

Tesis de Licenciatura

Ontogenia de la síntesis de neuroesteroides en el sistema nervioso central y su modulación sobre el receptor GABA sub A

Pomata, Pablo Ernesto

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pomata, Pablo Ernesto. (). Ontogenia de la síntesis de neuroesteroides en el sistema nervioso central y su modulación sobre el receptor GABA sub A. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000675_Pomata

Cita tipo Chicago:

Pomata, Pablo Ernesto. "Ontogenia de la síntesis de neuroesteroides en el sistema nervioso central y su modulación sobre el receptor GABA sub A". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000675_Pomata

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ONTOGENIA DE LA SÍNTESIS DE NEUROESTEROIDES EN
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU MODULACIÓN
SOBRE EL RECEPTOR GABA_A**

PABLO ERNESTO POMATA

DIRECTORA: DRA. MONICA L. FISZMAN
CO-DIRECTOR: DR. J. LINO BARAÑAO



TESIS DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Nº 0675

FUNDACION CIMAE
BUENOS AIRES

1998

1. ÍNDICE

	Páginas
1. Índice	1-2
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	4
3.1. El ácido γ -aminobutírico	4
3.1.1. Respuesta fisiológica	5
3.1.2. Receptores de GABA	6
3.1.3. Farmacología	9
3.2. Neuroesteroides	10
3.2.1 Efectos no genómicos	11
3.2.2. Neuroesteroides y canales iónicos	12
3.2.3. Estructura química y mecanismo de acción	13
3.2.4. Biosíntesis de neuroesteroides	16
3.2.5. Regulación de la esteroideogénesis	17
3.2.6. Importancia funcional del camino de la 5α -reductasa	18
3.2.7. 5α -reductasa: características y distribución en el SNC	19
3.2.8. $3\alpha/3\beta$ -HSD: características y distribución en el SNC	20
3.2.9. Especificidad celular en el SNC	20
3.2.10. Esteroideogénesis durante el desarrollo del SNC	21
4. Objetivos	22
5. Materiales y Métodos	23
5.1. Animales	23
5.2. Disección	23
5.3. Incubación con progesterona- $[C^{14}]$	24
5.3.1. Extracción y separación por TLC	24

5.3.2. Identificación de los neuroesteroides	25
5.3.3. Análisis de los resultados	25
5.4 Estudios de unión específica.	27
5.4.1 Fraccionamiento subcelular	27
5.4.2. Curva de desplazamiento	28
5.4.3. Modulación del receptor GABA _A con neuroesteroides	28
6. Resultados	30
6.1 Metabolismo de la progesterona en el SNC	30
6.1.1 Estandarización de las condiciones de incubación	30
6.1.2 Identificación de los neuroesteroides	34
6.1.3 Síntesis de neuroesteroides durante el desarrollo	35
6.2 Ensayos de unión específica al receptor GABA _A	39
6.2.1. Interacción alopregnanolona-isopregnanolona en P5	41
6.2.2. Isopregnanolona en E19	44
7. Discusión	45
7.1 Síntesis de neuroesteroides	45
7.2 Estudios de unión específica al receptor GABA _A	49
8. Conclusiones	52
9. Referencias	53

2. ABREVIATURAS y SINONIMOS

3α/β-hidroxiesteroide oxidorreductasa:	3 α / β -HSO
3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa:	3 β -HSD
5α-pregnan-3α-ol-20-ona:	Alopregnanolona, Alo 5 α ,3 α -THP
5α-pregnan-3,20-diona:	Dihidroprogesterona, 5 α -DHP
5α-pregnan-3β-ol-20-ona:	Isopregnanolona, Iso, 5 α ,3 β -THP
5β-pregnan-3β-ol-20-ona:	Pregnanolona, 5 β ,3 β -THP
Dehidroepiandrosterona:	DHEA
Dehidroepiandrosterona sulfato:	DHEAS
Exx:	Embriones de rata en el día XX de gestación
GABA:	Acido γ -aminobutírico
GABA-T:	GABA transaminasa
GAD:	Acido glutámico decarboxilasa
MBR:	Receptor mitocondrial de benzodiazepinas
NMDA:	N-metil-D-aspartato
Pregnenolona:	PREG
Pregnenolona sulfato:	PREGS
Progesterona:	Prog
Px:	Ratas postnatales de X días
Tetrahidrodeoxicorticosterona:	5 α ,3 α -THDOC
TLC:	Cromatografía en capa delgada

3. INTRODUCCION

3.1. El ácido γ -aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. Este pertenece a la familia de aminoácidos neurotransmisores junto con la glicina, el glutamato y el aspartato. Se sintetiza a partir del glutamato, mediante la ácido Glutámico Decarboxilasa (GAD), una enzima que solo se encuentra en neuronas del SNC y la retina. De la cantidad total de neurotransmisores en el SNC, el GABA representa aproximadamente el 50 %. La GABA- α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T) es la enzima encargada de la metabolización del GABA. Cuando es liberado al espacio sináptico, puede ser recaptado por el terminal o las células gliales, para ser incorporado al ciclo de Krebs mediante la GABA-T.

FIGURA 1: Dibujo Metabolismo: GLUTAMATO \rightarrow GABA \rightarrow Ciclo de Krebs

El GABA ha sido identificado como neurotransmisor inhibitorio en sinapsis neuromusculares de invertebrados. En el SNC de mamíferos su distribución es más difusa, encontrándose principalmente en interneuronas inhibitorias de axón corto, especialmente de la corteza cerebral, el hipocampo y la médula espinal. También se lo ha detectado en diversas conexiones hipotalámicas, en proyecciones de células cerebelosas del Purkinje a núcleos cerebelosos y vestibulares, y en proyecciones del cuerpo estriado a la sustancia nigra.

3.1.1. Respuesta fisiológica

En todos los casos mencionados la función fisiológica del GABA sería la regulación fina de la respuesta neuronal, mediante la producción de un potencial hiperpolarizante que contrarresta las señales despolarizantes debidas a neurotransmisores excitatorios. La hiperpolarización producida por el GABA es consecuencia del cambio de permeabilidad de la membrana celular, selectivo para ciertos iones. Si el receptor sobre el cual actúa el GABA es del tipo A o C (ver más adelante), aumentará la permeabilidad al ion cloruro (Cl^-), que debido al gradiente electroquímico, tenderá a entrar en la célula y le aportará cargas negativas (hiperpolarización). Si en cambio, el GABA actúa sobre su receptor tipo B, aumentará la permeabilidad celular el ion potasio (K^+), que tenderá a salir y por ende a quitarle cargas positivas a la célula, dando también un potencial hiperpolarizante. Como resultado final se obtendrá o no, una respuesta neuronal despolarizante, dependiendo de la sumatoria de señales de entrada excitatorias e inhibitorias. Sin embargo, el GABA no parece ser siempre un neurotransmisor inhibitorio. En neuronas inmaduras de varias regiones del cerebro prenatal y neonatal, hay respuestas despolarizantes mediadas por el receptor GABA_A (Fiszman, et al, 1990; Cherubini, et al, 1991), probablemente debido a un gradiente de Cl^- invertido. Durante el desarrollo del SNC de mamíferos se ha observado que el GABA, su enzima de síntesis (GAD) y su receptor GABA_A , están presentes en varias estructuras aún cuando no están bien establecidas las sinapsis (Lauder, et al, 1986; Van Eden, et al, 1989; Cobas, et al, 1991; Schaffner et al, 1993; Fiszman, et al, 1993). En neonatos tempranos, donde la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas están aún inmaduras, el GABA, a través de su receptor GABA_A , es el principal neurotransmisor excitatorio. Esta despolarización debida a GABA produce un aumento de calcio intracelular (Yuste and Katz, 1993), lo que sugiere que el GABA estaría mediando procesos de proliferación y/o diferenciación de células nerviosas.

Por otra parte se ha postulado que interacciones en las vías gabaérgicas centrales son las implicadas en enfermedades como Corea de Huntington, Parkinson, la

Epilepsia, la Discinesia tardía y la Demencia Senil.

3.1.2. Receptores de GABA

Actualmente se conocen 3 tipos de receptores para el ácido γ -aminobutírico, los A, B y C. Los receptores GABA_A y GABA_C son canales ionotrópicos dependientes de ligando, permeables al ion cloruro. El tipo A es el más ampliamente distribuido y estudiado (Macdonald, R.L. and Olsen, R.W., 1994). Se lo encuentra principalmente en la membrana de neuronas postsinápticas donde, al ser activado media el aumento de la concentración de cloruro intracelular, disminuyendo la probabilidad de disparo de la neurona postsináptica. Mediante la confección de curvas de dosis respuesta se determinó que el GABA tendría por lo menos dos sitios de unión al receptor GABA_A (Sakman, B., et. al., 1983). El receptor GABA_B es metabotrópico y esta asociado a la activación de canales de potasio y calcio mediante proteínas G. Su ubicación puede ser pre o postsináptica. Presinápticamente se lo asocia con la regulación de la liberación de neurotransmisores del terminal. El receptor GABA_A, al igual que el tipo C, pertenece a una superfamilia de receptores ionotrópicos activables por ligandos cuyos miembros (como por ejemplo el receptor de glicina, el receptor nicotínico de acetilcolina y el 5-HT₃ de serotonina), comparten ciertas características estructurales y funcionales. El GABA_A es probablemente el receptor más complicado en términos de la cantidad de subtipos que posee y la variedad de ligandos que interaccionan en sitios específicos del receptor. Los integrantes de esta superfamilia son proteínas heteropentaméricas en la que las 5 subunidades transmembrana se ensamblan formando un poro central. En el caso del receptor GABA_A, se han identificado hasta el momento 4 familias de subunidades que pueden formar parte de él: α , β , γ y δ . A su vez de cada familia se conocen varios subtipos de subunidades: 1 a 6 de α , 1 a 4 de β , 1 a 3 de γ y 1 de δ . Si no hubiera restricciones en las combinación posibles entre todas las subunidades conocidas, potencialmente podrían existir miles de isoformas del receptor GABA_A.

Fisiológicamente se ha descrito un número limitado de combinaciones, ya que existiría cierta predisposición de algunas subunidades a ser coensambladas (Mc Kernan, R. M. and Whiting, P. J., 1996), y/o expresarse selectivamente en ciertas regiones del SNC. La combinación de subunidades más común es $\alpha 1, \beta 2, \gamma 2$, con una abundancia relativa del 43%. Esta combinación esta presente en la mayor parte del cerebro, pero existen en menor cantidad al menos otras 15 combinaciones identificadas en regiones específicas del cerebro. La estequiometría del receptor no está aún esclarecida, pero es evidente que al menos una subunidad debe estar representada más de una vez. Se ha encontrado que en algunos casos coensamblan en un mismo receptor diferentes subtipos de subunidades α (Pollard, S., et al, 1995; Duggan, M.J., et al, 1993) y γ (Quirk, K, et al, 1994; Khan, Z.U., et al, 1994), pero no hay evidencias de que esto ocurra con las subunidades β . La subunidad δ , es la menos representada en la población total de receptores GABA_A, y pareciera ser mutuamente excluyente con la subunidad γ . Con respecto al receptor GABA_C se creyó en un principio que era un subtipo del GABA_A, pero debido a importantes diferencias farmacológicas se lo considera ahora como un tipo distinto. Aparentemente es un homopentámero conformado por subunidades ρ descritas recientemente (Cutting, et al, 1991), que se expresan principalmente en la retina. Hasta el momento se conocen 3 subtipos de subunidad ρ .

Todas las subunidades poseen 4 dominios transmembrana (TM), un loop citoplasmático largo con sitios susceptibles a la fosforilación (aproximadamente 90 aminoácidos) que une TM3 con TM4 y también un gran dominio N terminal en el cual están los sitios de interacción con ligandos. El dominio TM2 de cada subunidad seria el involucrado en la formación del poro del canal (Smith, G. B. and Olsen, R. W., 1995). El cambio de un residuo de Alanina por Serina en el dominio TM2 en las subunidades α , β o γ , da por resultado un receptor GABA_A resistente a picrotoxina, un bloqueante del canal de cloro (French-Constant, R.H., et al, 1993)

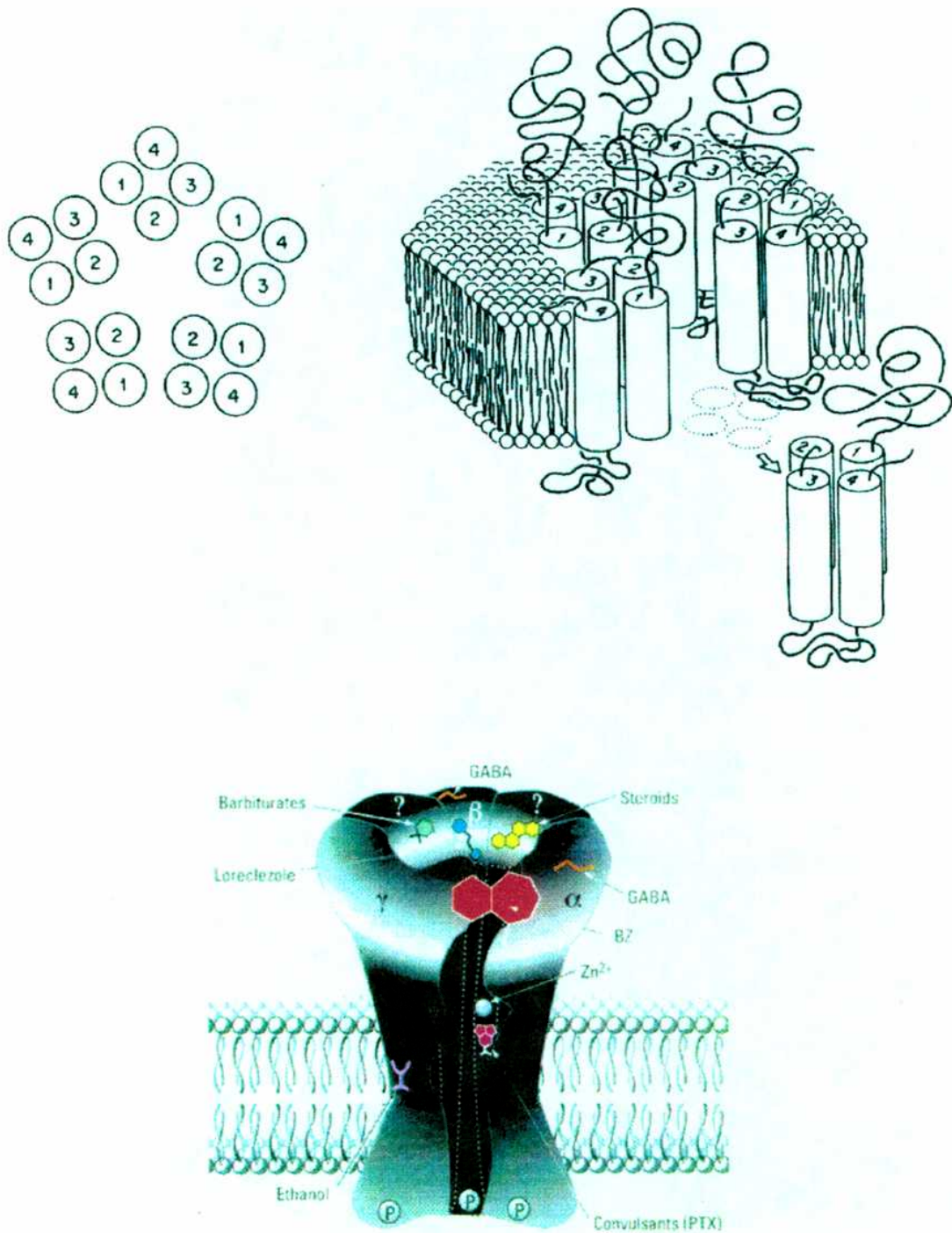


FIGURA 2: Modelos de la estructura tridimensional del receptor GABA_A. Arriba: ubicación de los cuatro dominios transmembrana (cilindros representando las α -hélices) de las 5 subunidades, corte transversal (derecha) y perspectiva de la inserción en la membrana plasmática (izquierda). Nótese que el poro del receptor estaría formado por el dominio transmembrana 2 de cada subunidad. Abajo: representación esquemática del receptor asignando los sitios de unión del GABA y algunos moduladores a las subunidades correspondientes (McKernan and Whiting, 1996).

3.1.3. Farmacología

El receptor GABA_A es modulado alostéricamente por un amplio espectro de moléculas, como etanol, benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, etc (Figura 2). Las benzodiazepinas ejercen sus efectos sedativo, hipnótico, relajante muscular, ansiolítico y anticonvulsivante probablemente a través de varios mecanismos, pero su principal blanco es sin duda el receptor GABA_A al cual se unen y modulan alostéricamente (Pritchett, et al, 1989a y 1989b). La presencia de la subunidad γ en la estructura del canal es esencial para que pueda ser modulado por benzodiazepinas. El mecanismo de acción involucra un aumento de la frecuencia de apertura del canal de cloruro asociado al receptor (Twyman, et al, 1989), probablemente aumentando la fuerza de unión entre la proteína y el ácido γ -aminobutírico, pero sin afectar la cinética de apertura y cierre del canal (Rogers, et al, 1994).

