

Tesis de Posgrado

Neuroesteroides en el sistema nervioso central en desarrollo : biosíntesis y modulación del complejo receptor GABA sub A

Pignataro, Leonardo Antonio

2000

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Pignataro, Leonardo Antonio. (2000). Neuroesteroides en el sistema nervioso central en desarrollo : biosíntesis y modulación del complejo receptor GABA sub A. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3306_Pignataro.pdf

Cita tipo Chicago:

Pignataro, Leonardo Antonio. "Neuroesteroides en el sistema nervioso central en desarrollo : biosíntesis y modulación del complejo receptor GABA sub A". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3306_Pignataro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

**NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL EN DESARROLLO: BIOSINTESIS Y
MODULACION DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA_A**

Autor

LEONARDO PIGNATARO

Director de Tesis

DRA. SARA FISZER DE PLAZAS

Lugar de trabajo

**INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR Y NEUROCIENCIAS,
"PROF. DR. EDUARDO DE ROBERTIS"
FACULTAD DE MEDICINA - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

3006

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

2000

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Sara Fiszer de Plazas, por su confianza y por darme la oportunidad de comenzar en la investigación, por brindarme su laboratorio, su conocimiento y todo su apoyo durante los difíciles años del comienzo y además por darme tanta libertad para trabajar.

A la Dra. Herminia Alicia Brusco y al Dr. Javier Ramos por su invaluable colaboración en los estudios inmunocitoquímicos y a los Dres. Gabriel Scicolone y Vladimir Flores por la ayuda en los estudios histológicos, todos ellos del Instituto de Biología Celular.

A las Dras. Haydeé Benencia y Viviana Mesch del Laboratorio de Endocrinología, Dto. de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por la medición de los esteroides.

A mi amiga personal y compañera de laboratorio de tantos años, la Dra. María Clara Gravielle por enseñarme generosamente todo lo que sé, por su ayuda en todo momento, en lo laboral y en lo personal, por ser una amiga excepcional que llevaré siempre en mi corazón.

Al Dr. Mariano Viapiano y al Lic. Diego Rodríguez Gil, también amigos personales, además de compañeros de mesada en el laboratorio, por los maravillosos momentos que compartimos, por su ayuda y su amistad que atesoro especialmente.

A una persona especial, Alba Mitridate de Novara -Albita- con quien comparto hermosas charlas acerca de la vida que me han sido de gran enseñanza. Por estar siempre ayudándome y por ser una compañera tan fiel.

A María Florencia Coronel con quien he compartido hermosos momentos en el laboratorio, y por ser tan buena persona.

A Diego Javier Kormes, un nuevo compañero de aventuras en las mesadas, por ser tan paciente con mis indicaciones y por los buenos momentos.

A los amigos que he hecho en estos años en el Instituto de Biología Celular, Analía Reinés, María Ana Calviño, Javier Ramos, Patricia Schneider, Graciela López Ordieres, Claudia López, Patricia Tagliaferro y muchos otros más que no recuerdo en este momento.

A las autoridades del Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Dr. Eduardo De Robertis por permitirme desarrollar mis investigaciones en sus instalaciones.

A mis amigos y compañeros docentes de Análisis Biológicos, las Dras. Lucía Kordich, Alcira Nesse, Beatriz Sasseti, Graciela Garbossa, Gladys Perez, Irene Quintana, Cristina Dubosq, Ma. Cristina Romero, Daniela Vittori, Ana Ma. Lauricella, Eleonora Rossi y especialmente al Lic. Carlos “Charly” Lafourcade por ser más además de mis colegas docentes, amigos personales.

A la Universidad de Buenos Aires por financiar mi actividad científica.

Al CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a la Universidad de Buenos Aires por la financiación de los proyectos de investigación en los que participe.

Por último y no por ello menos importante les quiero agradecer a personas que no estuvieron tan directamente involucradas en esta Tesis pero si lo están en mi vida, lo que me ha permitido seguir adelante y llegar hasta aquí.

A mis padres por su constante e incondicional apoyo en todas las cosas de mi vida y su ejemplo.

A mi hermano Claudio y su esposa Amorina por su amor y por crear a dos personas maravillosas que me alegran la vida, Chiara y Fabrizio.

Especialmente a mis amigas Patricia Pereyra, Silvina Gazzaniga y Laura López por brindarme su corazón y estar siempre cerca de mi alma.

A Sergio Alvarez por ser un amigo extraordinario y por enseñarme a disfrutar de muchas cosas de la vida y mostrarme el mundo. Junto con él, especialmente a Jacqueline Lacoste y a Eduardo González, a Adriana Alvarez, a Guillermo De la Plaza, a Jacqueline Graves y a Emilio Quesada Martínez, por su inmerecida amistad.

A muchos más que escapan de mi memoria que directa o indirectamente han ayudado en esta Tesis.

A todos ellos muchas gracias

A mis padres

A mi familia

A mis amigos

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE TESIS

AC	adenilato ciclasa
afx	alfaxalona
alo	alopregnanolona
am	antes meridiano
ANOVA	análisis de varianza
APS	ácido 3-aminopropán sulfónico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
(-)baclofen	ácido β -(4-clorofenol)- γ -aminobutírico
B_{max}	máxima capacidad de unión/número máximo de sitios receptores
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
[^{14}C]	carbono 14
CACA	ácido <i>cis</i> -4-aminocrotónico
CamKII	proteína kinada dependiente de Ca^{2+} -calmodulina de tipo II
β -CCM	β -carbolina-3-carboxilato
CE_{50}	concentración de droga que produce la mitad del efecto máximo
CHAPS	3-[(3-coloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato
Ci	Curie
μCi	microCurie
CI_{50}	concentración que produce la mitad de la inhibición máxima
Cl^{-}	cloruro
$^{36}\text{Cl}^{-}$	cloruro 36
cpm	cuentas por minuto
DE	día embrionario
DHEA	dehidroepiandrosterona
DMCM	dimetil- β -carbolina-3-carboxilato
DMEM:F12	medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle: Mezcla nutriente F-12

E_{max}	efecto máximo de la droga
epi	epipregnanolona
ESM	error estándar de la media
g	aceleración de la gravedad
g	gramo
μg	microgramo
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	L-glutamato decarboxilasa
GAT	transportador de GABA
GFAP	proteína ácida fibrilar de la glía
GMP _c	guanosin monofosfato cíclico
GTP	guanosin trifosfato
[³ H]	tritio
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etansulfónico]
5-HT ₃	receptor de serotonina
K_d	constante de disociación aparente
kDa	kiloDalton
μl	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar
M	molar
mCi	miliCurie
mg	miligramo
min.	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina
nM	nanomolar

nmol	nanomol
p/v	peso en volumen
P450 _{c17α}	citocromo P450 17αhidroxilasa/17-20-liasa
P450 _{scc}	citocromo P450 <i>side-chain cleavage</i>
PAP	peroxidasa anti-peroxidasa
PKA	proteína kinasa A
PKC	proteína kinasa C
pmol	picomol
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
POPOP	2,2'-p-fenilén-bis(5-feniloxazol)
PPO	2,5-difeniloxazol
prot	proteína
PTK	proteína tirosina kinasa
PTZ	petilentetrazol
RN	recién nacido
SKF97541	ácido 3-aminopropil-(metil)fosfínico
SNC	sistema nervioso central
SR 95531	gabazina
SSADH	semialdehído succínico deshidrogenasa
T _{1/2}	tiempo medio
TACA	ácido <i>trans</i> -4-aminocrotónico
TBPS	<i>t</i> -butilbiclofosforotionato
THIP	4,5,6,7-tetrahidroixozazol(5,4-c)-piperidine-3-ol
TM	dominio transmembrana
TPMPA	ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridín-4-il)metilfosfónico
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
v/v	volumen en volumen

INDICE DE CONTENIDOS

	página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
1. Metabolismo del Acido γ -aminobutírico	3
2. Tipos de receptores GABAérgicos	5
3. El complejo receptor GABA _A	7
3.1. Estructura molecular	7
3.2. Farmacología del receptor GABA _A	13
3.3. Interacciones alostéricas de los sitios del receptor GABA _A	14
4. El sitio receptor Benzodiazepínico	16
5. Barbitúricos	18
6. Neuroesteroides	18
6.1. Biosíntesis de Neuroesteroides	20
6.2. Significado de las interacciones Neuroesteroides- receptor GABA _A	24
6.3. Efectos genómicos de los Neuroesteroides	25

7. La vía visual de las aves	26
7.1. Morfología del lóbulo óptico	27
7.2. Desarrollo del lóbulo óptico	30
7.3. El sistema GABAérgico en el lóbulo óptico de pollo	31
7.4. El lóbulo óptico como modelo de desarrollo	33
OBJETIVOS	34
1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA _A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO	34
2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA _A	34
3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO	35
4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO <i>IN OVO</i> CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA _A	35
MATERIALES Y METODOS	37
1. MODULACION NEUROESTEROIDEA DEL RECEPTOR GABA _A	37
1.1. Drogas y reactivos químicos	37
1.2. Animales	38
1.3. Preparación de membranas sinápticas	38
1) <i>Exhaustivos lavados</i>	39
2) <i>Tratamiento con detergente</i>	39

1.4. Ensayos de unión de radioligando	40
1.4.1. Ensayos de unión de [³ H]flunitrazepam a receptores asociados a membranas	40
1.4.2. Ensayos de unión de [³ H]flunitrazepam a receptores solubilizados	40
1.4.3. Determinación de los parámetros constante de disociación aparente (K_d) y máxima capacidad de unión (B_{max}) de los sitios receptores benzodiazepínicos	41
1.4.4. Modulación neuroesteroidea de la unión de [³ H]flunitrazepam	42
1.5. Determinación de proteínas	43
1.6. Análisis estadístico de los resultados	43
2. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO	44
2.1. Drogas y reactivos químicos	44
2.2. Metabolismo de la [¹⁴ C]progesterona y análisis cromatográfico en capa delgada.	44
2.3. Acetilación de los metabolitos de [¹⁴ C]progesterona	45
2.4. Medición del contenido endógeno de progesterona y testosterona en el lóbulo óptico	46
3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO <i>IN OVO</i> CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A	47
3.1. Drogas y reactivos químicos	47
3.2. Tratamiento crónico de los embriones con neuroesteroides	48
3.3. Estudio de la histología de lóbulo óptico de pollo	48
3.4. Estudio de la inmunotinción para GABA en el lóbulo óptico	49
3.5. Preparación de membranas sinápticas	50

3.6. Ensayos de unión de radioligandos	51
3.6.1. Ensayos de unión de [³ H]GABA a receptores asociados a membranas	51
3.6.2. Determinación de los parámetros constante de disociación aparente (K_d) y máxima capacidad los de unión (B_{max}) de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad	52
3.6.3. Modulación de la unión de [³ H]GABA a los sitios receptores de baja afinidad por alopregnanolona, pentobarbital sódico y diazepam.	52
3.6.4. Ensayos de unión de [³ H]flunitrazepam a receptores asociados a membranas	53
3.7. Preparación de microsacos	54
3.8. Ensayos de captación de ³⁶ Cl ⁻	54
3.9. Determinación de proteínas	55
3.10. Análisis estadísticos de los resultados	55
RESULTADOS	56
1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA _A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO	56
1.1. Efecto <i>in vitro</i> de alopregnanolona y alotetrahydrodesoxicorticosterona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam durante el desarrollo del lóbulo óptico	56
1.2. Mecanismo de acción de alopregnanolona y alotetrahydrodesoxicorticosterona para potenciar la unión de [³ H]flunitrazepam	58

2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA_A	62
2.1. Efecto de epipregnanolona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam y sobre su potenciación por alopregnanolona	62
2.2. Efecto de epipregnanolona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam estimulada por alopregnanolona y alfaxalona	64
2.3 Efectos aditivos de los neuroesteroides alopregnanolona y alfaxalona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam	67
2.4. Modulación de la unión de [³ H]flunitrazepam a una preparación de receptores solubilizados	69
3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO	71
3.1. Metabolismo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la [¹⁴ C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo	71
3.2. Medición del contenido endógeno de progesterona y testosterona en el lóbulo óptico	75
3.3. Efecto <i>in vitro</i> del metabolito de la progesterona, epipregnanolona, sobre la unión de [³ H]flunitrazepam durante el desarrollo del lóbulo óptico	77
4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO <i>IN OVO</i> CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A	80
4.1. Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre el lóbulo óptico	80
4.2. Efecto de la administración crónica de neuroesteroide sobre la unión de [³ H]flunitrazepam	86

4.3. Efecto del tratamiento crónico <i>in ovo</i> con 30 μ M de epipregnanolona sobre la unión de [3 H]GABA	90
4.4. Efecto de la administración de 30 μ M de epipregnanolona sobre la captación de 36 Cl inducida por GABA	94
DISCUSION	96
1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA_A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO	96
1.1. Ontogenia de la modulación neuroesteroidea del complejo receptor GABA _A	96
1.2. Bases moleculares de las variaciones farmacológicas de los receptores GABA _A a lo largo del desarrollo	98
1.3. Implicancias fisiológicas de la existencia de diferentes tipos de receptor GABA _A durante el desarrollo	101
2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA_A	102
2.1. Modulación alostérica del receptor GABA _A por diferentes neuroesteroides	102
2.2 El sitio modulador neuroesteroideo en la molécula del receptor GABA _A	106
3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO	108
3.1. Neuroesteroides derivados de la [14 C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo	108

3.2. Importancia de la presencia de metabolitos 5 β -reducidos en el SNC de las aves	109
4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO <i>IN OVO</i> CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A	111
4.1. Estudio del efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre el lóbulo óptico	111
4.2. El tratamiento crónico <i>in ovo</i> con epipregnanolona sobre el sitio receptor benzodiazepínico y su interacción con el sitio modulador esteroideo	112
4.3. Efectos de la administración de epipregnanolona sobre el sitio receptor GABA y su interacción alostérica con los sitios moduladores esteroideo, benzodiazepínico y de barbitúricos	113
4.4. Exposición crónica de los embriones a epipregnanolona y su efecto sobre las características funcionales del receptor GABA _A	115
4.5. Mecanismos de epipregnanolona para afectar las interacciones alostéricas entre los sitios del receptor GABA _A	116
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFIA	121

INDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1: Metabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA)	4
Figura 2: Estructura topológica del polipéptido de una subunidad genérica del receptor GABA _A	9
Figura 3: Modelo del complejo proteico receptor GABA _A -Canal de Cl ⁻	11
Figura 4: Esquema representativo de las principales interacciones alostéricas de los sitios del receptor GABA _A	15
Figura 5: Estructura de una benzo-1,4-diazepina	16
Figura 6: Esquema de las rutas metabólicas de síntesis de neuroesteroides, mineralocorticoides y esteroides sexuales derivados de la progesterona	23
Figura 7: Esquema de las estructuras encefálicas de las aves.	26
Figura 8: Curva concentración-efecto de la unión de [³ H]flunitrazepam estimulada por alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona a membranas sinápticas frescas aisladas del lóbulo óptico de pollo en diferentes estadios del desarrollo	56
Figura 9: Representación de Scatchard de los datos obtenidos de las curvas de saturación de unión de flunitrazepam a membranas sinápticas frescas en presencia y ausencia de 4 μ M de neuroesteroides	60
Figura 10: Efecto de epipregnanolona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam y sobre su potenciación por 4 μ M de alopregnanolona	64
Figura 11: Efecto de epipregnanolona sobre la potenciación de la unión de [³ H]flunitrazepam por alopregnanolona y alfaxalona.	66
Figura 12: Efecto de 16 μ M de alfaxalona sobre la potenciación de la unión de [³ H]flunitrazepam por alopregnanolona	67

Figura 13: Estimulación de la unión de [³ H]flunitrazepam a receptores GABA _A solubilizados a partir de membranas sinápticas de lóbulo óptico de pollos adultos	69
Figura 14: Curva representativa de saturación de la unión de flunitrazepam a receptores solubilizados en presencia y ausencia de 4 μM de alopregnanolona	70
Figura 15: Metabolismo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la [¹⁴ C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo	76
Figura 16: Curva concentración-efecto de la epipregnanolona sobre la unión de [³ H]flunitrazepam a membranas sinápticas de lóbulo óptico	78
Figura 17: Estudio de la histología del tectum óptico luego del tratamiento crónico con epipregnanolona	83
Figura 18: Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en el tectum óptico	84
Figura 19: Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en la zona del núcleo ístmico del lóbulo óptico	85
Figura 20: Efecto del tratamiento con epipregnanolona sobre el acoplamiento alostérico entre los sitios neuroesteroideo y benzodiazepínico	87
Figura 21: Efecto de la administración de epipregnanolona sobre la modulación de la unión de [³ H]flunitrazepam por alopregnanolona	88
Figura 22: Efecto de la administración crónica <i>in ovo</i> de epipregnanolona sobre la unión del flunitrazepam	90
Figura 23: Efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre la modulación de la unión de [³ H]GABA por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico	92
Figura 24: Efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre la unión de GABA	93
Figura 25: Efecto de epipregnanolona sobre la captación de Cl ⁻ inducida por GABA	94

INDICE DE TABLAS

	página
Tabla I: Farmacología de los diferentes receptores GABA	6
Tabla II: Subunidades del receptor GABA _A	10
Tabla III: Valores de CE ₅₀ y E _{max} de alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona para modular la unión de [³ H]flunitrazepam en diferentes estadios del desarrollo del lóbulo óptico	58
Tabla IV: Valores de constante de disociación aparente (K _d) y número máximo de sitios receptores (B _{max}) obtenidos de las curvas de saturación de unión de flunitrazepam en presencia y ausencia de 4 μM de los neuroesteroides	59
Tabla V: Efecto de 16 μM de epipregnanolona sobre la CE ₅₀ y el E _{max} de alopregnanolona y alfaxalona para modular la unión de [³ H]flunitrazepam	65
Tabla VI: Efecto de 4 μM de alopregnanolona sobre los valores de constante de disociación (K _d) y número máximo de sitios receptores (B _{max}) de la unión de flunitrazepam a receptores solubilizados	71
Tabla VII: Valores de CE ₅₀ y E _{max} de epipregnanolona para modular la unión de [³ H]flunitrazepam en diferentes estadios del desarrollo	78
Tabla VIII: Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre el peso de tejido fresco y el contenido total de proteína del lóbulo óptico	81
Tabla IX: Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre la unión específica de [³ H]flunitrazepam	87
Tabla X: Efecto del tratamiento crónico sobre los valores de CE ₅₀ y E _{max} de alopregnanolona para modular la unión de [³ H]flunitrazepam	89

Tabla XI: Efecto del tratamiento con epipregnanolona sobre la constante de disociación (K_d) y número máximo de sitios de unión (B_{max}) del flunitrazepam	89
Tabla XII: Efecto de la exposición crónica a epipregnanolona sobre los valores de CE_{50} y E_{max} de la modulación de la unión de [3H]GABA por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico	91
Tabla XIII: Efecto del neuroesteroide endógeno sobre la constante de disociación (K_d) y número máximo de sitios de unión (B_{max}) de GABA de baja afinidad	93
Tabla XIV: Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre la captación de Cl^- inducida por GABA	95

RESUMEN

El ácido γ -aminobutírico (GABA) se une principalmente al receptor GABA_A y aumenta la conductancia de la membrana plasmática al ion Cl⁻, lo que suele estar acompañado de una hiperpolarización de la misma. Estas funciones del GABA son moduladas por diversas drogas como ser benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides. Los resultados aquí presentados demuestran que al igual que en los mamíferos los neuroesteroides son capaces de modular positivamente al receptor GABA_A presente en el SNC de las aves, siendo este efecto mayor en los estadios embrionarios. Además, se comprobó que en el SNC de las aves existe un sitio esteroideo en la molécula receptora con requerimientos estructurales para la neuroactividad diferente a los hallados en mamíferos. La biosíntesis de derivados de la progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo reveló que la misma es mayormente metabolizada a esteroides 5 β -reducidos, que luego son 3 β -hidroxilados resultando en el derivado epipregnanolona, el cual modula la unión del [³H]flunitrazepam en forma inversamente relacionada con la edad. Por último, el tratamiento crónico *in ovo* con este esteroide demostró que el mismo es capaz de reducir el acoplamiento alostérico entre los sitios benzodiazepínicos y GABAérgicos con el de los neuroesteroides y por otro lado facilitar la interacción entre los sitios de GABA con los de benzodiazepinas y barbitúricos. Estos datos sugieren que la epipregnanolona podría endógenamente modular las interacciones alostéricas del receptor GABA_A de las aves afectando su funcionamiento.

SUMMARY

γ -aminobutyric acid (GABA) binds mainly to GABA_A receptor increasing membrane chloride conductance, that usually results in membrane hyperpolarization. GABA actions are modulated by several drugs such as benzodiazepine, barbiturates and neurosteroids. We demonstrated that neurosteroids positively modulate GABA_A receptor present in avian CNS, in a manner inversely related to age. Results also disclosed that structural requirements for neuroactivity in birds are not identical to those of mammals. Progesterone derived steroids produced in the optic lobe are mainly 5 β -reduced metabolites, which are in turn 3- β hydroxylated to form epipregnanolone. Epipregnanolone biosynthesis is higher at early stages of development as well as its ability to modulate [³H]flunitrazepam binding. Lastly, *in ovo* chronic treatment with this steroid produced a reduction in the allosteric coupling between GABA and benzodiazepine sites and the steroid modulatory sites. On the other hand, this treatment increased the coupling between GABA receptor sites and benzodiazepine and barbiturate modulatory sites. These data suggest that epipregnanolone may endogenously modulate GABA_A receptor interactions and consequently affects its function.

INTRODUCCION

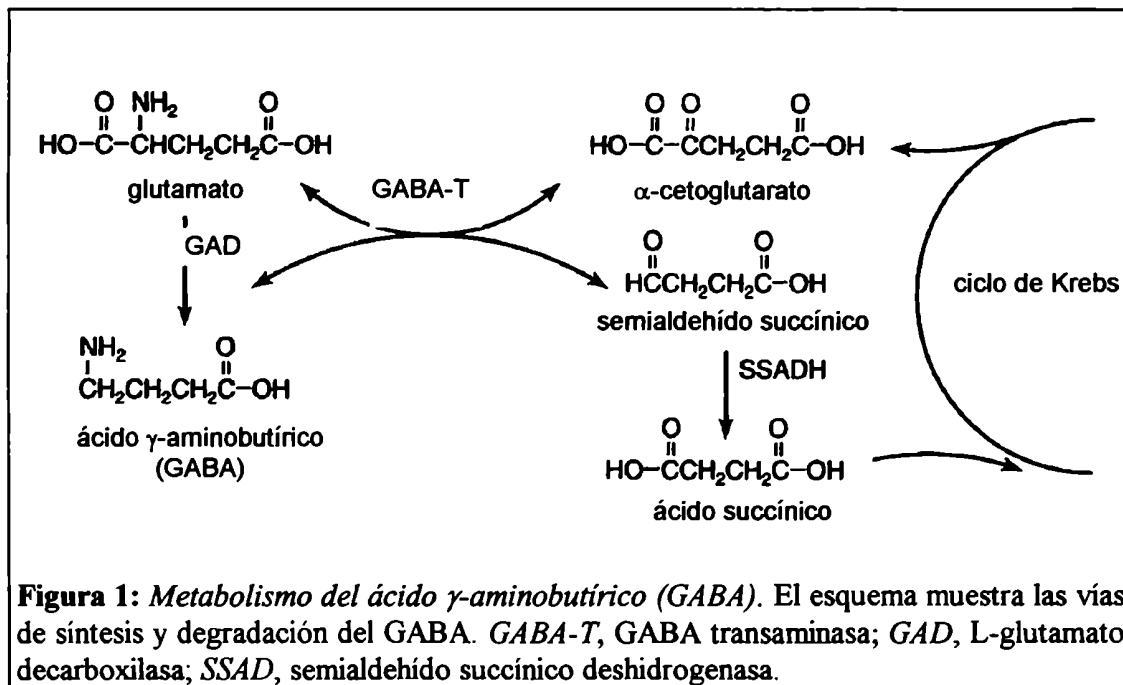
1. Metabolismo del Acido γ -aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) se sintetiza *in vivo* por medio de una vía metabólica auxiliar del GABA, conocida como *GABA shunt*. La glucosa es la fuente principal para la producción de GABA *in vivo* en el adulto, aunque el piruvato y otros aminoácidos pueden actuar como precursores *in vitro*, mientras que durante el desarrollo neuronal temprano el precursor es la ornitina (Seiler 1980). En los adultos, el primer paso del ciclo es la transaminación del α -cetoglutarato, formado a partir del ciclo de Krebs por la enzima GABA- α -cetoglutarato transaminasa o GABA transaminasa (GABA-T), a ácido L-glutámico. La L-glutamato decarboxilasa (GAD) cataliza la descarboxilación del ácido glutámico a GABA. La GAD, de la cual existen dos isoformas, GAD₆₅ y GAD₆₇ (Schousboe y Redburn, 1995) parece sólo expresarse en las células que usan GABA como neurotransmisor y sirve como marcador de neuronas GABAérgicas.

El GABA es metabolizado por la GABA-T para formar semialdehído succínico; esta transaminación sólo ocurre cuando el componente inicial, el α -cetoglutarato, está presente para aceptar el grupo amino removido del GABA, volviendo a formar el ácido L-glutámico. Por lo tanto, una molécula de GABA puede ser metabolizada si una molécula del precursor es formada. El semialdehído succínico es oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) a ácido succínico, el cual puede entrar nuevamente en el ciclo de Krebs.

La liberación del GABA al espacio sináptico está inducida por la despolarización de la presinapsis, difundiendo en este espacio hasta sus receptores blanco en la postsinapsis. La acción de este neurotransmisor finaliza por un mecanismo de recaptación presináptico a nivel de los terminales nerviosos y células gliales vecinas. Los transportadores del GABA, GAT1 a GAT4 (Guastella y col., 1990; Liu y col., 1993) son dependientes de la temperatura y los iones. Los mismos tienen un requerimiento absoluto

de Na^+ extracelular y una dependencia adicional de Cl^- (Iversen y Kelly, 1975; Majbeesh y col., 1992). En la glía el GABA es metabolizado a semialdehído succínico por la GABA-T pero no puede ser re-sintetizado ya que la glía carece de GAD y entra al ciclo de Krebs (McGeer y McGeer, 1989).



2. Tipos de receptores GABAérgicos

El GABA liberado de la presinapsis, puede activar tres clases diferentes de receptores, GABA_A, GABA_B y GABA_C, los cuales difieren en sus propiedades farmacológicas y mecanismos de transducción de señales. El receptor GABA_A pertenece a la familia de los receptores asociados a canales iónicos y por lo tanto es un receptor de tipo ionotrópico (J. Borman, 1988; Silviotti y Nistri, 1991). Este receptor media el aumento de la conductancia al ion Cl⁻ de la membrana postsináptica, lo que suele estar acompañado de una hiperpolarización de la misma, que resulta en un alejamiento del potencial de membrana del umbral de gatillado y como consecuencia en una reducción de la probabilidad de generación de un potencial de acción (DeLorey y Olsen, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que el GABA produce una despolarización sobre las neuronas CA3 del hipocampo de ratas neonatas entre los días 0 a 7 postnatal, lo que resulta de un gradiente de Cl⁻ modificado debido a una inversión de las bombas para este anión (Cherubini y col, 1991).

Los receptores GABA_B regulan la actividad de canales de Ca²⁺, reduciendo la conductancia de este catión y produciendo una disminución de la liberación de neurotransmisores de la presinapsis (Holtz y col., 1996) y aumentan la conductancia de canales de K⁺ (Inoue y col., 1995), llevando a una hiperpolarización lenta de la neurona postsináptica (Bowery, 1993). Además, se demostró que modulan a la adenilato ciclasa (AC) mediante una proteína de unión a GTP, Proteína G, (Wojcik y Neff, 1984; Karbon y Enna, 1985; Hill, 1985). Por lo tanto, estos receptores pertenecen al tipo de los mediados por segundos mensajeros y son por ende metabotrópicos (Strange 2000). Mientras que los receptores GABA_A son predominantemente postsinápticos, a los GABA_B se los encuentra en la pre y la postsinapsis y son menos abundantes en su distribución en el sistema nervioso central (SNC) (Wilkin y col., 1981; Bowery y col., 1987).

El tercer tipo de receptor, el GABA_C, difiere de los anteriores en su farmacología pero al igual que el GABA_A es del tipo ionotrópico y está asociado a una canal permeable al ion Cl⁻ (Borman y Fingspan, 1995). Debido a esto y a sus características

moleculares se lo ha propuesto clasificar como un subtipo especial de receptor GABA_A como se discutirá más adelante (Barnard y col., 1998).

Además del mecanismo transductor de la señal los receptores GABA difieren en su farmacología. A continuación se encuentra una tabla con los principales agonistas, antagonistas competitivos y antagonistas no-competitivos que bloquean el canal de Cl⁻.

