidney: the role of endothelium. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 292, 131-140.
266. Del Río, M., Chulia, T., González, P., Tejerina, T. (1993) Effects of indapamide on contractile responses and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ movements in various isolated blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.* 250, 133-139.
267. Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H. (1991) Different effects of verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Japan. J. Pharmacol.* 55, 35-42.
268. Ahlner, J., Ljusegren, M. E., Grundström, N., Axelsson, K. L. (1991) Role of nitric oxide and cyclic GMP as mediators of endothelium-independent neurogenic relaxation in bovine mesenteric artery. *Circulation Res.* 68, 756-762.
269. Heuzé-Joubert, I., Mennecier, P., Simonet, S., Laubie, M., Verbeuren, T. J. (1992) Effect of vasodilators, including nitric oxide, on the release of cGMP and cAMP in the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 220, 161-171.
270. Marín, J., Sánchez-Ferrer, C. F. (1990) Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen. Pharmacol.* 21(5), 575-587.
271. King, A. J., Brenner, B. M. (1991) Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am. J. Physiol.* 260, R653-R662.
272. Vanhoutte, P.M. (1989-1990) Endothelium-derived vasoactive factors. *International Society of Hypertension. Hypertension Annual Critical Reviews for the clinician*, 3-20.
273. Schini, V. B., Vanhoutte, P. M. (1991) L-Arginine evokes relaxations of the rat aorta in both the presence and absence of endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17(53), S10-S14.

274. Lamontagne, D., Pohl, U., Busse, R. (1991) NG-Nitro-L-arginine antagonizes endothelium-dependent dilator responses by inhibiting endothelium-derived relaxing factor release in the isolated rabbit heart. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 418, 266-270.
275. Mohy El-Din, M. M., Malik, K. U. (1988) Neuropeptide Y stimulates renal prostaglandin synthesis in the isolated rat kidney: Contribution of Ca^{++} and calmodulin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246(2), 479-484.
276. Roe, H. H., Epstein, J. H., Goldstein, N. P. (1949) A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.* 178, 839-842.
277. Waugh, W. H., Beall P. T. (1974) Simplified measurement of para-aminohippuric acid and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.* 5, 429-436.
278. Bohrer, M. P., Baylis, C., Humes, H. D., Gassock, R. J. (1978) Permselectivity of the glomerular capillary wall. *J. Clin. Invest.* 61, 72-78.
279. Baylis, C. (1980) The mechanism of the increase in glomerular filtration rate in the twelve-day pregnant rat. *J. Physiol.* 305, 405-414.
280. Boonjarern, S., Mehta, P. K., Laski, M. E., Earnest, W. R., Kurtzman, N. A. (1977) Effect of furosemide on renal handling of glucose in the rat. *Am. J. Physiol.* 1(5), F438-F442.
281. de Mello Aires, M. (1983) Reabsorção e excreção tubular: técnicas de depuração. En: *Fisiologia Renal*. Editores: G. Malnic, M. Marcondes. Editora pedagógica e Universitária Ltda., São Paulo, Brasil, pag. 89-110.
282. Koushanpour, E. (1976) Tubular processing of glomerular ultrafiltrate: Mechanisms of electrolyte and water transport. En: *Renal Physiology: Principles and functions*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pag 150-217.
283. Gregg, C. M., Cohen, J. J., Black, A. J., Espeland, M. A., Feldstein, M. L. (1978). Effects of glucose and insulin on metabolism and function of perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 235, F52-F61.
284. Trimble, M. E. (1982) Long chain fatty acid transport by the perfused rat kidney. *Renal Physiol.* 5, 136-142.