Los barbitúricos aumentan alostéricamente la unión tanto del GABA como de las benzodiazepinas al receptor GABA_A. Sin embargo a diferencia de estas últimas, los barbitúricos en altas concentraciones, activan el canal de cloruro aún en ausencia de GABA (Macdonald, R.L., et al, 1979). Por otro lado, el mecanismo de acción también es diferente, ya que los barbitúricos producen un aumento del tiempo promedio de apertura del canal una vez que este ya se encuentra abierto, sin cambiar la probabilidad de apertura (Macdonald, R.L., et al, 1989). Los barbitúricos fueron reemplazados en su uso clínico por las benzodiazepinas dado que estas poseen mayor especificidad terapéutica y menor cantidad de efectos secundarios.

El receptor GABA_A sería uno de los principales implicados en los efectos del etanol y el alcoholismo (Korpi, R.E., 1994). El etanol tiene un efecto concentración dependiente sobre la potenciación de los efectos del GABA, y puede modular diferencialmente las corrientes debidas al receptor GABA_A en distintas partes del cerebro (Soldo, B.L., et al, 1994). Concentraciones de etanol anestésicas (de 40 a 500 mM) y sub-anestésicas (20 mM) parecen tener distintos

mecanismos de acción. La respuesta al etanol a bajas concentraciones (por ejemplo sedación y disminución de los reflejos) es dependiente de la subunidad γ_{2L} . Esta es una variante de la γ_2 producida por procesamiento alternativo, que posee un loop citoplasmático con un posible sitio de fosforilación por la proteína kinasa C (PKC) (Wafford, K.A and Whiting, P.J., 1992). En concordancia con esto fue publicado que la potenciación del efecto del GABA debida al etanol, esta modulada por PKC (Weiner, et al, 1994).

Los tres subtipos de receptores para el ácido γ -aminobutírico pueden ser discriminados farmacológicamente. El receptor GABA_A posee un agonista selectivo, el muscimol, que es sintetizado naturalmente por el hongo *Amanita Muscaria* y es ampliamente utilizado para estudios de unión específica. Los anticonvulsivantes bicuculina y picrotoxina son respectivamente, el antagonista competitivo y el bloqueante no competitivo, característicos de este receptor. Aunque el GABA_C también responde al muscimol y es bloqueado por picrotoxina, tiene al ácido cis-aminocrotónico (CACA) como agonista selectivo, siendo además insensible a bicuculina, benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides (Bormann y Feigenspan, 1995). El receptor GABA_B no es activable por muscimol, ni es bloqueado por bicuculina o picrotoxina. Posee al baclofén y al faclofén como agonista selectivo y antagonista competitivo, respectivamente.

3.2. Neuroesteroides

El término neuroesteroides ha sido adjudicado a aquellos esteroides que son sintetizados en el sistema nervioso de novo, o bien a partir de precursores, de forma independiente de las fuentes periféricas (Baulieu EE. and Robel, 1990). Los esteroides neuroactivos, o sea aquellos que ejercen algún efecto sobre el sistema nervioso, pueden o no, ser neuroesteroides. La acumulación de estos compuestos en el tejido nervioso ya ha sido descripta hace varias décadas (Karavolas, H. J. and Herf, S. M., 1971; Corpèchot, C., et al, 1981 and 1983), pero recién en los últimos diez años ha sido demostrada su síntesis a partir del colesterol (Hu Z. Y.,

et al, 1987; Le Goascogne, C., et al, 1987; Jung-Testas, I., et al, 1989; Melcangi, R. C., et al 1993; Sanne and Krueger, 1995; Khanna, M., et al, 1995).

Algunos neuroesteroides cumplen funciones fundamentales en la regulación de la homeostasia y la fisiología de los vertebrados (como por ejemplo la progesterona y la dehidroepiandrosterona), pero se conoce poco sobre su participación en funciones fisiológicas del sistema nervioso, mas allá de los cambios comportamentales y neuroanatómicos que producen los esteroides sexuales. Una mención especial merece el efecto regenerativo que ejerce la progesterona en el nervio ciático, donde es sintetizada por las células de Schwan. Allí, el bloqueo de la síntesis de progesterona luego una criolesión, impide la remielinización del nervio, mientras que su administración local promueve la generación de nuevas capas de mielina (Koenig, H.L., et al, 1995).

A raíz de su lipofilicidad, los esteroides logran atravesar las membranas celulares y ejercen su acción directamente dentro de la célula. Luego de atravesar la membrana plasmática las hormonas esteroideas pueden unirse a su receptor citoplasmático mediante el cual activan o reprimen genes. Este es el clásico mecanismo de acción de las hormonas esteroideas. Los receptores de hormonas esteroideas pertenecen a la superfamilia de receptores citoplasmáticos junto con los receptores de hormona tiroidea, vitamina D y ácido retinoico. Son proteínas solubles que poseen tres dominios principales: de unión a la hormona, de transactivación y de unión al ADN. En ausencia de la hormona específica se hallan en el citoplasma, pero cuando se unen a su ligando, todo el complejo hormona receptor se transloca al núcleo donde pueden unirse al ADN en secuencias específicas, y regular directamente la transcripción. Este mecanismo de acción hormonal, como cualquier otro que tenga el paso limitante de la transcripción, es lento, pudiendo tardar desde aproximadamente 30 minutos a varias horas para que el efecto sea apreciable.

3.2.1 Efectos no genómicos

Hace ya más de cincuenta años que fue descripta una rápida actividad sedativa y

anestésica de algunos esteroides naturales, que es incompatible con la clásica y lenta regulación génica (Selye, 1941). En 1984, Harrison y Simmonds, observaron que el esteroide sintético alfaloxona (5α -pregnan- 3α -ol-11,20-diona), el cual fue utilizado como anestésico, potenciaba la hiperpolarización mediada por el receptor GABA_A. Con esta observación, tomó mayor sustento la teoría del mecanismo de acción no genómico de estos esteroides, ya que explica el efecto anestésico y sedativo rápido observado por primera vez por Selye, y posteriormente por otros autores (Figdor S K, et al, 1957; Atkinson R M, et al, 1965). Además de estas observaciones tempranas, se han descrito y reconocido en los últimos años muchos efectos no genómicos mediados por esteroides. Los ejemplos de acciones esteroideas no genómicas incluyen los efectos rápidos de la aldosterona en linfocitos y músculo liso vascular, los efectos de la vitamina D3 en las células epiteliales, la acción de la progesterona en el esperma humano y los efectos vasculares de los estrógenos (Revisado por Wehling, M, 1997).

3.2.2. Neuroesteroides y canales iónicos

Hasta la fecha ha aparecido una gran cantidad de neuroesteroides capaces de modular al receptor tipo A del ácido γ -aminobutírico y de otros neurotransmisores, produciendo efectos tanto depresivos como excitatorios del sistema nervioso central (SNC). Wu F-S. y colaboradores en 1990 demostraron que la progesterona modula negativamente al receptor de glicina y en 1991 que la pregnenolona sulfato (PREGS) modula positivamente al receptor de NMDA, el cual responde al neurotransmisor excitatorio más abundante en el SNC, el glutamato. La progesterona también inhibe la respuesta del receptor nicotínico de acetilcolina (Valera, S., et al, 1992; Lèna and Changeux, 1993) posiblemente mediante un sitio alostérico, se une a receptores σ de opiáceos (Su, T. P., et al, 1988), y junto con pregnanolona sulfato y dehidroepiandrosterona sulfato, modula vía receptores $\sigma 1$ la liberación de norepinefrina-[H³] causada por el NMDA en rebanadas de hipocampo precargadas (Monnet. F. P., et al, 1995). La alopregnanolona (5α -

pregnan-3 α -ol-20-ona; 5 α ,3 α -THP), un derivado de la progesterona, es uno de los más potentes moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A (Majewska, M. D., et al, 1986; Lambert, J. J., et al, 1995), mientras que tanto la pregnenolona sulfato como la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) serían moduladores alostéricos negativos del mismo receptor (Majewska M D, et al, 1987 y 1990). Recientemente, mediante la técnica de fijación de voltaje (voltage clamp), se encontraron evidencias de que la progesterona potenciaría la respuesta del receptor de Kainato, en cultivos de neuronas de médula espinal de pollo (Wu, F.S., et al, 1998).

Receptor	Modulación	Esteroides
GABA _A	+	Alopregnanolona (5 α ,3 α -THP)
		Tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC)
		Pregnanolona (5 β ,3 α -THP)
		Androsterona
	-	Pregnenolona sulfato (PREGS)
		Dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS)
Glutamato (NMDA)	+	PREGS
Glutamato (Kainato)	+	Progesterona (Wu FS, et al, 1998)
Nicotínico de Ach.	-	Progesterona
Glicina	-	Progesterona
		PREGS

Tabla 1: Receptores asociados a canales iónicos modulados por esteroides neuroactivos.

3.2.3. Estructura química y mecanismo de acción

Mediante técnicas de electrofisiología y estudios de unión específica a radioligandos se han hallado ciertos requerimientos estructurales que los esteroides deben cumplir para que posean actividad moduladora sobre el receptor

GABA_A. Por convención, la configuración α para un determinado sustituyente lateral, corresponde a aquellos que están por debajo del plano formado por el sistema de anillos de los esteroides, mientras que los β son los que están por encima. Cuando se las representa en el plano, la configuración α se simboliza con una línea discontinua para diferenciarla de la β (Figura 3). Los compuestos activos poseen un esqueleto pregnano (21 carbonos) o androstano (19 carbonos) reducido en la posición 5α o 5β y con un oxidrilo en la posición 3α que es fundamental (Harrison, N. L., et al, 1987). En los pregnan-esteroides la cadena lateral del carbono 17 debe estar en posición β con un grupo cetona en el carbono 20, mientras que en los esteroides de 19 carbonos el grupo cetona esta en la posición 17 (Lamert, J. J., et al, 1995). Los esteroides 3β reducidos como la isopregnanolona (5α -pregnan- 3β -ol-20-ona) o la epipregnanolona (5β -pregnan- 3β -ol-20-ona), carecen totalmente de capacidad moduladora sobre el receptor GABA_A de mamíferos adultos. Muchos neuroesteroides están presentes también en sus formas conjugadas como sulfatos o ésteres de ácidos grasos. Estas formas pueden tener una especificidad biológica totalmente distinta a la de su homólogo no conjugado (Tabla1). Parecería ser que la orientación α o β del sulfato conjugado es importante para determinar el tipo de modulación que ejerce sobre el receptor GABA_A. Los 3α -hidroxiesteroides sulfato (como alopregnanolona sulfato) potencian la captación de Cl⁻ mediada por muscimol, mientras que los 3β -hidroxiesteroides sulfato la inhiben (El Etr, M., et al, 1998).

Estos estrictos requerimientos estructurales necesarios para que los esteroides neuroactivos modulen el receptor GABA_A, sugieren que su mecanismo de acción es mediante un sitio específico, más que por un efecto inespecífico de desorganización de la membrana celular en el entorno del receptor (Laurence and Gill, 1975). Cuando los neuroesteroides son aplicados intracelularmente no se observa el incremento de las corrientes entrantes de cloruro visto cuando se los aplica extracelularmente, lo que indica que el sitio de acción de estos neuroesteroides estaría del lado externo de la membrana plasmática (Lambert, J.J., et al, 1996). Los neuroesteroides actuarían aumentando el tiempo medio de

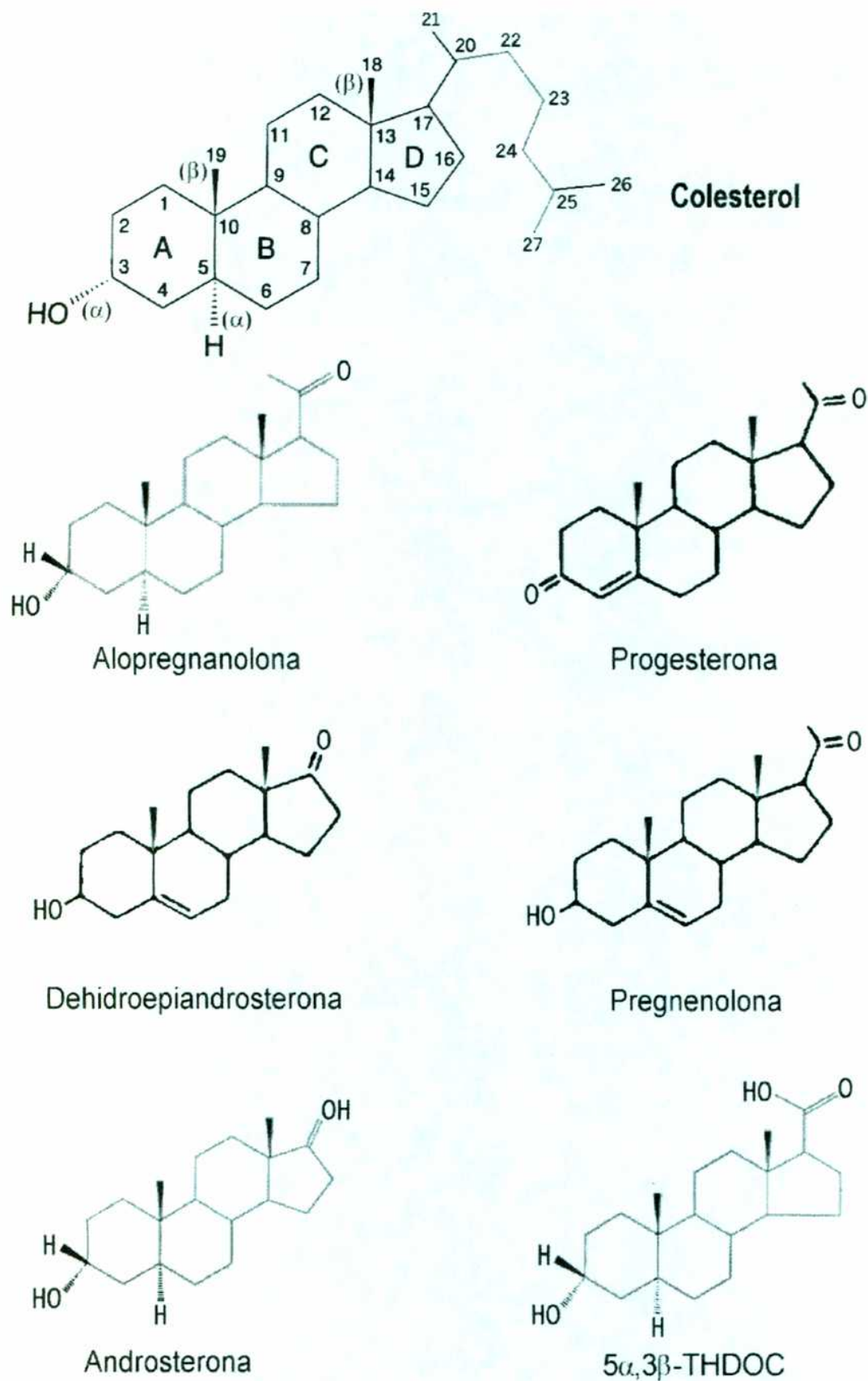


Figura 3: Estructura química y nomenclatura de los esteroides. Arriba: colesterol con la nomenclatura. Abajo: algunos neuroesteroides conocidos.

apertura y la probabilidad de apertura del canal de cloruro asociado al receptor GABA_A, sin modificar la duración de los estados abiertos, teniendo de esta forma similitud en su modo de acción con los barbitúricos y las benzodiazepinas. También se observó que en altas concentraciones activan directamente el canal, como sucede con los barbitúricos, pero el efecto sinérgico o aditivo entre esteroides y barbitúricos descarta la posibilidad de que actúen sobre el mismo sitio. Como se vio por estudios con DNA recombinante, los neuroesteroides pueden modular alostéricamente varios subtipos de receptor GABA_A, aún homooligómeros. A pesar de que se encontró, que diferencias en la composición de subunidades altera la eficiencia de la modulación por neuroesteroides, no se halló una correlación absoluta con la presencia o ausencia de alguna subunidad. Las subunidades que más parecen influir son las del tipo α , γ y δ (Puia, G., et al, 1993; Zhu, W.J., et al, 1996)

3.2.4. Biosíntesis de neuroesteroides

La síntesis de todos los esteroides, inclusive los neuroesteroides, comienza con la molécula precursora de colesterol cuya estructura básica es el ciclopentano-perhidrofenantreno (Figura 3). Este puede ser incorporado desde la dieta o sintetizado en el propio organismo totalmente *de novo*. En la corteza adrenal y otros tejidos esteroideogénicos, incluidas las células gliales, se lleva a cabo la conversión de colesterol en pregnenolona que es catalizada por el citocromo P450_{scc}, localizado en la membrana interna mitocondrial. A partir de la pregnenolona derivan las vías que darán progestágenos, corticosteroides, andrógenos y estrógenos. La progesterona es sintetizada directamente desde la pregnenolona mediante la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4 isomerasa (3 β -HSD), de la cual se conocen seis isoformas de ratón, dos de humanos y cuatro de ratas, entre otros vertebrados (Morel, Y., et al, 1997). Esta enzima es inhibida reversiblemente por el trilostano. En el cerebro, la principal vía de metabolización de la progesterona es la de la 5 α -reductasa. Su producto es la 5 α -pregnan-3,20-

diona (5α -DHP), un progestágeno que conserva la capacidad de unirse al receptor intracelular de progesterona. La 5α -DHP puede ser hidroxilada en posición 3 para dar alopregnanolona si es 3α , o isopregnanolona si es 3β . Las enzimas que catalizan esta reacción son la 3α ó 3β -hidroxiesteroide oxidorreductasa (3β -HSO), también conocidas como hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta última denominación no es utilizada para no confundirla con la enzima homónima que sintetiza progesterona.