Tabla I: Farmacología de los diferentes receptores GABA

	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Agonistas	-GABA -muscimol -isoguvacina ^(Mehta y Ticku, 1999) -4,5,6,7-tetrahidroixozazol (5,4-c)-piperidine-3-ol (THIP) -ácido 3-aminopropán sulfónico (APS) -ácido imidazol-4-acético -ácido β-hidroxi-γ-amino-n-butírico ^(DeLorey y Olsen, 1994) -piperidina-4-sulfonato ^(Macdonald y Olsen, 1994)	-GABA -ácido β-(4-clorofenol)-γ-aminobutírico ((-)baclofen) -ácido (±)-4-amino-3-(5-cloro-2-tietil)butanoico -ácido 3-aminopropil-(metil)fosfínico (SKF 97541) ^(Seabrook y col., 1990)	-GABA -ácido <i>cis</i> -4-aminocrotónico (CACA) -ácido <i>trans</i> -4-aminocrotónico (TACA) ^(Bormann y Feigenspan, 1995) -ácido imidazol-4-acético -ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridín-4-il)metilfosfínico (TPMPA) ^(Ragozzino y col., 1996)
Antagonistas competitivos	-(+)bicuculina -gabazina (SR 95531) -(1)-β-hidrastina ^(Wermuth y Biziere, 1986)	-faclofen -saclofen -2-hidroxi-saclofen ^(Wermuth y Biziere, 1986) -APS -ácido 4-amino-3-(5-metoxi-benzo[β]furán-2-il)butírico -CGP 35348, 36742 y 54625 ^(Bowery, 1993)	-Isoguvacina -THIP -APS -ácido Z-3-amidinoiopropenoico -SR 95531 ^(Bormann y Feigenspan, 1995)
Antagonistas no competitivos que bloquean el canal	-picrotoxina -dihidropicrotoxina -petilentetrazol (PTZ) - <i>t</i> -butilbiclofosforotionato (TBPS) -penicilina ^(DeLorey y Olsen, 1994)	-no corresponde	-picrotoxina -dihidropicrotoxina -TBPS -γ-hexaclorociclohexano ^(Bormann y Feigenspan, 1995)

3. El complejo receptor GABA_A:

3.1. Estructura molecular

El receptor GABA_A pertenece a la superfamilia de los canales iónicos operados por ligando, la cual comprende además a los receptores nicotínico de acetilcolina (nAChR), glicina y serotonina (5-HT₃) (Schofield y col., 1987; Betz, 1990; Maricq y col., 1991). Los receptores de esta superfamilia están formados a partir de la combinación de cinco subunidades (Unwin, 1993), cada péptido atraviesa la membrana plasmática cuatro veces (Unwin, 1989). El segundo segmento transmembrana (TM2) de la subunidad se dispone alrededor del poro central del canal proveyendo el ambiente de hidrofiliidad necesario para la selectividad y el pasaje de los iones (Unwin, 1989). Los dominios transmembrana tienen una estructura secundaria de hélice- α , aunque más recientemente algunos hallazgos han demostrado que puede ser también de tipo lámina- β (Unwin, 1989, 1993). Dado que existen múltiples variantes de cada subunidad de los receptores de esta superfamilia y considerando que cinco subunidades se ensamblan para formar un complejo funcional, esto genera la posibilidad de obtener un variado número de receptores a partir de un limitado número de proteínas. Respecto de esto, el complejo receptor GABA_A es uno de los que presenta el mayor número de subunidades.

Las subunidades de este complejo receptor han sido agrupadas, según su homología de secuencia, en clases e isoformas dentro de cada clase. La homología dentro de cada clase es de ~ 70%, mientras que entre las clases es de ~ 30% (Mehta y Tick, 1999). Las clases e isoformas del receptor GABA_A son: α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, δ , ϵ , π , θ y ρ 1- ρ 3 (Burt y Kamatchi, 1991; Cutting y col., 1992; Cutting y col., 1991; De Blas 1996; Hedblom y Kirkness, 1997; Luddens y col., 1995; Macdonald y Olsen, 1994; Ogurusu y Shingai, 1996; Olsen y Tobin, 1990; Shimada y col., 1992; Zhang y col., 1995). A los receptores derivados de varias formas de subunidades ρ se los clasificó tradicionalmente como GABA_C ya que eran insensibles tanto a la bicuculina como al baclofen (Ogurusu y Shingai, 1996; Shimada y col., 1992). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que los receptores que contienen esta subunidad sean clasificados como

una clase especializada de receptores GABA_A (Barnard y col., 1998), ya que las subunidades ρ de acuerdo a su estructura forman parte de la familia de subunidades de los receptores GABA_A a pesar de sus sitios regulatorios diferentes (Ogurusu y Shingai, 1996; Shimada y col., 1992). Se han identificado dos subunidades adicionales ($\beta 4$, $\gamma 4$) en el cerebro de pollos (Bateson y col., 1991, Harvey y col., 1993). Además, existen evidencias de que algunas subunidades sufren procesamiento alternativo. La subunidad $\gamma 2$ se expresa en dos formas, $\gamma 2S$ (forma corta) y $\gamma 2L$ (forma larga). La forma $\gamma 2L$ contiene ocho aminoácidos más entre los dominios TM3 y TM4 lo que le confiere un sitio de fosforilación potencial (Kofuji y col., 1991; Whiting y col., 1990). También se han reportado dos variantes de procesamiento de la subunidad $\alpha 6$ (Korpi y col., 1994), de los genes de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ de pollo (Bateson y col., 1991; Harvey y col., 1994) y del gen humano $\beta 3$ (Kirkness y Fraser, 1993).

Cada uno de estos genes codifica un polipéptido de aproximadamente 50 kDa, con un dominio amino-terminal extracelular con sitios de glicosilación potenciales, cuatro dominios transmembrana (TM1 a TM4) característicos de la familia y un dominio hidrofílico citoplasmático intracelular, altamente variable entre TM3 y TM4 involucrado en la regulación del receptor por mecanismos tales como fosforilación.

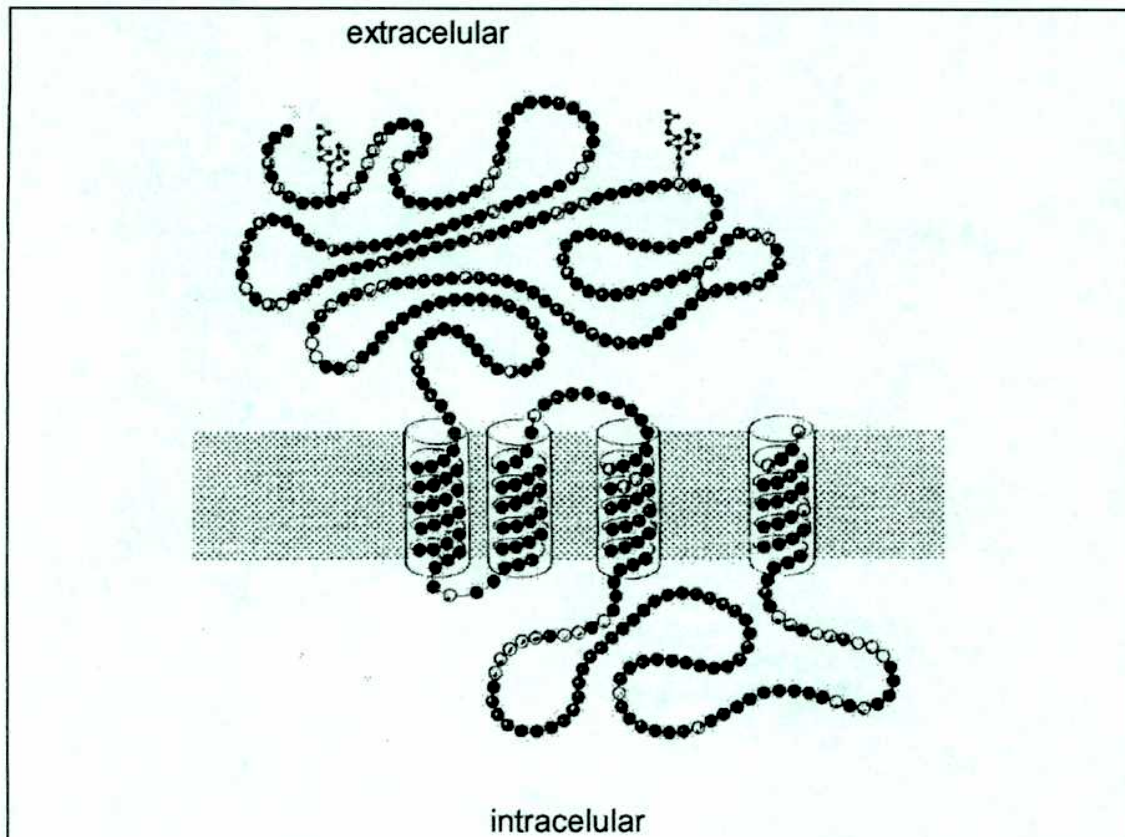


Figura 2: Estructura topológica del polipéptido de una subunidad genérica del receptor $GABA_A$. El dominio amino-terminal se postula que se ubica hacia el lado extracelular con sitios de glicosilación potenciales en asparragina indicados por los polímeros unidos a los aminoácidos en posiciones 10 y 110. El puente disulfuro se encuentra entre las cisteínas de las posiciones 138-152. Los cuatro dominios transmembrana (TM) se muestran como hélices α cilíndricas dentro de la membrana plasmática y el carboxilo-terminal al final del cuarto dominio transmembrana hacia el lado extracelular. Entre el TM3 y 4 existe un lazo intracelular (Macdonald y Olsen, 1994).

A continuación se detalla una tabla con algunas características de las clases e isoformas más conocidas.

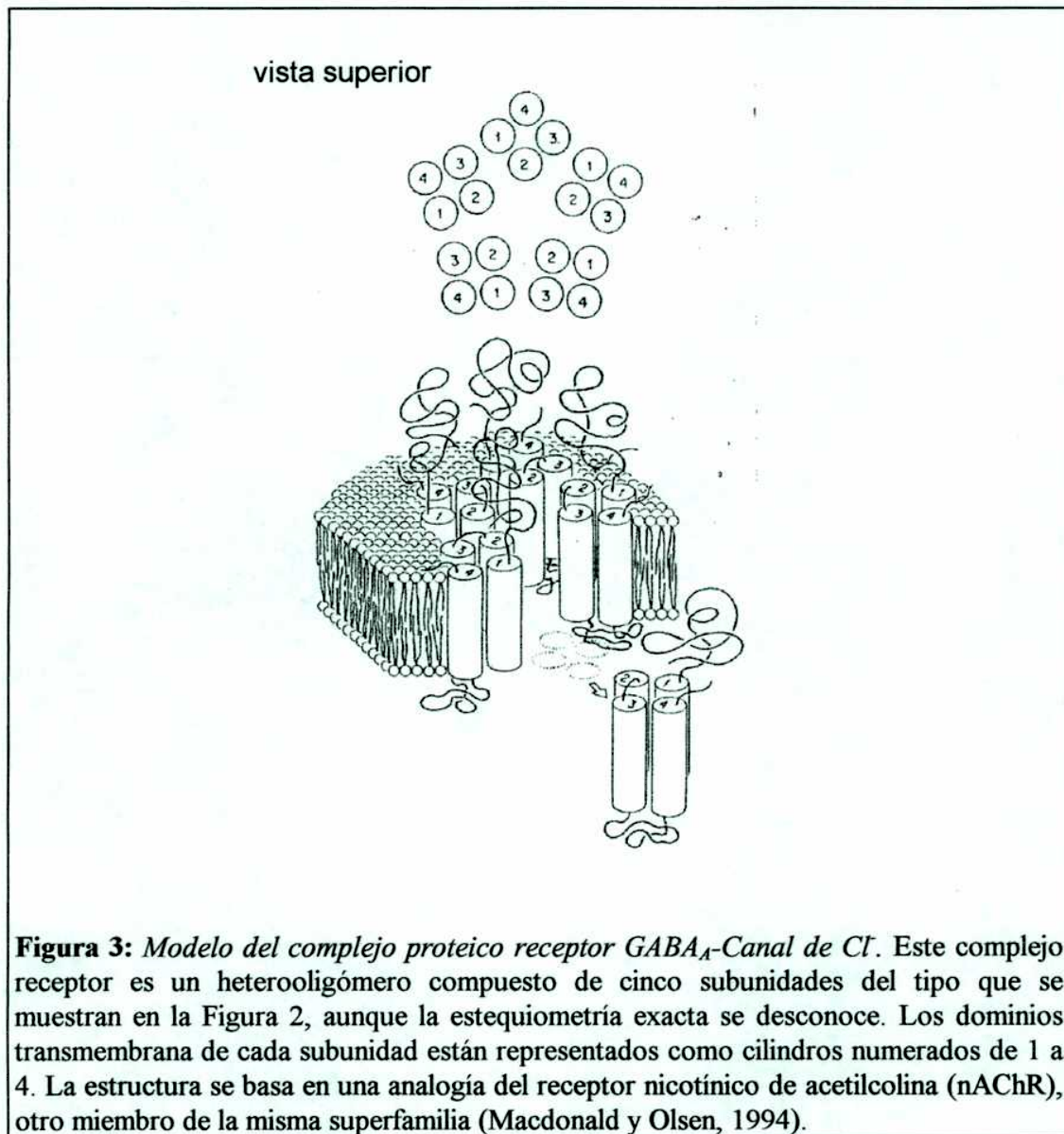
Tabla II: Subunidades del receptor GABA_A

-Subunidad	α	β	γ	δ	ρ
-Número de isoformas	6	4	4	1	3
-Número de variantes de procesamiento	1 (α6)	2 (β2, β4)	1 (γ2)	0	0
-Rango de peso en kDa según: -secuencia de aminoácidos -electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	48-64 α1 50-51 α2 52-53 α3 58-61 α4 66-67 α5 53-55 α6 75-58	51 β1 57 β2 54-57 β3 58 β4 ?	48 γ1 45-51 γ2 45-49 γ3 43-46 γ4 ?	48 54	52 ρ1 ? ρ2 ? ρ3 ?
-% de homología aminoacídica intrafamiliar	70-80	70-80	70-80	no corresp.	70-80
-% de homología aminoacídica interfamiliar	30-40	30-40	30-40	30-40	30-40
-Sitios consenso de fosforilación	α4, α6: PKA, PKC	β1-β4: PKA, PKC CamKII	γ1, γ3: PTK γ2S/L: PTK, PKC PKA, CamKII	?	ρ1, ρ2: PKC

PKA, Proteína Kinasa A; PKC, Proteína Kinasa C; CamKII, Proteína Kinasa dependiente de Ca²⁺-Calmodulina de tipo II; PTK, Proteína Tirosina Kinasa; ?, no conocido. Adaptada de Macdonald y Olsen, 1994; Mehta y Ticku, 1999.

El complejo receptor GABA_A es una pentámero formado a partir de la combinación de varias subunidades. La elucidación de la estequiometría de los receptores GABA_A nativos es de gran importancia ya que teóricamente podría existir una gran cantidad de diferentes tipos de receptores derivados de distintos arreglos de subunidades. Hay reportes que indican que las subunidades α1, β2/3 y γ2 coexisten en muchos de los receptores nativos (Benke y col, 1994; Khan y col., 1993; Stephenson y col., 1990). Aún más, se sabe que dos isoformas diferentes de α (Khan y col., 1994; Mehta y Ticku,

1999), β (Li y De Blas, 1997) o γ (Khan y col., 1994) pueden colocalizar en el mismo receptor. Sin embargo, la configuración pentamérica más frecuente incluye dos α , dos γ y una subunidad β , $2\alpha_x\beta_x2\gamma_x$ (Backus y col., 1993) o dos α , dos β y una γ , $2\alpha_x2\beta_x\gamma_x$ (Chang y col., 1996). Recientemente se ha sugerido que un total de cuatro subunidades α y β alternadas, conectadas por una γ sería la conformación del receptor $GABA_A$ pentamérico (Tretter y col., 1997). Sin embargo, la estequiometría de los receptores $GABA_A$ es probable que varíe entre las diferentes regiones del cerebro.



Aunque se requiere la colocación de las subunidades α , β y γ para formar un receptor GABA_A totalmente funcional y la mayoría de los receptores nativos contienen estas subunidades, la colocación de estos tres tipos de subunidades no es un requerimiento absoluto para la formación de un receptor GABA_A. Se sabe que ratones que carecen de la subunidad $\gamma 2$ son capaces de expresar receptores funcionales en número normal a partir de las restantes subunidades aunque sin sitio de unión de benzodiazepinas (Gunther y col., 1995). Por el contrario, cuando los genes de las subunidades $\alpha 5$ (Fritschy y col., 1997), $\alpha 6$ (Homanics y col., 1997a; Jones y col., 1997) o $\beta 3$ (Homanics y col., 1997b) son inactivados, algunos de los receptores GABA_A del cerebro se pierden, sugiriendo que las subunidades α y β , pero no la γ , son componentes esenciales para el ensamblado y el destino de los receptores en la membrana.

Durante los últimos años se ha estudiado la localización de varios de los sitios de unión en el receptor. Estos estudios indicaron que los sitios de unión de alta afinidad para el GABA/muscimol están localizados en la interfase de las subunidades α y β (Pregenzer y col., 1993). La subunidad β ha sido identificada como un requerimiento esencial para la unión del *t*-butilbiciclofosforotionato (TBPS) (Zezula y col., 1996).

El sitio receptor benzodiazepínico estaría localizado en la interfase de las subunidades α y γ (Wong y col., 1992; Zezula y col., 1996). Por lo tanto, los receptores GABA_A que contienen dos isoformas de subunidades α tanto como γ tendrían dos sitios de unión benzodiazepínicos en la misma molécula receptora (Khan y col., 1996).

Como puede deducirse la posibilidad teórica de formar distintos receptores GABA_A es increíblemente grande con este repertorio de subunidades. Además, se ha comprobado que la expresión de las diferentes subunidades le confieren al receptor GABA_A diferentes características farmacológicas, afectando su funcionamiento y modulación. Esto crea la necesidad de caracterizar la farmacología del receptor GABA_A en distintas condiciones ya que esta puede diferir significativamente. La discusión acerca de la expresión diferencial de las subunidades y su efecto sobre la farmacología del receptor no se hará en esta sección de la Tesis sino que se hará en relación a los resultados presentados, pero para una revisión puede consultarse Macdonald y Olsen (1994) y Siegel y col. (1990).

3.2. Farmacología del receptor GABA_A

El complejo receptor GABA_A es activado por GABA y análogos estructurales del GABA, como muscimol, isoguvacina (Mehta y Ticku, 1999), 4,5,6,7-tetrahidroixozazol (5,4-c)-piperidine-3-ol (THIP), ácido 3-aminopropán sulfónico (APS), ácido imidazol-4-acético, ácido β-hidroxi-γ-amino-n-butírico (DeLorey y Olsen, 1994) y piperidina-4-sulfonato (Macdonald y Olsen, 1994). El GABA se une al receptor para regular la apertura y cierre del canal de Cl⁻, siendo las curvas concentración-efecto sigmoideas con un número de Hill de aproximadamente dos, sugiriendo que al menos dos moléculas de GABA se deben unir para activar totalmente el canal del receptor nativo (Sakmann y col., 1983). Las acciones del GABA son antagonizadas competitivamente por diversos compuestos como ser: (+)bicuculina, gabazina (SR 95531) y (+)-β-hidrastina (Wermuth y Biziere, 1986).

Además del sitio de unión de GABA, este complejo supramolecular posee sitios de unión para benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides, convulsivantes, aniones y cationes (Schumacher y McEwen, 1989; DeLorey y Olsen, 1994; Macdonald y Olsen, 1994). Los sitios para benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides serán discutidos en particular en las secciones siguientes.

Al sitio de los convulsivantes se une la picrotoxina y la dihidropicrotoxina que reducen el tiempo medio de apertura del canal de Cl⁻. Los convulsivantes petilentetrazol (PTZ) y *t*-butilbiclofosforotionato (TBPS) también se unen al mismo sitio y reducen el T_{1/2} de apertura del canal de Cl⁻. El antibiótico penicilina es capaz de bloquear el canal con una carga neta negativa que parece interactuar con los residuos positivamente cargados de los aminoácidos del poro del canal ocluyendo entonces el pasaje de los iones Cl⁻ (DeLorey y Olsen, 1994).

3.3. Interacciones alostéricas de los sitios del receptor GABA_A

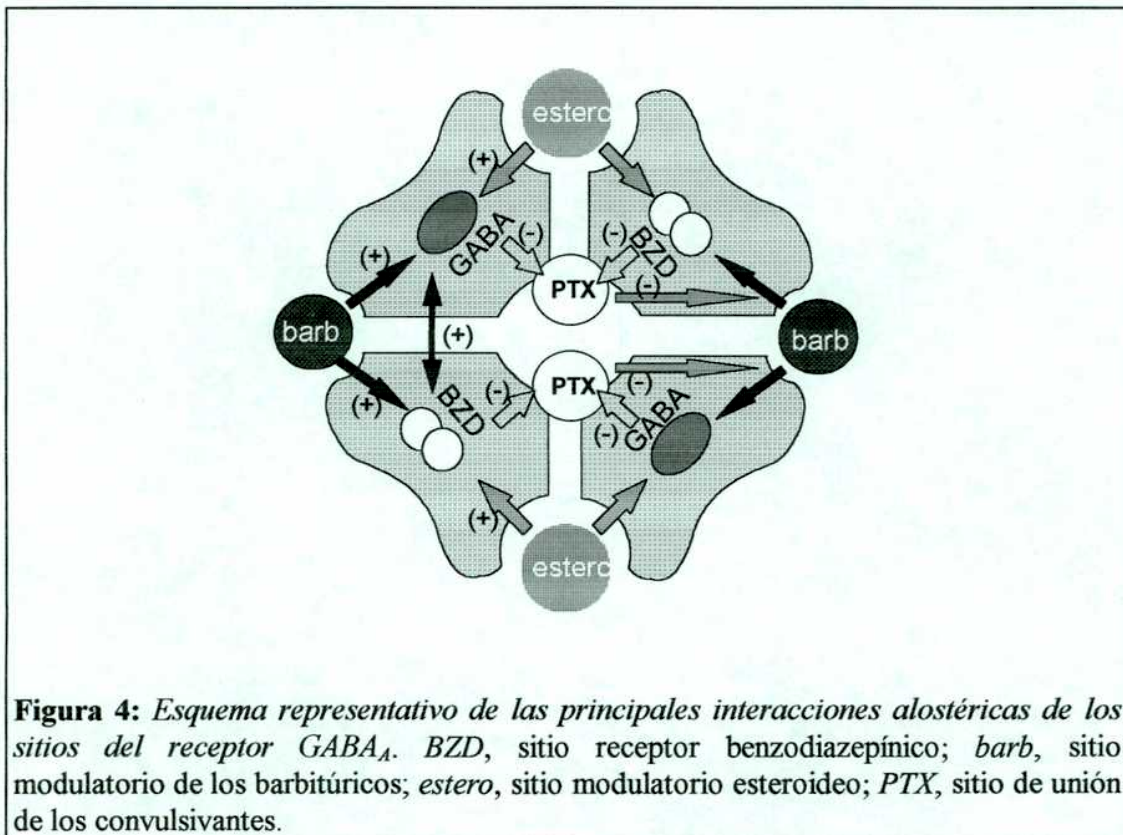
Los diferentes sitios de reconocimiento de drogas y el canal de Cl⁻ del receptor GABA_A interactúan en forma alostérica entre sí. La unión del diazepam al sitio benzodiazepínico es facilitada por el GABA y el muscimol, siendo estos aumentos antagonizados por la (+)bicuculina. Recíprocamente, las benzodiazepinas aumentan la unión del GABA a sus sitios de reconocimiento. Los estudios cinéticos muestran que el diazepam aumenta la afinidad de los sitios de unión de GABA de baja afinidad sin alterar la capacidad de unión (Schumacher y McEwen, 1989). Estas interacciones entre los sitios de GABA y benzodiazepinas son dependientes de los iones Cl⁻ (Costa y col., 1979).

El sitio de unión de barbitúricos interactúa con los sitios de GABA, benzodiazepinas y convulsivantes. En presencia de iones Cl⁻, los barbitúricos producen un aumento en la densidad receptora de los sitios GABAérgicos de baja y alta afinidad (Olsen y Snowan, 1992). También inhiben la unión de los antagonistas del receptor GABA como la (+)bicuculina (Wog y col., 1984) y aumentan la afinidad de las benzodiazepinas sin afectar el número de sus sitios de unión (Leeb-Lundberg y col., 1980; Majewska y col., 1986). Por el contrario, la unión de las β-carbolinas (agonistas inversos del sitio receptor benzodiazepínico) se ve reducida por los barbitúricos (Wong y col., 1984).

La picrotoxina bloquea el efecto de los barbitúricos sobre el GABA (Willow y Johnston, 1980; Olsen y Snowan, 1982) y las benzodiazepinas (Leeb-Lundeberg y col., 1981a). La observación de que la picrotoxina bloquea los aumentos de la unión de benzodiazepinas producidos por los barbitúricos pero no los producidos por el GABA (Leeb-Lundeberg y col., 1981a), demuestra que los sitios de reconocimiento de la picrotoxina y el GABA son diferentes. La picrotoxina y el TBPS no solo inhiben el incremento de la unión del GABA y las benzodiazepinas provocado por los barbitúricos, sino que la unión de estos convulsivantes al sitio de la picrotoxina es, recíprocamente, inhibida por las benzodiazepinas, el GABA y los barbitúricos (Squires y col., 1983).

En resumen, la unión de los agonistas benzodiazepínicos y los barbitúricos a sus respectivos sitios de reconocimiento aumenta la unión del GABA y potencia su rol

fisiológico. Por el contrario, la unión de los convulsivantes como ser picrotoxina y TBPS, es inhibida por los barbitúricos y las benzodiazepinas pero aumentada por los agonistas inversos benzodiazepínicos. Estos convulsivantes, a su vez, bloquean los efectos de los barbitúricos sobre el sitio del GABA y el canal de Cl⁻. Las interacciones entre el GABA y las benzodiazepinas son recíprocas: El GABA aumenta la afinidad de la unión de los agonistas benzodiazepínicos y estos aumentan la afinidad de los sitios de GABA de baja afinidad.



4. El sitio receptor Benzodiazepínico

Las benzodiazepinas constituyen una clase de drogas que contienen el núcleo benzo-1,4-diazepina y excepcionalmente benzo-1,5-diazepina o tieno-1,4-diazepina y comparten un mecanismo de acción común. La primera benzodiazepina, el clordiazepóxido, fue introducida en 1960 y a partir de allí estos compuestos se han hecho muy populares. Las mismas han sido utilizadas en el tratamiento de varias formas agudas y crónicas de ansiedad, sedación, depresión, epilepsia, esquizofrenia, insomnio, desórdenes psicomotrices y como mio-relajantes a nivel central (Haefely, 1988a).

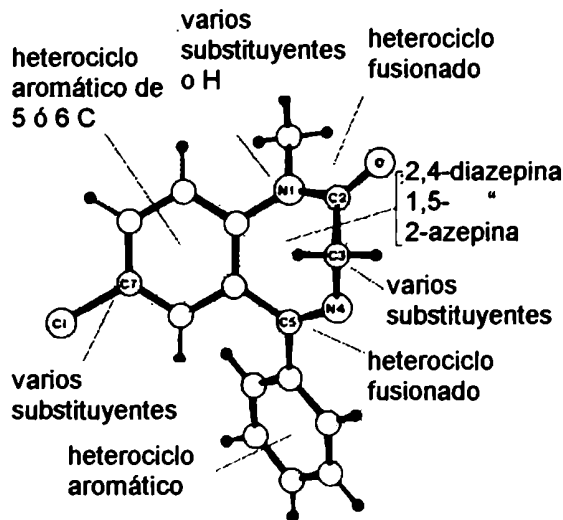


Figura 5: Estructura de una benzo-1,4-diazepina.

Usando benzodiazepinas radiomarcadas, se encontraron sitios de unión de alta afinidad en neuronas centrales y en células gliales del SNC y en órganos periféricos (Squires y Braestrup, 1977; Möhler y Okada, 1977). Las benzodiazepinas se unen a las neuronas del SNC con afinidades altas y similiares, mientras que en las células gliales estas afinidades fueron muy variadas para las diferentes benzodiazepinas y más importante, no demostraron que las mismas se correlacionaran con las potencias relativas para la actividad central de estos compuestos (Haefely y col., 1985). La función de estos sitios en células gliales y tejidos periféricos no fue del todo aclarada y por lo tanto se los llamó sitios de unión benzodiazepínicos periféricos y se supone que no estarían

relacionados con las funciones clásicas de las benzodiazepinas (Villiger, 1985; Anholt y col., 1986). Por el contrario, los sitios de unión centrales o neuronales son verdaderos receptores y se los llamó entonces *receptores benzodiazepínicos*. El sitio receptor benzodiazepínico es parte integral de casi todos los receptores GABA_A (Costa y Guidotti, 1979) y es el que media los efectos facilitatorios de la neurotransmisión GABAérgica producidos por esta clase de drogas (Haefely, 1990). Por ende, éste es en realidad un sitio modulador alostérico de los receptores GABA_A.

Las benzodiazepinas ejercen su acción aumentando la frecuencia de apertura del canal, sin variación en los tiempos de apertura (Study y Barker, 1981; Rogers y col., 1994), siendo este efecto potenciador siempre dependiente de la presencia de GABA (Macdonald y Berker, 1978).

Una característica única de este receptor es la posibilidad de mediar dos efectos moduladores opuestos, uno facilitatorio, mediado por los agonistas, y otro depresor, producido por los agonistas inversos, de las funciones del canal de Cl⁻ del receptor GABA_A.

En realidad existe un espectro completo de ligandos del receptor benzodiazepínico que va desde compuestos con una eficacia intrínseca positiva máxima (agonistas totales del receptor benzodiazepínico), todo tipo de eficacias positivas parciales (agonistas parciales), sin eficacia intrínseca (antagonistas), varios grados de eficacias intrínsecas negativas parciales (agonistas inversos parciales) a compuestos con eficacias negativas totales o máximas (agonistas inversos totales) (Haefely, 1989a).

Entre los agonistas totales de este receptor con acciones ansiolíticas, anticonvulsivantes, sedantes y mio-relajantes encontramos al midazolán, el diazepam, el flunitrazepam y otras benzodiazepinas. Entre los agonistas parciales está el clordiazepóxido, el clonazepam, el furazepam, el Ro 16-6028 y el CL 218872, una triazolopiridazina. El antagonista por excelencia es una imidazobenzodiazepina, el flumazenil, antiguo Ro 15-1788. Entre los agonistas inversos se encuentran además de las benzodiazepinas otros compuestos, las β -carbolinas. De este modo, como agonistas inversos parciales tenemos al Ro 15-4513 y a la β -carbolina-3-carboxilato (β -CCM) y

como totales al Ro 19-4603 y al dimetil- β -carbolina-3-carboxilato (DMCM) (Haefely, 1988a).