285. Mályusz, M., Ehrens, J., Uschtrin, D. (1982) Interdependence of O₂ consumption, renal NEFA pattern and N-acetylation of PAH in the isolated perfused rat kidney. *Renal Physiol.* 5, 165-172.
286. Fogel, R., Kaplan, R. B., Arbit, E. (1985) Central action of GABA ligands to alter basal water and electrolyte absorption in the rat ileum. *Gastroenterol.* 88, 523-530.
287. Blanckesteijn, W. M., Siero, H. L. M., Rodrigues de Miranda, J. F., van Megen, Y. J. B., Russel, F. G. M. (1993) Characterization of muscarinic receptors in rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 244, 21-27.
288. Pirola, C. J., Alvarez, A. L., Balda, M. S., Finkielman, S., Nahmod, V. E. (1989) Evidence for cholinergic innervation in dog renal tissue. *Am. J. Physiol.* 257, F746-F754.
289. Koushanpour, E. (1976) Formation of glomerular ultrafiltrate. En: *Renal Physiology: Principles and functions*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pág 68-89.
290. Marshall, B. E., Longnecker, D. E. (1996) Anestésicos generales. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen I, pág. 327-351.
291. Iamele, G. E. (1990) Derivados particulares de la benzodiazepina (BD). En: *Las drogas tranquilizantes en medicina veterinaria*. Editorial Inter-Vet. Impresiones Sudamérica, Buenos Aires, República Argentina. pág. 149-185.
292. Haefely, W. E. (1989) Pharmacology of the benzodiazepine receptor. *Eur. Arch. Psychiatr. Neurol. Sci.* 238, 294-301.
293. Yagi, K., Onaka, T. (1996) A benzodiazepine, chlordiazepoxide, blocks vasopressin and oxytocin release after footshocks but not osmotic stimulus in the rat. *Neurosci. Lett.* 203, 49-52.
294. Benet, L. Z., Øie, S., Schwartz, J. B. (1996) Diseño y optimización de regímenes de dosificación; datos farmacocinéticos. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Novena edición. Editores: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., México. Volumen II, pág. 1819-1906.

295. Basile, A. S., Lueddens, H. W. M., Skolnick, P. (1988) Regulation of renal peripheral benzodiazepine receptors by anion transport inhibitors. *Life Sci.* 42, 715-726.
296. Weissman, B. A., Bolger, G. T., Chiang, P. K. (1990) Interactions between nitrogen oxide-containing compounds and peripheral benzodiazepine receptors. *FEBS Lett.* 260(2), 169-172.
297. Gavish, M., Fares, F. (1985) The effect of freezing and thawing or of detergent treatment on peripheral benzodiazepine binding: The possible existence of an endogenous ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 107, 283-284.
298. LeFur, G., Vaucher, N., Perrier, M. L., Flamier, A., Benavides, J., Renault, C., Dubroeuq, M. C., Guérémy, C., Uzan, A. (1983) Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, ³H-RO 5-4864 and ³H-PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sci.* 33, 449-457.
299. Haefely, W. E. (1989) The story and activity of flumazenil (Anexate). *Acta Anaesth. Belg.* 40, 3-9.
300. Haefely, W., Hunkeler, W. (1988) The story of flumazenil. *Eur. J. Anaesthesiol., Supl.* 2, 3-14.
301. Haefely, W. E. (1989) Pharmacology of the allosteric modulation of GABA_A receptors by benzodiazepine receptor ligands. En: *Allosteric modulation of amino acid receptors: Therapeutic Implications*. Eds: Barnard, E. A., Costa, E., Raven Press, Ltd., New York, pag. 47-69.
302. Wikinski, S. I., Acosta, G. B., García Bonelli, C., Medina, J. H., Rubio, M. C. (1992) Acute flumazenil administration: effects on serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, noradrenaline, normetanephrine and gamma-aminobutyric acid endogenous levels in hypothalamus and cerebral frontal cortex. *Biogenic Amines* 9 (1), 57-65.
303. Buldakova, S., Weiss, M. (1997) Electrophysiological evidence for agonist properties of flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist, in rat hippocampus slices. *J. Neurol. Sci.* 149, 121-126.
304. Swillens, S., Waelbroeck, M., Champeil, P. (1995) Does a radiolabelled ligand bind to a homogeneous population of non-interacting receptor sites? *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 151-155.

305. Hathaway, S., Britton, D. R., Solomon, S. (1982) Effects of flurazepam and chlordiazepoxide on the kidney of the rat. *Physiologist* 25, 297.
306. Beaumont, K., Cheung, A. K., Geller, M. L., Fanestil, D. D. (1983) Inhibitors of peripheral-type benzodiazepine receptors present in human urine and plasma ultrafiltrates. *Life Sci.* 33, 1375-1384.