La alopregnanolona puede ser sintetizada activamente a partir de la progesterona en varios tejidos, incluido el SNC. Como su efecto sobre el receptor citoplasmático de la progesterona es prácticamente nulo, se suponía en un principio que era un producto derivado del catabolismo y la inactivación de la progesterona. Sin embargo esto cambió a partir del descubrimiento de su acción neuromoduladora *in vitro* e *in vivo*.

Uno de los neuroesteroides que desde hace más tiempo se conoce que se acumula en el cerebro independientemente de órganos periféricos es la DEHA, y sus formas conjugadas, con sulfato (DEHAS) o ácidos grasos (DEHAL). La DHEA sería sintetizada por la enzima $P450_{17\alpha}$ a partir de la pregnenolona, pero esta enzima aún no ha sido encontrada en cerebro y por lo tanto se desconoce el origen de la acumulación de DEHA y sus derivados en el sistema nervioso (Robel, P. and Baulieu, EE., 1994).

FIGURA 4: DIBUJO DEL CAMINO METABOLICO COLESTEROL A ALOPREGNANOLONA E ISOPREGNANOLONA

3.2.5. Regulación de la esteroideogénesis

A pesar de que no se conoce demasiado acerca de los mecanismos que regulan la síntesis de neuroesteroides, se sabe que existe un complejo mecanismo que regula la accesibilidad del colesterol al citocromo $P450_{scc}$, limitando así la velocidad de síntesis de pregnenolona. En este proceso está implicado un péptido endógeno

llamado DBI (Diazepam Binding Inhibitor) que se expresa especialmente en tejidos esteroideogénicos, aumentando la capacidad de síntesis de esteroides. En la membrana externa mitocondrial existe una proteína hetero-oligomérica, llamada receptor mitocondrial de benzodiazepinas (MBR), que influencia la translocación del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna, donde está el citocromo P450_{scc}. El DBI y algunos derivados suyos, aumentarían la síntesis de pregnenolona en células gliales mediante su interacción con el MBR (Papadopoulos, V., et al, 1991; Costa, E.; et al, 1994). Existen otros factores que pueden regular la síntesis de neuroesteroides. El AMP cíclico y los glucocorticoides pueden estimular la síntesis de pregnanolona en cultivos mixtos de células gliales; aunque esto también puede ser un efecto de la diferenciación inducida *in vitro*. La densidad de células gliales en cultivo también es un factor que regula la síntesis de PREG y DHEA, ya que la actividad 3 β -HSD es inhibida fuertemente a alta densidad celular.

3.2.6. Importancia funcional del camino de la 5 α -reductasa

Esta enzima tiene un papel importante en la inactivación y activación de esteroides con actividad biológica. Como ya se mencionó, la 5 α -reductasa transforma la progesterona en dihidroprogesterona, la cual tiene menor actividad progestágena. Este paso facilita la síntesis de alopregnanolona por la 3 α -HSO, la cual no tiene acción como progestágeno, pero es uno de los más potentes moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A. La 5 α -reductasa también reduce la testosterona dando 5 α -androstano-17 β -ol-3-ona (Dihidrotestosterona), que posee mayor capacidad androgénica por ser más afín al receptor intracelular de testosterona. La deoxicorticosterona también es sustrato de la 5 α -reductasa y la 3 α -HSO, dando tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC), que al igual que la alopregnanolona es un potente modulador del receptor GABA_A.

3.2.7. 5 α -reductasa: características y distribución en el SNC

La reacción catalizada por la 5 α -reductasa es dependiente de NADPH, y al menos en células de mamíferos es irreversible (Celotti, F., et al, 1992; Negri-Cesi, P., et al, 1996). Algunos corticosteroides, andrógenos y progestágenos pueden ser sustrato de la 5 α -reductasa, aunque con diferentes afinidades. Tomando como referencia el sustrato circulante más representativo de estas clases de esteroides, se determinó que la afinidad de la 5 α -reductasa por la progesterona es mayor que por la testosterona, que a su vez es mayor que por la corticosterona; siendo los Km respectivos (en mM) de 0,8 a 1,3; de 1 a 5 y 18, para la isoenzima tipo I de humanos (Levy, M.A., et al, 1995). Sin embargo muy diferentes son los valores de Km de las 5 α -reductasa asiladas de hipófisis e hipotálamo, donde dan aproximadamente 100nM en ambos casos (Karavolas, H.J. and Hodges, D.R., 1992). Hasta el momento se han caracterizado y clonado dos isoformas de la 5 α -reductasa, la tipo I y la tipo II. La 5 α -reductasa II es la más abundante en los tejidos reproductivos, pero la I es la predominante en los tejidos periféricos incluyendo el cerebro. Las dos isoformas de 5 α -reductasa poseen diferente pH óptimo. Mientras que la tipo I es activa en un amplio rango de pH (5 a 8) la tipo II tiene un estrecho margen entre pH 4,5 y 5,5, siendo prácticamente inactiva a pH 7,5 (Negri-Cesi, P., et al, 1996). No existen muchos datos acerca de la distribución cerebral de la 5 α -reductasa, pero hay evidencias de que se expresan ambas isoformas (Normington, K and Rusell, D.W., 1992). Los niveles más altos de actividad 5 α -reductasa en el SNC fueron encontrados en estructuras asociadas con la sustancia blanca como *midbrain tegmantum*, *midbrain*, *pons* y la medula espinal. Posteriormente se vio que las membranas mielinizadas purificadas poseen una alta actividad 5 α -reductasa. Experimentos con antisueros policlonales e hibridación de ARN, mostraron que la 5 α -reductasa tipo I esta presente en muestras de cerebelo, hipotálamo, pons y medulla oblongata de humanos (Thigpen, A., et al, 1993), mientras que por inmunocitoquímica la isoenzima tipo II solo fue detectada en las células piramidales de la corteza cerebral (Eicheler,

W., et al, 1994.).

3.2.8. 3 α /3 β -HSO: características y distribución en el SNC

La producción de metabolitos con potente actividad neuromoduladora, como los tetrahydroxisteroides 5 α ,3 α -THP y THDOC, es llevada a cabo por la 3 α -HSO (Figura 4). De la 3 β -HSD hay muy poca información. De la 3 α -HSO se ha clonado 3 isoformas y se ha visto que pertenecen a la familia de las aldo-ceto reductasas y al igual que casi todos sus miembros prefieren NADPH como cofactor. La hidroxilación en posición 3 α ó 3 β es una reacción reversible que utiliza NADH o NADPH como agente reductor. La 3 α -HSO se expresa en tejidos esteroideogénicos clásicos, pero también en el cerebro, en regiones como el bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo, corteza e hipófisis (Cheng, K.C., et al, 1994). En hipotálamo e hipófisis están descritas al menos dos actividades distintas de 3 α -HSO, que difieren en la localización subcelular, cofactores requeridos, pH y temperatura óptimos. En ambas estructuras la actividad de la isoenzima que requiere NADH como cofactor está asociada a la fracción de membranas y parece favorecer la reacción en el sentido de la oxidación (5 α ,3 α -THP a 5 α -DHP), mientras que la que necesita NADPH esta asociada a la fracción citoplasmática y favorecería la reducción (Krause, J.E. and Karavolas, H.J.; 1980a, b y c).

3.2.9. Especificidad celular en el SNC

La esteroideogénesis en el sistema nervioso es llevada a cabo por las células gliales, aparentemente astrocitos de tipo I y oligodendrocitos, ya que son ellas, y no las neuronas, las que tienen actividad de citocromo P450_{scc} y pueden convertir colesterol en pregnenolona. Sin embargo algunos pasos de la síntesis de alopregnanolona pueden ser llevados a cabo en neuronas. Aunque se encontró baja actividad 3 β -HSD tanto en neuronas como glía, la progesterona, cuando no es derivada de algún tejido periférico, podría ser sintetizada por ambos tipos

celulares (Robel, P. and Baulieu, EE., 1994). En estudios llevados a cabo en cultivos puros Melcangi R.C. y col. observaron que la capacidad de metabolizar progesterona a 5α -DHP esta presente principalmente en neuronas, pero también en oligodendrocitos y astrocitos, aunque en estos últimos en menor grado. La actividad 3α -HSD (transformación de 5α -DHP en $5\alpha,3\alpha$ -THP) estaría casi exclusivamente en astrocitos tipo 1 (Melcangi, R.C., et al, 1994). Resultados muy similares fueron obtenidos utilizando testosterona como sustrato (Melcangi, R.C., et al, 1993).

3.2.10. Esteroideogénesis durante el desarrollo del SNC

Hay muchas evidencias de que durante la neurogénesis, el SNC y periférico tienen la capacidad de sintetizar esteroides. En este sentido se ha publicado que el citocromo P450_{scc}, esta presente en sistema nervioso central y periférico desde los 9,5 días de gestación (Compagnone, et al, 1995). Durante el desarrollo prenatal de la rata se describió un pico de actividad 5α -reductasa en los días 17 o 18 que coincide con el de expresión de su ARN mensajero y luego baja a niveles moderados hasta el día 4 de vida (Lephart, E.D., et al, 1990). En el mismo trabajo muestran que en el desarrollo postnatal, la actividad máxima tanto en corteza como en hipotálamo se da durante las dos primeras semanas de vida, mientras que en la fracción mielinizada la mayor actividad se da en los días 19 a 21. Recientemente, mediante experimentos de hibridación *in situ* (Lauber and Lichtensteiger, et al, 1996) mostraron la presencia del ARN mensajero de la 5α -reductasa tipo 1 en embriones de 12 días de gestación en adelante. Su expresión se vio claramente asociada a zonas del SNC en activo desarrollo durante el período prenatal, haciéndose más difusa su localización a medida que prosigue el desarrollo. Estas evidencias sugieren que el SNC embrionario tiene una alta capacidad de sintetizar neuroesteroides. Sin embargo no esta claro aún si fisiológicamente lo hacen, cuales neuroesteroides se producirían, y si tienen alguna función para el desarrollo del sistema nervioso del feto y el embrión.

4. OBJETIVOS

- Investigar si el sistema nervioso central embrionario tiene la capacidad de sintetizar neuroesteroides derivados de la progesterona, con actividad neuromoduladora.
- Caracterizar el patrón de síntesis de neuroesteroides de interés, en el sistema nervioso central de ratas en distintos estadios de gestación.
- Estudiar si los neuroesteroides sintetizados en el sistema nerviosos central de ratas prenatales y neonatales pueden modular el receptor GABA_A de esos estadios.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Animales para la experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas (Ad), postnatales de 5 días (P5), neonatas (P0) y embriones de tres estadios de gestación (E13, E16 y E19). Salvo los animales adultos, en los que se tomó la precaución de que sean todos machos, en el resto de las edades no se hizo discriminación por sexo para ningún experimento. Los animales fueron criados y mantenidos en un bioterio con un fotoperíodo luz-oscuridad de 12 hs (luz entre las 6 y las 18 hs). Fueron alimentadas con dieta balanceada estándar para ratas. El agua se proveyó *at libitum*. La edad gestacional embrionaria fue determinada por la presencia de espermatozoides vaginales, tomando el día que se realizó el extendido como cero (E0).

5.2. Disección

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Los embriones fueron extraídos previamente por disección cesárea e inmediatamente decapitados.

En estadios de gestación superior a E19, se disecó la corteza cerebral de ambos hemisferios, mientras que en los embriones de 16 días se disecó la vesícula telencefálica y en los de 13 sólo fue posible disecar la cabeza completa, debido a que la inmadurez del SNC imposibilita el reconocimiento de estructuras más específicas. También fueron disecadas y utilizadas en este trabajo las placentas de estadios E13, E16 y E19, y la médula espinal de E13, E16 y P0. Todos los tejidos fueron mantenidos durante la disección, y hasta el momento de ser pesados, en solución fisiológica en hielo.

FIGURA 5: CORTES PARA CADA ESTADIO INDICADOS EN FIGURAS DE ATLAS DE RATA (FALTA).

5.3. Incubación con progesterona-[C¹⁴]

Como la consistencia del tejido nervioso aumenta con su maduración, es posible que en ratas adultas la difusión de la progesterona-[C¹⁴] a las células, sea más lenta que en embriones donde el tejido es muy blando. Para disminuir este efecto, las muestras disecadas fueron picadas con tijera en trozos pequeños.

Luego, 100 mg de cada tejido fueron incubados entre 30 min. y 6 hs, a 37°C, en 0,5 ml de DMEM (Dulbecco Minimum Esencial Medium) sin suero a tubo cerrado, y con agitación. El medio contenía también 20000 dpm de progesterona-[C¹⁴] (48.9nCi/mmol) y 6 gramos/litro de glucosa. La concentración de progesterona-[C¹⁴], la cantidad de tejido y medio de incubación fueron fijadas inicialmente según Colman-Lerner 1992. Todo el procedimiento fue realizado en hielo hasta el momento de la incubación. La reacción se cortó congelando los tubos a -20°C. Las muestras fueron mantenidas en esas condiciones hasta el momento de la extracción, nunca por mas de 15 días.

5.3.1. Extracción y separación por TLC

Para la extracción de los esteroides se homogeneizó el tejido con 3 ml de éter etílico (en póter de vidrio de 4ml con émbolo de teflón), se trasvasó el homogenato a tubos herméticos plásticos resistentes a solventes orgánicos, y se agitó vigorosamente durante 45 seg., con vortex. Las fases fueron separadas por centrifugación, 10 min. a 1000 rpm. Este método de separación fue necesario porque debido a la heterogeneidad del homogenato, muchos restos de tejido quedan en suspensión en ambas fases y no se separan por sí solos. Con la centrifugación se logra una interfase bien definida. La fase etérea fue levantada cuidadosamente con pipeta Pasteur y trasvasada a tubos cónicos de vidrio, para evaporación. El éter fue evaporado bajo campana en atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 40°C, hasta sequedad. Los residuos fueron resuspendidos en 20 µl

de éter y sembrados en una placa de sílica gel para cromatografía en capa delgada (TLC). La operación se repitió lavando bien el fondo del tubo para minimizar la pérdida de material. La separación se realizó corriendo dos veces cada placa en una mezcla de ciclohexano:cloroformo:éter, en proporción 2:2:1, (Colman-Lerner, et. al., 1995).

5.3.2. Identificación de los neuroesteroides

La posición de los compuestos separados se reveló por autorradiografía, para luego poder cuantificar la radioactividad correspondiente a cada metabolito en un contador de centelleo líquido. La primera identificación de los esteroides separados se realizó corriendo en paralelo a las muestras, una serie de los posibles productos del metabolismo de la progesterona. La posición de estos estándares fue revelada por reacción con una mezcla de ácido vainillín-sulfúrico y etanol. Para ello se sumerge la zona de la TLC con los esteroides a revelar, en la solución por unos segundos, y se deja escurrir durante 10 min. a temperatura ambiente. Luego se le da calor apoyando el reverso de la placa sobre un calentador eléctrico a temperatura media-alta, hasta que aparezcan las manchas que delatan la posición de los esteroides (entre 2 y 5 min.). Para una identificación más confiable, se acetilaron los productos a identificar y los supuestos estándares con anhídrido acético y piridina (Kliman and Peterson, 1960). Los esteroides bien secos se resuspendieron en 250µl de piridina y se les agregó 250µl de anhídrido acético agitando con vortex. Se deja bien tapado hasta en otro día. Luego se evaporaron a sequedad, y se corrieron nuevamente en el mismo sistema de TLC. Si nuevamente las movibilidades coinciden, entonces quiere decir que es altamente probable que se trate del compuesto del cual se sospecha.

5.3.3. Análisis de los resultados

Para realizar el análisis de los resultados cuantificados en dpm, se calculó el

porcentaje de cada metabolito, tomando como 100 % suma las dpm de los esteroides separados en cada calle de la TLC. De esta forma se puede comparar el patrón de síntesis de diferentes incubaciones ya que se eliminan las diferencias debidas a la manipulación independiente de las muestras. En la tabla 2 se muestra un ejemplo de esto comparando dos experimentos independientes de dos muestras de cerebro tomadas de embriones de 13 días de gestación. Las primeras cuatro columnas dan las dpm leídas directamente del contador de centelleo para cada producto. La quinta columna es la suma de las dpm de la muestra correspondiente, y las cuatro últimas columnas muestran los porcentajes para cada esteroide. Todos los datos de los productos metabólicos de la progesterona, son representados como porcentaje de las dpm recuperadas. Cuando se trata de un promedio se da también el error estándar y el número de réplicas, n.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra #	Prog	DHP	Alo	Iso	dpm Totales	% Prog	% DHP	%Alo	%Iso
1	653	1834	288	1986	4761	13.72	38.52	6.05	41.71
2	629	2972	629	2523	6753	9.31	44.01	9.31	37.36

Tabla 2: Ejemplo del cálculo de los porcentajes de los neuroesteroides separados por TLC en dos muestras independientes de embriones de 13 días de gestación.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test de Student con el programa Graph Path Prism.

Este estudio fue realizado en membranas celulares de corteza cerebral de embriones de rata de 19 días de gestación, postnatales de 5 días y adultos jóvenes. La disección se realizó de la misma forma que en la sección anterior. En edades gestacionales menores a los 19 días no fue posible realizar este ensayo por la gran proporción de ligando que se retiene inespecíficamente, con relación a las dpm específicas obtenidas. Las membranas celulares fueron semi-purificadas por fraccionamiento subcelular.