5. Barbitúricos

Los barbitúricos anestésicos y anticonvulsivantes poseen sitios de acción específicos sobre el receptor GABA_A (Asano y Osagawara, 1981; Leeb-Lundberg y col, 1981b; Olsen 1981; Johnston y Willow, 1982), modulando positivamente la unión del GABA y las benzodiazepinas a sus sitios receptores y aumentando así la conductancia al ion Cl⁻ (Leeb-Lundber y col., 1980, Allan y Harris, 1986). Estos compuestos actúan fundamentalmente aumentando el tiempo que el canal de Cl⁻ permanece abierto sin afectar la frecuencia de apertura (Study y Barker, 1981).

Se ha demostrado que la acción de la mayoría de los barbitúricos es bifásica, teniendo diferentes efectos a medias y altas concentraciones (Willow y Johnston, 1981; Schwatz y col., 1986).

A pesar de ser moduladores positivos de la acción del GABA, se sabe que en altas concentraciones estos compuestos son capaces de producir la apertura del canal de Cl⁻ en forma independiente del GABA, debido a una acción directa sobre el mismo (Robertson, 1989; Rho y col., 1996).

6. Neuroesteroides

Más de cincuenta años atrás, Hans Seyle describió efectos sedantes rápidos de ciertos esteroides sobre el SNC que no eran compatibles con cambios en la síntesis proteica (Seyle, 1941). También se demostró que esteroides clásicos como la progesterona (4-pregnen-3,20-dione) y la desoxicorticosterona (4-pregnen-21-ol-3,20-diona) producen sedación (Gyernsek y Soyka, 1975). Luego se encontró que los metabolitos de la progesterona, la alopregnanolona (5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona), y de la

desoxicorticosterona, la alotetrahidrodesoxicorticosterona (5α -pregnan- $3\alpha,21$ -diol-20-ona), eran capaces de aumentar la unión del muscimol a los sitios de unión de GABA y del flunitrazepam a los sitios de unión de benzodiazepinas, así como la conductancia al ion Cl^- mediada por el GABA en forma similar a los barbitúricos pero a través de un sitio de acción diferente (Majewska y col., 1968; Harrison y col., 1987; Turner y col., 1989).

La modulación ejercida por estos compuestos, los neuroesteroides, está dada por un aumento de la afinidad de los sitios receptores GABA y benzodiazepínicos por sus agonistas (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987). También reducen la unión del antagonista GABAérgico bicuculina y el convulsivante TBPS (Gee y col., 1987, 1988) y aumentan la captación de Cl^- en preparaciones de sinaptoneurosomas (Morrow y Col., 1989). El aumento de conductancia producido se debe a un incremento en el tiempo de apertura del canal (Callachan y col., 1987), mientras que a concentraciones mayores, los neuroesteroides también aumentan la frecuencia de apertura (Harrison y col., 1987). A concentraciones muy altas, al igual que los barbitúricos, éstos pueden producir una apertura del canal de Cl^- en forma independiente de la presencia de GABA (Hill-Venning y col., 1984).

Existen también neuroesteroides que modulan negativamente al receptor $GABA_A$, entre ellos los más importantes son la pregnenolona (5-pregnen- 3β -ol-20-ona) sulfato y la dehidroepiandrosterona (5-androsten- 3β -ol-17-ona) sulfato (DHEA-sulfato) (Majewska y col., 1990, Akwa y col., 1991), disminuyendo la unión específica de los agonistas GABAérgicos y produciendo una inhibición de la neurotransmisión (Majewska y col., 1990, Demirogen y col., 1991, San Martín y col., 1996).

Los estudios de estructura-actividad llevados a cabo en mamíferos han permitido definir los requerimientos estructurales para la neuroactividad de estos compuestos sobre el receptor $GABA_A$. Todos los esteroides neuroactivos presentan un esqueleto pregnano reducido, siendo los 5α -reducidos mucho más potentes que los 5β . Un grupo ceto en el C-20 es más favorable que un hidroxilo o un etilendioxido y una hidroxilación en el C-3 en orientación α es esencial para la neuroactividad, resultando los isómeros 3β -hidroxilados muy poco potentes y eficaces (Gee y col., 1988; Harrison y col., 1987) tanto en estudios de unión de radioligando (Prince y Simmonds, 1992) como

electrofisiológicos (Hill-Venning y col., 1984). Otras sustituciones en C-3 también reducen drásticamente la potencia como ser los 3 α -hidroxiésteres o los 3-ceto. El rango de potencias de los esteroides 5 α -reducidos sustituidos en C-17 es 17 β -acetilos > 17 β -ciano > 17-metoxicarbonil > 17-ona. Por último, la hidroxilación en C-11 α ó 12 α , también reduce la actividad (Hawkinson y col., 1994a).

Por otro lado se ha tratado de investigar la naturaleza de este sitio moduladorio a través de estudios *in vitro* con neuroesteroides, lo que no ha resultado del todo concluyente. Así, en experimentos de unión de [³H]muscimol, la alopregnanolona y la alfaxalona (5 α -pregnan-3 α -ol-11,20-dione) presentaron curvas de aumento bifásicas con componentes de alta (nanomolar) y baja (micromolar) afinidad. En presencia de pregnanolona (5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona), también se obtuvieron curvas de estimulación de la unión de [³H]flunitrazepam bifásicas, mientras que con alopregnanolona, sólo se observó un solo sitio moduladorio (Hawkinson y col., 1994). Como se describió, los isómeros 3 β -hidroxilados de la progesterona son inactivos en los estudios de unión de radioligando (Prince y Simmonds, 1992) y electrofisiológicos (Hill-Venning y col., 1984); sin embargo, altas concentraciones de un metabolito 5 β -reducido, 3 β -hidroxilado de la progesterona, la epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona), han sido utilizadas para antagonizar el efecto estimuladorio de la unión de [³H]flunitrazepam inducido por los esteroides neuroactivos alopregnanolona y alfaxalona y estudiar así la posible heterogeneidad de este sitio moduladorio (Prince y Simmonds, 1993).

6.1. Biosíntesis de Neuroesteroides

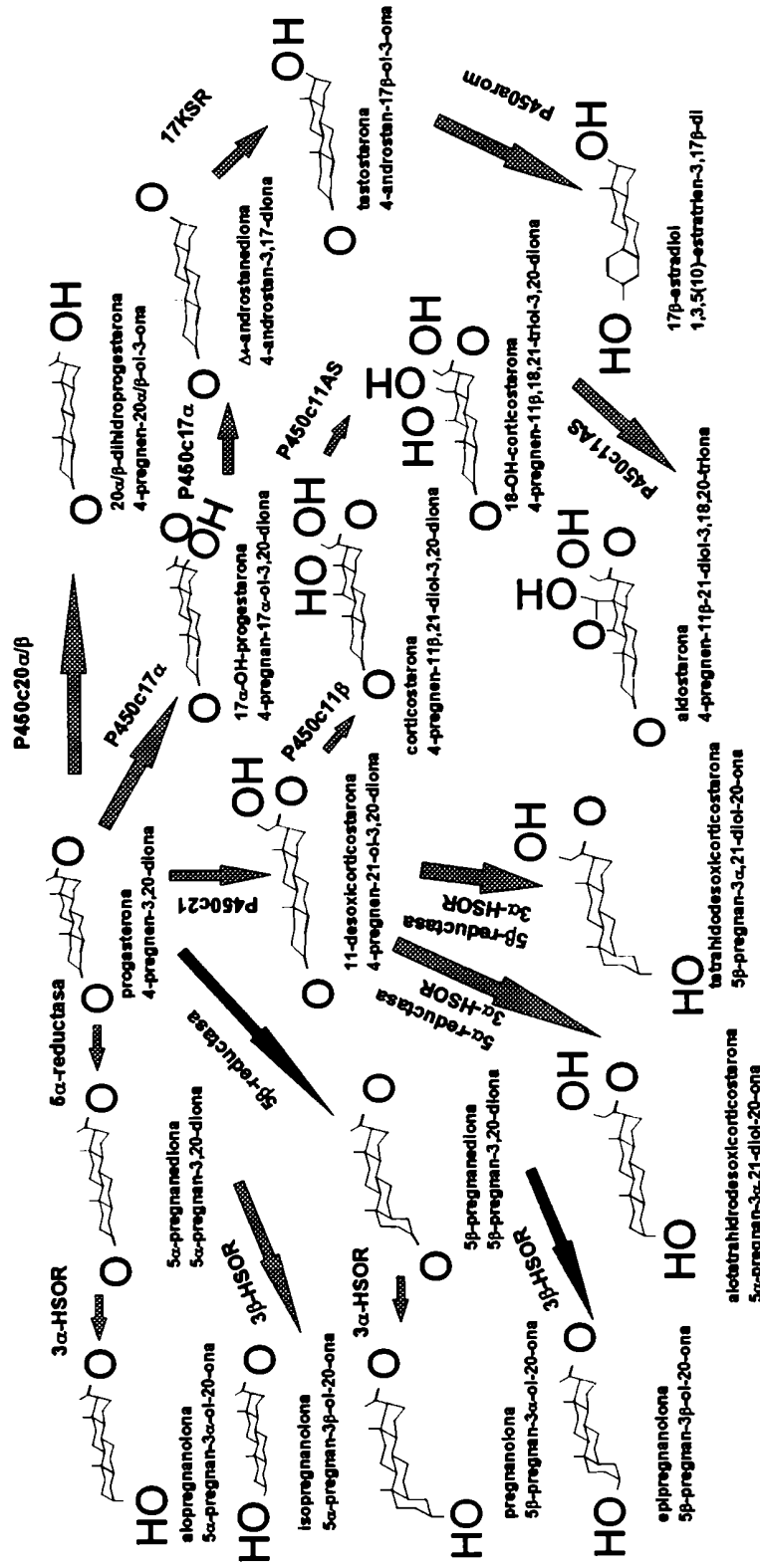
A partir de estos resultados, se llevaron a cabo numerosas investigaciones acerca de la síntesis de estos metabolitos en el SNC, demostrándose que el cerebro de los mamíferos puede sintetizar algunos esteroides a partir de colesterol independientemente del aporte de glándulas esteroideogénicas periféricas, denominándose a estos compuestos *neuroesteroides* (Le Goascogne y col., 1987). El término no debe incluir a los

andrógenos ni a los estrógenos ya que estos desaparecen luego de una gonadectomía y adrenalectomía y porque la enzima que convierte pregnenolona a DHEA y progesterona a androstenediona, el citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17-20-liasa (P450_{C17 α}), no parece expresarse en el SNC (Mellon, 1994). Sin embargo, a pesar de aún no haberse dilucidado la síntesis de DHEA en los mamíferos, sus concentraciones en dicho sistema superan a las concentraciones plasmáticas sugiriendo que debe haber una fuente endógena de dicho esteroide (Akwa y col., 1991). Los glucocorticoides probablemente no sean neuroesteroides debido a que sus niveles cerebrales se hacen indetectables luego de la remoción de las glándulas endócrinas (Mellon y Deschepper, 1993). Además, los esteroides pueden ser clasificados en dos grupos: *neuroactivos* y *neuroinactivos*. El término *esteroides neuroactivos* se refiere a los esteroides que son activos en tejidos nerviosos y que pueden ser sintetizados en el cerebro o por tejidos endócrinos clásicos. Se define como *esteroides neuroinactivos* a aquellos compuestos que son sintetizados en el cerebro pero que son inactivos en tejidos nerviosos (Mellon, 1994).

Los estudios preliminares de las vías metabólicas de los neuroesteroides demostraron la conversión de colesterol a pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-one) en células gliales; sin embargo, la enzima que lleva cabo este proceso, el citocromo P450_{SCC} (side-chain cleavage), ha sido hallada en células gliales y neuronas de embriones y ratas adultas (Papadopoulos y col., 1992; Kabbadj y col., 1993; Compagnone y col., 1995; Sanne y Krueger, 1995). Un estudio más reciente reveló la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol por células ganglionares de la retina de rata (Guarneri y col., 1994). También se ha observado que los homogenatos de cerebro de rata así como los cultivos de células gliales y neuronas pueden metabolizar la pregnenolona a progesterona (Robel y col., 1987; Jung-Testas y col., 1989; Kabbadj y col., 1993). Aun más, la enzima responsable de esta conversión, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 -isomerasa fue localizada en ambos tipos celulares (Guennoun y col., 1995; Sanne y col., 1995). La habilidad de las neuronas y células gliales para sintetizar esteroides independientemente del aporte de las glándulas esteroideogénicas periféricas, sugiere que el cerebro puede autónomamente controlar la producción de esteroides, los cuales actuarían localmente en respuesta a ciertos estados fisiológicos, como podría ser el *stress* (Purdy y col., 1991).

En el cerebro de las aves se demostró la presencia de pregnenolona independientemente de las glándulas endócrinas periféricas, así como su síntesis a partir de colesterol (Tsutsui y Yamzaki, 1995). Además, una proteína de tipo P450 scc fue localizada en el soma y las dendritas de células de Purkinje y en células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Usui y col., 1995). A diferencia de las ratas, la producción de progesterona a partir de pregnenolona, no ha sido aún demostrada en las aves (Nakamura y Tanabe, 1974), sin embargo, las enzimas que metabolizan a la progesterona para sintetizar esteroides neuroactivos, la 5α y 5β -reductasa/hidrogenasa y la 3α y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/oxidoreductasa fueron halladas en cerebro de pollos adultos (Nakamura y Tanabe, 1974; Schlinger y Callard, 1987; Mellon, 1994).

Figura 6: Esquema de las rutas metabólicas de síntesis de neuroesteroides, mineralocorticoides y esteroides sexuales derivados de la progesterona



Las enzimas son: 3α-HSOR, 3α-hidroxiesteroide oxidoreductasa/deshidrogenasa; 3β-HSOR, 3β-hidroxiesteroide oxidoreductasa/deshidrogenasa; P450c21, 21-hidroxiilasa; P450c11β, 11β-hidroxiilasa, P450c20α/β, 20α/β-hidroxiilasa; P450c17α, 17α-hidroxiilasa-17-20-desmolasa/C₁₇₋₂₀ liasa; P450c11AS, aldosterona sintasa; 17KSR, 17-cetoesteroide reductasa; P450arom, aromatasa

6.2. Significado de las interacciones Neuroesteroides-receptor GABA_A

En test comportamentales, los neuroesteroides demostraron ser, como era esperable, ansiolíticos (Wieland y col., 1991), inclusive se ha demostrado que el efecto ansiolítico de la progesterona es debido a su metabolito neuroactivo, la alopregnanolona (Bitran y col., 1991). Además, los neuroesteroides derivados de la progesterona poseen propiedades sedantes, hipnóticas y anticonvulsivantes que se correlacionan con sus eficacias sobre la neurotransmisión GABAérgica en el SNC (Belleli y col., 1989; Kokate y col., 1994; Wieland y col., 1995; Crawley y col., 1986; Holzbauer, 1976).

Se ha demostrado un rol preponderante de los mismos en situaciones de *stress*, como se demuestra por el rápido aumento de alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona en el cerebro de ratas sometidas al test de natación forzada (Purdy y col., 1991).

También se han probado estos compuestos para el tratamiento de convulsiones. Así, se ha sintetizado un derivado de la alopregnanolona, la ganaxolona (5 α -pregnan-3 α -ol-3 β -metil-20-ona), con mejor disponibilidad oral, el cual es un agente potente y eficaz para tratar convulsiones parciales y generalizadas, y convulsiones producidas por intoxicación con cocaína (Carter y col., 1997). Se ha reportado que este compuesto es más efectivo que el valproato, la etosuximida, el clonazepam, el diazepam y el fenobarbital para prevenir las convulsiones inducidas por el PTZ y los efectos comportamentales del PTZ incluyendo sus efectos depresores locomotor y exploratorio en ratones, sugiriendo que la ganaxolona puede proveer beneficios adicionales en el tratamiento de la epilepsia controlando la ansiedad, los cambios de estado de ánimo y otras alteraciones previas a las convulsiones (Beekman y col., 1998).

Además, estos compuestos están relacionados con la adquisición de memoria, demostrándose que la infusión de pregnenolona sulfato en el núcleo magnocelular basal aumenta la memoria de las ratas mientras que la alopregnanolona ejerce el efecto contrario. La pregnenolona, pregnenolona sulfato, DHEA y DHEA sulfato inyectadas en los ventrículos cerebrales de ratones también facilitan la memoria, por mecanismos que no se han elucidado totalmente. Es interesante especular que la pérdida de la memoria

asociada con muchas enfermedades y procesos normales de desarrollo incluida la vejez, pueden ser el resultado de una neurosteroidogénesis alterada (Flood y col, 1992; Mellon, 1994).

Finalmente, los neuroesteroides están involucrados en muchos otros procesos como ser modulación de comportamientos agresivos, supervivencia y diferenciación de neuronas, desarrollo, envejecimiento y regeneración del SN periférico (Schumacher y col., 1996).

6.3. Efectos Genómicos de los Neuroesteroides

Todos los efectos descritos hasta ahora son evocados por la unión de los neuroesteroides a un componente de la membrana plasmática. Sin embargo estos compuestos pueden unirse a receptores intracelulares, los cuales son factores de transcripción dependientes de ligando y modular la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, la alopregnanolona y la alotetrahidrodesoxicorticosterona pueden activar el receptor intracelular de progesterona presente en el cerebro a concentraciones nanomolares. Por lo tanto estos dos esteroides actúan de ambas formas, no-genómica, vía el receptor GABA_A y a nivel genómico vía el receptor intracelular de progesterona (Rupprecht y col., 1993, 1996). Hay evidencias preliminares indicando que la progesterona puede regular la expresión de varias subunidades del receptor GABA_A en varias regiones del cerebro, uniéndose a sus receptores intracelulares (Petersen y col., 1993).

En cuanto a esto, se ha demostrado que el tratamiento crónico de neuronas con neuroesteroides disminuye los niveles de ARNm de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\beta 3$, aunque en este caso parece que este efecto no parece estar mediado por el receptor intracelular de progesterona (Yu y col., 1996). Además, los tratamientos crónicos resultaron en una disminución del acoplamiento alostérico entre los sitios de GABA, benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides (Friedman y col., 1993, 1996; Yu y Ticku, 1995a), además de reducir la eficacia del GABA, de los ligandos benzodiazepínicos y de los neuroesteroides (Yu y Ticku, 1995b).

7. La vía visual de las aves

En todos los vertebrados, el *mesencéfalo* o *cerebro medio* realiza el nexo e integra los componentes sensoriales y motores del rombencéfalo con los del procencéfalo. Este comprende tres grandes regiones, el *tectum*, el *tegmento* y el *istmo*. Una característica importante es la presencia de áreas dentro del tectum o “techo”, que reciben proyecciones topográficamente organizadas de los sistemas auditivo, visual y somatosensorial las que forman mapas sensoriales tridimensionales del animal. Una segunda característica es la presencia del núcleo ístmico a través del cual pasan tractos de fibras ascendentes y descendentes (Butler y Hodos, 1996).

El tectum contiene estructuras laminadas, particularmente el *tectum óptico* y el *torus semicularis*. El *tectum óptico*, es la porción externa del *lóbulo óptico*, que comprende además del tectum, al *pretegmentum*, al complejo espiriforme, al mismo núcleo ístmico y a la formación mesencefálica reticular (Hunt y Brecha, 1984). El lóbulo óptico es llamado así debido a que recibe la mayor parte de las aferencias del tracto óptico que es la continuación central del nervio óptico formado por los axones de las células ganglionares de la retina. En los mamíferos esta estructura es llamada *colículo superior* (Butler y Hodos, 1996).

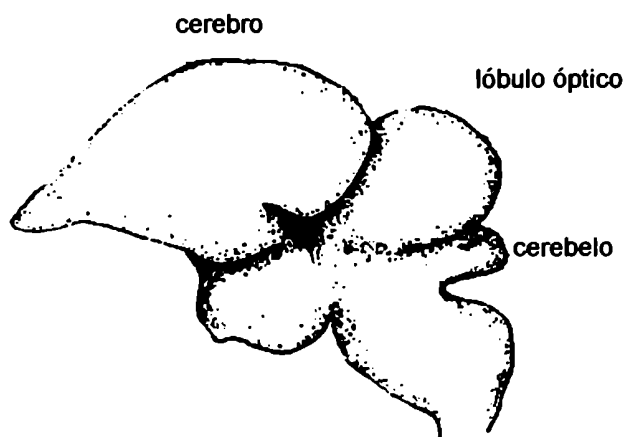


Figura 7: Esquema de las estructuras encefálicas de las aves.

7.1. Morfología del tectum óptico

El tectum óptico presenta una serie de capas celulares y plexiformes que varían en su color, luego de la tinción de Nissl, y extensión dentro de las diferentes regiones. Existen dos clasificaciones de las láminas, el sistema numérico de Ramón y Cajal (1911) y el más aceptado actualmente, el propuesto por Cowan y col. (1961). Este sistema divide al tectum óptico en seis capas principales que desde la periferia hacia el ventrículo son (entre paréntesis se indica el sistema numérico de Ramón y Cajal):

I. **Estrato óptico (1)**: el más superficial de todos formado principalmente por los axones de las células ganglionares de la retina.

II. **Estrato gris y fibroso superficial**: es una capa heterogénea con diez subláminas celulares y plexiformes identificables, designadas con las letras “a” - “j” (2-12).

Lámina a (2): es una banda muy estrecha de células de forma estrellada sin orientación definida de unos 10-15 μm de ancho.

Lámina b (3): está prácticamente libre de células y consiste en los procesos dendríticos de las capas superficiales y más profundas y fibras de la retina que pasan a través de ella.

Lámina c (4): esta es una capa celular prominente con neuronas agrupadas con dos tipos celulares principales. Células pequeñas con dendritas que ascienden a la lámina b y axones que descienden a láminas más profundas y células de tamaño medio con dendritas horizontales o descendentes que van a las láminas e y f.

Lámina d (5): contiene fibras del estrato óptico y la lámina c, además de dendritas apicales de las células piriformes.

Lámina e (6): es una capa de una o dos células de espesor cuyas células piriformes están agrupadas con sus dendritas ascendiendo hasta la lámina c y sus axones descendiendo a capas más profundas.

Lámina f (7): además de las dendritas de las láminas vecinas esta capa contiene principalmente los axones de las fibras de la retina que se bifurcan a este nivel y siguen horizontalmente en esta lámina.

Lámina g (8): es la capa más profunda a la que llegan fibras de la retina, además, contiene células con dendritas ascendentes y axones descendentes así como células estrelladas con dendritas ramificadas.

Lámina h (9): es una capa celular grande con neuronas piramidales o fusiformes y células multipolares grandes con dendritas profusamente ramificadas.

Lámina i (10): es la lámina celular más grande del lóbulo óptico de unos 300 μm de espesor con dos tipos de neuronas; unas de tamaño mediano orientadas horizontalmente y otras fusiformes.

Lámina j (12): las células que contiene son parecidas a las de la lámina i, además de células estrelladas y tiene un aspecto radial estriado.

III. Estrato gris central (13): consistente mayormente en una población homogénea de neuronas multipolares grandes.

IV. Estrato blanco central (14): compuesto primariamente por axones tectales eferentes, sistemas aferentes y una población dispersa de neuronas multipolares grandes.

V. Estrato gris periventricular (15): una capa celular que se ubica mayormente en la región dorsal y está compuesta principalmente por células estrelladas.

VI. Estrato fibroso periventricular: son axones tectales eferentes que rodean al epitelio del ventrículo. Por último está el *epitelio endimario* que rodea al ventrículo (Cowan y col., 1961).

El estudio histológico del lóbulo óptico con la técnica de Golgi reveló una población de neuronas tectales con sus dendritas radialmente (centrífugamente) orientadas a las que se llamó *células piriformes*. Estas dendritas se extienden a través de la mayoría de las láminas tectales. Cada población de axones entrantes tiende a quedar confinado a una sublámina del lóbulo óptico, permitiendo esta disposición física que la información aferente se segregue en las espinas dendríticas de neuronas individuales. El limitado grado de arborización de las dendritas de las neuronas piriformes radialmente

orientadas también permite un patrón de terminación punto a punto preciso de la información aferente.

Estas características morfológicas proveen un alto grado de precisión en el mapeo espacial del lóbulo óptico, además de permitir que los diferentes sistemas sensoriales estén en registro. La información sensorial en el lóbulo óptico está en orden topográfico.

Las aferencias tectales se derivan de una amplia variedad de núcleos dentro del telencéfalo y el diencefalo. La mayoría de estos núcleos están localizados ipsilateralmente al lóbulo óptico. En general las aferencias pueden ser divididas en dos grandes tipos, visuales y no-visuales. Las visuales incluyen principalmente a la retina y otros núcleos íntimamente relacionados con la vía visual. Las no-visuales se originan de grupos celulares más heterogéneos. Las aferencias más estudiadas son las provenientes de la retina y se sabe que provienen del ojo contralateral y que contactan elementos dendríticos radiales en el estrato gris y fibroso superficial, subláminas "a-f" (Hunt y Brecha, 1984),

Las proyecciones eferentes del lóbulo óptico pueden ser divididas en tres grandes grupos. Las ascendentes que terminan en el tálamo y el *pretectum*, las descendentes están organizadas de tal forma que las respuestas motoras a los estímulos sensoriales resulten apropiadamente orientadas en el espacio y que van al tegmento en el mesencéfalo que está asociado con funciones motoras, a la formación reticular y a la sección rostral de la médula. El lóbulo óptico inicia comandos motores que controlan secuencias de movimientos dirigidos a una ubicación precisa en el espacio. Estos impulsos llegan a la médula a través de las vías del tegmento y reticulares y en forma directa por medio de las vías tecto-espinales.

Por último, las otras eferencias del lóbulo óptico son las que se dirigen al núcleo ístmico (Butler y Hodos, 1996).

7.2. Desarrollo del lóbulo óptico

El desarrollo embrionario del lóbulo óptico puede dividirse en tres fases principales (La Vail y Cowan, 1971):

1era Fase (días 3 a 6 de incubación): En este período la proliferación celular es máxima y el lóbulo óptico está constituido por el epitelio neural original y por células que se diferencian temprana y externamente a esta capa.

2da Fase (días 6 a 12 de incubación): Hay una migración a partir del epitelio neural de gran número de las células diferenciadas. Cesa la proliferación celular y las seis capas principales y la mayoría de las subdivisiones se hacen identificables. Las fibras de la retina llegaron a todas las regiones correspondientes del lóbulo óptico. Hasta el día 12 embrionario, el lóbulo óptico es independiente de las influencias tróficas del ojo, a partir del día 12 o 14, la deaferentación unilateral produce un atrofia progresiva en esta estructura.

3era Fase (del día 12 al 18 de incubación): Crecen las células de todas las capas y se completa la diferenciación citoarquitectónica del lóbulo óptico. Entre los días 17 y 18 ocurre el período crítico para las conexiones provenientes de la retina y otras conexiones sinápticas. Los primeros registros en el lóbulo óptico en respuestas a estimulaciones de la retina se obtienen en el día 17 pero no son hasta el día 18 que estas pueden ser evocadas consistentemente y de mayor amplitud. No está claro si esta latencia en la respuesta es debida a un retardo en el desarrollo de la retina o si es una indicación precisa del momento en que se establecen los contactos funcionales entre las fibras de la retina y las células del lóbulo óptico. Lo que es importante notar es que sólo cuando el desarrollo citoarquitectónico del lóbulo óptico está completo se obtienen las respuestas funcionales definitivas.

A pesar de que esta división en fases propuesta por La Vail y Cowan termine arbitrariamente en el día embrionario 18, el crecimiento y la maduración de las células del lóbulo óptico continúa hasta los primeros días del período postnatal.

7.3. El sistema GABAérgico en el lóbulo óptico de pollo

Hunt and Künzle inyectaron [³H]GABA en el lóbulo óptico y caracterizaron tres poblaciones de neuronas de acuerdo a la captación inicial y transporte de este neurotransmisor. El primer sistema tiene sus somas neuronales en el estrato gris y fibroso superficial, sublámina i con sus axones atravesando el estrato óptico y terminando en el *pretectum* y el tálamo ventral. Las dendritas ascendentes y axones colaterales de estas neuronas arborizan en la sublámina f del estrato gris y fibroso superficial. La segunda población de neuronas que se marcó con [³H]GABA se localizó en la sublámina c, con dendritas dirigidas localmente y superficialmente y un axon dispuesto en forma radial y profunda del cual se origina un sistema importante de axones colaterales. Esta subpoblación fue tentativamente identificada como las neuronas estrelladas vistas en la tinción de Golgi. La tercer población de neuronas fue identificada dentro de la sublámina d, orientada en forma horizontal (Hunt y Künzle, 1976).

Además, estudios electrofisiológicos han demostrado la importancia del GABA como neurotransmisor inhibitorio en los circuitos locales del lóbulo óptico (Cuenod y Streit, 1980). Ensayos autoradiográficos realizados con [³H]muscimol y con [³H]flunitrazepam han revelado densidades de unión muy altas en el lóbulo óptico y probaron que la unión de [³H]flunitrazepam puede ser estimulada por el agregado *in vitro* de GABA, indicando la presencia de receptores de tipo GABA_A en esta estructura mesencefálica (Stewart y col., 1988; Dietl y col., 1988; Veenman y col., 1994).

Se ha descrito la presencia de receptores GABA_A en el lóbulo óptico de pollo a lo largo del desarrollo (Flores y col., 1986; Ríos y col., 1987), así como la enzima que lleva a cabo la síntesis del GABA, GAD (González y col., 1990), usando sus perfiles ontogenéticos como indicadores bioquímicos de maduración sináptica (Fischer de Plazas y col., 1986). Los sitios de GABA aumentan en número entre el día embrionario 12 y el 6 postnatal a partir del cual se produce un descenso y estabilización de los mismos para alcanzar los valores del adulto en el día 18 postnatal. Se ha comprobado la existencia de dos poblaciones de receptores GABAérgicos, de baja afinidad y alta afinidad por el GABA. Los sitios de baja afinidad se detectan como únicos entre los días 11 a 16

embrionarios mientras que los de alta afinidad aparecen partir del día 16-17 de incubación, coexistiendo a partir de ese estadio ambas poblaciones receptoras (Flores y col., 1986). La enzima GAD presenta su período de máxima actividad alrededor de los días 2-3 postnatales (González y col., 1990).