5.4.1 Fraccionamiento subcelular

Las cortezas cerebrales, disecadas con el mismo criterio que en los experimentos de incubación con progesterona-[C¹⁴], fueron rápidamente extraídas en frío, pesadas y homogeneizadas al 10% peso en volumen de una solución de sacarosa 0,32 M. El homogenato fue centrifugado 10 minutos a 1000 xg descartándose el pellet. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 12000 xg durante 20 minutos. El pellet obtenido se homogeneizó en el mismo volumen de agua bidestilada, y se sometió a una nueva centrifugación a 20000 xg, durante 30 minutos. El pellet fue nuevamente homogeneizado en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y centrifugado a 26000 xg por 40 minutos, dos veces. Las membranas resuspendidas se congelaron a -20°C hasta el día siguiente. Luego se realizó una segunda sesión de lavados por centrifugación, dos veces a 26000 xg, durante 40 min. De allí se saca una alícuota para determinación de proteínas, y se vuelven a congelar hasta el día siguiente. El proceso de congelado y descongelado de las membranas, ayuda a eliminar el GABA endógeno (Yang, J. S.-J and Olsen, R. W., 1987). El día de la incubación, las membranas se lavan nuevamente a 26000 xg dos veces por 40 min. y finalmente se resuspenden en buffer Tris-HCl con 50 mM de KCl en un volumen tal que la concentración de proteínas sea de 350 a 400 µg/ml, que es la concentración final utilizada en todos los experimentos. De la suspensión final de membranas se guarda una alícuota para determinar proteínas

nuevamente, y tener un valor más exacto de la cantidad colocada. El KCl se adiciona solamente en el buffer en el que se realizará el binding, porque se sabe empíricamente que favorece la interacción con el receptor.

5.4.2. Curva de desplazamiento

La curva de desplazamiento fue realizada con un animal adulto joven para confirmar que el sistema este funcionando correctamente, según resultados previos del laboratorio (Borodinsky, et al, 1997).

Se analizaron nueve puntos. Cada uno tiene una determinada concentración de ligando frío para desplazar al ligando marcado, que está en igual concentración en todos los tubos. Se realizó con triplicados incubando 1 ml de la suspensión de las membranas, con muscimol-[H³] en una concentración de 3 nM (Borodinsky, et al, 1997), y una de las siguientes concentraciones de muscimol frío 1×10^{-12} ; 1×10^{-10} ; 1×10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 5×10^{-9} ; 1×10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 1×10^{-7} y 1×10^{-6} en M. La unión inespecífica de muscimol-[H³] fue determinada con el agregado de ligando frío en exceso (100uM), también hecho por triplicado. La incubación se realizó a 0°C en baño de agua-hielo. Lo último que se agregó fueron las membranas.

El corte de la incubación y la separación de las membranas se realizó con una rápida filtración en vacío, con filtros de fibra de vidrio Whatmann GF/C. Cada filtro se colocó en un vial, y se dejó secar hasta el otro día. Como líquido de centelleo se utilizó PPO-xileno. Luego se cuantificó la radioactividad de cada filtro en un contador de centelleo líquido. El dosaje de proteínas se realizó por el método de Lowry (Lowry, et al, 1951).

El análisis de las curvas de desplazamiento fue realizado por regresión no lineal ajustando la ecuación de competencia de unión de radioligandos para un sitio con el programa Graph Path Prism.

5.4.3. Modulación del receptor GABA_A con neuroesteroides

Para evaluar la potenciación de la unión específica del muscimol-[H³] al receptor GABA_A no se confeccionaron curvas de desplazamiento completas, sino que solo se utilizó un punto de la curva con una concentración del ligando marcado sin desplazamiento, que por ensayos previos se sabía que daba una cantidad de cuentas apropiada para observar el efecto de la modulación. Se realizó en las mismas condiciones experimentales que la curva de desplazamiento. Tanto el ligando como los esteroides, fueron agregados con un volumen de 10 µl para que no modifiquen significativamente las concentraciones finales. Los esteroides fueron disueltos en alcohol, haciendo una solución madre 10⁻¹M, por lo tanto, como la máxima concentración de esteroides que se puso en la incubación es 2 x 10⁻⁵ M, la concentración máxima de alcohol fue del 0,02%. Esta concentración de alcohol mostró, en un experimento control, una disminución del binding de muscimol del 8%. Normalmente, en casi todos los experimentos el alcohol esta al 0,01 ó 0,001% (o sea una concentración de esteroides de 10 µM y 1 µM respectivamente).

Cuando se realizaron coincubaciones de alopregnanolona con isopregnanolona, se realizó una preincubación de 30 min. de las membranas con isopregnanolona, y luego 30 min. más, con alopregnanolona, ya que la intención fue determinar si la primera compite con la segunda por el sitio alostérico.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test de Student con el programa Graph Path Prism.

6. RESULTADOS

6.1 Metabolismo de la progesterona en el SNC

6.1.1 Condiciones de incubación

En experimentos preliminares se determinó el tiempo necesario para obtener una cantidad mensurable de productos derivados de la incubación del tejido nervioso con progesterona- C^{14} . Se incubó la corteza cerebral de embriones de rata de 16 días de gestación (E16), neonatos (P0) y adultos con progesterona- $[C^{14}]$, y se corrieron en cromatografía de capa delgada los extractos etéreos. Se separaron cuatro metabolitos principales marcados radioactivamente. Se vio que la movilidad de estos compuestos coincidía con los estándares de dihidroprogesterona (5α -DHP), progesterona, alopregnanolona ($5\alpha,3\alpha$ -THP) e isopregnanolona ($5\alpha,3\beta$ -THP), corridos en paralelo. Se incubaron 20000 dpm de precursor en 0,5 ml de medio de cultivo (DMEM) con 100 mg de corteza de ratas macho adultas, recién nacidas o embriones, durante 30 min, 1, 2 ó 4 hs. Luego de extraer las muestras y separarlas por TLC, se obtuvieron las curvas de síntesis-degradación de los productos en función del tiempo para cada edad (Figura 6). Se eligió como tiempo estándar de incubación 4 hs, ya que fue suficiente para que en el caso de los embriones de 16 días de gestación (E16) se metabolice la mayor parte de la PROG marcada (Figura 6a), por lo tanto es tiempo suficiente para asegurar que si en alguna muestra no aparecieron productos, es por que su velocidad de síntesis es muy baja o nula (Figura 6c). Se puede observar que el estadio E16 tiene un metabolismo de la progesterona muy activo comparado con P0 y adulto. En lo sucesivo todas las incubaciones se realizaron durante un período de 4 hs.

Una vez que se fijaron las condiciones en las que se puede medir la cantidad de metabolitos 5α -reducidos de la progesterona, se realizaron incubaciones con tejidos provenientes de ratas de estadios de gestación prenatal (E13, E16 y E19), neonatos (P0), postnatales de 5 días (P5) y adultas (Ad). En las figuras 7a y 7b se

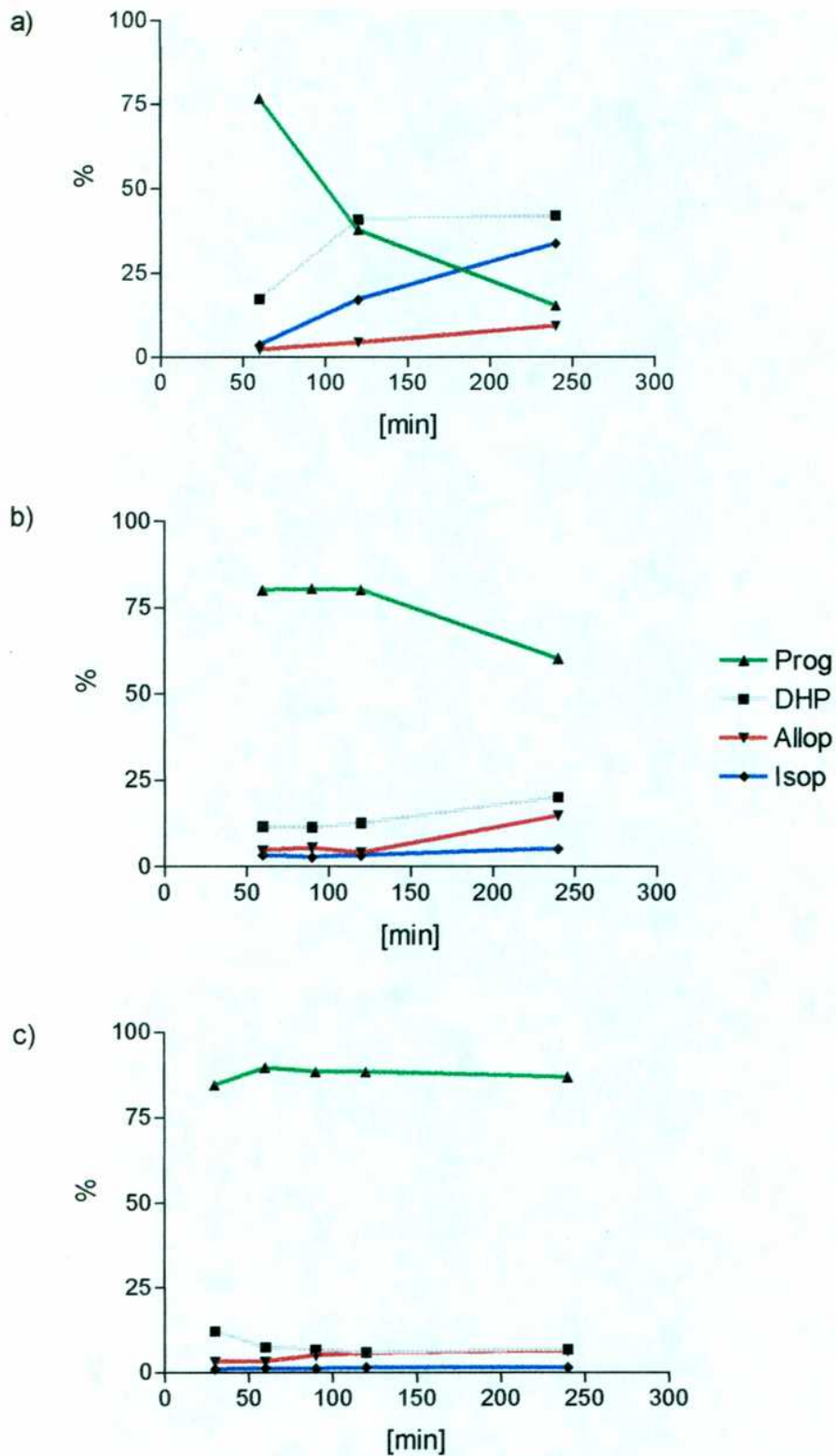


Figura 6: Cursos temporales representativos de corteza cerebral de ratas en tres estadios de maduración distintos. Vesículas telencefálicas de ratas E16 (a) y corteza cerebral de ratas P0 (b) y adultas (c), fueron incubadas por 4 hs. con 20000 dpm del precursor radioactivo, extraídas con éter y separadas por TLC. Luego las manchas que delatan radioactividad fueron cuantificadas en un contador de centelleo líquido. Los datos están expresados como porcentaje de recuperación de cada neuroesteroide. El eje x representa las horas de incubación del tejido con la Progesterona-[C¹⁴].

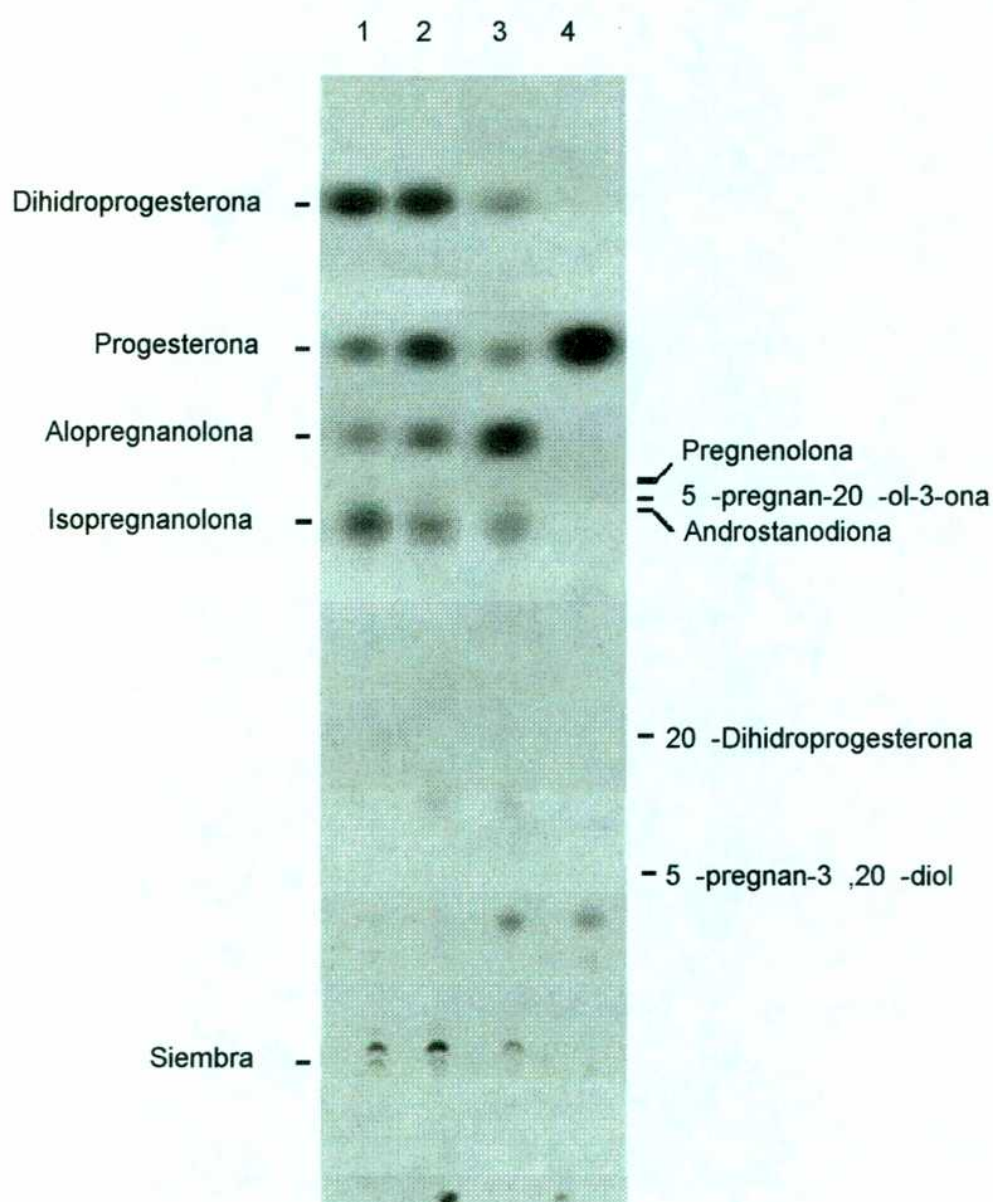


Figura 7a: Metabolismo de la progesterona en el SNC y placenta de embriones de ratas en el día gestacional 16. Se observa una autorradiografía representativa de una cromatografía en capa delgada en la cual se separaron los metabolitos resultantes de incubar tejidos de corteza cerebral (calle 1), médula espinal (calle 2) y placenta (calle 3) de ratas en estadio E16, con Progesterona-[C¹⁴]. La calle 4 es un control sin tejido.

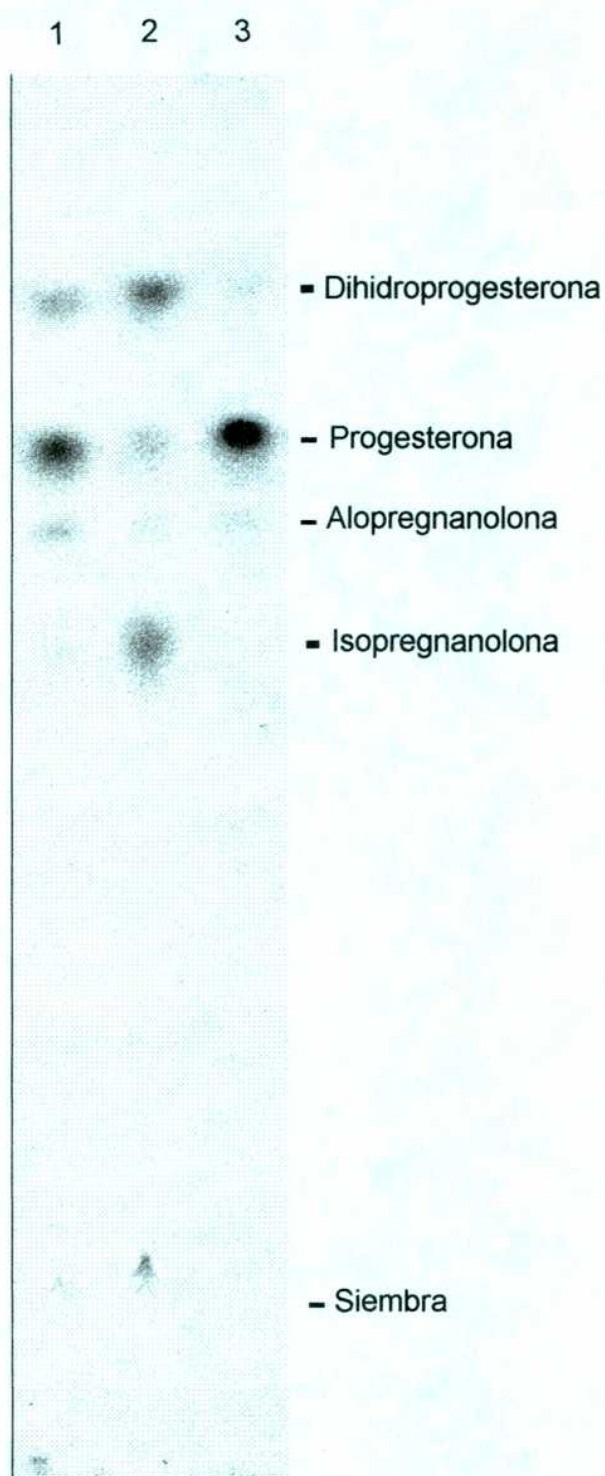


Figura 7b: Metabolismo de la progesterona en el SNC de embriones de ratas de tres edades distintas. Se observa una autorradiografía representativa de un experimento en el cual se separaron los metabolitos resultantes de incubar la corteza cerebral de ratas en el estadio P0 (calle 1), la cabeza completa de ratas E13 (calle 2) y corteza cerebral de ratas adultas (calle 3), con Progesterona-[C¹⁴].