Los sitios receptores benzodiazepínicos siguen un perfil parecido al de los sitios GABAérgicos con un período de máxima expresión entre el nacimiento y los días postnatales inmediatos (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1991), y también presentan dos sitios diferentes de acuerdo a su afinidad por la triazolopiridazina, CL 218872. En el día embrionario 13, la mayoría de los sitios receptores benzodiazepínicos (98,23%) son del tipo II, es decir el de baja afinidad por la triazolopiridazina, mientras que el de tipo I sólo representa una mínima fracción que va aumentando con el desarrollo hasta alcanzar un 62,88% de los sitios benzodiazepínicos totales en el adulto a expensas de una reducción en los sitios de tipo II (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1995).

La presencia de los receptores GABA_A en el lóbulo óptico de pollo fue confirmada estudiando la expresión de los ARNm de los genes que codifican a las subunidades del receptor por medio de hibridación *in situ* con oligonucleótidos sintéticos, detectándose niveles bajos pero evidentes del ARNm de las subunidades $\gamma 2$ y $\gamma 4$ en embriones de 18 días de incubación (Glencorse y col., 1992; Harvey y col., 1993). En el día 1 postnatal se detectó una mayor expresión de la subunidad $\gamma 2$ en varias de las capas de lóbulo (subláminas g, i del estrato gris y fibroso superficial) mientras que en el caso de $\gamma 1$, ésta estuvo confinada a la sublámina i (Glencorse y col., 1993). En el mismo estadio se observó una gran abundancia de los dos tipos de mensajeros de la subunidad $\beta 2$, $\beta 2S$ y $\beta 2L$ (Harvey y Darlison, 1997)

Los estudios bioquímicos de estos dos sitios, GABAérgicos y benzodiazepínicos, revelaron cambios en respuesta a la estimulación luminosa ambiental y a patrones visuales, indicando que poseen un rol fisiológico en el lóbulo óptico (Ríos y col., 1987; Fiszer de Plazas y col., 1991; Gravielle y col., 1992). También pudieron ser comprobadas las interacciones alostéricas del complejo receptor GABA_A, revelando que los sitios de unión de GABA de baja afinidad son modulados positivamente por el agregado *in vitro* de diazepam (Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990) y pentobarbital sódico en

una forma inversamente relacionada con la edad (Fiszer de Plazas y col., 1995), sugiriendo que los receptores GABA_A presentes en el lóbulo óptico de pollo poseen las características clásicas que se han descrito para este tipo de receptor.

Estos datos bioquímicos de los sitios receptores GABAérgicos y benzodiazepínicos sugieren que sus propiedades bioquímicas varían a lo largo de la ontogenia del lóbulo óptico de pollo y en respuesta a factores ambientales, probando un rol funcional de los mismos en dicha estructura mesencefálica.

7.4. El lóbulo óptico como modelo de desarrollo

El lóbulo óptico es un modelo de desarrollo interesante ya que realiza la integración de diferentes sistemas sensoriales y presenta un patrón de conexiones sinápticas muy definido que le permiten captar la información sensorial y mantenerla en orden topográfico, para luego generar respuestas motoras orientadas en el espacio (Butler y Hodos, 1996).

Tiene una citoarquitectura bien definida, resultado de un desarrollo y migración celular muy precisos, que parece ser indispensable para las respuestas funcionales (La Vail y Cowan, 1971). Se conoce muy bien el desarrollo del lóbulo óptico lo que permite correlacionar cambios bioquímicos producidos durante la ontogenia con eventos determinados de la proliferación, migración y diferenciación celular.

Por último, es un tejido rico en sinapsis GABAérgicas involucradas en el funcionamiento de los circuitos neuronales locales, cuyos parámetros bioquímicos se ven alterados por cambios en los estímulos sensoriales. En particular, se ha demostrado que los receptores GABA_A, cuya ontogenia en el lóbulo óptico está bien determinada, son capaces de responder a los cambios ambientales (Ríos y col., 1987; Fiszer de Plazas y col., 1991; Gravielle y col., 1992), siendo dichas alteraciones representativas de fenómenos de plasticidad.

OBJETIVOS

En el presente trabajo de Tesis se estudiarán diversos aspectos de la acción de los neuroesteroides y su relación con el complejo receptor GABA_A durante la ontogenia del sistema nervioso central de las aves, los cuales han sido agrupados en cuatro grandes temas para mayor claridad:

1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA_A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO

El primer objetivo de la presente tesis fue estudiar los efectos moduladores *in vitro* que ejercen los esteroides anestésicos alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona sobre el receptor GABA_A durante el desarrollo pre y postnatal del lóbulo óptico de pollo, como así también el mecanismo de acción, a fin de corroborar si este efecto modulador, presente en el SNC de mamíferos, se puede observar también en el SNC de las aves.

2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA_A

Como se expuso en la Introducción, no existe suficiente información acerca del sitio de reconocimiento esteroideo presente en el receptor GABA_A, por lo tanto otro de los objetivos de esta Tesis fue determinar la complejidad del sitio de unión de estas sustancias en el complejo mediante experimentos de competición con un neuroesteroide inactivo, la epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona). También se comparó la modulación ejercida por los esteroides neuroactivos actuando separadamente o en conjunto, a fin de determinar la existencia de sitios de reconocimiento diferente para cada uno de ellos.

Además se investigó si parte de la modulación ejercida por los neuroesteroides a nivel del receptor GABA_A es mediada a través de alteraciones a nivel de membrana, ya que debido a su lipofilia, no se ha podido descartar que parte de estos efectos sean debidos a cambios en la composición local fosfolipídica de las membranas sinápticas. Para llevar a cabo este objetivo se obtuvieron preparaciones de receptores libres de membrana (solubilizados) y se determinó si la modulación esteroidea de estos receptores podía ser observada luego de la solubilización.

3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO

Se estudió la biosíntesis *in vitro* de neuroesteroides durante la ontogenia del SNC de la aves, con el fin de dilucidar las vías metabólicas presentes en dicho sistema así como identificar los principales esteroides producidos en las distintas etapas del desarrollo del lóbulo óptico de pollo, correlacionándolos con los resultados de estructura-actividad planeados.

4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO *IN OVO* CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A

Como se ha expuesto, es sabido que los neuroesteroides ejercen efectos en procesos de plasticidad de SNC (García-Segura y col., 1996) y en la maduración de células gliales y neuronas (Schumacher y col., 1996). A nivel del receptor GABA_A, se probó que estos compuestos afectan la farmacología al ser administrados crónicamente (Friedman y col., 1993, 1996; Yu y Ticku, 1995a, 1995b).

De este modo, esta línea experimental tendrá por objeto dilucidar el posible rol fisiológico de los neurosteroides en este sistema durante su ontogénesis, lo que se

llevará a cabo mediante experimentos de administración crónica *in ovo* y posteriores estudios a niveles morfológico y molecular.

Se espera que estos experimentos aclaren la naturaleza del mecanismo de acción de estos compuestos sobre el receptor GABA_A. Los estudios de relación estructura-actividad permitirán determinar si los requerimientos estructurales de los neuroesteroides para actuar como moduladores en el SNC de las aves son similares a los ya conocidos para mamíferos. Los resultados de dichos experimentos serán correlacionados con los obtenidos acerca de la esteroidogénesis en dicho sistema.

Por otro lado, los experimentos del sitio modulador esteroideo con preparaciones de receptores solubilizados aclararán si los efectos moduladores a nivel de receptores de membrana son debidos a alteraciones en ésta, a la unión con un sitio dentro de la molécula receptora o a ambas, lo que ayudará a comprender más profundamente su mecanismo de acción.

El estudio de la biosíntesis de neuroesteroides permitirá determinar las vías esteroidogénicas presentes a lo largo del desarrollo del SNC de las aves. Además, se podrá establecer una correlación entre la aparición de estas vías metabólicas con parámetros de maduración y desarrollo del SNC y se lo podrá comparar con las vías metabólicas presentes en mamíferos.

Por último, con los experimentos de administración crónica se tratará de determinar el rol fisiológico de los neuroesteroides producidos durante el desarrollo ontogenético del SNC a nivel de los sitios de unión y del funcionamiento del receptor GABA_A.

MATERIALES Y METODOS

1. MODULACION NEUROESTEROIDEA DEL RECEPTOR GABA_A

En esta primera sección de materiales y métodos se describe la metodología utilizada para llevar a cabo el **objetivo 1. Modulación del Receptor GABA_A por Neuroesteroides en el Sistema Nervioso Central de las Aves en Desarrollo** y el **objetivo 2. Estudio del Sitio de Reconocimiento Esteroideo presente en el Receptor GABA_A**, de la presente Tesis.

1.1. Drogas y reactivos químicos

El [metil-³H]flunitrazepam (80 Ci/mmol) fue provisto por DuPont New England Nuclear Research Bioproducts, EE. UU. de América. El flunitrazepam fue gentilmente donado por Laboratorios Roche de Argentina.

Los esteroides alopregnanolona (5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona), alotetrahidrodesoxicorticosterona (5 α -pregan-3 α ,21-diol-20-ona), alfaxalona (5 α -pregan-3 α -ol-11,20-diona) y epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona), el detergente 3-[(3-coloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS), la L- α -fosfatidilcolina (tipo II-S de poroto de soja), todos los inhibidores de proteasas, la γ -globulina bovina, el polietilenglicol 8000 y la seroalbúmina bovina, fueron adquiridos en Sigma Chemical Co., EE. UU. de América.

El resto de los reactivos utilizados fueron del mayor grado de pureza analítica disponible.

1.2. Animales

Se utilizaron huevos embrionados y pollos de la especie *Gallus gallus domesticus*, de la raza White Leghorn.

Se incubaron huevos fértiles a 37°C, con una humedad relativa ambiente del 60%.

Luego del nacimiento, los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente en condiciones normales de iluminación ambiental (12 horas luz/oscuridad; encendido de luces: 6:00 am) y provistos *ad libitum* de agua corriente y alimento balanceado para aves.

1.3. Preparación de membranas sinápticas

En diferentes estadios del desarrollo, embriones y pollos fueron sacrificados por decapitación y los lóbulos ópticos removidos y enfriados a 4°C.

La preparación de membranas fue llevada a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por De Robertis y col. (1962), adaptado según Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara (1990). Suficiente cantidad de lóbulos ópticos fue homogeneizada al 10% p/v en una solución de sacarosa 0,32 M, pH 7,4. El procedimiento fue realizado en frío (0-4°C) con un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de Teflon a una velocidad aproximada de 1.500 rpm durante un minuto. El homogenato se centrifugó durante 10 minutos a 900 g, se descartó el sedimento y el sobrenadante fue centrifugado a 12.000 g durante 20 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió al 10% p/v en agua bidestilada, pH 7,4 y se centrifugó nuevamente a 20.200 g por 30 minutos.

Este tercer sedimento (M_1) consiste en una fracción mitocondrial enriquecida en membranas sinápticas. Esta fracción M_1 fue sometida a diferentes procedimientos:

1) Exhaustivos lavados

Este procedimiento fue utilizado para la obtención de una fracción en la cual se estudió la unión de [³H]flunitrazepam a receptores asociados a membranas y consistió en someter a la fracción M₁ a 8 lavados mediante homogeneización en solución reguladora (buffer) Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y posterior centrifugación a 100.000 g durante 20 minutos. Se ha demostrado que este tratamiento sirve para remover gran parte del GABA endógeno presente en las membranas sinápticas (Fischer de Plazas y col., 1993).

2) Tratamiento con detergente

Este tratamiento se utilizó para obtener una fracción que fue usada para ensayar la unión de [³H]flunitrazepam a receptores solubilizados y fue llevado a cabo siguiendo un protocolo descrito por F. Anne Stephenson (1990).

La fracción M₁ fue sometida a 2 lavados mediante homogeneización en solución reguladora Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y posterior centrifugación a 100.000 g por 20 minutos.

La solubilización de receptores se realizó resuspendiendo el sedimento al 10% p/v en una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 conteniendo 150 mM de KCl, 24,4 mM (1,5% p/v) de 3-[(3-coloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS) y 0,3% p/v de L- α -fosfatidilcolina (tipo II-S de poroto de soja), y agitándolo a 4°C durante 30 minutos. Luego, la suspensión fue centrifugada a 105.000 g por 1 hora y el sobrenadante fue usado como fuente de receptores solubilizados.

Las soluciones de sacarosa 0,32 M, pH 7,4 y agua bidestilada, pH 7,4 utilizadas en la preparación de estos receptores contenían los siguientes inhibidores de proteasas: Inhibidor de tripsina aislado de poroto de soja 1% p/v, ácido etilén-diamino tetraacético (EDTA) 1 mM y fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0,34 mM. La solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contenía además de los inhibidores antes mencionados, azida sódica (Na₃N) 2,41 mM.

1.4. Ensayos de unión de radioligando

1.4.1. Ensayos de unión de [³H]flunitrazepam a receptores asociados a membranas

El sedimento final exhaustivamente lavado fue usado fresco para los ensayos de unión de [³H]flunitrazepam por medio de la técnica convencional de filtración según Braestrup y Squires, (1977). El tejido fue resuspendido en solución Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo 150 mM de KCl.

Alícuotas de esta fracción (0,3-0,4 mg de proteínas totales) de membranas fueron preincubadas durante 5 minutos a 37°C en presencia de los distintos moduladores. Luego de la preincubación se agregó 1 nM de [³H]flunitrazepam (unión total) y se incubó por 15 minutos más en las mismas condiciones. El volumen final de incubación fue de 1 ml. Luego de la incubación, las muestras fueron filtradas bajo vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de solución reguladora, se secaron y contaron en un contador de centelleo líquido con una solución centellante conteniendo 18 mM de 2,5-difemioxazol (PPO) y 0,27 mM de 2,2'-p-fenilén-bis(5-feniloxazol) (POPOP) en tolueno, con una eficiencia aproximada del 40-50%.

La unión inespecífica del ligando fue determinada incubando las muestras en presencia de 10 µM de flunitrazepam y representó aproximadamente un 10% de la unión total. La unión específica de [³H]flunitrazepam fue entonces calculada restando la cantidad de ligando unido en presencia de 10 µM de flunitrazepam (unión inespecífica) de la unión total.

1.4.2. Ensayos de unión de [³H]flunitrazepam a receptores solubilizados

El sobrenadante obtenido luego de tratar las membranas con el detergente CHAPS se usó como fuente de receptores solubilizados. El método de unión de [³H]flunitrazepam fue adaptado a partir de dos protocolos (Stephenson, 1990 ; Giusti y col., 1993).

Alicuotas de este sobrenadante (0,5 mg de proteínas totales) se preincubaron durante 5 minutos a 37°C en presencia de los distintos moduladores. Luego de la preincubación, se agregó 1 nM de [³H]flunitrazepam (unión total) y se incubó por 15 minutos más en las mismas condiciones. El volumen final de incubación fue de 0,5 ml. La solución reguladora usada fue Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 conteniendo los mismos inhibidores de proteasas antes indicados y KCl 150 mM.

La fracción unida se separó de la libre por precipitación con polietilenglicol. Luego de la incubación se agregó 0,5 ml de una solución de γ -globulina bovina 0,5% p/v en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y seguidamente 0,5 ml de una solución de polietilenglicol 8.000 al 30% p/v en solución reguladora de Tris-HCl 10 mM. Los tubos se agitaron vigorosamente e incubaron a 0°C por 10 minutos. Los precipitados fueron filtrados bajo vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) y lavados 2 veces con 5 ml de una solución de polietilenglicol 8000 al 7,5% p/v en solución reguladora. La radioactividad unida se midió como se describió anteriormente.

La unión inespecífica del ligando fue determinada incubando las muestras en presencia de 5 μ M de flunitrazepam y representó aproximadamente un 10% de la unión total.

1.4.3. Determinación de los parámetros constante de disociación aparente (K_d) y máxima capacidad de unión (B_{max}) de los sitios receptores benzodiazepínicos

Para la determinación de estos parámetros se realizaron ensayos de saturación de unión por competencia con [³H]flunitrazepam y concentraciones crecientes de flunitrazepam. El rango de concentraciones de flunitrazepam utilizado para la unión a receptores asociados a membranas tanto como a receptores solubilizados fue de 0,5 a 60 nM.

Las curvas de saturación resultantes fueron sometidas a análisis de regresión no-lineal según se describe en Rodbard y col. (1980).

La representación gráfica de los resultados se realizó mediante la transformación lineal de Scatchard (1949). La misma no se utilizó en la estimación de los parámetros cinéticos aparentes dado su mayor error (Rodbard y col., 1980) pero se aplicó para ilustrar gráficamente los resultados por ser más clara para su interpretación.

1.4.4. Modulación neuroesteroidea de la unión de [³H]flunitrazepam

La temperatura utilizada para estudiar ésta modulación sobre el sitio receptor benzodiazepínico fue elegida de acuerdo a la bibliografía y a observaciones de nuestro laboratorio donde se determinó que dicho efecto modulador era significativamente menor a temperaturas inferiores a los 37°C (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987; Gee y col., 1988; Hawkinson y col., 1994; McCauley y col., 1995).

La concentración de Cl⁻ (150-200 mM) presente en la solución reguladora utilizada para la incubación del ligando también fue elegida por ser la óptima para estudiar este efecto (Leeb-Lundberg y col., 1980; Skolnic y col., 1981; Skolnic y col., 1982; Giusti y col., 1983). Por último, las membranas sinápticas y preparaciones de receptores solubilizados se utilizaron sin congelar debido a que tanto algunos autores como nosotros no observamos esta modulación en muestras congeladas (Turner y col., 1989; Pignataro y col., 1996).

Para estudiar la modulación ejercida por los neuroesteroides sobre el sitio receptor benzodiazepínico, se realizaron curvas de concentración-efecto, con una concentración fija del ligando [³H]flunitrazepam y concentraciones variables de los moduladores.

Los esteroides utilizados se disolvieron en etanol absoluto; la concentración final de etanol fue de 1% v/v en todos los tubos, incluidos aquellos en los que no se agregó esteroides.

La representación gráfica de los resultados fue ajustada por análisis computarizado a fin de obtener los valores de CE₅₀ (concentración de droga que produce la mitad del efecto máximo) y E_{max} (efecto máximo de dicha droga). En todos los casos

se evaluó la presencia de uno o más sitios moduladores, para lo cual se aplicó un test de bondad de ajuste comparativo, que compara las sumas de cuadrados de ambas curvas y se consideró como mejor ajuste a dos sitios solamente cuando el test rindió un resultado significativo ($p < 0,05$).

1.5. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas totales en todas las fracciones utilizadas se determinó por el micrométodo de Lowry y col. (1951) usando seroalbúmina bovina como estándar.

1.6. Análisis estadístico de los resultados

Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron mediante pruebas paramétricas utilizándose test *t* de Student o Análisis de Varianza (ANOVA) de 1 ó 2 vías (indicado en los resultados) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, según correspondió. Estos análisis se hicieron con los programas GraphPad InStat, V2.05a (GraphPad Software Inc., EE. UU. de América) y SYSTAT for Windows, V2.01 (SYSTAT Inc, EE. UU. de América).

El ajuste de las curvas y cálculo de los parámetros CE_{50} , E_{max} , K_d y B_{max} , así como el test de F comparativo para la bondad de ajuste se realizaron con los programas GraphPad Prism V2.0 y GraphPad InPlot V4.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU. de América).

2. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO

2.1. Drogas y reactivos químicos

La [4-¹⁴C]progesterona (48,90 mCi/mmol) fue provista por DuPont New England Nuclear Research Bioproducts, EE. UU. de América.

El ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES) se adquirió en Sigma Chemical Co., EE. UU. de América. El medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle: Mezcla nutriente F-12 (DMEM:F12) fue de GIBCO-BRL, EE. UU. de América

Los solventes utilizados (ciclohexano, cloroformo, eter sulfúrico, piridina y anhídrido acético) fueron del mayor grado de pureza analítica disponible.

2.2. Metabolismo de la [¹⁴C]progesterona y análisis cromatográfico en capa delgada

En diferentes estadios del desarrollo, embriones y pollos fueron sacrificados por decapitación y los lóbulos ópticos removidos. Cincuenta miligramos de tejido fresco se trituraron con un par de tijeras quirúrgicas e incubaron con 0,22 µg de [¹⁴C]progesterona (aproximadamente 75.000 cpm/tubo) en 1 ml de medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle: Mezcla nutriente F-12 (DMEM:F12) adicionado con 15 mM de ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico] (HEPES).

Luego de 3 horas de incubación a 37°C, los esteroides fueron procesados según un protocolo de Colman Lerner y col. (1995). El tejido se procesó con un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de Teflon y extrajo con 5 volúmenes de eter sulfúrico. Las dos fases fueron separadas por centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos y la fase orgánica fue removida y evaporada a sequedad bajo un flujo de nitrógeno gaseoso. Los extractos se disolvieron en un pequeño volumen de eter

sulfúrico y se resolvieron por medio de cromatografía en capa delgada con una mezcla de ciclohexano, cloroformo y eter sulfúrico (2:2:1). Las placas de gel de sílice se expusieron a un film Kodak X-OMAT AR-5 por 4 días. Para visualizar a los esteroides comerciales radioinertes usados como estándares, las placas de gel se rociaron con una mezcla de etanol, ácido sulfúrico y vainillina y luego se calentaron en estufa hasta la aparición de las respectivas manchas.

Los metabolitos de la progesterona fueron indentificados siguiendo diferentes criterios (Colman Lerner y col., 1995): Su movilidad respecto de los esteroides comerciales usados como estándares corridos en paralelo en la misma cromatografía; segundo, considerando el esteroide radioactivo agregado y las rutas metabólicas conocidas, los posibles productos fueron restringidos a la actividad de algunas pocas enzimas; finalmente, la desaparición de los metabolitos radioactivos cuando las incubaciones fueron llevadas a cabo con un exceso de un sustrato radioinerte competidor. Estos criterios permitieron una identificación casi definitiva de la mayor parte de los metabolitos detectados. De todos modos, para confirmar la identidad de algunos de los metabolitos de interés, estos fueron derivatizados por acetilación como se describe a continuación.

2.3. Acetilación de los metabolitos de [¹⁴C]progesterona

Los metabolitos radioactivos de la progesterona que resultaron de interés fueron localizados en las placas de gel de sílice, extraídos con eter sulfúrico y tanto los extractos como los esteroides comerciales usados como estándares fueron evaporados a sequedad bajo un flujo de nitrógeno gaseoso. La acetilación se llevó a cabo como la describieron De Vries y De Jong (1980); 0,5 ml de anhídrido acético y 0,1 ml de piridina se incubaron a 60°C por 1 hora con los metabolitos radioactivos a identificar junto con su estándar radioinerte correspondiente. La solución se evaporó bajo nitrógeno y los esteroides disueltos en eter sulfúrico se resolvieron y visualizaron como se describió anteriormente.

2.4. Medición del contenido de progesterona y testosterona en el lóbulo óptico

Los esteroides fueron medidos en un extracto etéreo obtenido de lóbulos ópticos como se describe en el punto 2.2. de esta sección. Una vez evaporada la fase orgánica, el extracto fue resuspendido en solución reguladora de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4.

Los esteroides fueron medidos en el Laboratorio de Endocrinología del Dto. de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Los niveles de progesterona fueron medidos por medio de un inmunoensayo enzimático competitivo quimioluminiscente utilizando partículas paramagnéticas como medio de separación de la fase sólida (Progesterone Access®, Pasteur Sanofi Diagnostics, Francia). La sensibilidad teórica (0,08 ng/ml) del método fue calculada por el fabricante como la media menos dos desvíos estándar de 10 mediciones del calibrador de 0 ng/ml de progesterona. La sensibilidad funcional fue asumida como el valor del calibrador de menor concentración utilizado, el cual fue de 0,1 ng/ml. El coeficiente de variación intraensayo fue de 6,18% y el interensayo 6,22%.

La testosterona se midió por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA) competitivo con [¹²⁵I]testosterona utilizando tubos recubiertos como medio de separación de la fase sólida (DSL-4000 ACTIVE®, EE.UU. de América). La sensibilidad teórica fue 0,08 ng/ml y se asumió también como sensibilidad funcional al valor de patrón de menor concentración utilizado (0,1 ng/ml). Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 8,5% y 8,7%, respectivamente.

Los valores fueron luego corregido según el porcentaje de recuperación de la progesterona y la testosterona calculado procesando el tejido con cantidades conocidas de [¹⁴C]progesterona y [³H]testosterona.

3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO *IN OVO* CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A

3.1. Drogas y reactivos químicos

El ácido 4-amino-[2,3³H(N)]-butírico ([³H]GABA) (90 Ci/mmol), el ³⁶Cl⁻ (13.37 mCi/g) y el Solvable, fórmula NEF 910 fueron provistos por DuPont New England Nuclear Research Bioproducts, EE. UU. de América.

El pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co., EE. UU. de América) fue amablemente cedido por la Dra. Edda Adler de Grashinsky, Directora del Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El diazepam fue donado por Laboratorios Roche, Argentina. El GABA, alopregnanolona, epipregnanolona y la picrotoxina se adquirieron en Sigma Chemical Co., EE. UU. de América. El centellante Ultima Gold XR fue provisto por Packard Instruments (Groningen, Holanda).

El anticuerpo monoclonal anti ácido γ -aminobutírico fue de CHEMICON International Inc. (EE. UU. de América). El anticuerpo secundario, anti ratón, desarrollado en cabra, el complejo peroxidasa anti-peroxidasa y la 3,3'-diaminobencidina fueron provistos por Sigma Chemical Co., EE. UU. de América. El glutaraldehído fue de Fluka (Suiza), el metabisulfito de sodio de Mallinckrodt (EE. UU. de América) y el sulfato de nickel y de amonio fueron de Carlo Erba (Italia).

El resto de los reactivos son los mismos que se describieron en las secciones anteriores.

3.2. Tratamiento crónico de los embriones con neuroesteroides

Huevos fértiles (*Gallus gallus domesticus*) de la raza White Leghorn se incubaron a 37°C y 60% de humedad relativa ambiente durante 8 días (día embrionario 8).

En el día embrionario 8, a los huevos se les practicó una abertura en la cáscara sobre la zona donde se localizó la membrana corio-alantoides sin daño en la misma o en los otros anexos embrionarios siguiendo la técnica de Hamburger (1960) modificada por Calkin y col. (1994). En forma estéril se depositó sobre esta membrana corio-alantoides 100 µl de una solución conteniendo el esteroide. La abertura se ocluyó con cinta adhesiva Micropore (3M) y los huevos prosiguieron su incubación en las mismas condiciones. La administración del esteroide se repitió en los días embrionarios 11, 14 y 17. Los experimentos se llevaron a cabo en el día embrionario 18.

El esteroide fue disuelto en un pequeño volumen de alcohol bencílico y llevado a volumen final con aceite de maíz. Esta solución fue filtrada a través de una membrana esterilizante MILLIPORE con un poro de 0,22 µm.

La concentración del esteroide fue calculada asumiendo que éste fue accesible a todo el volumen del huevo, el cual fue estimado en 50 ml. La concentración de alcohol bencílico final en el huevo fue de 0,006% v/v mientras que la del aceite fue de 0,2% v/v.

La tanda de embriones controles fue administrada crónicamente en los mismos días y con el mismo volumen del vehículo (alcohol bencílico-aceite de maíz) en que se disolvió el esteroide.

3.3. Estudio de la histología de lóbulo óptico de pollo

Luego del tratamiento crónico con neuroesteroide se estudio la citoarquitectura del lóbulo óptico de pollo a fin de determinar si existían alteraciones macroscópicas de dicha estructura. El estudio se realizó mediante una técnica histológica clásica, la tinción

con hetamoxilina-eosina de cortes obtenidos con micrótopo a partir de lóbulos ópticos incluidos en parafina (Scicolone y col., 1995).

3.4. Estudio de la inmunotinción para GABA en el lóbulo óptico

También se estudió el efecto del tratamiento crónico sobre las neuronas GABAérgicas por medio de la técnica de inmunocitoquímica con un anticuerpo monoclonal contra el ácido γ -aminobutírico (GABA). Lóbulos ópticos tratados con vehículo y con neuroesteroides fueron procesados en paralelo comenzando con una fijación por inmersión en una solución con 5% p/v de glutaraldehído conteniendo 1% p/v de metabisulfito de sodio en solución reguladora cacodilato 0,1M, pH 7,5 por 2 horas. Luego de tres lavados con una solución reguladora de Tris 0,1 M, pH 7,5 con 0,85% p/v de metabisulfito de sodio y 5% p/v de sacarosa, los lóbulos fueron incluidos en agarosa y cortados en un vibrátomo Oxford. Las secciones, de 40 μ m de espesor, fueron procesadas por la técnica inmunocitoquímica de Peroxidasa anti-Peroxidasa (Sternberger y col., 1970).

Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti ácido γ -aminobutírico comercial de la firma CHEMICON International Inc.

Técnica inmunocitoquímica de peroxidasa anti-peroxidasa:

Los cortes fueron lavados 2 veces con agua destilada y luego deshidratados por pasajes en alcoholes de grado creciente (50, 70, 90 y 100% v/v). La peroxidasa endógena se inhibió durante 30 min. con una solución de metanol-H₂O₂ al 0,5% v/v. Las secciones fueron nuevamente re-hidratadas por pasajes en alcoholes de grado decreciente hasta llegar a agua destilada y lavadas 2 veces en esta última, seguidos de 2 lavados en solución reguladora fosfato salino 0,1 M, pH 7,4. Se incubaron los cortes con suero normal de oveja al 3% v/v en solución reguladora fosfato salino + Tritón X100 0,25% p/v, durante 60 minutos y después con el anticuerpo primario en una dilución 1/500 en

1% v/v de suero normal de oveja en la misma solución, durante 48 horas a 4°C en agitación continua. Se lavó 3 veces x 5 min. con solución fosfato salino y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 1/100 anti ratón-desarrollado en cabra . Después de lavar 3 veces x 5 min. con solución fosfato salino se incubó con el complejo PAP (peroxidasa anti-peroxidasa) durante 60 min. a temperatura ambiente en agitación. Se lavó nuevamente como antes y se realizó 1 lavado con solución reguladora de acetato 0,1M, pH 6,0. Por último se reveló con 3,3'-diaminobencidina 0,035% p/v más sulfato de níquel y amonio 2,5% p/v disueltos en solución de acetato y H₂O₂ 0,1% v/v. Se lavó 2 veces con la misma solución reguladora y 2 veces más con agua destilada

Una vez realizada la inmunocitoquímica, los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se secaron a 37°C durante 30 min. Luego de una deshidratación por un pasaje en alcoholes de grado creciente, se realizó un pasaje por xilol y los mismos se montaron con medio de montaje (Permount).