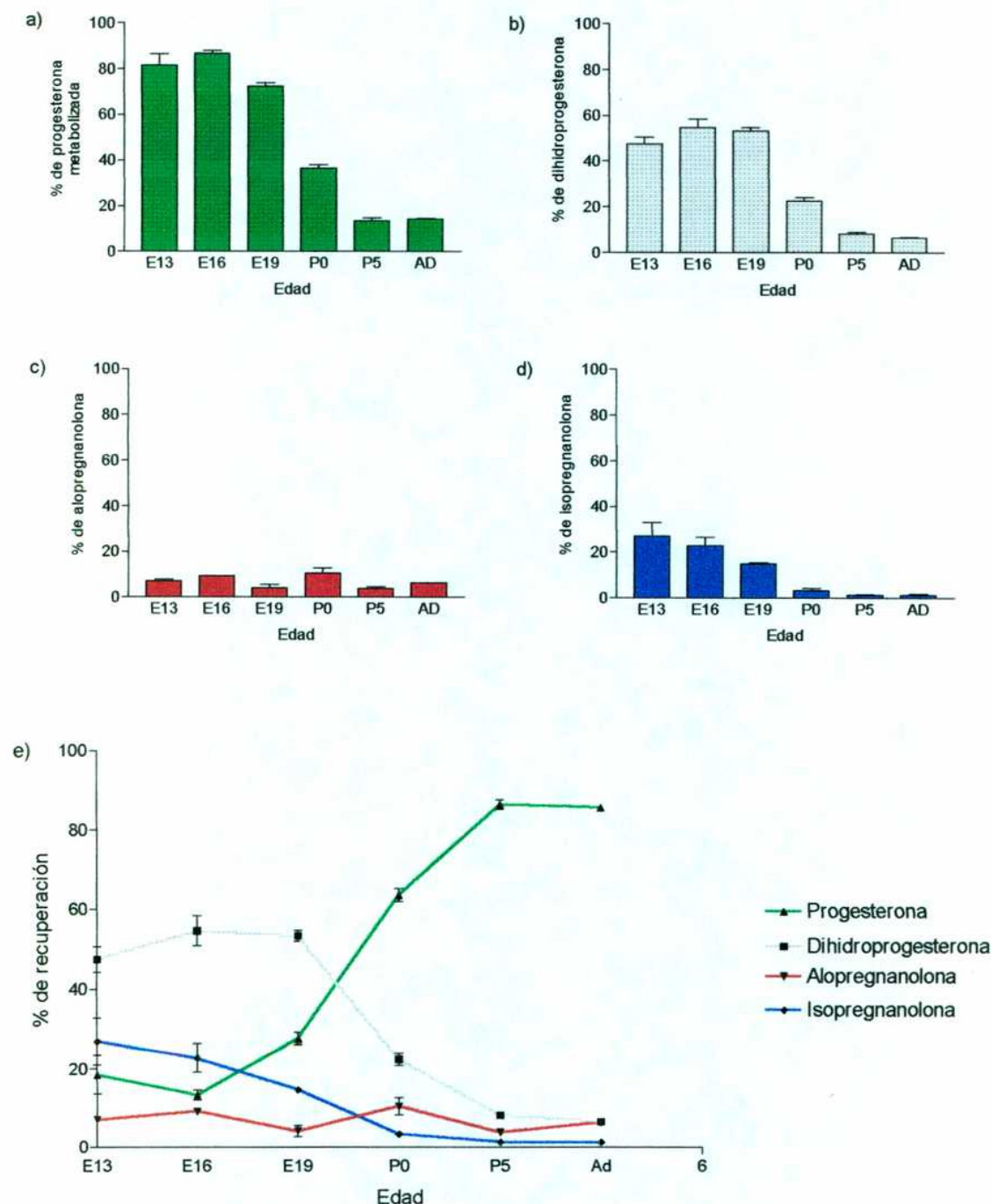


Figura 8: Patrón metabólico de la progesterona y sus neuroesteroides derivados, en corteza cerebral de ratas en varios estadios de gestación. El tejido de ratas E13, E16, E19, P0, P5 y Ad fue incubado con Progesterona- $[C^{14}]$, y sus productos separados y cuantificados como en la figura 7. Los datos se expresan como el porcentaje de cada neuroesteroide respecto del total recuperado, (b) dihidroprogesterona, (c) alopregnanolona y (d) isopregnanolona, salvo (a) que es la progesterona metabolizada (100% - el % recuperado de progesterona). (e) superposición de a, b, c y d, donde ahora la progesterona se expresa directamente como el porcentaje recuperado. En todos los casos agrupados por estadio gestacional o edad.

muestran dos autorradiografías en las que se puede observar a la progesterona y los tres metabolitos principales separados. La figura 7a es un experimento en el cual se corrieron los extractos etéreos de vesícula telencefálica (calle 1), médula espinal (calle 2) y placenta (calle3) de embriones de 16 días de gestación. La figura 7b es otro experimento en el que se corrieron los extractos etéreos de la corteza cerebral de tres estadios del desarrollo distintos, P0 (calle1), E13 (calle 2) y adulto (calle 3).

6.1.2 Identificación de los neuroesteroides

De los cuatro productos marcados separados por la TLC, la progesterona y la dihidroprogesterona son las más claramente identificables. La progesterona por ser el precursor utilizado esta siempre en cantidades detectables, y en el control sin tejido es el único esteroide reconocido. La dihidroprogesterona por su movilidad en la TLC, es inconfundible con otros posibles productos derivados de la progesterona. Como se puede ver en la figura 7, éste es el producto que se logra separar mejor, y no se vio en este sistema otro metabolito con un R_f tan alto. El más cercano es la progesterona. Los metabolitos que corren como los estándares de alopregnanolona e isopregnanolona también son claramente identificables. Sin embargo esta última corre en un sector de la placa cercano al 5α -pregnan- 20α -ol-3-ona. Si bien no esta descripto que este pueda sintetizarse en el SNC, existe a priori una cierta incertidumbre sobre su identidad. Para corroborar que estos metabolitos son alopregnanolona e isopregnanolona se realizó un ensayo de acetilación de estos dos compuestos y de los estándares correspondientes, y luego se los separó en el mismo sistema de TLC. Ambos volvieron a correr igual que los estándares, por lo tanto es muy probable que sean efectivamente alopregnanolona e isopregnanolona.

Un factor importante que se tiene en cuenta para la identificación de los metabolitos marcados, es el sustrato del cual se parte, o sea la progesterona. Esto acota bastante los posibles esteroides que se pueden obtener derivados de ella, máxime teniendo en cuenta que se sabe por la literatura que en el SNC la principal

vía metabólica de la progesterona es la de la 5α -reductasa (Figura 4). En concordancia con esto, hay trabajos publicados en los que incuban progesterona con tejido nervioso o cultivos de células nerviosas, donde también obtienen los 3 neuroesteroides que aquí se describen o como ocurre generalmente, no aparece la isopregnanolona (Barnea, A et al, 1990, Karavolas, H.J. and Hodges, D.R., 1992, Melcangi, RC et al, 1994). Algunos derivados de la progesterona tienen movilidades muy diferentes a la observada para alopregnanolona e isopregnanolona, como es el caso de la 20α -dihidroprogesterona y 5α -pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol (Figura 7a), quedando por lo tanto descartados desde un principio.

Otro elemento que apoya la presente identificación, está en los cursos temporales mostrados en la figura 6. En estos se puede ver una coherencia entre los pasos del camino de la 5α -reductasa y la cinética de aparición de los 3 neuroesteroides. Se observa claramente que la dihidroprogesterona es el primero en producirse en las tres edades.

En las autorradiografías de las muestras de placenta se observaron manchas pertenecientes a otros productos de mayor polaridad que no fueron identificados. En el caso de corteza cerebral y médula espinal también se detectaron metabolitos más polares, pero sin un patrón regular de aparición y en mucha menor proporción que los cuatro principales. Estos tampoco fueron identificados ni tomados en cuenta para el análisis de los resultados

6.1.3 Síntesis de neuroesteroides durante el desarrollo

Basándose en la identificación de los neuroesteroides explicada en el ítem anterior, se realizó un análisis de las cantidades relativas de cada neuroesteroide sintetizado en los diferentes estadios del desarrollo ensayados. En la figura 8 se muestra el patrón metabólico de la progesterona y los tres neuroesteroides identificados derivados de ella en corteza cerebral de ratas de los estadios E13, E16, E19, P0, P5 y adulto. Pueden observarse cambios cuantitativos en la proporción de los neuroesteroides sintetizados durante el desarrollo, que reflejan cambios de actividades enzimáticas. El más evidente es la disminución de la tasa

metabólica de progesterona, o sea la reducción de la actividad 5α -reductasa (por que es prácticamente la única enzima en este sistema que usa como sustrato a la progesterona), evaluada según la cantidad de progesterona transformada a productos (Figura 8a). Su porcentaje de metabolización es muy alto en E13 ($82\% \pm 5$, $n=5$) y E16 ($87\% \pm 2$, $n=6$), mientras que va disminuyendo en forma más o menos gradual desde el estadio E19 hasta llegar al P5, a partir de donde parece mantenerse en niveles bajos (E19: $72\% \pm 1,5$, $n=4$, P0: $36\% \pm 1,7$, $n=3$, P5: $13\% \pm 2$, $n=3$ y Ad: $14\% \pm 2$).

La cantidad de dihidroprogesterona presente depende de la actividad 5α -reductasa, y de las enzimas que la metabolizan, la 3α y 3β -hidroxiesteroide oxidoreductasa. Como se observa en la figura 8b, la cantidad de dihidroprogesterona disminuye a partir de E19, respondiendo a la disminución de la actividad 5α -reductasa. A pesar de esta gran reducción de la actividad 5α -reductasa, la cantidad de alopregnanolona sintetizada no muestra variaciones importantes en los estadios de gestación ensayados, E13: $7\% \pm 0,8$, $n=5$, E16: $9,2\% \pm 0,2$, $n=6$, E19: $4,2\% \pm 0,2$, $n=4$, P0: $10,4\% \pm 2,3$, $n=3$, P5: $3,9\% \pm 0,7$, $n=3$ y Ad: $6,3\% \pm 0,1$, $n=2$ (Figura 8c), aunque la producción de 5α -DHP, su inmediato precursor, halla disminuído sensiblemente después de E19. No ocurre lo mismo con la Isopregnanolona cuya producción resultó máxima en los primeros estadios, y fue decayendo con el desarrollo, paralelamente a la actividad 5α -reductasa, hasta hacerse casi indetectable a partir del día 5 postnatal: E13: $27\% \pm 6$, $n=5$, E16: $22,7\% \pm 3,6$, $n=6$, E19: $14,7\% \pm 0,7$, $n=4$, P0: $3,4\% \pm 0,9$, $n=3$, P5: $1,4\% \pm 0,2$, $n=3$ y Ad: $1,3\% \pm 0,5$, $n=2$ (Figura 8d). En los estadios postnatales probados, P5 y Ad, la cantidad de isopregnanolona obtenida llega a ser varias veces menor que la de alopregnanolona, invirtiendo la proporción de ambos neuroesteroides con respecto a E13 y E16.

De la misma forma que para la corteza cerebral, se obtuvo el patrón de síntesis en la médula espinal de ratas de E13, E16 y P0. Como se puede observar en la figura 9, el perfil metabólico en médula espinal es similar al de la corteza cerebral. La alopregnanolona no varía significativamente en los tres estadios. Al igual que en

la corteza cerebral, se observa una tendencia a la disminución la actividad 5α -reductasa y una disminución de la cantidad de isopregnanolona. En la tabla 2 se muestran los datos correspondientes a la figura 9

	Prog.		5α -DHP		$5\alpha,3\alpha$ -THP		$5\alpha,3\beta$ -THP	
Edad	%	\pm SEM	%	\pm SEM	%	\pm SEM	%	\pm SEM
E13 (3)	13.8	0.8	35.2	1.2	13.5	0.6	37.6	1
E16 (3)	38.3	2.3	35.5	0.7	15.5	0.7	10.8	2.4
P0 (1)	73.8	-	13.8	-	9.5	-	2.9	-

Tabla 3: Patrón metabólico de la progesterona y sus neuroesteroides derivados en la médula espinal de ratas de tres estadios de gestación (E13, E16 y P0). Estos datos corresponden a la figura 9.

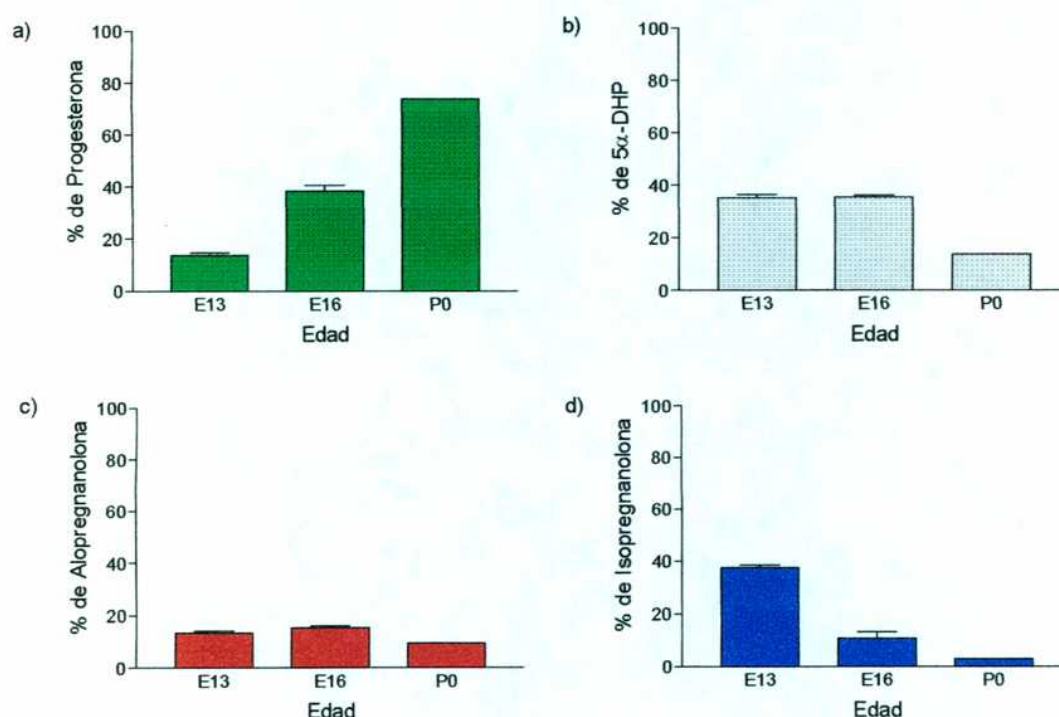


Figura 9: Patrón metabólico de la progesterona y sus neuroesteroides derivados, en médula espinal de ratas en varios estadios de gestación. El tejido de ratas en estadio E13, E16 y P0 fue incubado con Progesterona- $[C^{14}]$ y sus productos separados y cuantificados como en la figura 7. Los datos se expresan como porcentaje de cada neuroesteroide respecto del total recuperado. (a) progesterona, (b) dihidroprogesterona, (c) alopregnanolona, (d) isopregnanolona.

Dada la gran cantidad de mielina que hay en la médula espinal de ratas adultas, nos fue imposible resolver esas muestras. La gran cantidad de lípidos que componen la mielina quedan en la fase etérea formando una mezcla espesa al evaporar el éter, lo que dificulta la siembra en la TLC.