3.5. Preparación de membranas sinápticas

Los embriones tratados crónicamente tanto con esteroide como con vehículo fueron sacrificados por decapitación en el día embrionario 18.

La preparación de membranas sinápticas (fracción M₁ exhaustivamente lavada) se realizó según el procedimiento de De Robertis y col. (1962), adaptado por Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara (1990), descrito en la sección 1.

3.6. Ensayos de unión de radioligandos

3.6.1. Ensayos de unión de [³H]GABA a receptores asociados a membranas

La fracción mitocondrial enriquecida en membranas sinápticas (M_1) exhaustivamente lavada se uso fresca para los ensayos de unión de [³H]GABA por medio de una técnica convencional de centrifugación, descrita originalmente por Enna y Snyder (1975).

El tejido fue resuspendido en solución reguladora de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 conteniendo 150 mM de KCl. Alícuotas de membranas (0,2-0,4 mg de proteínas totales) se preincubaron en tubos de polipropileno 5 minutos, en hielo (0-4°C) en presencia de los distintos moduladores. Luego se agregó [³H]GABA y se prosiguió con la incubación 15 minutos más en las mismas condiciones. El volumen final de incubación fue de 0,6 ml. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 20.800 g por 10 minutos en una centrífuga refrigerada, para separar las fracciones de radioligando unido (sedimento) del libre (sobrenadante). El sobrenadante se aspiró con vacío y el sedimento se lavó superficialmente con 1 ml de solución reguladora Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 enfriada.

Los sedimentos fueron disueltos con 200 µl de un solvente comercial (Solvable, fórmula NEF 910) durante toda la noche a 37°C en estufa. A los sedimentos así disueltos se les agregó 3 ml de un líquido de centelleo comercial (Ultima Gold XR) y se contaron en un contador de centelleo líquido con una eficiencia de 25 a 30%.

En estos ensayos de radioligando sólo se estudió la población de sitios receptores de baja afinidad debido a que resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que sólo estos sitios son sensibles a las modulaciones por neuroesteroides y barbitúricos (Viapiano, 1998). Además, se ha postulado que los sitios receptores de alta afinidad, sólo revelados con la congelación-descongelación de las membranas sinápticas (Enna y Snyder, 1977; Fiszer de Plazas, 1982), serían sitios aceptores y no sitios receptores con un correlato biológico (Laduron, 1984). Por lo tanto la concentración final de GABA utilizada fue de 100 nM obtenida mediante la mezcla de [³H]GABA y GABA.

Con el objeto de determinar la unión inespecífica, las muestras se incubaron 15 minutos con 1 mM de GABA antes del agregado de [³H]GABA. La unión específica fue calculada restando la radioactividad retenida en presencia de un exceso de GABA frío (unión inespecífica) a la radioactividad retenida en presencia de [³H]GABA (unión total).

En los ensayos realizados, el tiempo y la temperatura de incubación fueron parámetros previamente puestos a punto para la medición óptima de la unión de [³H]GABA al receptor GABA_A (Fiszer de Plazas, 1982).

3.6.2. Determinación de los parámetros constante de disociación aparente (K_d) y máxima capacidad de unión (B_{max}) de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad

Para ello se realizaron ensayos de saturación de unión por competencia con [³H]GABA y concentraciones crecientes de GABA. El rango de concentraciones de GABA utilizado para la unión a los sitios receptores de baja afinidad asociados a membranas fue de 20 a 600 nM.

Las curvas de saturación se analizaron por medio de regresión no-lineal según se describe en Rodbard y col. (1980), al igual que lo que se describe en el punto 1.4.3 para los sitios receptores benzodiazepínicos y se tuvieron las mismas consideraciones en la representación de los resultados y la obtención de los parámetros cinéticos aparentes.

3.6.3. Modulación de la unión de [³H]GABA a los sitios receptores de baja afinidad por alopregnanolona, pentobarbital sódico y diazepam.

La concentración de Cl⁻ (150-200 mM) presente en la solución reguladora utilizada para la incubación del ligando además de haberse demostrado ser óptima para estudiar la modulación neuroesteroidea, lo es para estudiar la modulación por

barbitúricos (Leeb-Lundberg y col., 1980; Skolnic y col., 1981; Skolnic y col., 1982; Giusti y col., 1983).

Para estudiar la modulación de la unión de [³H]GABA se realizaron curvas de concentración-efecto, con una concentración fija del ligando (100 nM) y concentraciones variables de los moduladores.

El esteroide utilizado, alopregnanolona, se disolvió en etanol absoluto; la concentración final de etanol fue de 1% v/v en todos los tubos, incluyendo aquellos en los que se midió la unión basal (sin esteroide). El diazepam también fue disuelto en etanol absoluto y la concentración final del solvente nunca superó el 1% v/v en todos los tubos, mientras que el pentobarbital sódico se disolvió en agua bidestilada a temperatura ambiente.

La representación gráfica de los resultados fue ajustada por análisis computarizado a fin de obtener los valores de CE₅₀ y E_{max}. Al igual que para la modulación neuroesteroidea del receptor benzodiazepínico, en todos los casos se evaluó la presencia de uno o más sitios modulatorios, para lo cual se aplicó un test de bondad de ajuste que compara las sumas de cuadrados de ambas curvas y se consideró como mejor ajuste a dos sitios solamente cuando el test rindió una resultado significativo ($p < 0,05$).

3.6.4. Ensayos de unión de [³H]flunitrazepam a receptores asociados a membranas

Las drogas y reactivos químicos y la preparación de membranas fueron los mismos que se describen en la sección 1 para la modulación neuroesteroidea del receptor GABA_A (puntos 1.1, 1.3, 1.4.1 y 1.4.4).

En los estudios de radioligando se ensayó la unión de [³H]flunitrazepam a los receptores asociados a las membranas exhaustivamente lavadas, igual a lo que se describe en la sección 1.

Para estudiar la modulación de la unión de [³H]flunitrazepam por alopreganaolona, se realizaron curvas de concentración-efecto, con una concentración fija del ligando (1 nM) y concentraciones variables del esteroide.

El resto de las consideraciones son idénticas a las de la sección 1.

3.7. Preparación de microsacos

A fin evaluar las características funcionales del receptor GABA_A luego de la administración crónica, se estudió la captación de ³⁶Cl⁻ inducida por GABA. Para ello se prepararon microsacos según la técnica de Allan y Harris (1987). Se homogeneizaron lóbulos ópticos de embriones tratados crónicamente con neuroesteroides y con vehículo. El procedimiento se realizó en forma suave con solución reguladora (30 ml/ g. de tejido fresco) de HEPES 20 mM, conteniendo 118 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1,18 mM de MgSO₄, 2,5 mM de CaCl₂ y 10 mM de glucosa, ajustado a pH 7,4 con Tris base usando un homogeneizador Potter Elvehjem con émbolo de Teflon. El homogenato se centrifugó a 1.000 g por 15 minutos, el sedimento se resuspendió y centrifugó nuevamente de la misma forma. El sedimento final se resuspendió en la misma solución, se conservó en hielo y se utilizó inmediatamente para los ensayos de captación de cloruro.

3.8. Ensayos de captación de ³⁶Cl⁻

Alicuotas de 200 µl de la preparación de microsacos (1,5-2,0 mg de proteína) fueron preincubadas a 30°C por 15 minutos y la reacción de captación fue iniciada agregando 200 µl de la mezcla de reacción conteniendo 0,2 µCi de ³⁶Cl⁻ y diferentes concentraciones de GABA. La reacción se terminó luego de 3 segundos por la adición de solución reguladora fría conteniendo 100 µM de picrotoxina, seguida de una filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) embebidos con una solución

de polietilénimina 0,05% v/v en solución reguladora. Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de la solución reguladora de HEPES, se secaron y la radioactividad se midió por centelleo líquido con una solución 18 mM de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0,27 mM de 2-2'-p-fenilén-bis(5-feniloxazol) (POPOP) en tolueno 34% v/v y Tritón X-100 66% v/v, con una eficiencia aproximada de 90-95%. En cada experimento se incluyeron tubos controles sin GABA para medir la captación basal. Los datos se expresaron como CI captado (captación en presencia de GABA menos la captación basal) en nmol/mg proteína.

3.9. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas totales se midió de la misma forma que se describe en la sección 1, punto 1.5.

3.10. Análisis estadísticos de los resultados

Las comparaciones estadísticas y el ajuste de las curvas llevadas a cabo con ambos ligandos, así como el cálculo de los parámetros CE_{50} , E_{max} , K_d y B_{max} se realizaron como se describió en la sección 1.

RESULTADOS

1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA_A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO

1.1. Efecto *in vitro* de alopregnanolona y alotetrahydrodesoxicorticosterona sobre la unión de [³H]flunitrazepam durante el desarrollo del lóbulo óptico

El agregado *in vitro* de alopregnanolona aumentó la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas frescas aisladas del lóbulo óptico en diferentes estadios del desarrollo (Figura 8 y Tabla 3). En los tres estadios analizados, día embrionario 14 (DE14), recién nacido (RN) y adulto, este esteroide potenció la unión basal del ligando en forma dependiente de la concentración. El análisis de los datos demostró que la modulación alostérica positiva de esta unión es de un sólo componente, sugiriendo la presencia de un sólo sitio modulador neuroesteroideo o al menos de sitios con idéntica afinidad. Los efectos máximos de este esteroide fueron alcanzados en el rango de concentraciones 4-8 μ M de droga. Concentraciones mayores no produjeron mayores aumentos. Estos resultados, además de demostrar que este neuroesteroide es capaz de modular al receptor GABA_A presente en el CNS de las aves, muestran que este efecto de la alopregnanolona está inversamente relacionado con la edad, alcanzándose las estimulaciones máximas en el estadio más temprano estudiado (DE14). La Tabla III resume las concentraciones a las cuales se alcanza la mitad del efecto máximo (CE₅₀) y la estimulación máxima (E_{max}) de la alopregnanolona y la alotetrahydrodesoxicorticosterona.

La alotetrahydrodesoxicorticosterona también estimuló la unión del [³H]flunitrazepam a las mismas membranas en forma dependiente de la concentración de droga agregada, alcanzando el máximo efecto en el mismo rango de concentraciones que la alopregnanolona (4-8 μ M). De la misma forma, la modulación alostérica positiva de un componente producida por esta droga estuvo inversamente relacionada con la edad.

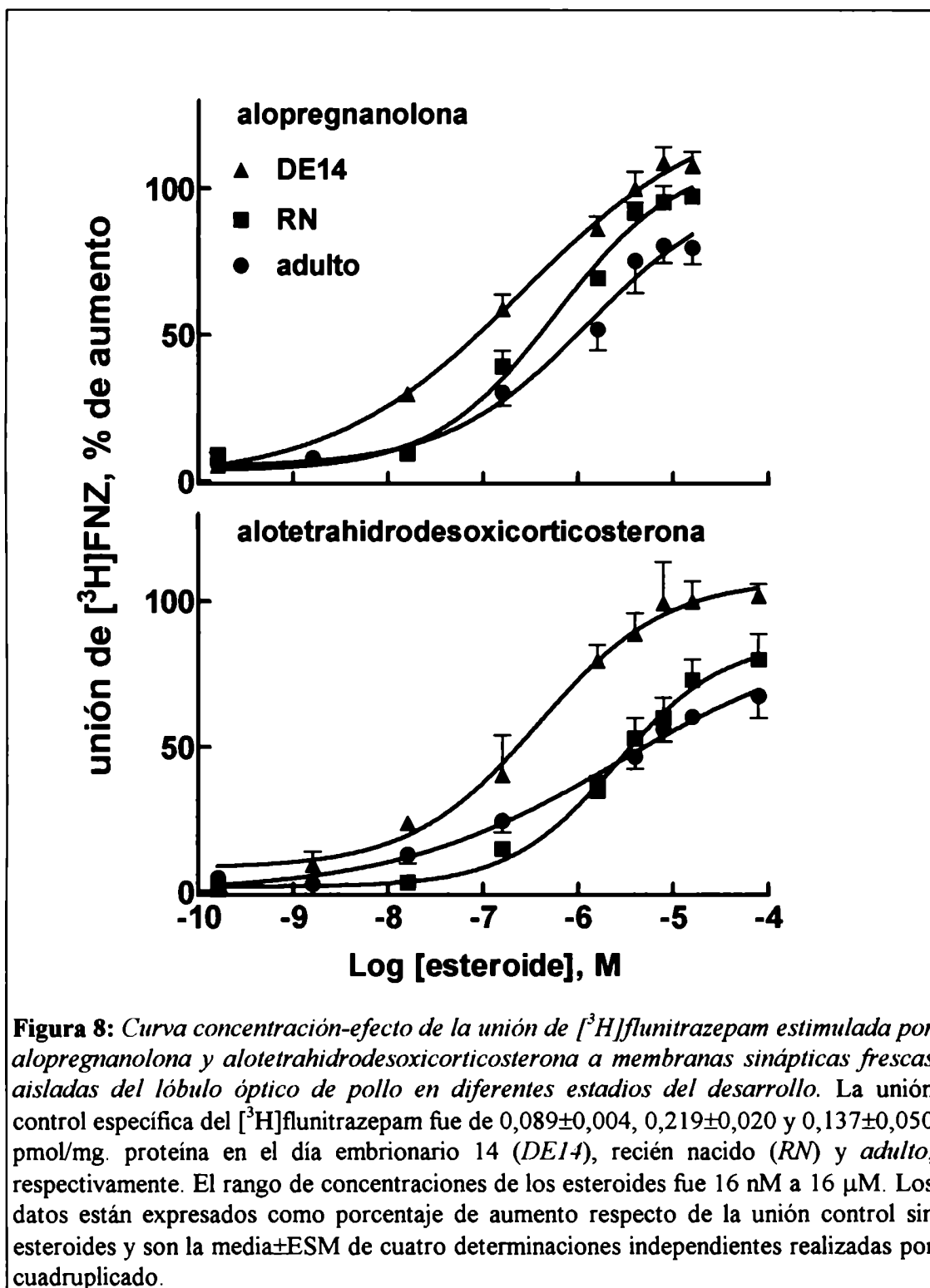


Tabla III: Valores de CE_{50} y E_{max} de alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona para modular la unión de [3H]flunitrazepam en diferentes estadios del desarrollo del lóbulo óptico

	CE_{50} (μM)		E_{max} (% de aumento)	
	alopregnanolona	alotetrahidro desoxi corticosterona	alopregnanolona	alotetrahidro desoxi corticosterona
DE14	1,56 \pm 0,31	0,35 \pm 0,11 ^b	127 \pm 13,7	114 \pm 2,5
RN	0,71 \pm 0,06 ^a	2,12 \pm 0,03 ^{a,b}	86 \pm 4,3 ^a	66 \pm 7,0 ^a
Adulto	1,14 \pm 0,03 ^a	2,99 \pm 0,15 ^{a,b}	89 \pm 10,1 ^a	78 \pm 5,9 ^a

CE_{50} : Concentración de droga que produce la mitad del efecto máximo; E_{max} : Efecto máximo alcanzado por la droga.

El análisis global de los datos (la media \pm ESM de cuatro determinaciones independientes realizadas por cuadruplicado) fue realizado por ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples se realizaron con el test de Tukey-Kramer con un $P < 0,05$.

^a: valores significativamente diferentes entre estadios para una droga; ^b: valores significativamente diferentes entre droga para un mismo estadio.

Además de observarse que las eficacias de estos dos esteroides para modular la unión de [3H]flunitrazepam son mayores en el estadio más temprano analizado, el DE14, también se demuestra que, excepto para ese estadio, la alopregnanolona es más potente que la alotetrahidrodesoxicorticosterona para modular esta unión (Tabla III).

1.2. Mecanismo de acción de alopregnanolona y alotetrahidro-desoxicorticosterona para potenciar la unión de [3H]flunitrazepam

A fin de determinar el mecanismo por el cual estos esteroides son capaces de aumentar la unión del [3H]flunitrazepam a las membranas sinápticas, se llevaron a cabo experimentos de saturación de unión en los tres estadios estudiados. Las curvas de saturación resultantes fueron sometidas a análisis de regresión no-lineal según Rodbard y

col. (1980) mediante el cual se estimaron los parámetros cinéticos aparentes como se describe en Materiales y Métodos, y la representación gráfica de los resultados se realizó mediante la transformación lineal de Scatchard (1949) por ser más clara para su interpretación.

Como puede verse en la Figura 9, el agregado *in vitro* de 4 μ M de ambos esteroides aumentó la afinidad del [3 H]flunitrazepam por su sitio de unión sin cambiar significativamente el número máximo de sitios receptores. Además, puede observarse en la Tabla IV que la reducción de la constante de disociación aparente (K_d) fue menor en el estadio adulto comparada con el recién nacido y el día embrionario 14, confirmando que el efecto de los esteroides está inversamente relacionado con la edad.

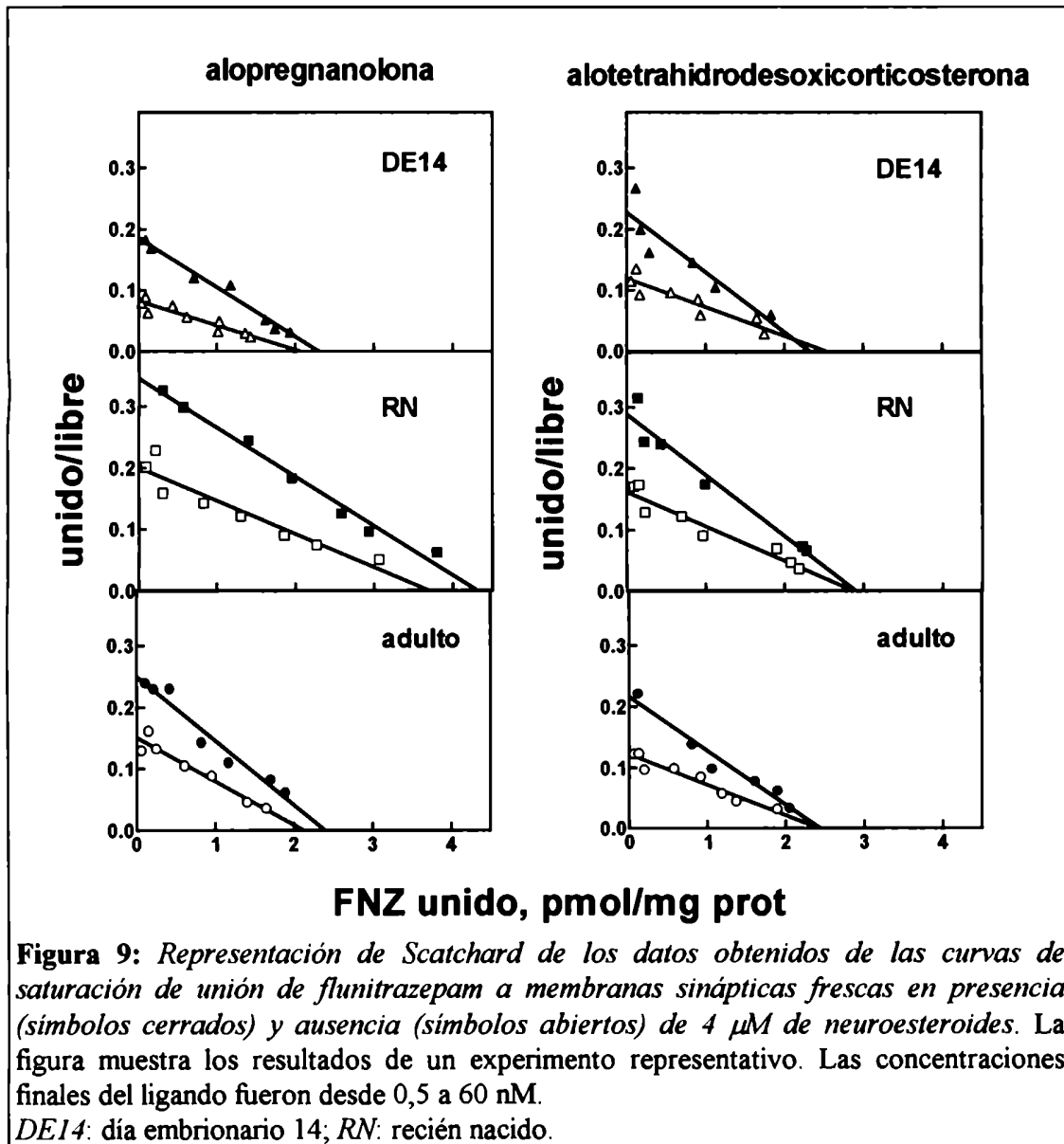
Como se ha reportado, se observa un aumento transitorio en los sitios de unión benzodiazepínicos alrededor del nacimiento (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1991)

Tabla IV: Valores de constante de disociación aparente (K_d) y número máximo de sitios receptores (B_{max}) obtenidos de las curvas de saturación de unión de flunitrazepam en presencia y ausencia de 4 μ M de los neuroesteroides

	DE14		RN		Adulto	
	K_d nM	B_{max} pmol/mg. prot.	K_d nM	B_{max} pmol/mg. prot.	K_d nM	B_{max} pmol/mg. prot.
control	22,25 \pm 1,74	1,98 \pm 0,18	19,28 \pm 1,09	2,99 \pm 0,32 ^b	21,30 \pm 1,13	2,31 \pm 0,15
alopregnanolona	10,57 \pm 1,07 ^a	1,81 \pm 0,32	9,98 \pm 2,00 ^a	3,33 \pm 0,47 ^b	13,26 \pm 0,90 ^a	2,70 \pm 0,23
alotetrahidrodesoxicorticosterona	9,54 \pm 0,92 ^a	1,96 \pm 0,50	11,16 \pm 1,80 ^a	2,85 \pm 0,38	13,75 \pm 1,45 ^a	2,11 \pm 0,13

En análisis global de los datos (la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado) fue realizado por ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples se realizaron con el test de Tukey-Kramer con un $P < 0,01$.

^a: valores significativamente diferentes entre droga en un mismo estadio; ^b: valores significativamente diferentes entre estadios para una misma droga.



La modulación del receptor GABA_A ha sido extensamente estudiada en preparaciones de mamíferos, en particular ratas. Con estos primeros experimentos hemos demostrado que esta clase de drogas es capaz de modular también a este receptor en preparaciones provenientes del lóbulo óptico de pollo, indicando que esta modulación se observa en el SNC de las aves.

Además, el efecto modulador de los neuroesteroides sólo ha sido demostrado en preparaciones sinápticas de ratas adultas y nunca sobre la ontogenia del receptor GABA_A. Estos estudios demostraron sus efectos potenciadores a lo largo del desarrollo y que los mismos son mayores en los estadios más tempranos. Por último, se comprobó que el mecanismo de acción para modular positivamente la unión de benzodiazepinas, el aumento de la afinidad por los sitios de unión, es el mismo en mamíferos y aves y durante el desarrollo.

2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA_A

En la sección anterior se ha demostrado que tanto la alopregnanolona como la alotetrahidrodesoxicorticosterona son capaces de modular la unión del [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas provenientes de lóbulos ópticos de pollo en distintos estadios del desarrollo. Además, se probó que este aumento es debido a un incremento en la afinidad del flunitrazepam por sus sitios receptores, al igual de lo que ocurre en las membranas sinápticas de mamíferos.

En esta sección se estudió en detalle la complejidad de este sitio modulador esteroideo presente en el receptor GABA_A, así como su posible heterogeneidad utilizando distintos neuroesteroides usando preparaciones de membranas sinápticas obtenidas de pollos adultos.

2.1. Efecto de epipregnanolona sobre la unión de [³H]flunitrazepam y sobre su potenciación por alopregnanolona

El metabolito 5β-reducido, 3β-hidroxilado de la progesterona, epipregnanolona, fue utilizado para antagonizar el efecto estimulador de la unión de [³H]flunitrazepam inducido por el esteroide neuroactivo alopregnanolona y estudiar así la posible heterogeneidad de este sitio modulador.

La epipregnanolona, produjo una potenciación débil de la unión del [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas frescas aisladas de lóbulos ópticos de pollos adultos con una CE₅₀ de 0,59±0,15 μM. El efecto máximo de este neuroesteroide fue alcanzado con una concentración de 0,16 mM y fue de 15,11±2,67%, mientras que 4 μM de alopregnanolona incrementó dicha unión en un 89,54±4,50% sobre el valor control (Figura 10).

El agregado de 0,16 μM de epipregnanolona conjunto con 4 μM de alopregnanolona produjo un aumento de la unión de [³H]flunitrazepam de sólo un

51,86±4,73% y esta estimulación disminuyó a medida que la concentración de epipregnanolona fue aumentando. El aumento obtenido luego de la adición conjunta *in vitro* de 4 µM de alopregnanolona y 0,16 mM de epipregnanolona no fue significativamente diferente al porcentaje de aumento obtenido con esa concentración de epipregnanolona solamente. Estos resultados, presentados en la Figura 10, demuestran que la epipregnanolona es capaz de modular en forma positiva pero débil la unión del [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas y también de antagonizar el efecto alostérico positivo producido por una concentración máxima (4 µM) de alopregnanolona, un potente modulador alostérico del complejo receptor GABA_A.

Además, puede verse que el efecto máximo de la epipregnanolona coincide con el valor de estimulación de la unión de [³H]flunitrazepam alcanzado por el agregado de 4 µM de alopregnanolona y una concentración máxima de epipregnanolona, sugiriendo que el efecto antagonista de este último compuesto sería de tipo competitivo por los mismos sitios a los que se uniría la alopregnanolona.

De acuerdo con estos resultados, se utilizó 16 µM de epipregnanolona para realizar el resto de los experimentos ya que esta concentración de esteroide tiene poco efecto *per se* pero antagoniza marcadamente la potenciación producida por alopregnanolona.

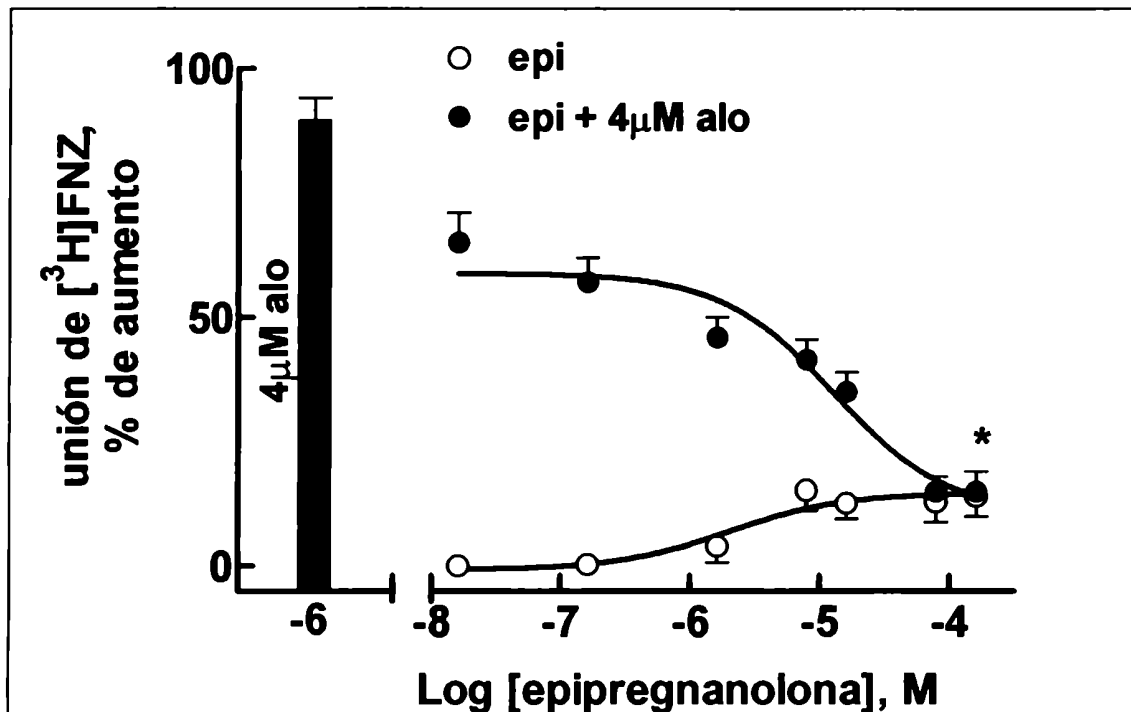


Figura 10: Efecto de epipregnanolona sobre la unión de $[^3\text{H}]$ flunitrazepam (símbolos abiertos) y sobre su potenciación por $4\ \mu\text{M}$ de alopregnanolona (símbolos llenos). El efecto de $4\ \mu\text{M}$ de alopregnanolona sola está representado por la barra vertical. Los datos son la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado y están expresados como porcentaje de aumento respecto de la unión sin esteroides.

*El porcentaje de E_{max} de epipregnanolona es significativamente diferente de cero ($P < 0,05$) pero no es significativamente diferente del porcentaje de aumento obtenido a esa misma concentración de epipregnanolona junto con $4\ \mu\text{M}$ de alopregnanolona.

epi: epipregnanolona; *alo*: alopregnanolona.

2.2. Efecto de epipregnanolona sobre la unión de $[^3\text{H}]$ flunitrazepam estimulada por alopregnanolona y alfaxalona

Continuando la caracterización de los sitios de unión de los esteroides, se estudió el efecto del agregado de epipregnanolona sobre la modulación de la unión de $[^3\text{H}]$ flunitrazepam por dos esteroides neuroactivos, alopregnanolona y alfaxalona a fin de analizar sus interacciones con el sitio de reconocimiento esteroideo del receptor GABA_A . La Figura 11 muestra que tanto la alopregnanolona como la alfaxalona producen una

estimulación de la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas frescas provenientes de pollos adultos con un sólo componente de aumento y dependiente de la concentración. Los efectos máximos (E_{max}) se lograron con concentraciones micromolares similares de ambos esteroides y alcanzaron $100,52 \pm 7,08$ y $62,29 \pm 3,11\%$, mientras que las concentraciones a las que se obtuvieron la mitad de estos efectos (CE_{50}) fueron $1,25 \pm 0,13$ y $3,75 \pm 0,70$ μM para la alopregnanolona y la alfaxalona, respectivamente. Puede observarse que la alopregnanolona es más potente y eficaz que la alfaxalona para modular la unión de [³H]flunitrazepam a estas membranas. Esto se ilustra en la Figura 11 y la Tabla V.

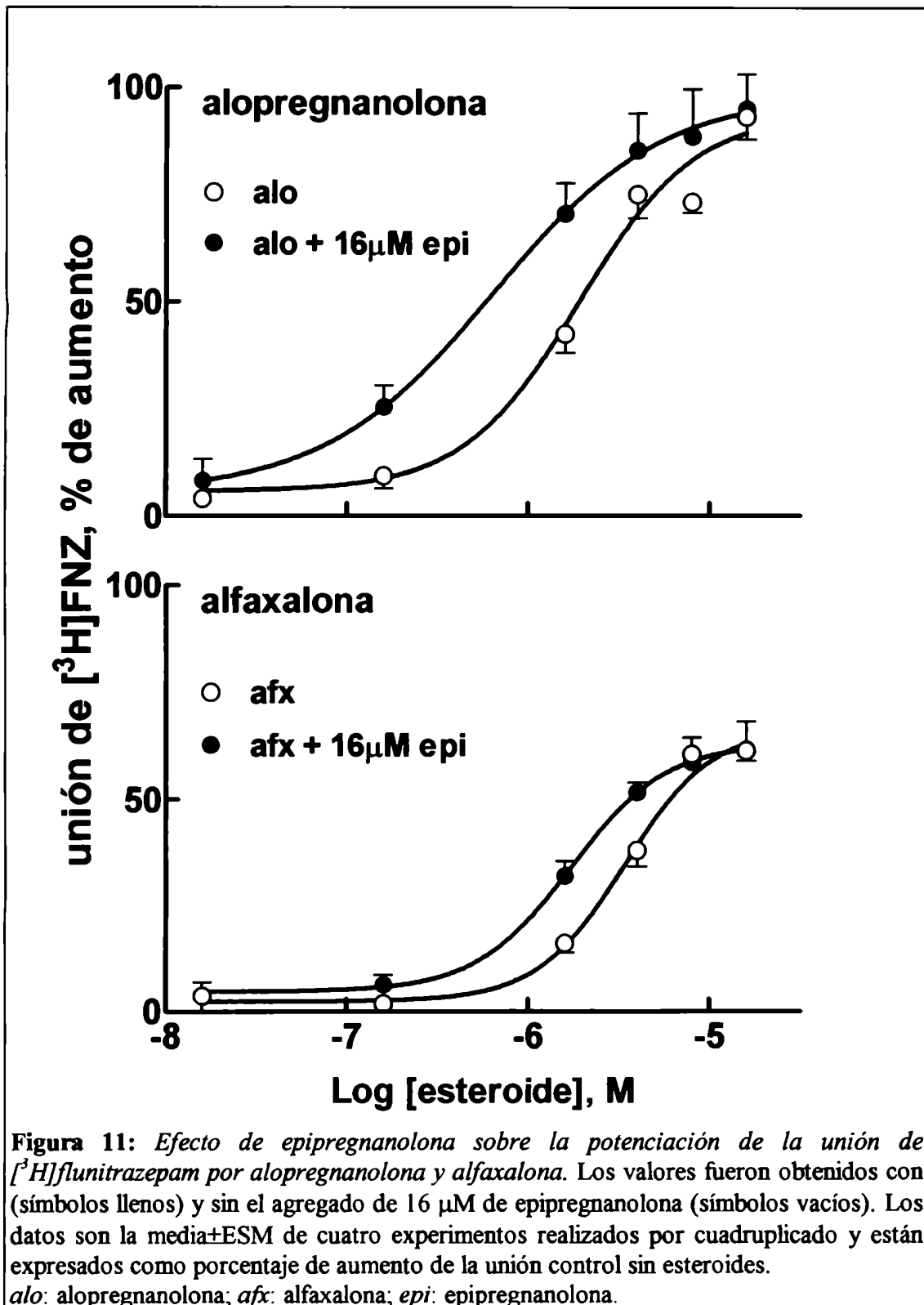
Como se dijo al principio, a fin de estudiar la interacción de estos dos neuroesteroides con su sitio de reconocimiento, se llevaron a cabo las curvas concentración-efecto para estos compuestos con el agregado de 16 μM de epipregnanolona. Los resultados revelaron que las CE_{50} disminuyeron a $0,54 \pm 0,08$ y $1,26 \pm 0,15$ μM , respectivamente, mientras que los E_{max} no fueron afectados significativamente (Figura 11 y Tabla V).

Tabla V: Efecto de 16 μM de epipregnanolona sobre la CE_{50} y el E_{max} de alopregnanolona y alfaxalona para modular la unión de [³H]flunitrazepam

	CE_{50} (μM)	E_{max} (% de aumento)
alopregnanolona	$1,25 \pm 0,13$	$100 \pm 7,1$
+ 16 μM epipregnanolona	$0,54 \pm 0,08^a$	$110 \pm 5,4$
alfaxalona	$3,75 \pm 0,70^b$	$62 \pm 3,1^b$
+ 16 μM epipregnanolona	$1,26 \pm 0,15^a$	$58 \pm 2,7^b$

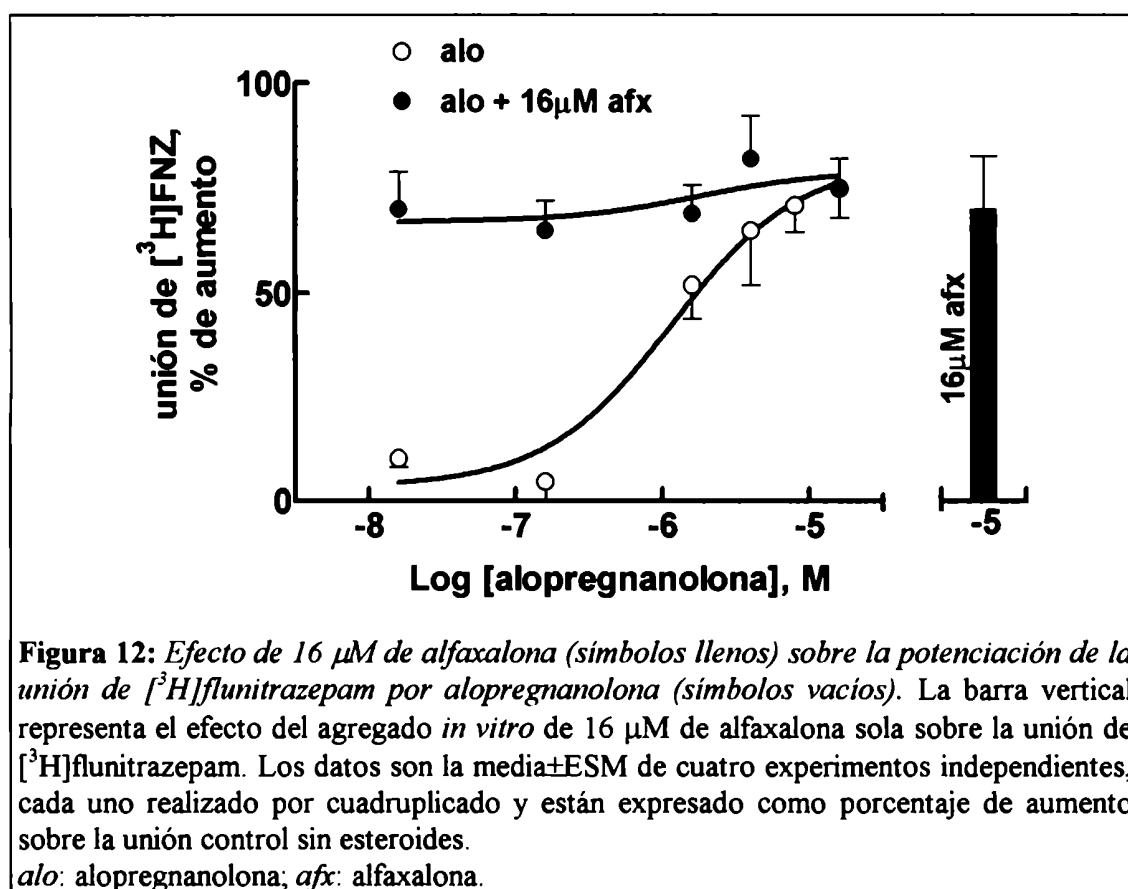
Los datos son la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes, llevados a cabo por cuadruplicado. Los datos fueron analizados por ANOVA de 1 vía y test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un $P < 0,05$.

^a: significativamente diferente del valor correspondiente sin el agregado de epipregnanolona; ^b: significativamente diferente entre alopregnanolona y alfaxalona.



2.3 Efectos aditivos de los neuroesteroides alopregnanolona y alfaxalona sobre la unión de [³H]flunitrazepam

Los resultados anteriores no descartan la posibilidad de sitios modulatorios diferentes que unan a la alopregnanolona y alfaxalona. Para estudiar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos en presencia de ambos neuroesteroides en forma conjunta. La Figura 12 muestra una curva concentración-efecto de la alopregnanolona en el rango de 16 nM a 16 μ M, sobre la unión de [³H]flunitrazepam con o sin el agregado de una concentración máxima (16 μ M) de alfaxalona. Los resultados muestran que no hay aditividad en los efectos de estos dos esteroides y que la alfaxalona no es capaz de potenciar la unión de [³H]flunitrazepam por encima del efecto máximo de la alopregnanolona, sugiriendo que ambos neuroesteroides actuarían a través de un mismo sitio de reconocimiento.



De lo expuesto hasta ahora se ha demostrado que la epipregnanolona se comporta como un modulador alostérico débil de la unión de [³H]flunitrazepam, lo que podría interpretarse como un agonismo parcial del sitio modulador esteroideo y que frente a una concentración máxima de un agonista total de dicho sitio (4 μM de alopregnanolona), éste esteroide se comporta como un antagonista de dicha modulación alostérica positiva. Por otro lado, los efectos moduladores positivos de 16 μM de epipregnanolona se suman al ser agregada a concentraciones submáximas de alopregnanolona y alotetrahydrodesoxicorticosterona, produciendo un corrimiento (*shift*) hacia la izquierda de las curvas concentración-efecto de estos dos neuroesteroides y reduciendo sus CE₅₀. Este comportamiento dual de la epipregnanolona como agonista y antagonista es característico de los agonistas parciales (Pulvirentu y Koob, 1994; Leff, 1995) e indica, a diferencia de lo que se observa en mamíferos (Prince y Simmonds, 1992, 1993), que la epipregnanolona sería, en vez de un antagonista, un agonista parcial del sitio modulador esteroideo del complejo receptor GABA_A presente en las membranas sinápticas de las aves. Además, se comprobó que la alopregnanolona y la alfaxalona no ejercen efectos aditivos sobre la unión de [³H]flunitrazepam sobre estas membranas sugiriendo que actúan a través del mismo sitio modulador.

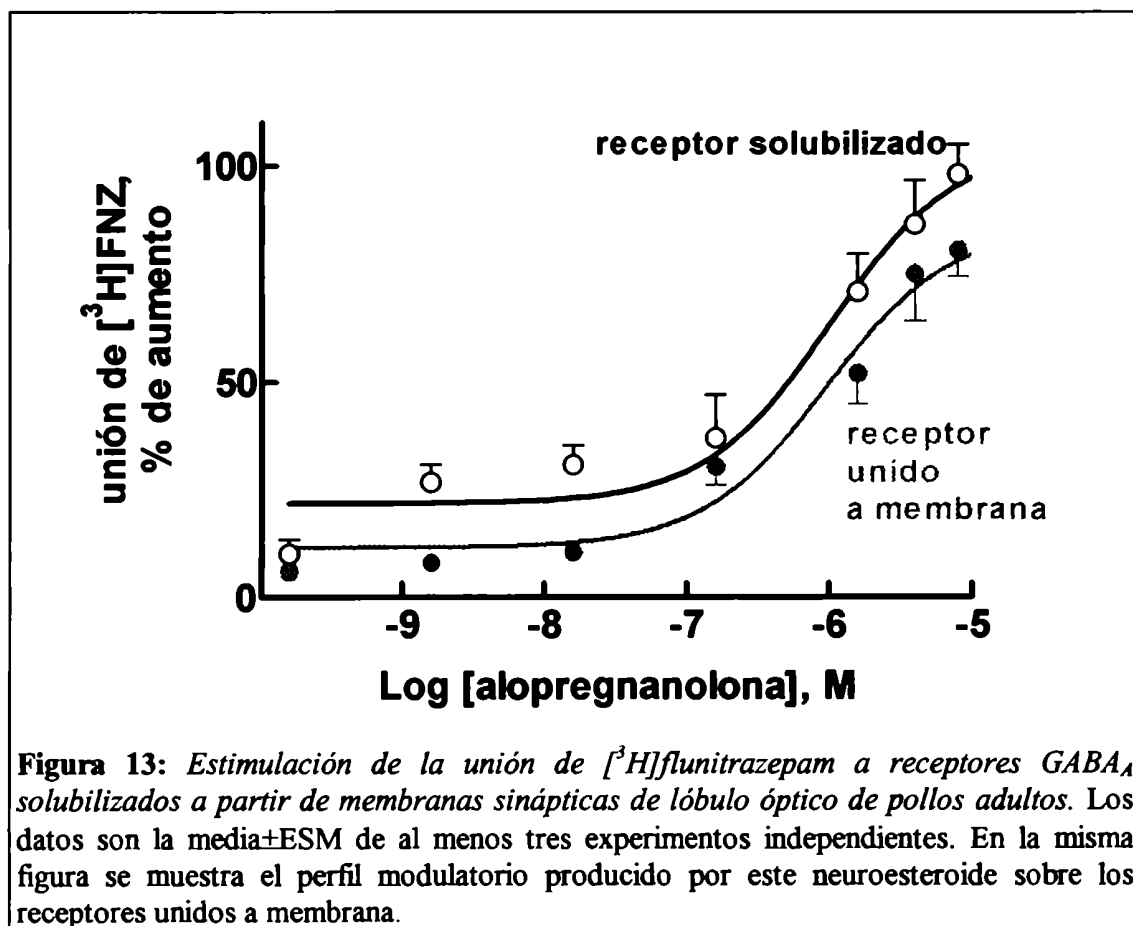
Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de un sitio modulador esteroideo como parte de la molécula receptora GABA_A. Sin embargo, teniendo en cuenta la lipofiliidad de estos compuestos, no se descarta la posibilidad de que estos efectos sean debidos a alteraciones en la composición fosfolipídica de la membrana plasmática.

Por lo tanto, a fin de evaluar esta posibilidad, se investigó la habilidad de la alopregnanolona para modular alostéricamente el sitio receptor benzodiazepínico en una preparación de receptores solubilizados con el objetivo de determinar si la modulación de la unión del [³H]FNZ se mantiene en ambas preparaciones.

2.4. Modulación de la unión de [³H]flunitrazepam a una preparación de receptores solubilizados

Los receptores solubilizados se obtuvieron a partir de una fracción de membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico de pollos adultos, tratada con el detergente anfótero 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano-sulfonato (CHAPS) 1.5% y L- α -lecitina 0.3% en buffer Tris-HCl 50mM, pH 7.4, como se describe en Materiales y Métodos

Los resultados mostraron una unión control de [³H]flunitrazepam a receptores solubilizados de 34.75 ± 6.79 fmoles/mg. proteína. La alopregnanolona moduló positivamente dicha unión con una CE_{50} de $1,26 \pm 0,72$ μ M y un E_{max} de $100 \pm 8,7\%$ (Figura 13) en forma muy similar a la modulación obtenida con el receptor unido a membrana (CE_{50} de $1,14 \pm 0,03$ μ M y E_{max} de $89 \pm 10,1\%$).



Los ensayos de saturación de la unión de [^3H]flunitrazepam demostraron que, al igual que lo que ocurre con los receptores unidos a membranas, este esteroide ejerce su efecto modulador disminuyendo la constante de disociación (K_d), sin cambiar el número máximo de sitios receptores (B_{max}) (Figura 14 y Tabla VI).

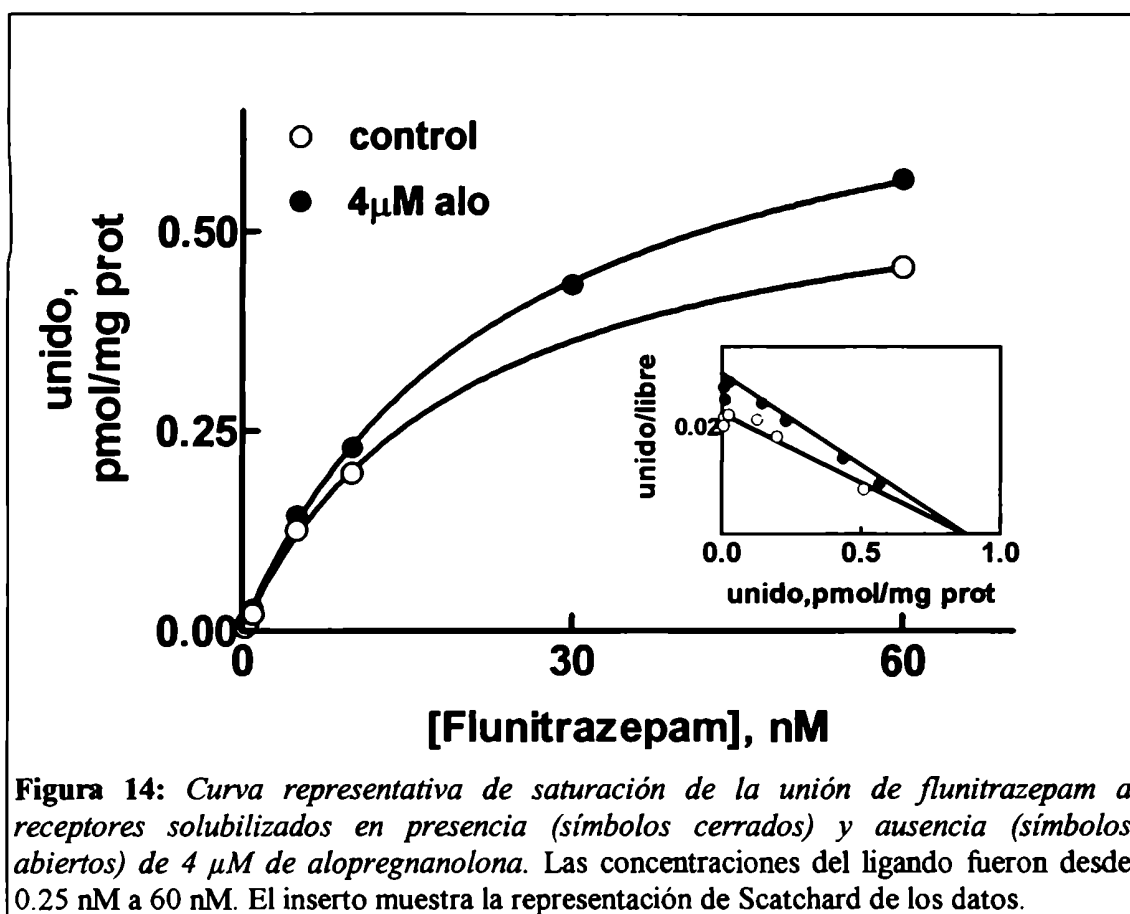


Tabla VI: Efecto de 4 μM de alopregnanolona sobre los valores de constante de disociación (K_d) y número máximo de sitios receptores (B_{max}) de la unión de flunitrazepam a receptores solubilizados

	K_d nM	B_{max} pmol/mg. proteína
control	33,35 \pm 5,05	0,76 \pm 0,11
4 μM de alopregnanolona	25,90 \pm 5,60*	0,77 \pm 0,11

Los valores son la media \pm ESM de al menos tres experimentos independientes.

* $p < 0.05$ (Student's *t* test).

Los datos demuestran que la modulación alostérica ejercida por la alopregnanolona sobre la unión de [^3H]flunitrazepam a receptores de membrana previamente observada se conserva en los receptores solubilizados confirmando la presencia de un sitio modulador esteroideo específico en la molécula receptora GABA_A y descartando una acción indirecta de estos compuestos sobre la membrana plasmática.

3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO

Como se describió anteriormente, se ha demostrado que los neuroesteroides también son capaces de modular el receptor GABA_A presente en el SNC de las aves, siendo este efecto inversamente proporcional a la edad. Además, se probó que esta modulación alostérica positiva de la unión de las benzodiazepinas a su sitio receptor dentro del complejo GABA_A es mediada por un aumento de la afinidad de este sitio por su ligando. También se observó que varios de los neuroesteroides conocidos ejercen sus efectos a través de un sitio común de reconocimiento y que este sitio sería parte de la molécula receptora ya que se conserva luego de la solubilización del receptor.

Se estudiará ahora la biosíntesis *in vitro* de los neuroesteroides durante la ontogenia del SNC de las aves, con el fin de dilucidar las vías metabólicas presentes en dicho sistema así como identificar los principales esteroides producidos en las distintas etapas del desarrollo del lóbulo óptico de pollo, correlacionándolos con los resultados de la modulación neuroesteroidea anteriormente expuestos.

3.1. Metabolismo *in vitro* e *in vivo* de la [¹⁴C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo

La [¹⁴C]progesterona incubada con homogenatos de lóbulo óptico de pollo en diferentes estadios del desarrollo fue convertida a metabolitos con movilidades cromatográficas de 5β-pregnanediona (5β-pregnan-3,20-diona) y también epipregnanolona (5β-pregnan-3 β-ol-20-ona), 17β-estradiol (1,3,5(10)estratrien-3,17-diol), y un derivado 20-hidroxilado. Un metabolito con características de 5α-pregnanediona (5α-pregnan-3,20-diona), precursor de los esteroides neuroactivos, alopregnanolona (5α-pregnan-3α-ol-20-ona) e isopregnanolona (5α-pregnan-3β-ol-20-ona), sólo se observa en una extremadamente pequeña proporción recién en los estadios

más tardíos estudiados (RN y Adulto). No se encontraron metabolitos con propiedades cromatográficas de 17α -hidroxiprogesterona (4-pregnen- 17α -ol-3,20-diona), ni de 11-desoxicorticosterona (4-pregnen-21-ol-3,20-diona), precursor de los neuroesteroides alotetrahidrodesoxicorticosterona y tetrahidrodesoxicorticosterona (5β -pregnan- $3\alpha,21$ -diol-20-ona), como puede verse en la Figura 15A.

Como se describió en la Introducción, los trabajos previos de estructura actividad revelaron que la mayoría de los neuroesteroides activos tienen un esqueleto pregnano reducido, están hidroxilados en C-3 y presentan un grupo ceto en C-20 favorecido sobre un hidroxilo (Harrison y col., 1987; Gee y col., 1988). Teniendo esto en cuenta, se decidió confirmar las identidades de los derivados potencialmente neuroactivos, es decir, los metabolitos de la progesterona 5β -pregnanediona y su metabolito 3β -hidroxilado (*epipregnanolona*) el cual se demostró es un modulador alostérico positivo débil del sitio receptor benzodiazepínico del complejo GABA_A presente en las membranas sinápticas de las aves.

A fin de confirmar las identidades presuntivas de los metabolitos de la progesterona 5β -pregnanediona y *epipregnanolona*, la [¹⁴C]progesterona fue incubada con un exceso de testosterona (4-androsten- 17β -ol-3-ona) no marcada que es un sustrato tanto de la 5α como de la 5β -reductasa para formar $5\alpha/\beta$ -dihidrotestosterona ($5\alpha/\beta$ -androstan- 17β -ol-3-ona) y estos compuestos pueden ser subsecuentemente metabolizados por la 3α o 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/oxidoreductasa, resultando en $5\alpha/\beta$ -androstan- $3\alpha/\beta,17$ -diol, debido a que no existe una droga disponible para bloquear ni a la 5β -reductasa, ni a la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/oxidoreductasa. Por lo tanto, una reducción o desaparición de los metabolitos 5β -pregnanediona y *epipregnanolona* en este tipo de experimento indicaría que tales compuestos son derivados de las enzimas antes mencionadas, 5β -reductasa y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/oxidoreductasa (Colman-Lerner y col, 1995). Los resultados presentados en la Figura 15B confirman las identidades de los metabolitos de la progesterona 5β -pregnanediona y *epipregnanolona*, los cuales que fueron drásticamente reducidos cuando la [¹⁴C]progesterona se incubó con un exceso de

testosterona no marcada. Aparentemente, un compuesto con características más polares, de acuerdo a su movilidad, también resultó reducido, sugiriendo que podría tratarse de un metabolito más polar que la epipregnanolona, como ser 5β -pregnan- $3\beta,20$ -diol. Un metabolito radioactivo con la movilidad de la testosterona fue observado sólo en el día embrionario 11 cuando la testosterona no marcada estuvo presente en el medio de incubación.

Para confirmar definitivamente las identidades de la 5β -pregnanediona y la epipregnanolona, estos compuestos fueron extraídos de las placas de gel de sílice con eter y acetilados junto con su estándar correspondiente no marcado como se describe en Materiales y Métodos. La radioautografía confirmó que la [^{14}C] 5β -pregnanediona y la [^{14}C]epipregnanolona son los metabolitos más importantes derivados de la [^{14}C]progesterona cuando se incuba con lóbulos ópticos de pollo.

Como se deduce de la intensidad de las manchas vistas en la Figura 15A, la [^{14}C]progesterona es completamente metabolizada en los estadios embrionarios, excepto en el más temprano (día embrionario 8, DE8) y parcialmente en el recién nacido y en el adulto, indicando que la actividad esteroideogénica relacionada con el metabolismo de la progesterona en el lóbulo óptico es mayor en los estadios más tempranos y decrece con la edad. Por otro lado, considerando todos los metabolitos 5β -reducidos producidos, se deduce que la actividad 5β -reductasa es importante en todos los estadios del desarrollo. Sin embargo, una gran parte de la 5β -pregnanediona fue transformada al derivado 3β -hidroxilado (epipregnanolona) entre los días embrionarios 11 a 16, y una menor proporción en los otros estadios, sugiriendo nuevamente que la actividad 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/oxidoreductasa está también inversamente relacionada con la edad. Finalmente, las actividades enzimáticas que llevan a la síntesis de 17β -estradiol permanecen sin cambios a lo largo del desarrollo, como puede deducirse de la proporción de progesterona metabolizada a este compuesto. Con respecto al derivado 20 -hidroxilado de la progesterona, no se pudo determinar si era un metabolito 20α o 20β de la misma. Otros autores encontraron sólo productos 20α -hidroxilados en el cerebro de pollos adultos (Nakamura y Tanabe, 1974), por lo que este compuesto más polar derivado de la epipregnanolona debe ser probablemente un metabolito 20α -hidroxilado.

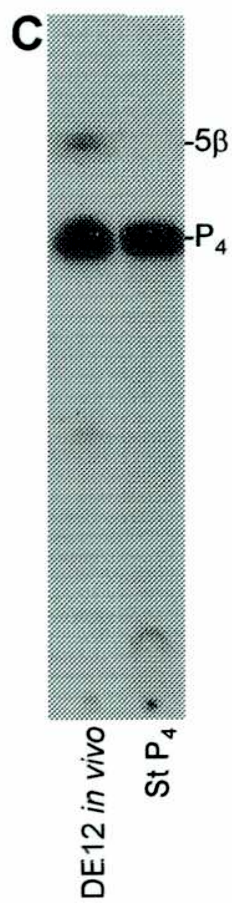
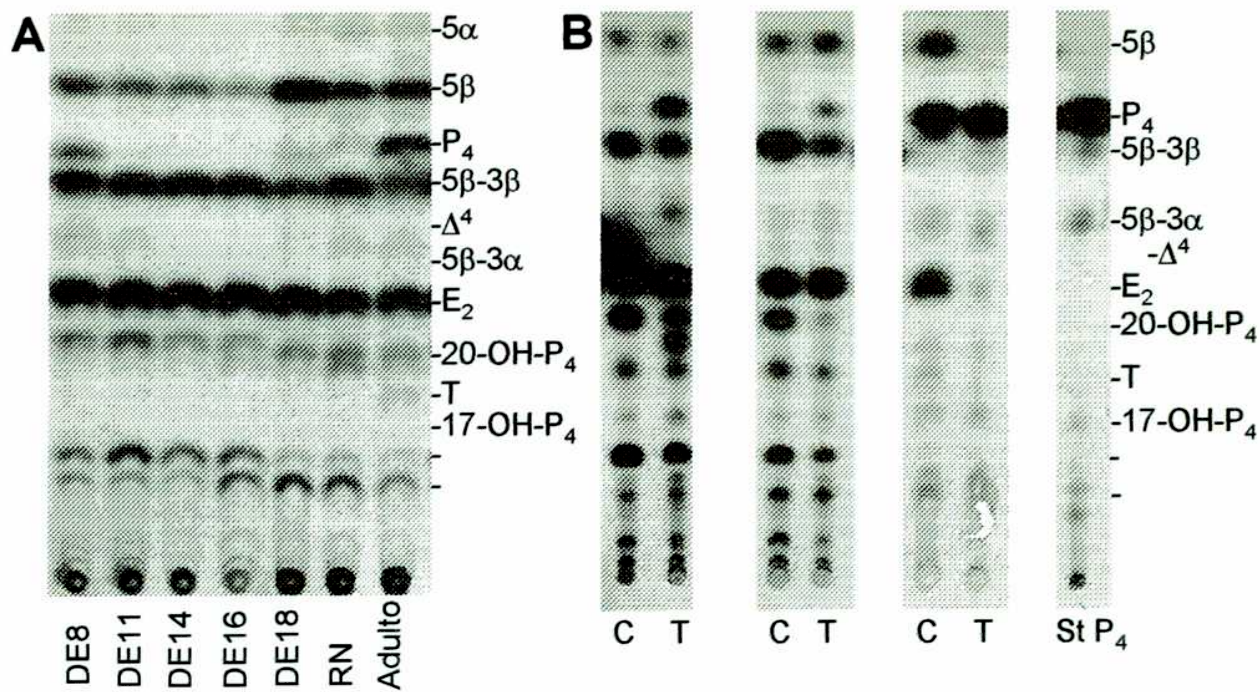
Para corroborar que la 5 β -reducción es también la actividad enzimática más importante en el lóbulo óptico *in vivo*, se practicó una abertura en la cáscara como se describe en Materiales y Métodos, punto 3.2. y se inyectó 0,22 μ g de [¹⁴C]progesterona (aproximadamente 75.000 cpm) en dicho órgano con una microjeringa a embriones de 12 días y se prosiguió con la incubación por 6 horas. Los lóbulos ópticos fueron disecados y los esteroides extraídos y procesados como se describió anteriormente. Los resultados de la Figura 15C revelan, al igual que en los experimentos *in vitro*, que la [¹⁴C]progesterona es metabolizada a 5 β -pregnandiona al ser incubada con lóbulos ópticos de pollo *in vivo*, sin embargo, no pudieron observarse los otros metabolitos de la progesterona probablemente debido a la difusión de este compuesto de dicho órgano. Incubaciones más prolongadas no permitieron observar más metabolitos.