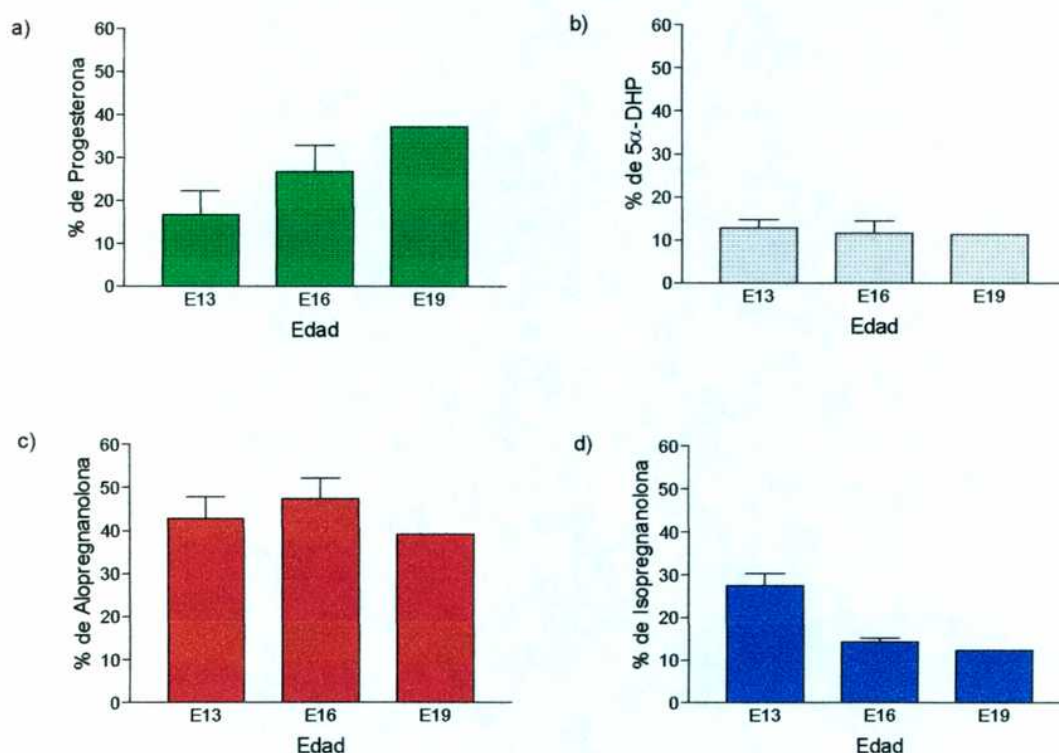


Figura 10: Patrón metabólico de la progesterona y sus esteroides derivados en placenta de ratas en varios estadios de gestación. El tejido de ratas en estadio E13, E16 y E19 fue incubado con Progesterona-[C¹⁴] y sus productos separados y cuantificados como en la figura 7. Los datos se expresan como porcentaje de cada neuroesteroide respecto del total recuperado. (a) progesterona, (b) dihidroprogesterona, (c) alopregnanolona, (d) isopregnanolona.

Como la producción de metabolitos por la placenta no puede dejarse de lado por la íntima conexión que tiene con el feto, realizamos el mismo análisis para placentas de embriones de 13, 16 y 19 días de gestación. Al igual que en tejido cerebral y médula espinal, en la placenta hay una alta metabolización de la progesterona en los tres estadios ensayados (Figura 10a). Sin embargo, a diferencia de lo visto anteriormente, la alopregnanolona es el neuroesteroide mayoritario en todos los estadios (Figura 10c). La baja cantidad de 5 α -DHP encontrada parece ser un

reflejo de la alta actividad 3α -HSD (Figura 10c). La actividad 5α -Reductasa tiene una tendencia a disminuir con la edad, pero las diferencias no son significativas. Al igual que en corteza cerebral y médula espinal la síntesis de Isopregnanolona es mayor en el estadio de menor desarrollo, E13, pero siempre en menor medida que su isómero 3α . En la tabla 3 se muestran los datos de la figura 10.

Edad	Prog.		5α -DHP		$5\alpha,3\alpha$ -THP		$5\alpha,3\beta$ -THP	
	%	\pm SEM	%	\pm SEM	%	\pm SEM	%	\pm SEM
E13 (3)	16.7	5.4	12.8	1.9	42.8	0.6	27.4	2.9
E16 (5)	26.7	6.2	11.6	2.8	47.2	4.7	14.3	0.9
E19 (1)	37.2	-	11.3	-	39.2	-	12.3	-

Tabla 3: Patrón metabólica de la progesterona en placenta de tres estadios de gestación (E13, E16 y P0). Estos datos corresponden a la figura 10.

6.2 Ensayos de unión específica al receptor $GABA_A$

Dada la alta proporción de isopregnanolona que puede ser sintetizada en los estadios E13, E16 y E19, es posible que esta cumpla algún papel fisiológico en el desarrollo del SNC. A pesar de que la isopregnanolona no es capaz de modular las acciones mediadas por el receptor $GABA_A$ en el SNC de mamíferos adultos, resulta de interés estudiar si esa capacidad existe o no durante el desarrollo del SNC. La composición de subunidades del receptor $GABA_A$ varía con el estadio de maduración del SNC (Laurie, D.J, et al, 1992), por lo tanto también puede cambiar la especificidad de sus moduladores conocidos o aparecer nuevos compuestos capaces de interactuar con el receptor. Otro aspecto interesante para estudiar, es la posible interferencia de la isopregnanolona con la potenciación mediada por alopregnanolona. En este último caso se tiene como antecedente que la epipregnanolona (5β -pregnan- 3β -ol-20-ona) inhibe la potenciación mediada por la pregnanolona (5β -pregnan- 3α -ol-20-ona) (Prince R.J., et al, 1992), por lo que

análogamente la isopregnanolona (5α -pregnan- 3β -ol-20-ona) pueda tener algún efecto similar sobre la potenciación mediada por la alopregnanolona (5α -pregnan- 3α -ol-20-ona). Para evaluar estas posibilidades se realizaron estudios de unión específica (binding) de Muscimol-[H^3] a membranas de corteza cerebral, en presencia de Alo, Iso o ambas, en P5 y E19.

En primer lugar se realizó una curva de desplazamiento con una concentración de Muscimol-[H^3] de 1,4 nM en membranas obtenidas de ratas adultas jóvenes, para confirmar que el sistema este funcionando correctamente (Figura 11). Como ligando frío para desplazar al marcado se utilizó muscimol en 9 concentraciones distintas, una para cada punto de la curva: 1×10^{-12} ; 1×10^{-10} ; 1×10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 5×10^{-9} ; 1×10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 1×10^{-7} y 1×10^{-6} en molar.

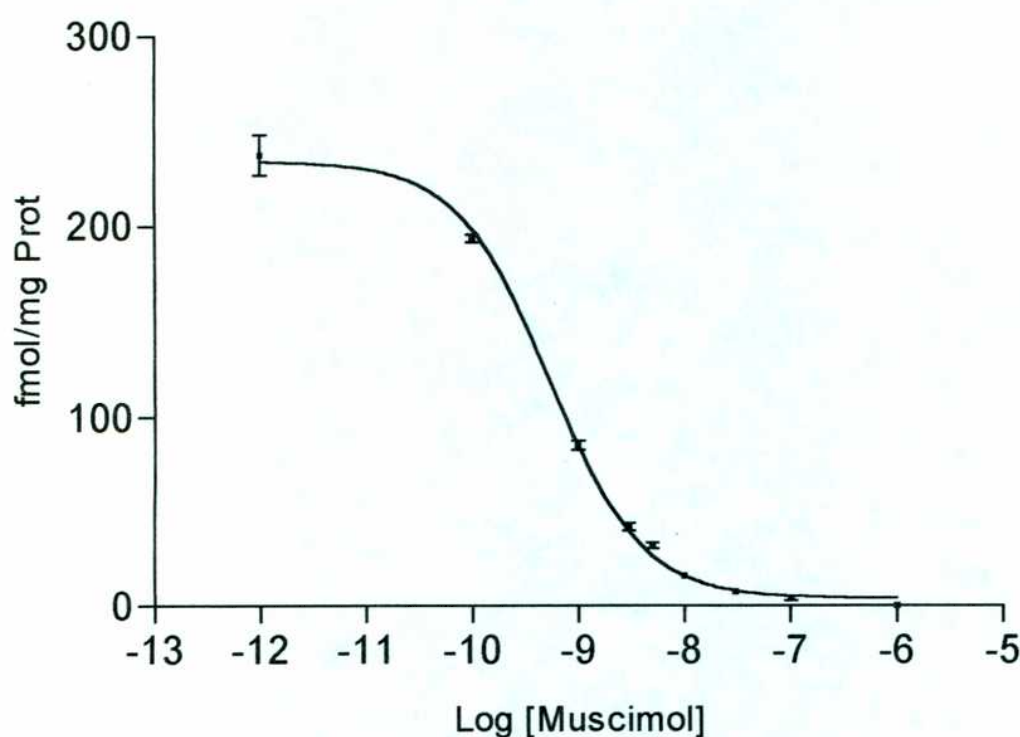


Figura 11: Binding de muscimol en corteza cerebral de ratas adultas. El eje y representa el binding en femto moles por mg de proteína. El eje x es el logaritmo de la concentración de ligando frío. $EC_{50}=0,55nM$

La curva se ajustó mejor a la ecuación de competencia de la unión de un

radioligando para un sitio, que para dos sitios. La concentración efectiva 50 (EC50) obtenida esta entre 0.47 y 0.64 nM con una probabilidad de 0,95.

En los siguientes experimentos, a raíz de la gran cantidad de corteza cerebral requerida para la confección de una curva completa, se midió la unión con una sola concentración de Muscimol-[H³] de entre 10 y 15 nM sin desplazamiento de ligando frío.

6.2.1. Interacción alopregnanolona-isopregnanolona en P5

Primero probamos la modulación del binding de muscimol con alopregnanolona y pregnanolona en ratas postnatales de 5 días, y de acuerdo a lo esperado ambas lo modularon positivamente (Figura 12). El experimento se realizó con triplicados y se utilizó una concentración de esteroides que por la experiencia previa y la literatura se sabe tiene efecto (1 μ M).

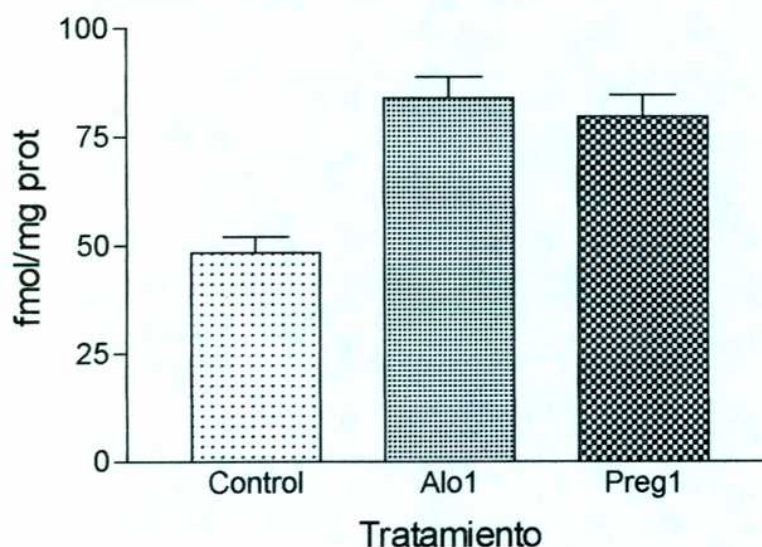


Figura 12: Modulación del binding de muscimol en membranas de corteza cerebral de ratas P5 con alopregnanolona y pregnanolona. La incubación de las membranas se realizó en presencia de alopregnanolona 1 μ M (Alo1) o pregnanolona 1 μ M (Preg1). Ambas muestran un modulación significativa ($p < 0,01$), del 74% para Alo1 y 65% para Preg1. Entre ambas no hay diferencias significativas.

Para evaluar el efecto directo de la isopregnanolona sobre el binding de muscimol y su interacción con la potenciación mediada por alopregnanolona, se realizó el experimento de la figura 13. Allí se puede observar que con una concentración $1\mu\text{M}$ de alopregnanolona se obtiene la máxima potenciación del binding de muscimol, ya que al incubar con $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ del neuroesteroide da la misma respuesta. También se ve claramente que la isopregnanolona sola, no modula significativamente el binding de muscimol. Al coincubar ambos neuroesteroides a una concentración de $10\mu\text{M}$ cada uno, no se observan diferencias con respecto al incubado con alopregnanolona $1\mu\text{M}$ o $10\mu\text{M}$. Cuando la isopregnanolona está en una concentración 10 veces mayor (Alo1+Iso10) se ve una disminución de la potenciación, pero que es no significativa. Dado que el vehículo de los neuroesteroides es etanol (en una concentración final máxima del 0.1%) se realizó un control en cual se colocó solo etanol en la máxima concentración usada.

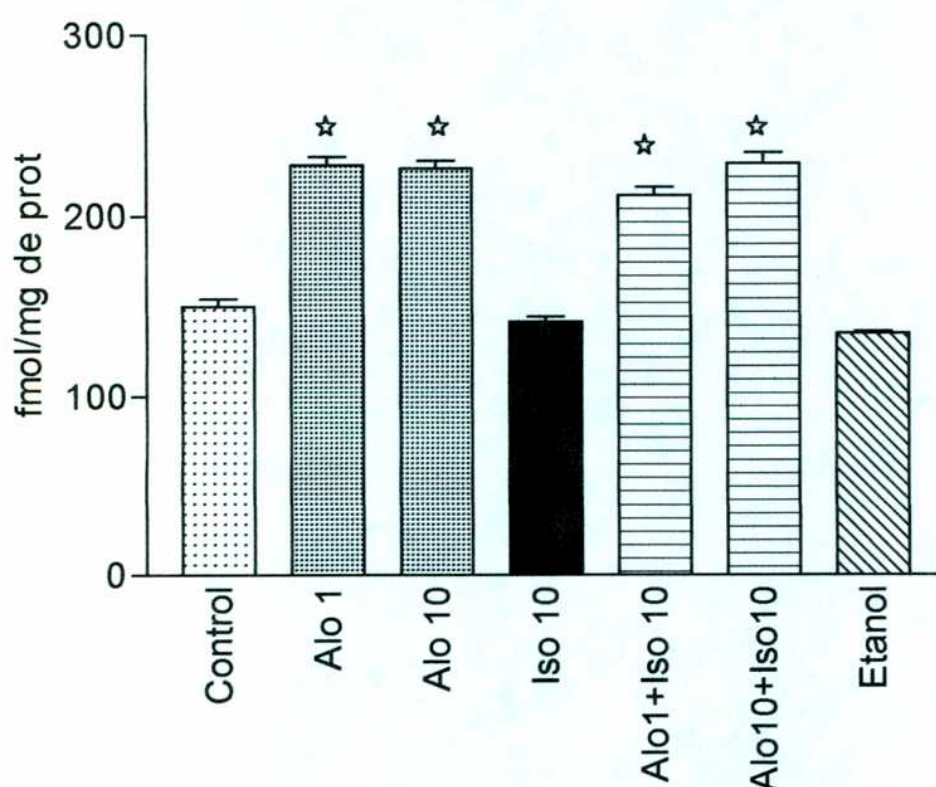


Figura 13: Modulación del binding de muscimol en corteza cerebral de ratas P5 con alopregnanolona e isopregnanolona. ★ Diferencias significativas respecto del control ($p < 0,001$). Ni Iso10 ni Etanol difieren significativamente del control.

Para aclarar si realmente la isopregnanolona disminuye la potenciación mediada por alopregnanolona se realizaron más experimentos de coincubación con ambos neuroesteroides. La figura 14 resume los resultados obtenidos. La potenciación lograda con alopregnanolona es del $55,9 \% \pm 8,7$ (ES) $n=5$, mientras que con isopregnanolona-alopregnanolona fue del $26,5 \% \pm 6,7$ (ES) $n=4$. A pesar de que se redujo aproximadamente a la mitad, esta diferencia no es significativa ($p=0,12$). En cambio, Alo1+Iso10 es significativamente distinto de Iso10 con un $p<0,005$.

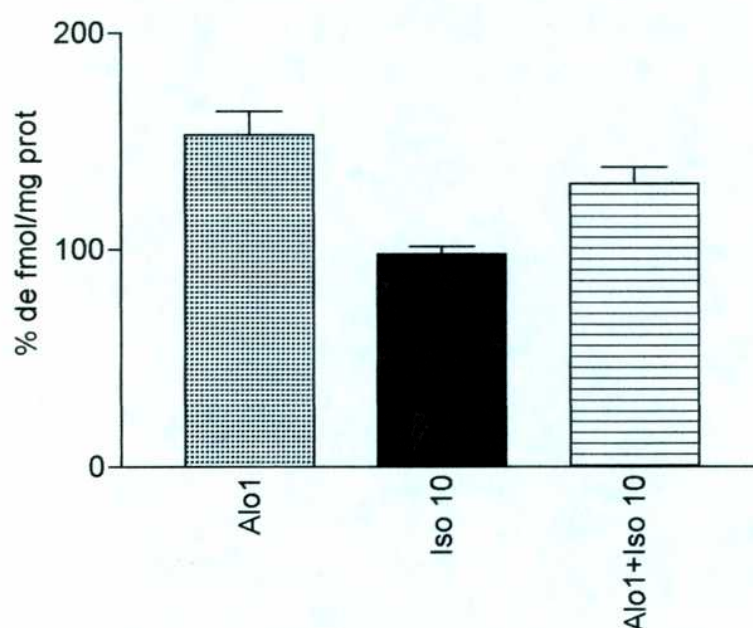


Figura 14: Modulación del binding de muscimol en corteza cerebral de ratas P5 con alopregnanolona e isopregnanolona. Cada ensayo se estandarizó tomando su control como 100% del binding y luego se promediaron. La diferencia que se observa entre Alo1 y Alo1+Iso 10 no es significativa ($p=0,12$), en cambio Alo1+Iso10 es diferente de Iso10 ($p<0,005$).