3.2. Medición del contenido endógeno de progesterona y testosterona en el lóbulo óptico

Los resultados expuestos hasta el momento indican que la progesterona incubada con el lóbulo óptico es metabolizada al esteroide neuroactivo epipregnanolona, el cual es un modulador alostérico débil del receptor GABA_A, con características de agonista parcial de su sitio de reconocimiento, siendo su síntesis *in vivo* dependiente de la presencia endógena de progesterona en dicha estructura. Además, la enzima 5 β -reductasa, responsable de esta conversión, es capaz de usar como sustrato a la testosterona.

A fin de confirmar que metabolitos estarán presentes en el lóbulo óptico se midió el contenido endógeno de progesterona y testosterona como se describe en Materiales y Métodos. Mediciones preliminares determinaron valores de progesterona de 1,98; 0,78 y 0,43 ng/g tejido fresco en el lóbulo óptico, cerebro y cerebelo y 1,71 ng/ml en sangre. Los niveles de testosterona fueron en todos los casos menores que la sensibilidad funcional del método por lo que se informaron inferiores al menor estándar utilizado para calibrar el método (testosterona <0,1 ng/g. tejido fresco). Esto indicaría junto con las actividades enzimáticas demostradas, que podría existir en el lóbulo óptico altos niveles

Figura 15: *Metabolismo in vitro e in vivo de la [¹⁴C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo*



de epipregnanolona, y no de metabolitos de testosterona, a concentraciones que pudieran modular endógenamente a los receptores GABA_A. A fin determinar si la epipregnanolona era capaz de modular al receptor GABA_A presente en el lóbulo óptico en desarrollo es que se llevaron cabo los experimentos descritos en el siguiente punto.

3.3. Efecto *in vitro* del metabolito de la progesterona, epipregnanolona, sobre la unión de [³H]flunitrazepam durante el desarrollo del lóbulo óptico

La caracterización del efecto moduladorio *in vitro* de los metabolitos de la progesterona fue restringida al metabolito neuroactivo endógeno de la misma, epipregnanolona, y se llevó a cabo en los mismos estadios en que se estudió su biosíntesis para establecer una correlación entre ésta y sus efectos facilitatorios sobre el receptor GABA_A.

Este neuroesteroide produjo un estimulación de la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas frescas que fue dependiente de la concentración en todos los estadios analizados (Figura 16). El análisis de los datos demostró que el ajuste al modelo de dos sitios no fue significativamente mejor que el ajuste a un sitio, indicando una modulación alostérica positiva de esta unión de un sólo componente.

La Tabla VII resume las concentraciones a las cuales se alcanzó la mitad de la estimulación máxima (CE₅₀) y las potenciaciones máximas (E_{max}) para este esteroide a lo largo de la ontogenia del lóbulo óptico. Los resultados muestran que la epipregnanolona tiene una mayor potencia para modular esta unión en los estadios más tempranos incluyendo al recién nacido y que los mayores aumentos sobre la unión basal se obtienen en el recién nacido, con los menores aumentos en el estadio adulto.

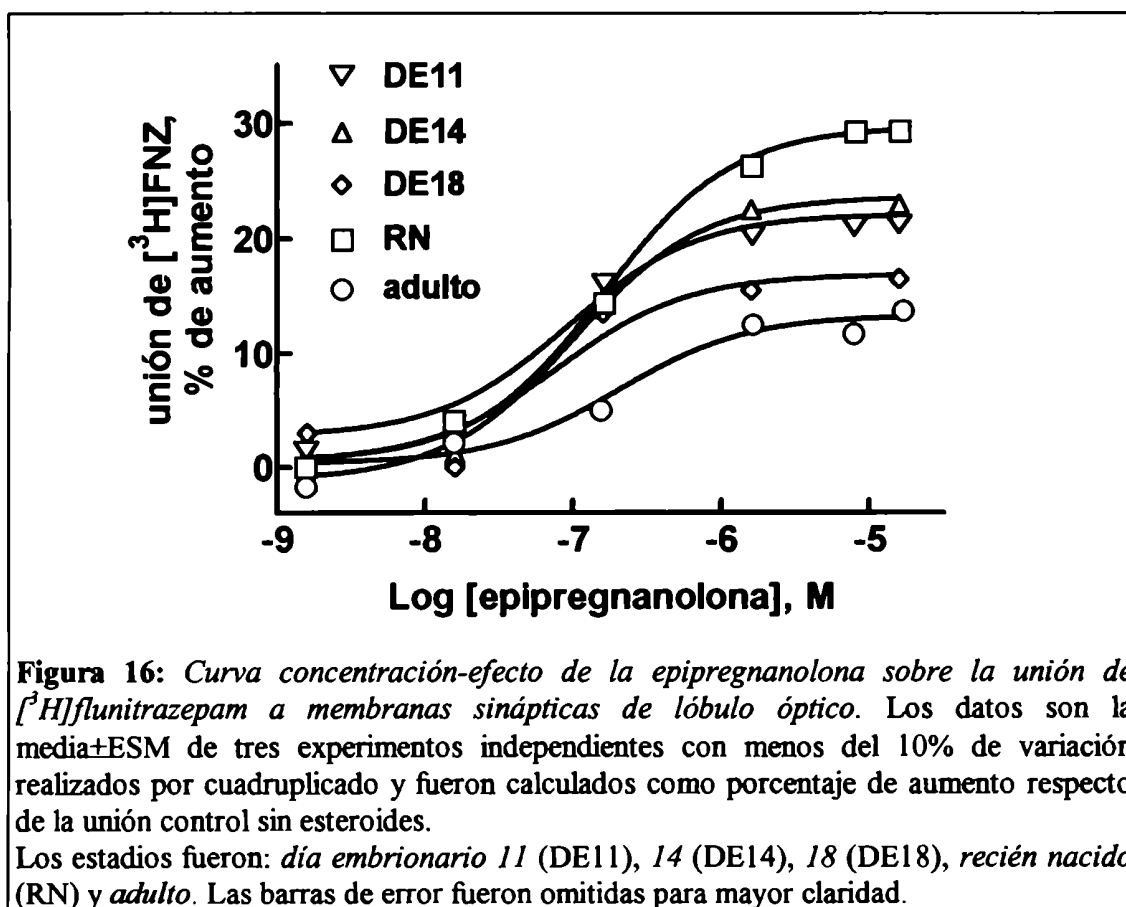
Tabla VII: Valores de CE_{50} y E_{max} de epipregnanolona para modular la unión de [3H]flunitrazepam en diferentes estadios del desarrollo

	CE_{50} (μ M)	E_{max} (% de aumento)
DE11	0,19 \pm 0,05	23 \pm 1,6
DE14	0,10 \pm 0,02 ^a	23 \pm 1,3
DE18	0,09 \pm 0,01 ^a	16 \pm 1,4
RN	0,13 \pm 0,01 ^a	29 \pm 1,2 ^b
Adulto	0,59 \pm 0,16	15 \pm 2,7 ^c

Los datos son la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Los estadios fueron: día embrionario 11 (DE11), 14 (DE14), 18 (DE18), recién nacido (RN) y adulto. El análisis de los mismos se realizó por medio de ANOVA de 1 vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un $p < 0,05$.

^a: significativamente diferente del estadio adulto; ^b: significativamente diferente del DE18;

^c: significativamente diferente del RN.



Como puede observarse en los experimentos de biosíntesis y de modulación *in vitro*, existe una correlación entre los resultados obtenidos, siendo los estadios embrionarios los más sensibles a este efecto facilitatorio de la epipregnanolona coincidiendo justamente con su mayor producción endógena. Estos datos sugieren que este neuroesteroide podría tener alguna función fisiológica durante el desarrollo del lóbulo óptico del pollo, como un modulador endógeno del complejo receptor GABA_A en etapas tempranas. Además, como existe evidencia de que los neuroesteroides tienen también efectos genómicos y que son capaces de alterar la expresión de los genes de las subunidades del receptor GABA_A y afectar su farmacología, la siguiente serie de experimentos tenderá a estudiar los efectos de la administración crónica *in vivo* de epipregnanolona durante el desarrollo embrionario sobre la farmacología y el funcionamiento de este complejo receptor.

4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRONICO *IN OVO* CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A

Con el fin de estudiar el posible rol endógeno del neuroesteroide epipregnanolona, se desarrolló un modelo de administración crónica *in ovo* de drogas a embriones de aves durante su incubación. Este procedimiento consistió en realizar una abertura en la cáscara sobre la zona donde se ubicó la membrana corio-alantoides sin daño en la misma o en los otros anexos embrionarios siguiendo la técnica de Hamburger (1960) modificada por Calkin y col. (1994). Los embriones prosiguieron su incubación, la administración del esteroide se realizó en los días embrionarios 8, 11, 14 y 17 y los experimentos se realizaron en el día embrionario 18. Se eligió este período ya que coincide con las etapas de mayor desarrollo de las estructuras cerebrales y de inervación por parte de los axones de las células ganglionares de la retina. Además, a partir del día embrionario 17 se obtienen los primeros registros en el lóbulo óptico en respuesta a las estimulaciones de la retina y es un momento crítico en el establecimiento de las conexiones sinápticas. Por otro lado, los resultados expuestos demuestran que la síntesis endógena de neuroesteroides al igual que la sensibilidad del receptor GABA_A a estos compuestos es máxima.

4.1. Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre el lóbulo óptico

La epipregnanolona administrada crónicamente en el rango de concentraciones de 15 a 50 μM no produjo ningún efecto en el peso fresco del lóbulo óptico comparado con los embriones tratados con vehículo (Tabla VIII). Además, los experimentos demostraron que no hubo diferencias significativas entre el peso del tejido fresco del lóbulo óptico de huevos intactos (es decir aquellos que no fueron sometidos a ningún tratamiento y fueron solamente incubados) con los de los embriones tratados con vehículo o epipregnanolona, indicando que la abertura en la cáscara del huevo no tuvo ningún efecto evidente. El contenido total de proteínas del lóbulo óptico, como en el

caso del peso del tejido fresco, no mostró diferencias entre embriones intactos, tratados con vehículo y tratados con esteroide (Tabla VIII).

Tabla VIII: Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre el peso del tejido fresco y el contenido total de proteína del lóbulo óptico

tratamiento	peso del tejido fresco (mg)	contenido de proteína (µg/lóbulo óptico)
ninguno	72±11	742±25
tratados crónicamente con:		
vehículo	97±21	834±49
epipregnanolona 15 µM	77±5	892±31
20 µM	85±7	783±57
30 µM	80±3	846±48
50 µM	71±4	775±147

Los datos son la media±ESM de al menos tres experimentos realizados por cuadruplicado. La concentración de epipregnanolona fue calculada asumiendo que el volumen total del huevo fue accesible al esteroide. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía.

Como se describió en la Introducción, el GABA_A y los agonistas GABAérgicos provocan despolarización en neuronas inmaduras (Cherubini y col., 1991; Barker y col., 1998), afectando la diferenciación y el crecimiento de las mismas (Segal, 1993). Por otro lado, se sabe que la alopregnanolona es capaz de alterar la citoarquitectura de neuronas de hipocampo en cultivo, efecto que fue iniciado por un influjo de Cl⁻ (Brinton, 1994).

A fin de investigar si el tratamiento crónico con epipregnanolona indujo alguno de estos efectos, se llevaron a cabo estudios morfológicos del tectum óptico con la técnica histológica de tinción con hematoxilina-eosina, los que demostraron que la

compleja citoarquitectura de este órgano permaneció inalterada luego del tratamiento (Figura 17).

Por último, los estudios inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo monoclonal anti GABA, revelaron que no hubo cambios en la inmunorreactividad del lóbulo óptico para este neurotransmisor, ni en la morfología de las neuronas GABAérgicas en ninguna de las dos áreas representativas del lóbulo óptico estudiadas, el tectum óptico y el núcleo ístmico (Figura 18 y 19).

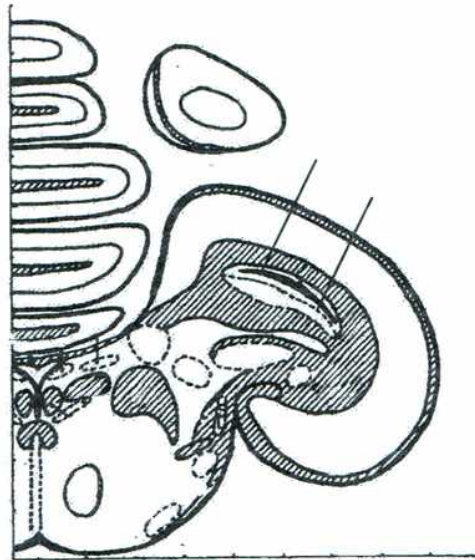
De los resultados hasta ahora expuestos se puede deducir que el tratamiento crónico con epipregnanolona no produjo cambios a niveles morfológico (histológico) ni inmunocitológico sobre el lóbulo óptico.

Figura 17: *Estudio de la histología del tectum óptico luego de tratamiento crónico con epipregnanolona*

Figura 17: Estudio de la histología del tectum óptico luego de tratamiento crónico con epipregnanolona. La foto muestra cortes del tectum óptico de 10 μm de espesor teñidos con hematoxilina-eosina provenientes de embriones tratados crónicamente con vehículo (foto A) y con 30 μM de epipregnanolona (foto B).

Las capas del tectum óptico son las siguientes: *SO*, estrato óptico; *SGFS*, estrato gris y fibroso superficial con las subláminas de "a" - "j"; *SGC*, estrato gris central; *SAC*, estrato blanco central; *SGP*, estrato gris periventricular; *SFP*, estrato fibroso periventricular; *Ep*, epitelio endimario; *V*, ventrículo.

Magnificación 120X. En el esquema se indica la zona fotografiada.



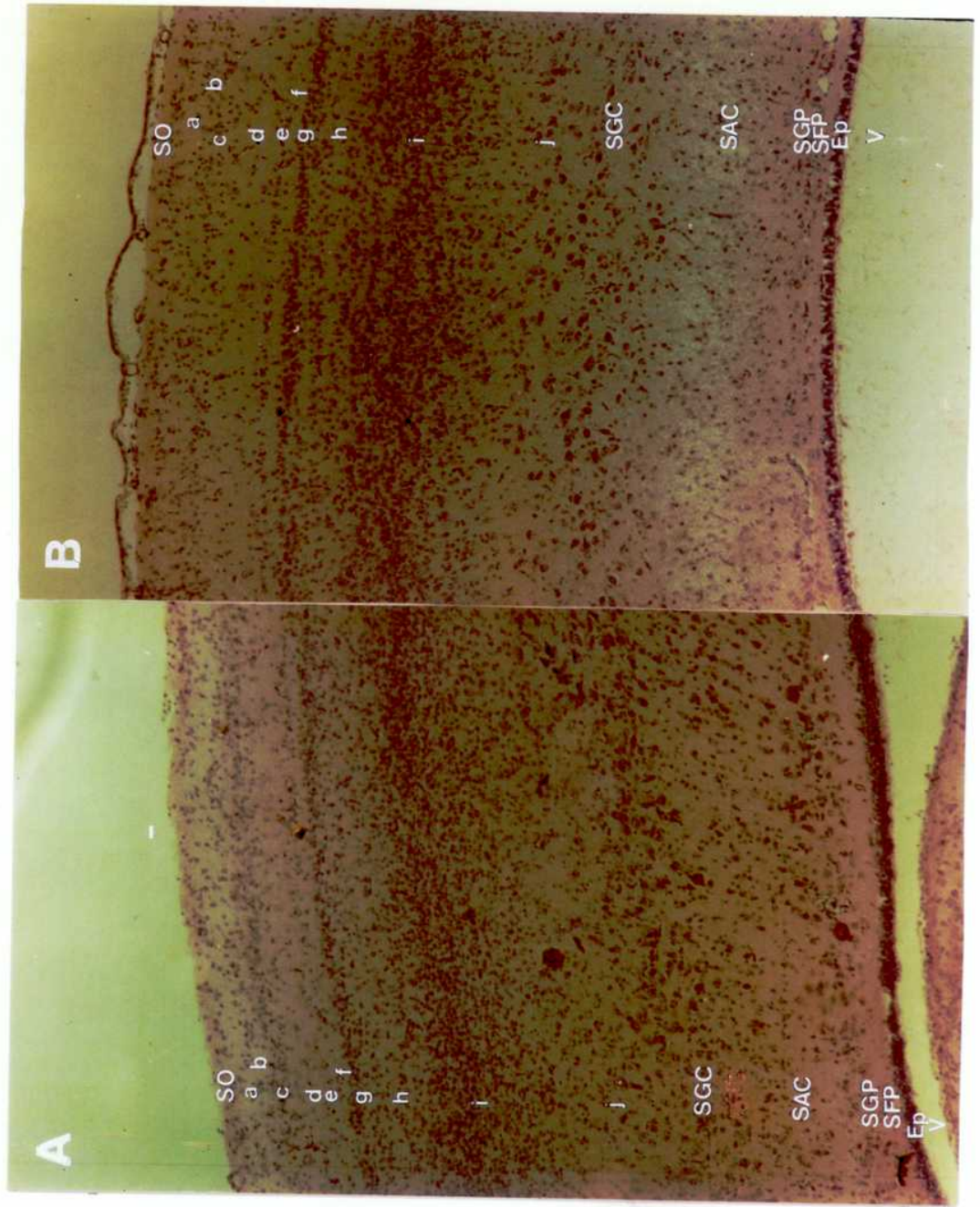
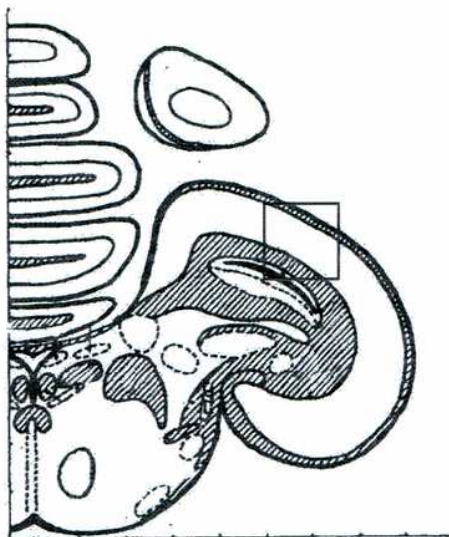


Figura 18: *Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en el tectum óptico*

Figura 18: *Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en el tectum óptico.* En las fotos se muestran neuronas de la zona cortical del tectum óptico provenientes de embriones tratados con vehículo (foto A) y con 30 μ M de epipregnanolona (foto B) con inmunotinción positiva para el neurotransmisor GABA.

Magnificación 400X. En el esquema se indica la zona fotografiada.



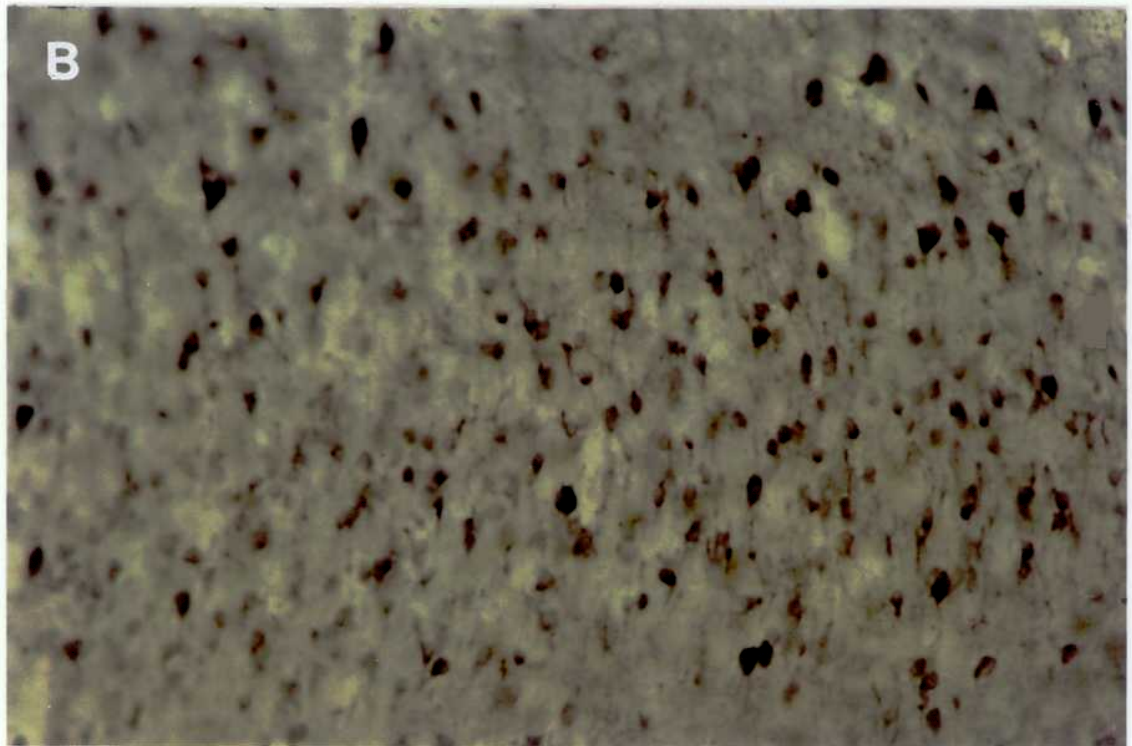
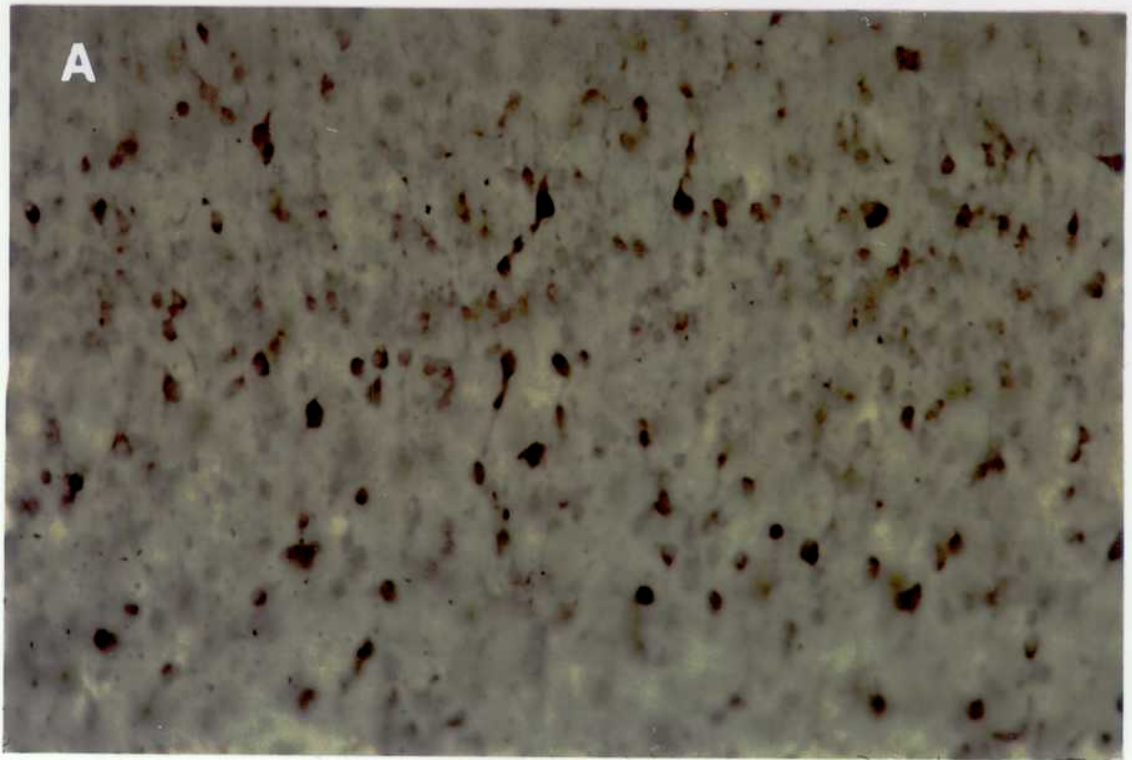
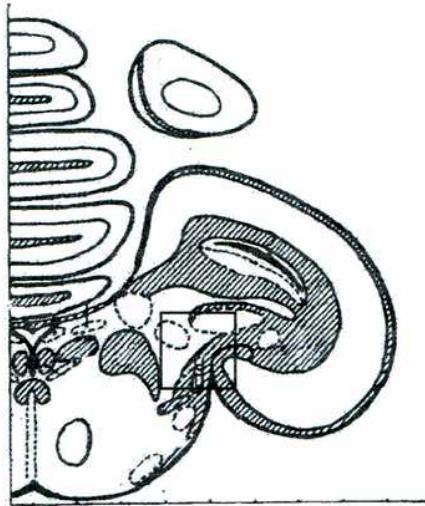
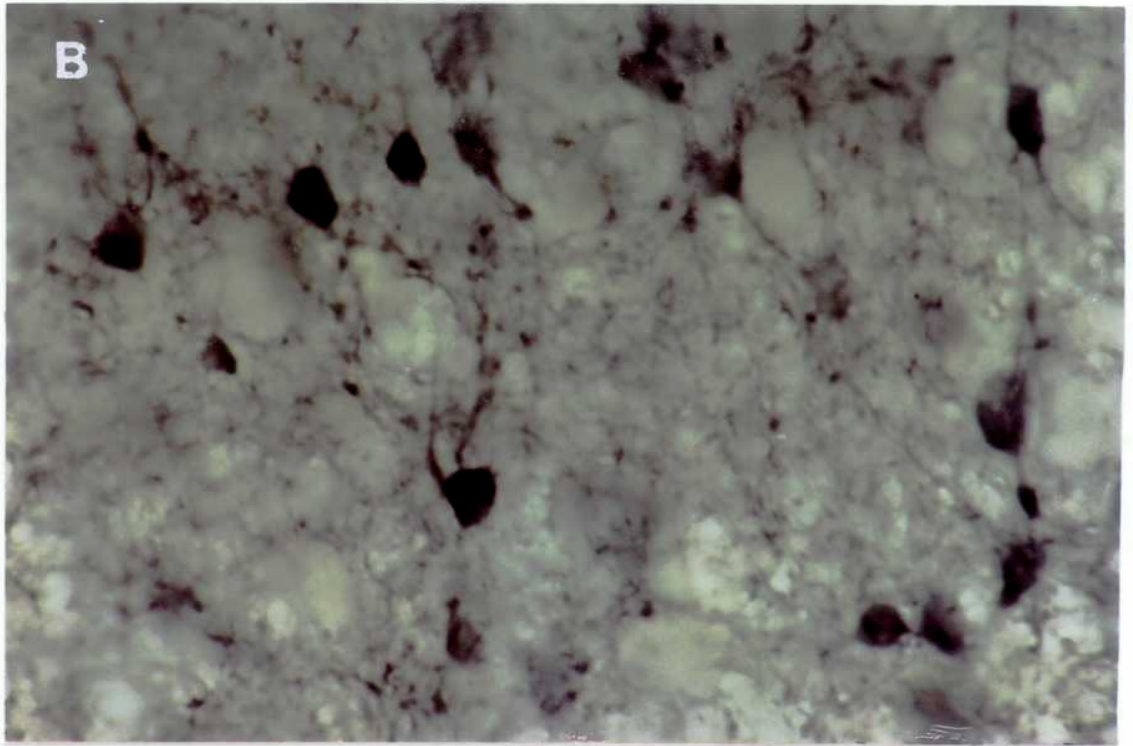
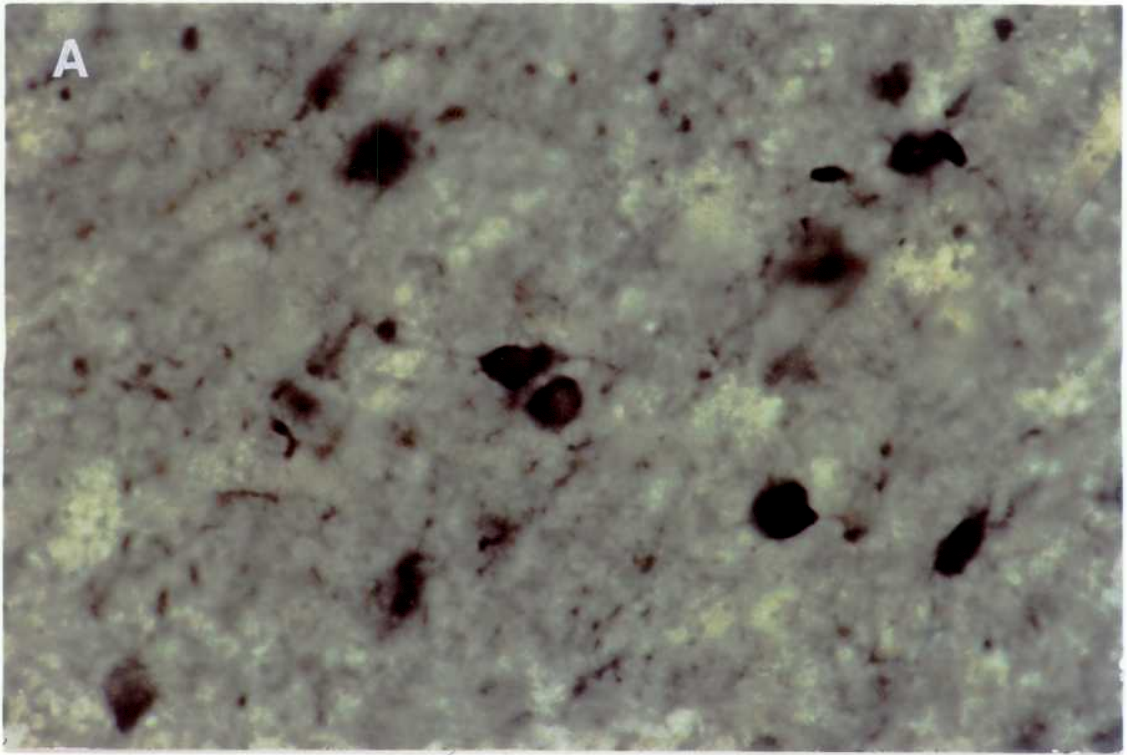


Figura 19: *Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en la zona del núcleo ístmico del lóbulo óptico*

Figura 19: *Estudio inmunocitoquímico del neurotransmisor GABA en la zona del núcleo ístmico del lóbulo óptico.* En las fotos se muestran neuronas del núcleo ístmico provenientes de embriones tratados con vehículo (foto A) y con 30 μM de epipregnanolona (foto B) con inmunotinción positiva para el neurotransmisor GABA.
Magnificación 1000X. En el esquema se indica la zona fotografiada.