Con estos resultados se puede afirmar que la isopregnanolona es incapaz de modular por sí misma el binding de muscimol en membranas aisladas de corteza cerebral de ratas de 5 días de vida. Sin embargo, en los experimentos de coincubación se ve una tendencia de la isopregnanolona a disminuir la

potenciación mediada por la alopregnanolona, pero no se lo pude asegurar por que no es significativa.

6.2.2. Isopregnanolona en E19

De la misma forma que en P5, se fraccionaron membranas de corteza cerebral de embriones de 19 días de gestación y se analizó la modulación del binding de muscimol con alopregnanolona e isopregnanolona. Como se puede observar en la figura 15, no hay modulación ni con alopregnanolona ni con isopregnanolona. Este resultado con alopregnanolona es acorde con los obtenidos previamente en el laboratorio (Borodinsky, L.N., et al, 1997).

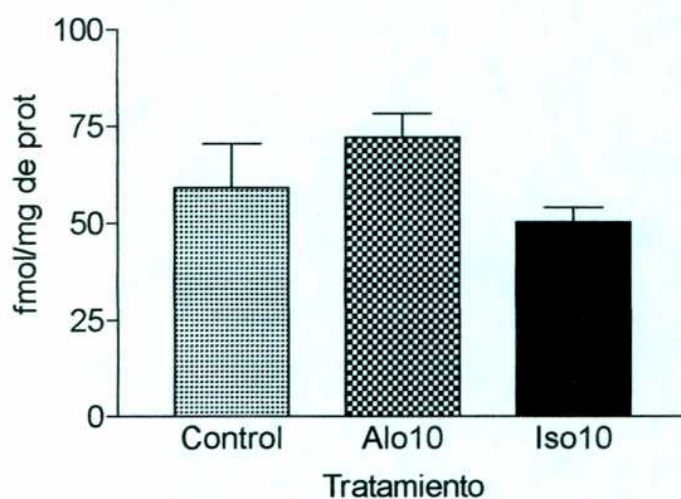


Figura 15: Modulación del binding de muscimol en membranas de corteza cerebral de E19. Tanto la diferencia Alo10 con el control como la de Iso10 no son significativas, es decir no modulan el binding de muscimol.

7. DISCUSION

7.1 Síntesis de neuroesteroides

En la primera parte de este trabajo se intentó analizar la capacidad que tiene el SNC de ratas en varios estadios del desarrollo pre y postnatal, de sintetizar neuroesteroides derivados de la progesterona. Para esto se incubó progesterona- C^{14} con fragmentos pequeños de corteza cerebral, médula espinal o placenta de ratas de estadios E13, E16, E19, P0, P5 o adulto. Mediante cromatografía en capa delgada se separaron e identificaron tres metabolitos principales provenientes de los extractos etéreos del tejido incubado (Figura 7). Uno de los neuroesteroides identificados, la alopregnanolona ($5\alpha,3\alpha$ -THP), es un conocido modulador alostérico del receptor $GABA_A$ del SNC maduro. Otro, llamado isopregnanolona ($5\alpha,3\beta$ -THP) e isómero del primero, no tiene hasta el momento alguna función conocida en la fisiología de los mamíferos. Como paso previo a la síntesis de alopregnanolona e isopregnanolona hay otro neuroesteroide llamado dihidroprogesterona (5α -DHP) el cual tiene efectos neuroendocrinos en la liberación de gonadotrofina y en el comportamiento sexual. Dada las crecientes evidencias de la importancia fisiológica de la alopregnanolona en el SNC (Bitran, D., et al, 1995; Dayanithi, G. and Tapia-Arancibia, L., 1996; Poisbeau, P, et al, 1997) y su similitud estructural con la isopregnanolona, en este trabajo se puso mayor énfasis en estos dos neuroesteroides.

Hay varios trabajos que apoyan la síntesis de estos tres neuroesteroides en el SNC como productos principales del metabolismo de la progesterona. En estudios donde se analizaron los productos de la progesterona en otras estructuras como hipotálamo, hipófisis, tálamo, pineal, médula, tecto-cerebro medio y cerebelo de ratas adultas, solo se encuentra la síntesis de productos 5α y $5\alpha,3\alpha$ reducidos, con muy poca contribución de los 20α reducidos y ninguna de los 17α reducidos (Karavolas, H.J. and Hodges, D.R., 1992). Según estos autores, si hay síntesis de isómeros 3β , 5β o 20β reducidos es tan baja que no la detectan.

Resultados similares fueron publicados con experimentos de cultivos primarios de células del SNC (Melcangi, R.C., et al, 1994). Por otro lado, en experimentos realizados con agregados de células hipotalámicas fetales se describió la síntesis de ambos neuroesteroides, isopregnanolona y alopregnanolona, utilizando progesterona como sustrato (Barnea, A et al, 1990). Esto concuerda con los resultados de esta tesis, donde también se vio síntesis de ambos neuroesteroides en estadios fetales.

La concentración de esteroides neuroactivos en el SNC depende de las fluctuaciones en su liberación desde glándulas endocrinas periféricas (glándula suprarrenal y órganos reproductores) y de la síntesis *in situ*. En ratas hembra adultas la concentración cerebral de alopregnanolona esta en el orden de 1 a 10 nM, lo que sería suficiente para producir una potenciación modesta sobre el receptor GABA_A *in vitro*. En ratas macho, la concentración es más baja, pero cuando son sometidas a estrés natatorio se produce un rápido aumento en la concentración tanto plasmática como cerebral de alopregnanolona y 5 α ,3 α -THDOC, suficiente para potenciar el receptor GABA_A *in vitro* (Lambert, J.J., et al, 1995). La mayor parte de la 5 α ,3 α -THDOC es producida por la glándula adrenal pero hay niveles apreciables de alopregnanolona que serían producidos por el SNC. Durante el desarrollo embrionario, la placenta es la principal fuente de progesterona y la responsable de los niveles altos de esteroides neuroactivos circulantes y en el SNC de ratas y mujeres preñadas (Majewska, M.D., 1992; Lambert, J.J., et al, 1995). Los neuroesteroides producidos en esta situación se hallan en concentraciones mayores a 30nM, suficientes para tener efecto sobre el receptor GABA_A. La concentración de progesterona con la cual se incubó el tejido en este trabajo es de 370nM, la cual se halla dentro del rango fisiológico. El Km de las 5 α -reductasa de hipófisis e hipotálamo es aproximadamente 100nM, mientras que el de las 3 α -HSO oscilaría entre 80nM y 1 μ M (Karavolas, H.J. and Hodges, D.R., 1992). Estos valores de Km para las enzimas involucradas en el metabolismo de la progesterona no están alejados de la concentración de progesterona utilizada como precursor, ni tampoco de los neuroesteroides sintetizados en las condiciones de este trabajo, con lo cual, las proporciones de

neuroesteroides observadas podrían llegar a darse también *in vivo* durante el desarrollo embrionario.

Aunque en el presente trabajo no se miden las actividades enzimáticas mediante el cálculo de velocidades iniciales de formación de productos, en determinados casos se puede asumir, por la cantidad de algunos metabolitos, que la actividad de una determinada enzima es alta o baja comparándola con otra de ese sistema, o a la misma en otro estadio del desarrollo. Para que esto pueda ser considerado así, la cantidad de cada esteroide debe depender de las actividades enzimáticas identificadas, es decir que sea despreciable la síntesis de metabolitos no identificados.

De los resultados obtenidos en este trabajo, en primer lugar llama la atención que es en las edades gestacionales más bajas estudiadas, E13 y E16, donde se encontró la mayor capacidad de metabolizar la progesterona por parte del SNC (Figura 8). También en estos dos estadios intermedios del desarrollo prenatal de la rata (cuyo período de gestación son de 21 a 22 días), se observa que la isopregnanolona se sintetiza en mucha mayor proporción que la alopregnanolona. Aproximadamente el 27% de la marca recuperada en E13 corresponde a la isopregnanolona, siendo cuatro veces más que la alopregnanolona en el mismo estadio (Figura 8). Tanto la elevada actividad 5α -reductasa como la síntesis de isopregnanolona disminuyen gradualmente con el desarrollo. Este paralelismo hace pensar que una es consecuencia de la otra, es decir al bajar la síntesis de 5α -DHP disminuye la producción de isopregnanolona porque es su precursor. Sin embargo tampoco es posible descartar la existencia de una 3β -HSO embrionaria cuya expresión sea regulada ontogenéticamente. Por otro lado, la alopregnanolona, a diferencia de la isopregnanolona, se sintetiza en proporciones bajas y sin variaciones importantes durante los estadios del desarrollo estudiados (Figura 8).

Este patrón ontogénico diferencial de síntesis de ambos isómeros puede ser explicado de varias formas. Las más sencillas implican una regulación a nivel transcripcional de la 3β -HSO o diferentes K_m y concentraciones de la 3α y la 3β -HSO.

Una hipótesis para explicar la reducción en la síntesis de isopregnanolona, es la regulación de la expresión de la 3β -HSO, esto implica que la enzima sea reprimida a nivel transcripcional a partir del estadio E16. A favor de esta hipótesis se puede ver en la figura 8 que la disminución de la cantidad de isopregnanolona sintetizada precede a la disminución de 5α -DHP, el cual disminuye a partir de E19. Para atribuir totalmente la disminución de la actividad 3β -HSO a una menor síntesis de la enzima, esta no tiene que “ver” la disminución de la concentración de sustrato. Es decir, que la enzima tendría que estar trabajando a saturación de sustrato en exceso, como parece ser el caso de la 3α -HSO, ya que se mantiene casi constante en todos los estadios estudiados.

Otra posibilidad es que la diferencia en el patrón de síntesis de alopregnanolona e isopregnanolona en el desarrollo de la corteza cerebral sea consecuencia de que las enzimas de síntesis correspondientes tengan distintas afinidades por el sustrato y se hallen en concentraciones diferentes, haciendo que respondan distinto a la disminución del sustrato. En este caso también hay que suponer que la 3α -HSO se halla en baja concentración (tiene baja expresión) y tiene alta afinidad por la 5α -DHP, trabajando a exceso de sustrato como en la primera hipótesis a todos los niveles de 5α -DHP obtenidos en ese trabajo. La 3β -HSO tendría baja afinidad por el sustrato y se hallaría, en mayor concentración que la 3α -HSO (para justificar la mayor actividad en estadios embrionarios). De esta forma la disminución de la 5α -DHP, causada por la reducción de la actividad 5α -reductasa observada desde el estadio E19 inclusive, solo afectaría la actividad 3β -HSO, reduciendo la síntesis de isopregnanolona y no la de alopregnanolona (Figura 8e).

Estas son dos de las interpretaciones posibles que existen para explicar el patrón de síntesis de neuroesteroides derivados de la progesterona encontrado en corteza cerebral de ratas durante varios estadios de gestación.

Aunque de la médula espinal hay pocos experimentos y edades estudiadas (E13, E16 y P0; figura 9), se perfila un patrón similar al de corteza cerebral. Por lo tanto las hipótesis anteriores se pueden hacer extensivas a la médula espinal.

La producción de neuroesteroides derivados de la progesterona también fue estudiada en la placenta durante los estadios embrionarios elegidos para corteza y médula. Este tejido tiene casi la misma capacidad de metabolizar la progesterona y de sintetizar isopregnanolona que el SNC, pero a diferencia de este tejido la mayor parte de la progesterona metabolizada es convertida a alopregnanolona (Figura 10). Esto muestra que si bien el SNC fetal no pareciera tener una gran capacidad de sintetizar alopregnanolona (7% de los esteroides recuperados, aproximadamente igual que en el adulto), tiene por parte de la placenta un alto potencial de disponibilidad de este neuroesteroide. De esta forma queda incluida también la alopregnanolona como candidata a ejercer alguna acción en el desarrollo.

Esta capacidad aumentada de síntesis de neuroesteroides en los estadios intermedios del desarrollo embrionario de la rata, sugiere que algunos de los compuestos derivados de la progesterona podrían participar de funciones ligadas al desarrollo del SNC. La pregunta obvia es por qué hay una elevada actividad 5α -reductasa y qué hacen la isopregnanolona (sintetizada principalmente por el tejido nervioso) y la alopregnanolona (sintetizada principalmente por la placenta) en el desarrollo embrionario, para tener esa capacidad de síntesis aumentada. Por supuesto que está la posibilidad de que no halla un motivo para este comportamiento. Sin embargo, dado que la alopregnanolona puede potenciar el efecto del GABA por lo menos desde el estadio P5 (Borodinsky, et al, 1997), y la similitud estructural que tiene con la isopregnanolona, es posible que esta última interactúe con el receptor GABA_A del SNC inmaduro. Aunque la isopregnanolona no modula el receptor GABA_A del SNC adulto, esto no puede ser descartado en los embriones porque su composición de subunidades es muy diferente (Laurie, D.J, et al, 1992).

7.2 Estudios de unión específica al receptor GABA_A

Dado que el GABA es un neurotransmisor despolarizante en algunas células nerviosas inmaduras, se postula que tendría un rol neurotrófico en el

desarrollo (Cherubini, E., et al, 1991). Teniendo en cuenta esta hipótesis resulta de interés conocer la posible producción, por parte del feto o la placenta, de esteroides capaces de modular el accionar del GABA embrionario.

Si bien por resultados previos del laboratorio (Borodinsky, et al, 1997), la alopregnanolona no modula alostéricamente el binding de muscimol-[H³] en membranas de corteza cerebral de embriones de 18 días y ratas neonatales, no se sabe si su isómero, la isopregnanolona, puede o no modularlo en algún estadio del desarrollo. Para evaluar esa posibilidad se realizaron ensayos de unión específica de muscimol en membranas de corteza cerebral de ratas postnatales de 5 días y embriones de 19 días de gestación. Para ello se preincubaron las membranas fraccionadas, con alopregnanolona o isopregnanolona y muscimol-[H³]. Como se puede ver en las figuras 12-14 la alopregnanolona potencia aproximadamente un 50% el binding de muscimol-[H³] en corteza cerebral de ratas postnatales de 5 días de gestación. En las mismas condiciones, se ve claramente que la isopregnanolona no modula el binding de muscimol, ni positiva ni negativamente (Figura 13 y 14). Un resultado similar se puede observar en un experimento realizado en embriones de 19 días de gestación. Aquí la isopregnanolona tampoco ejerce una acción significativa, pero a diferencia del estadio P5 la alopregnanolona tampoco modula el binding de muscimol. Parecería por lo tanto, que ambos neuroesteroides carecen de acción sobre el receptor GABA_A en embriones de 19 días de gestación. Esto no implica que no cumplan ninguna función en el desarrollo, sino que no lo hacen a través de este receptor, o que no fue detectada por este método.

Tampoco se conoce si en estadios del desarrollo en los que la alopregnanolona ya tiene efecto (como la corteza cerebral de ratas postnatales de 5 días), la isopregnanolona puede interferir con esa modulación positiva. En este sentido se ha publicado que la epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona) inhibe la potenciación del binding de flunitrazepam en membranas de cerebro de rata, mediado por pregnanolona (5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona) (Prince, R.J. and Simmonds, M.A., 1992). La pregnanolona es un esteroide neuroactivo, pero no un neuroesteroide, que actúa potenciando la acción del GABA como la

alopregnanolona. La relación de la pregnanolona con la epipregnanolona es la misma que la de la alopregnanolona con la isopregnanolona (un oxidrilo en posición 3β o 3α). Por lo tanto es posible que la isopregnanolona inhiba la potenciación mediada por alopregnanolona. Para evaluar esta posibilidad en membranas de corteza cerebral de ratas postnatales de 5 días de gestación, se utilizó el mismo procedimiento de medición del binding de muscimol, pero coincubando las membranas con ambos neuroesteroides (Figura 13 y 14). Los resultados obtenidos muestran una tendencia de la isopregnanolona a disminuir la potenciación mediada por alopregnanolona. Al incubar simultáneamente ambos neuroesteroides, la isopregnanolona diez veces más concentrada ($10\ \mu\text{M}$), el porcentaje de modulación del binding de muscimol disminuye aproximadamente un 50%. De ser correcto este resultado apoyaría posibilidad de que la isopregnanolona compitiera con la alopregnanolona por el sitio de unión al receptor GABA_A . Sin embargo esto en este trabajo eso no está comprobado por que la disminución del binding de muscimol es una tendencia no significativa.

CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra evidencias de que el SNC embrionario es capaz de sintetizar neuroesteroides a partir de la progesterona., por lo menos desde los 13 días de gestación.

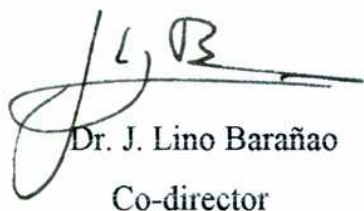
La capacidad de metabolizar la progesterona, es decir la actividad 5α -reductasa, está más desarrollada en el SNC de embriones de 13 y 16 días de gestación.

El SNC de los estadios embrionarios E13 y E16 puede sintetizar isopregnanolona en mayor proporción que alopregnanolona, siendo la primera aproximadamente cuatro veces más abundante.

La síntesis de alopregnanolona no presenta variaciones importantes durante todos los estadios del desarrollo analizados. Su síntesis oscila entre 5 y 10 % de los neuroesteroides totales recuperados.

La placenta sintetiza mayoritariamente alopregnanolona.


La isopregnanolona carece totalmente de capacidad moduladora sobre el receptor $GABA_A$ de corteza cerebral de embriones de rata de 19 días de gestación y postnatales de 5 días.



Dr. J. Lino Barañao
Co-director



Dra Mónica Fiszman
Directora



Pablo E. Pomata
Alumno

9. REFERENCIAS

- Atkinson, M.R.; Davis, B.; Prtatt, M. A.; Sharpe, H.M. and Tomich, E.G.: Action of some steroids on the central nervous system of mouse. II Pharmacology. *J. Med. Chem.* 8: 426-432, 1965.
- Barnea, A.; Hajibeigi, A.; Trant, J.M. And Mason, J.I.: Expression of steroid metabolizing enzymes by aggregating fetal brain cells in culture: a model for developmental regulation of the progesterone 5 α -reductase pathway. *Endocrinology*, 127:1, 500-502, 1990.
- Baulieu, EE. and Robel, P.: Neurosteroids: a new brain function? *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 37:3, 395-403, 1990.
- Bitran, D.; Shiekh, M.; McLeod, M.. Axiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptor. *J. Neuroendocrinology*, Mar, 7:3, 171-7, 1995.
- Bormann, J. and Feigenspan, A.: GABA_C receptors. *Trends Neurosci.*, 18, 515-519, 1995.
- Borodinsky, L.N.; Pesce, G.; Pomata, P.E. and Fiszman, M.L.: Neurosteroid modulation of the GABA_A receptors in the developing of the rat brain cortex. *Neurochem. Int.*, 31:2, 313-317, 1997.
- Celotti, F.; Melcangi, R.C. and Martini, L.: The 5 α -reductase in the brain. molecular aspects and relation to brain function. *Front. Neuroendocr.*, 13:163-215, 1992.
- Cheng, K.-C.; Lee, J.; Khanna, M. and Qin, K.-N.: Distribution and ontogeny of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J. Steroid. Molec. Biol.*, 50:85-89, 1994.
- Cherubini, E.; Gairasa, J.L. and Ben-Ari, Y.: GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *TINS*, 14, 515-519, 1991.
- Cobas, A.; Faireen, A.; Alvarez-Bolando, G. and Sánchez, M.P.: Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA_A receptor. *Neuroscience* 40, 375-397, 1991.
- Colman Lerner, A.A.; Salomone, D.F.; Chiappe, M.E. and Barañao, J.L.: Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J. Cell Physiol.*, 164: 395-403, 1995.
- Compagnone, N.A., Bulfone, A., Rubenstein, J.L. and Mellon, S.H.: Expression of steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous system during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136:2686-2696, 1995.

- Corpèchot, C.; Robel, P.; Axelson, M.; Sjöval and Baulieu, E.E.: Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:8, 4704-4707, 1981.
- Corpèchot, C.; Synguelakis, M.; Thala, S.; Axelson, M.; Sjöval, J.; Vihko, R.; Baulieu, EE. and Robel, P.: Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.*, 270:119-125, 1983.
- Costa, E.; Auta, J.; Guidotti, A.; Korneyev, A. and Romeo E.: The pharmacology of neurosteroidogenesis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 49:385-389, 1994.
- Cutting, G.R.; Lu, L.; O'Hara, B.F.; Kasch, L.M.; Montrose-Rafizadeh, C.; Donovan, D.M.; Shimada, S.; Antonarakis, S.E.; Guggino, W.B.; Uhl, G.R. and Kazazian, H.H.Jr.: Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ_1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:2673-2677, 1991.
- Dayanithi, G. and Tapia-Arancibia, L.: Rise in intracellular calcium via non genomic effect of allopregnanolone in fetal rat hypothalamic neurons. *J. Neurosci.*, 16:1, 130-136, 1996.
- Duggan, M.J.; Pollard, S. and Stephenson, F.A.: Immunoaffinity purification of GABA_A receptor α -subunit iso-oligomers. *J. Biol. Chem.*, 266:24778-24784, 1993.
- Eicheler, W.; Tuohimaa, P.; Vilja, P.; Adermann, K.; Forssmann, W.G. and Aumüller, G.: Immunocytochemical localization of human 5 α -reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 42:664-675, 1994.
- El Etr, M.; Akwa, Y.; Robel, P. and Baulieu, EE.: Opposing effects of different steroid sulfates on GABA_A receptor-mediated chloride uptake. *Brain Res*, 790:334-338, 1998
- Figdor, S.K.; Kodet, M.T.; Bloom, B. M.; Agnelle, E. J.; P'An, S. Y. and Laubach, G. D.: Central activity and structure in a series of water soluble steroid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119: 299-309, 1957.
- French-Constant, R.H., Rocheleau, T.A., Steichen, J.C. and Chalmers, A.E.: A point mutation in *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363:449-451, 1993.
- Fiszman, M.L.; Novotny, E.A.; Lange, G.D. and Barker, J.L.: Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentrations of muscimol. *Dev. Brain Res.* 53, 186-193, 1990.
- Fiszman, M.L.; Behar, T.; Lange, G.D.; Smith, S.V.; Novotny, A.E. and Barker, J.L.: GABAergic cells and signals appear together in early post-mitotic period of telencephalic and striatal development. *Dev. Brain Res.* 73, 243-251, 1993.

- Harrison, N.L. and Simmonds, M.A.: Modulation of the GABA_A receptor by a steroid anesthetic. *Brain Res.*, 323: 287-292, 1984.
- Harrison, N.L., Majewska, M.D., Harrington J.W. and Barker, J. L.: Structure-activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid A receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:346-353, 1987.
- Hu, Z.Y.; Bourreau, E.; Jung-Testas, I.; Robel, P. and Baulieu, EE.: Neurosteroids: Oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8215-8219, 1987.
- Jung-Testas, I., Hu, Z.Y., Robel, P., Baulieu, EE.. Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 125, 2083-2091, 1989.
- Karavolas, H.J. and Herf, S.M.: Conversion of progesterone by rat medial basal hypothalamic tissue to 5 α -pregnane-3,20-dione. *Endocrinology*, 89:3, 940-2, 1971.
- Karavolas, H.J. and Hodges, D.R.: Metabolism of progesterone and related steroids by neural and neuroendocrine structures. *Folia Res. Found.* (Eds. E. Costa y S.M. Paul), 8:135-145, 1992
- Khan, Z.U.; Gutierrez, A. and De Blas, A.L.: Short and long form $\gamma 2$ subunit of the GABA_A/benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.*, 63:1466-1476, 1994.
- Khanna, M., Qin, K.N. and Cheng, K.C.: Distribution of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and molecular cloning of multiple cDNA encoding structural related proteins in humans. *J. Steroid Biochem Molec Biol.* 48:145-154, 1995.
- Kliman, B. and Peterson, R.: Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts. *J. Biol. Chem.*, 235:1639-1648, 1960.
- Koenig, H.L.; Schumacher, M.; Ferzaz, B.; Thi, A.N.; Ressouches, A.; Guennoun, R.; Jung-Testas, I.; Robel, P.; Akwa, Y. and Baulieu, EE: Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, 268:1500-1503, 1995
- Korpi, E.R.: Role of GABA_A receptors in the actions of alcohol and in alcoholism: recent advances. *Alcohol Alcohol*, 29:115-129, 1994.
- Krause, J.E. and Karavolas, H.J.: Subcellular location of hypothalamic progesterone metabolizing enzymes and evidence for distinct NADH- and NADPH-linked 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase activities. *J. Steroid Biochem.*, 13:271:280, 1980a.
- Krause, J.E. and Karavolas, H.J.: Pituitary 5 α -dihydroprogesterone 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase. Subcellular location and properties of NADH- NADPH-linked activities. *J. Biol. Chem.*, 255:11807-11814, 1980b.

- Lamert, J.J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Peters, J.A.: Neurosteroid and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16:295-303, 1995.
- Lambert, J.J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Callachan, H.; Peters, J.A.: Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA_A. *Cell Mol Neurobiol*, 16:2, 155-74, 1996.
- Lauber, M.E. and Lichtensteiger, W.: Ontogeny of 5 α -reductase (type I) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in germinal zones. *Endocrinol.* 137:7, 2718-2730, 1996.
- Lauder, J.M.; Han, V.K.M.; Henderson, P.; Verdoorn, T. and Towle, A.C.: Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: a immunocytochemical study. *Neuroscience* 19, 465-493, 1986.
- Laurie, D.J.; Wisden, W. and Seeburg, P.H.: The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.*, 12(11):4151-4172, 1992.
- Laurence, D.K. and Gill, E. W.: Structurally specific effects of some steroid anesthetics on spin-labeled liposomes. *Mol. Pharmacol.*, 11:280-286, 1975.
- Le Goascogne, C.; Robel, P.; Gouézou, M.; Sananès, N.; Baulieu, EE. and Waterman, M.: Neurosteroids: Cytochrome P-450SCC in rat brain. *Science*, 237:1212-1215, 1987.
- Lèna, C. and Changeux, J. P.: Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci.* 16, 181-186, 1993.
- Lephart, E.D.; Andersson, S. And Simpson, E.R.: Expression of neuronal 5 α pfa-reductase messenger ribonucleic acid: comparison to 5 α lpha-reductase activity during prenatal development in the rat. *Endocrinology*, 127:1121-1128, 1990.
- Levy, M.A.; Brandt, M.; Sheedy, K.M.; Holt, D.A.; Heaslip, J.L.; Trill, J.J.; Ryan, P.J.; Morris, R.A.; Garrison, L.M. and Bergsma D.J.: Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 5 α lpha-reductases from Cynomolgus monkey: comparison with human and rat isoenzymes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 52:307-319, 1995.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- Macdonald, R.L. and Barker, J.L.: Anticonvulsants and anesthetic barbiturates: different postsynaptic actions in cultured mammalian neurons. *Neurology*, 29:432-447, 1979.
- Macdonald, R.L. and Olsen, R. W.: GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17:569-602, 1994.

- Macdonald, R.L.; Rogers, C.J. and Twyman, R.E.: Barbiturate regulation of kinetics properties of the GABA_A receptor channel of mouse spinal neurons in culture. *J. Physiol.*, 417:483-500, 1989.
- Majewska, M.D., Harrison N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L. and Paul, S.: Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232:1004-1007, 1986.
- Majewska, M.D. and Schwartz, R.D.: Pregnenolone sulfate: an endogenous antagonist of de γ -aminobutyric acid receptor complex in brain ?. *Brain Res.*, 404:355-360, 1987.
- Majewska, M.D., Demirgören, S., Spivak, C. E. and London, E.D.: The neurosteroid dehydroepiandrosterona sulfate is an allosteric antagonist of the GABA_A receptor. *Brain Res.*, 526:143-146, 1990.
- Majewska, M.D.: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology*, 38:379-395, 1992.
- Martini, L.; Celotti, F.; Melcangi, R.C.: Testosterone and progesterone metabolism in the central nervous system: cellular localization and mechanism of control of the enzymes involved. *Cell Mol Neurobiol*, 16:3, 271-82, 1996.
- McKernan, R. M. and Whiting, P. J.: Which GABA_A receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosc.* 19, 139-143, 1996.
- Melcangi, R.C.; Celotti, F.; Castano, P. and Martini, L.: Differential localization of de 5 α -reductase and the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology*, 132:1252-1259, 1993.
- Melcangi, R.C., Celotti, F. and Martini, L.: Progesterone 5 α -reduction in neuronal and in different types of glial cell cultures: type 1 and type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Brain Res.* 639, 202-206, 1994.
- Monnet, F.P.; Mahé, V.; Robel, P. and Baulieu, EE.: Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [H³]-norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 92, 3774-3778, 1995.
- Morel, Y.; Mébarki, F.; Rhéaume, E.; Sanchez, R.; Forest, M.G. and Simard, J.: Structure-function of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetic of 3 beta hydroxysteroide dehydrogenase deficiency. *Steroids*, 62:1, 176-184, 1997.
- Negri-Cesi, P.; Poletti, A. and Celotti, F.: Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 α -reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 58:5/6, 455-466, 1996.

- Normington, K. and Rusell, D.W.: Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 267:19548-19554, 1992.
- Papadopoulos, V.; Guarnieri, P.; Pan, B.; Krueger, K.E. and Costa, E.: Steroid synthesis by glial cells. *Fidia Res. Found.* (Eds. E. Costa y S.M. Paul), 8:165-161, 1991.
- Poisbeau, P.; Feltz, P. and Schlichter, R.: Modulation of GABA_A receptor-mediated IPSCs by neuroactive steroids in a rat hypothalamo-hypophyseal coculture model. *J. Physiol.*, 500:475-485, 1997.
- Pollard, S.; Thompson, C.L. and Stephenson, F.A.: Quantitative Characterization of $\alpha 6$ and $\alpha 1$ $\alpha 6$ subunit-containing native γ -aminobutyric acid_A receptors of adult rat cerebellum demonstrates two α subunits per receptor oligomer. *J. Biol. Chem.*, 270:21285-21290, 1995.
- Prince, R.J., Simmonds, M.A.: 5 β -pregnan-3 β -ol-20-one, a specific antagonist of the neurosteroids site of GABA_A receptor complex. *Neurosci. Lett.*, 135:2, 273-5, 1992.
- Pritchett, D. B.; Lüddens, H. and Seeburg, P. H.: Type I and Type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in trasfected cells. *Science*, 245:1389-1392, 1989a.
- Pritchett, D. B.; Sontheimer, H.; Shivers, B. D.; Ymer, S.; Kettenmann, H.; Schofield, P. R. and Seeburg, P. H.: Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338:582-585, 1989b.
- Puia, G.; Ducic, I.; Vicini, S. and Costa, E.: Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA_A receptor subunit composition? *Receptor Channels* 1:135-142, 1993.
- Quirk K; Gillard NP; Ragan CI; Whiting PJ; McKernan RM: gamma-Aminobutyric acid type A receptors in the rat brain can contain both gamma 2 and gamma 3 subunits, but gamma 1 does not exist in combination with another gamma subunit.. *Mol. Pharmacol.*, 45:1061-1070, 1994.
- Robel, P. and Baulieu, EE.: Neurosteroids Biosynthesis and Function. *Trends Endocrinol Metab*, 5:1-8, 1994.
- Rogers, C.J.; Twyman, R.E. and Macdonald, R.L.: Benzodiazepine and β -carboline regulation of single GABA_A channel of mouse spinal neuron in culture. *J. Physiol. (Lond)*, 475:69-82, 1994.
- Sakman, B.; Hamill, O.P. and Bormann, J.: Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitters GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J. Neural Transmission Suppl.* 18:83-95, 1983.
- Sanne, J.L. and Krueger: Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: A study by polimerase chain reaction and in situ hybridization. *J. Neurochem.* 65:528-536, 1995.

- Schaffner, A.E.; Behar, T.; Nadi, S. and Barker, J.L.: Quantitative analysis of transient GABA expression in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons. *Dev. Brain Res.* 72, 265-276, 1993.
- Smith, G.B. and Olsen, R.W.: Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Neurosci.* 16, 145-177, 1995.
- Soldo, B.L.; Practor, W.R. and Dunwiddie, T.V.: Ethanol differentially modulates GABA_A receptor-mediated chloride currents in hippocampal, cortical and septal neurons in rat brain slices. *Synapse*, 18:94-103, 1994.
- Su, T.P.; London, E.D. and Jaffe J.H.: Steroid binding at σ receptor suggest a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240, 219-221, 1988.
- Thigpen, A.E.; Silver, R.I.; Guilellardo, J.M.; Casey, M.L; McConnel, J.D. and Rusell, D.W.: Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.*, 92:903-910, 1993.
- Twyman, R.E.; Rogers, C.J. and Macdonald, R.L.: Differential regulation of γ -aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenoarbital. *Ann. Neurol.*, 25:213-220, 1989.
- Valera, S.; Balivet, M. and Bertrand, D.: Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 89, 9949-9953, 1992.
- Van Eden, C.G.; Mrzljak, L; Voorn, P. and Uylings, H.B.M.: Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 289:213-227, 1989.
- Wafford, K.A. and Whiting, P.J.: Ethanol potentiation of GABA_A receptors requires phosphorylation of alternatively spliced variants of γ_2 subunit. *FEBS Lett.*, 313:113-117, 1992.
- Wehling, M.: Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.*, 59:365-93, 1997.
- Weiner, J.L.; Zhang, L and Carlen, P.L.: Potentiation of GABA_A-mediated synaptic currents by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 268:1388-1395, 1994.
- Wu, F-S, Gibbs, T.T., Farb D.H.: Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the NMDA receptor. *Mol Pharmacol.* 40:333-336, 1991.
- Wu, F-S, Gibbs, T.T., Farb, D.H.: Inverse modulation of γ -amino-butyric acid and glycine-induced currents by progesterone. *Mol. Pharmacol.* 37:597-602, 1990.

Wu, F-S; Yu, H.M. and Tsai, J.J.: Mechanism underlying potentiation by progesterone of the kainate-induced current in cultured neurons. *Brain Res*, 779:354-358, 1998.

Yang, J.S.-J and Olsen, R.W.: γ -aminobutyric acid receptor binding in fresh mouse brain membranes at 22°C: ligand-induced changes affinity. *Mol. Pharmacol.*, 32:266-277, 1987.

Yuste, R. and Katz, L.C.: Control of postsynaptic Ca^{2+} influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*, 6, 333-344, 1993.

Zhu, W.J.; Wang, J.F. Krueger, K.E. and Vicini, S.: δ subunit inhibits neurosteroid modulation of GABAA receptor. *J. Neurosci.* 16:6648-6656, 1996.