4.2. Efecto de la administración crónica de neuroesteroide sobre la unión de [³H]flunitrazepam

Se estudió la unión control específica de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico de pollo. La Tabla IX muestra que la epipregnanolona en el rango de concentraciones usada no afectó la unión basal de [³H]flunitrazepam. Como en el caso del peso del tejido fresco y el contenido proteico total, los embriones intactos en el mismo estadio de desarrollo presentaron valores de unión de [³H]flunitrazepam similares. Sin embargo, el efecto estimulador de la alopregnanolona sobre la unión de [³H]flunitrazepam fue reducido por la administración crónica de epipregnanolona en forma dependiente de la dosis usada. La Figura 20 muestra el desacoplamiento alostérico homólogo de la potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam por alopregnanolona inducido por la epipregnanolona. Este desacoplamiento se calculó como la reducción de la potenciación producida por 4 μ M de alopregnanolona sobre la unión de [³H]flunitrazepam a membranas tratadas con epipregnanolona, respecto de la potenciación obtenida con esa misma concentración en membranas tratadas con vehículo ($82,15 \pm 6,75\%$ de aumento de la unión basal). Se consideró, usando la definición adoptada en trabajos previos, al desacoplamiento entre un par de sitios como **homólogo** cuando éste efecto fue inducido por el tratamiento crónico con una droga que actúa sobre alguno de los dos sitios acoplados y **heterólogo**, cuando fue producido por una droga que actúa a través de un sitio diferente (Friedman y col., 1993, 1996). El desacoplamiento homólogo de la interacción alostérica entre los sitios moduladores benzodiazepínicos y neuroesteroideos ocurrió en un rango de concentraciones de epipregnanolona de 20 a 50 μ M. Concentraciones menores de este neuroesteroide fueron ineficaces para inducir un efecto estadísticamente significativo. De acuerdo a estos resultados, 30 μ M de epipregnanolona se usaron en los siguientes experimentos ya que esta concentración produjo un desacoplamiento máximo ($54,30 \pm 3,68\%$).

El desacoplamiento fue calculado según reportes previos (Friedman y col., 1993, 1996):

$$\% \text{ de desacoplamiento} = \frac{\% \text{ potenc. de membranas tratadas con vehiculo} - \% \text{ potenc. de membranas trat. con epipregnanolona}}{\% \text{ potenc. de membranas tratadas con vehiculo}} \times 100$$

La potenciación de la membranas tratadas se refiere al efecto estimulador de 4 μM de alopregnanolona sobre la unión de [^3H]flunitrazepam a membranas crónicamente tratadas con epipregnanolona.

El inserto fue analizado estadísticamente por test *t* de Student ($^a\text{P}<0,001$). El resto del análisis fue ANOVA de 1 vía ($^a\text{P}<0,001$; $^b\text{P}<0,05$).

Para caracterizar la naturaleza de este efecto, se realizaron curvas concentración-efecto de la alopregnanolona sobre unión de [^3H]flunitrazepam a membranas sinápticas obtenidas de embriones tratados con vehiculo y con 30 μM de epipregnanolona. Los datos en la Figura 21, resumidos en la Tabla X, indican que la administración crónica de este neuroesteroide produjo una moderada pero estadísticamente significativa reducción de los valores de CE_{50} y E_{max} de la alopregnanolona.

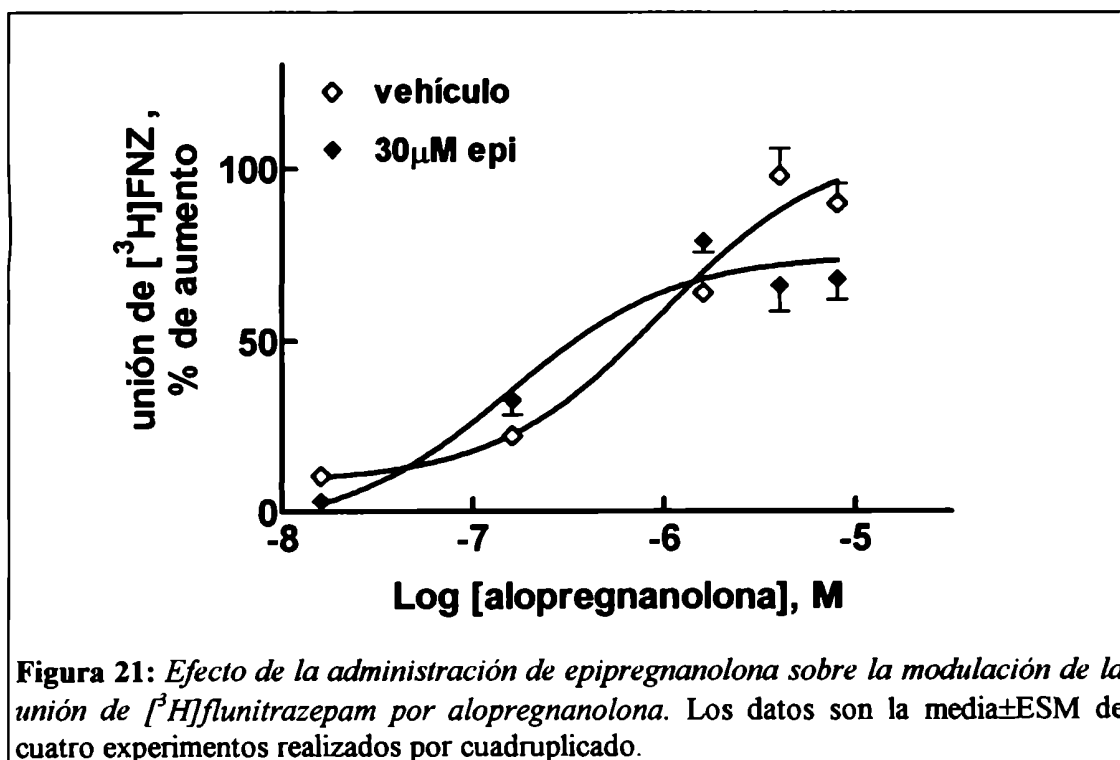


Tabla X: Efecto del tratamiento crónico sobre los valores de CE_{50} y E_{max} de alopregnanolona para modular la unión de [3H]flunitrazepam

	CE_{50} (μM)	E_{max} (% de aumento)
vehículo	1,09 \pm 0,00	96,25 \pm 6,93
30 μM epi	0,30 \pm 0,10 ^a	74,03 \pm 5,20 ^b

Los datos son la media \pm ESM de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado. ^aP<0,005, ^bP<0,05 comparado con el grupo tratado con vehículo por el test *t* de Student.

El análisis de regresión no-lineal de las isotermas de unión a saturación revelaron que la constante de disociación (K_d) y el número máximo de sitios de unión del flunitrazepam (B_{max}) no fueron afectados por el tratamiento crónico con el neuroesteroide (Figura 22 y Tabla XI) indicando que los sitios receptores benzodiazepínicos *per se* no son responsables de los cambios observados.

Tabla XI: Efecto del tratamiento con epipregnanolona sobre la constante de disociación (K_d) y número máximo de sitios de unión (B_{max}) del flunitrazepam

	K_d (nM)	B_{max} (pmol/mg prot)
vehículo	16,54 \pm 0,65	2,50 \pm 0,16
30 μM epi	18,14 \pm 2,11	2,35 \pm 0,17

Los datos son la media \pm ESM de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Los experimentos de saturación se realizaron con concentraciones de ligando de 1 a 60 nM. Los datos fueron analizados por el test *t* de Student.

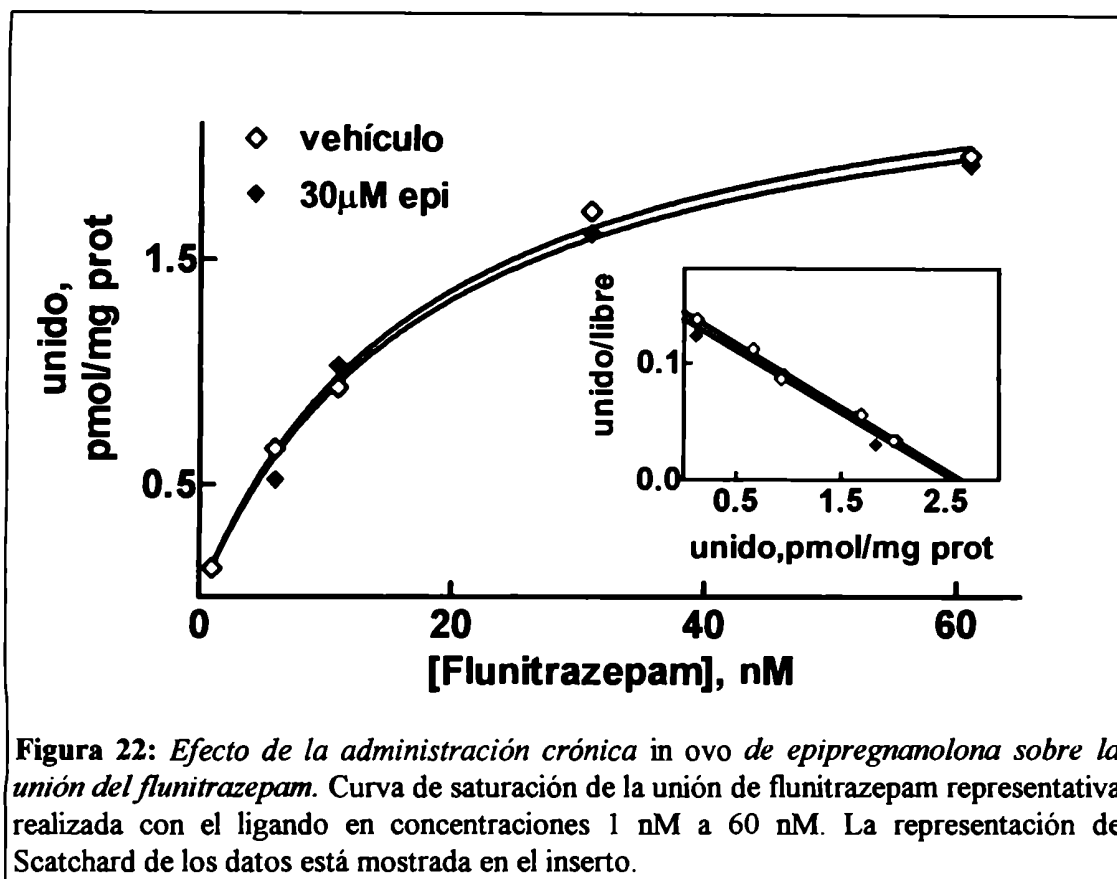


Figura 22: Efecto de la administración crónica *in ovo* de epipregnanolona sobre la unión del flunitrazepam. Curva de saturación de la unión de flunitrazepam representativa realizada con el ligando en concentraciones 1 nM a 60 nM. La representación de Scatchard de los datos está mostrada en el inserto.

4.3. Efecto del tratamiento crónico *in ovo* con 30 μM de epipregnanolona sobre la unión de [³H]GABA

En nuestro laboratorio hemos demostrado que las benzodiazepinas, los barbitúricos y los neuroesteroides son capaces de modular la unión de [³H]GABA al complejo receptor GABA_A presente en las membranas sinápticas del lóbulo óptico (Fischer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990; Fischer de Plazas y col., 1995; Viapiano y Fischer de Plazas, 1998; Viapiano y col., 1998). Para caracterizar los efectos de epipregnanolona luego de su administración crónica *in ovo* sobre las interacciones alostéricas de este receptor, se estudió entonces la modulación de la unión de [³H]GABA al sitio de unión de baja afinidad por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico. De la misma forma que antes, el tratamiento crónico produjo un desacoplamiento

homólogo entre los sitios moduladores esteroideos y los sitios de unión de GABA (Figura 23A y Tabla XII). La administración de este esteroide endógeno redujo marcadamente el E_{max} de la alopregnanolona e incrementó moderadamente su CE_{50} . Respecto de la modulación del diazepam, su CE_{50} fue significativamente aumentada luego de la administración crónica en comparación con los embriones tratados con vehículo, y también lo fue su E_{max} (Figura 23B y Tabla XII), sugiriendo que la exposición de los embriones a 30 μ M de este esteroide endógeno ejerce también efectos heterólogos en el acoplamiento alostérico entre los sitios receptores de GABA y benzodiazepinas.

La curva concentración-efecto del pentobarbital sódico fue bifásica con dos componentes de aumento de la unión de [3 H]GABA a las membranas tratadas con vehículo en forma similar a lo previamente observado (Fischer de Plazas y col., 1995) indicando sitios moduladores de alta y baja afinidad (CE_{501} , 24,80 \pm 10,21 nM; CE_{502} , 0,59 \pm 0,11 mM, respectivamente). Excepto por la reducción en el valor de CE_{502} , la epipregnanolona no produjo ningún efecto sobre el E_{max} de esta modulación (Figura 23C y Tabla XII).

Tabla XII: Efecto de la exposición crónica a epipregnanolona sobre los valores de CE_{50} y E_{max} de la modulación de la unión de [3 H]GABA por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico

<u>alopregnanolona</u>	CE_{50} (μ M)		E_{max} (% de aumento)
vehículo	0,14 \pm 0,01		78,49 \pm 9,46
30 μ M epi	0,24 \pm 0,01 ^c		50,95 \pm 3,02 ^b
<u>diazepam</u>	CE_{50} (nM)		E_{max} (% de aumento)
vehículo	5,31 \pm 0,70		38,13 \pm 1,18
30 μ M epi	21,53 \pm 3,35 ^a		59,56 \pm 3,44 ^a
<u>pentobarbital sódico</u>	CE_{501} (nM)	CE_{502} (mM)	E_{max} (% de aumento)
vehículo	24,80 \pm 10,21	0,59 \pm 0,11	160,20 \pm 13,33
30 μ M epi	18,25 \pm 9,04	0,06 \pm 0,00 ^b	183,75 \pm 23,07

Los datos son la media \pm ESM de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado. ^aP<0,005; ^bP<0,05; ^cP<0,01 comparado con el grupo tratado con vehículo por el test *t* de Student.

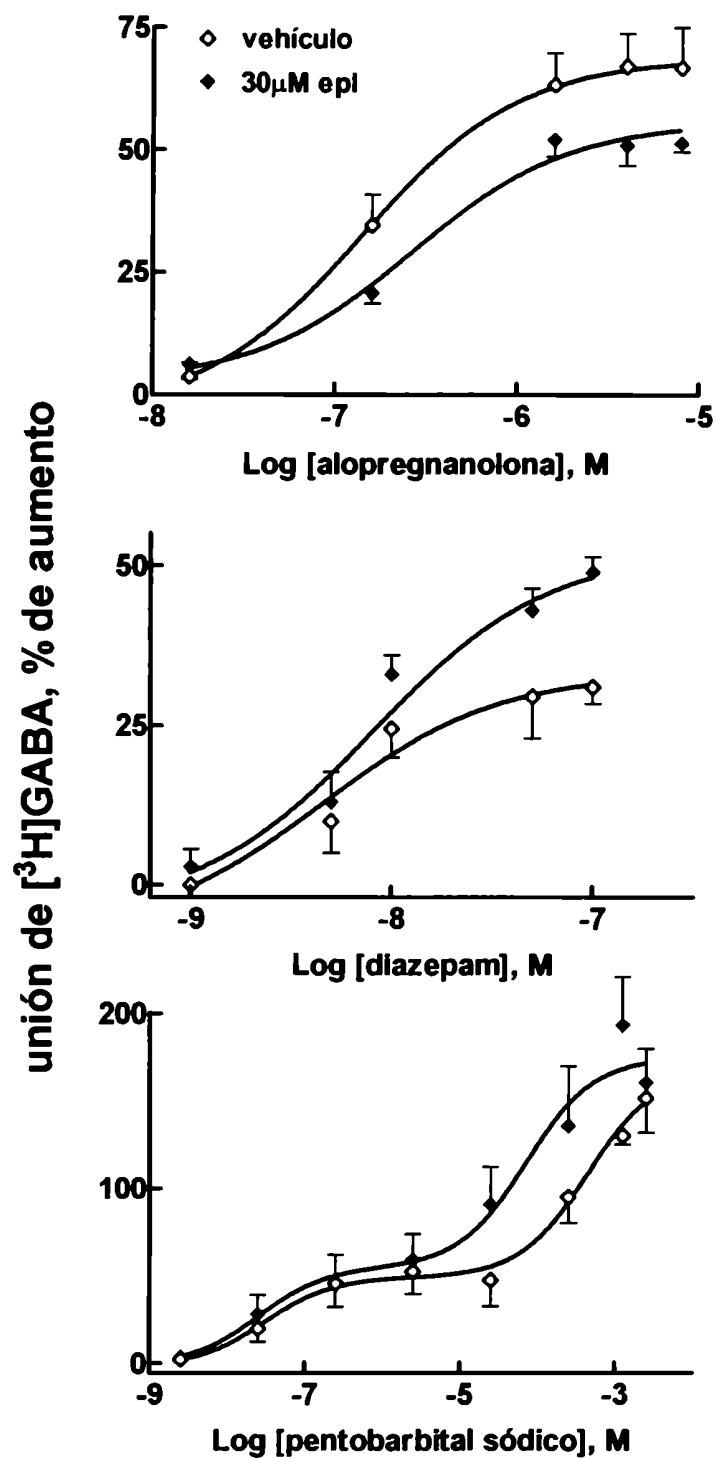


Figura 23: Efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre la modulación de la unión de [3 H]GABA por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico. Los datos son la media \pm ESM de cuatro determinaciones realizadas por cuadruplicado.

Los experimentos de saturación de unión revelaron que ni la K_d , ni el B_{max} del GABA fueron afectados por la administración de 30 μM de epipregnanolona (Figura 24 y Tabla XIII). Este resultado, además asegura que no hubo esteroide residual en las membranas sinápticas, ya que en trabajos previos hemos demostrado que la epipregnanolona agregada *in vitro* aumenta la afinidad del GABA a las membranas sinápticas (Viapiano y Fiszer de Plazas, 1997, 1998).

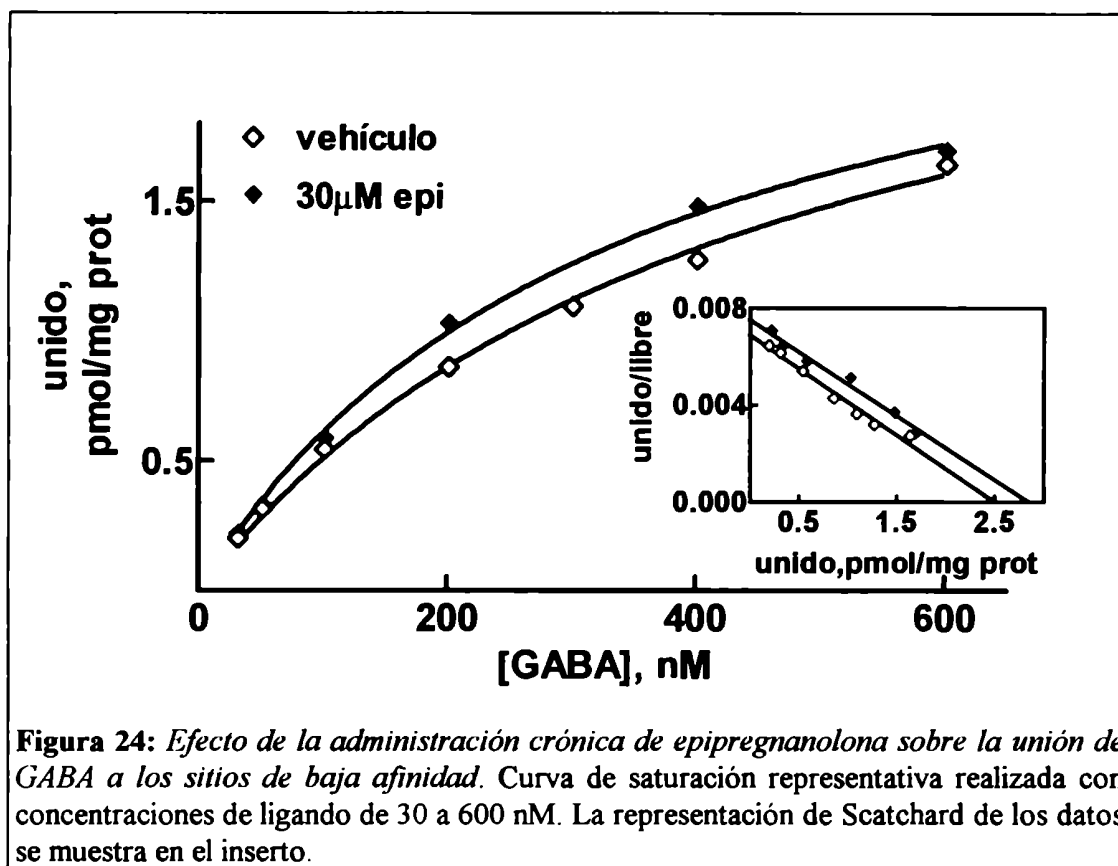


Figura 24: Efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre la unión de GABA a los sitios de baja afinidad. Curva de saturación representativa realizada con concentraciones de ligando de 30 a 600 nM. La representación de Scatchard de los datos se muestra en el inserto.

Tabla XIII: Efecto del neuroesteroide endógeno sobre la constante de disociación (K_d) y número máximo de sitios de unión (B_{max}) de GABA de baja afinidad

	K_d (nM)	B_{max} (pmol/mg prot)
vehículo	413,00±38,97	3,02±0,26
30 μM epi	427,83±34,37	3,15±0,18

Los datos son la media±ESM de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Los datos fueron analizados por test *t* de Student.

4.4. Efecto de la administración de 30 μM de epipregnanolona sobre la captación de Cl^- inducida por GABA

A fin de investigar los efectos de este tratamiento sobre los aspectos funcionales de la neurotransmisión GABAérgica, se midió la captación del ion $^{36}\text{Cl}^-$ inducida por GABA en una preparación de microsacos aislada del lóbulo óptico.

El influjo basal de Cl^- en ausencia de GABA no fue afectado por este neuroesteroide. En embriones tratados con vehículo, el GABA produjo un aumento de la captación de Cl^- dependiente de la concentración con una CE_{50} de $21,45 \pm 4,44 \mu\text{M}$ y una captación máxima de $49,53 \pm 3,70\%$ (Figura 25 y Tabla XIV). La exposición a epipregnanolona produjo una reducción estadísticamente significativa del E_{max} del GABA para inducir la captación de Cl^- . Considerando que ni la K_d , ni el B_{max} de la unión del GABA al sitio de baja afinidad fueron afectados por este tratamiento, entonces este último resultado indica que la administración crónica *in ovo* de epipregnanolona reduce la eficacia del GABA para inducir las respuestas funcionales mediadas por el receptor en el lóbulo óptico en desarrollo sin modificar las características de unión del ligando.

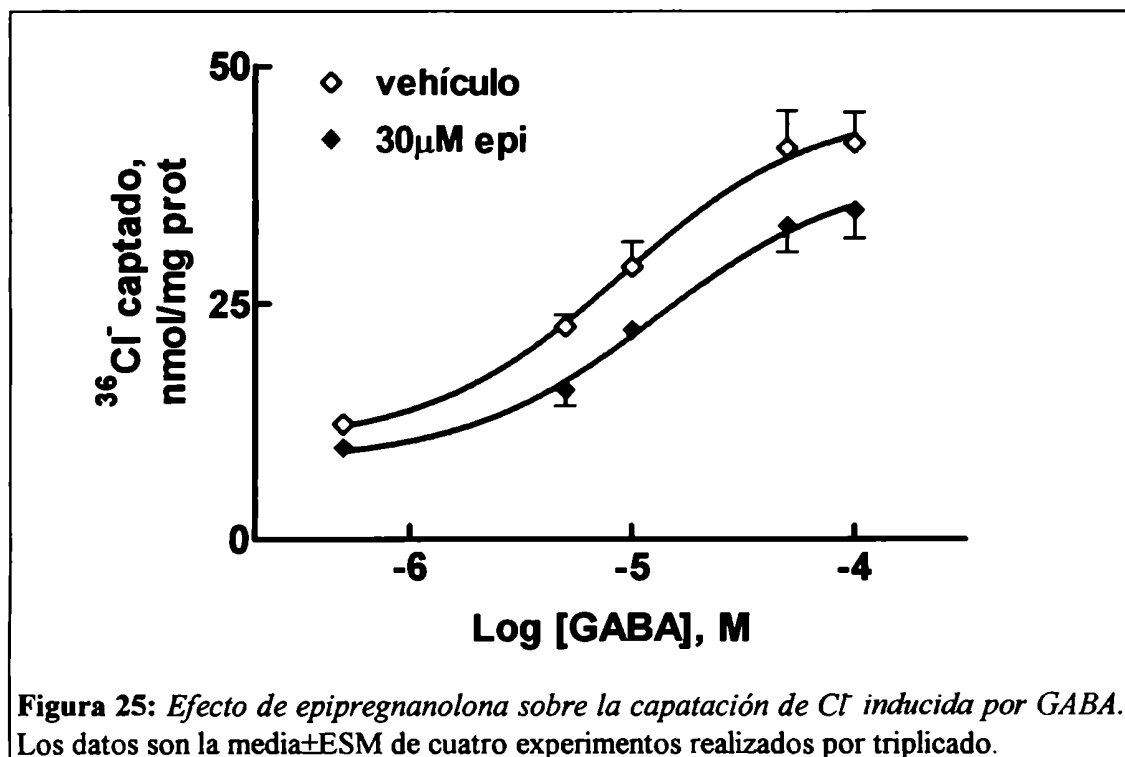


Figura 25: Efecto de epipregnanolona sobre la captación de Cl^- inducida por GABA. Los datos son la media \pm ESM de cuatro experimentos realizados por triplicado.

Tabla XIV: Efecto del tratamiento crónico con epipregnanolona sobre la captación de Cl⁻ inducida por GABA

	CE ₅₀ (μ M)	captación máxima de Cl ⁻ (nmol/mg. prot.)
vehículo	21,45 \pm 4,44	49,53 \pm 3,70
30 μ M epi	13,09 \pm 3,28	37,08 \pm 2,62 ^a

Los datos son la media \pm ESM de cuatro experimentos realizados por triplicado.

^aP<0,005 comparado con el grupo control por el test *t* de Student.

Esta última serie de experimentos demostró que la administración crónica del esteroide endógeno, epipregnanolona redujo el acoplamiento alostérico entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas con los sitios moduladores esteroideos. Además, este compuesto, produjo efectos facilitatorios de la interacción alostérica entre los sitios receptores GABAérgicos y los sitios moduladores benzodiazepínicos y de barbitúricos. Por último, la administración crónica de este esteroide endógeno redujo la eficacia del GABA para inducir la captación de Cl⁻ en una preparación de microsacos, lo que indica que las respuestas funcionales del GABA mediadas por el receptor GABA_A se verán afectadas. Por otro lado, no se vieron efectos evidentes de este tratamiento sobre la morfología del lóbulo óptico, ni sobre los sitios receptores de GABA y benzodiazepinas, sugiriendo que los efectos de la epipregnanolona son específicos.

DISCUSION

1. MODULACION DEL RECEPTOR GABA_A POR NEUROESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES EN DESARROLLO

1.1. Ontogenia de la modulación neuroesteroidea del complejo receptor GABA_A

Ha sido ampliamente demostrado que los neuroesteroides son capaces de modular al complejo receptor GABA_A presente en las membranas sinápticas aisladas de mamíferos adultos, en particular ratas. En la presente Tesis se ha demostrado que los neuroesteroides también modulan positivamente al receptor GABA_A presente en las membranas sinápticas de aves y aun más, que dicha modulación es mayor en los estadios tempranos del desarrollo (DE14). Las curvas concentración-efecto de unión de [³H]flunitrazepam moduladas por alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona presentaron un sólo componente de aumento lo que nos permite postular la existencia de un sitio de reconocimiento homogéneo para estos compuestos o sitios con idéntica afinidad indistinguibles por estas drogas (Figura 8).

Trabajos previos han demostrado que la alopregnanolona potencia la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas de corteza cerebral de rata adulta con CE₅₀ de 300-500 nM (Harrison y col., 1987), 126±10 nM (Prince y Simmonds, 1993) y 101±11 nM (Hawkinson y col., 1994), según diferentes trabajos. En esta Tesis se obtuvieron valores de CE₅₀ de alopregnanolona en el SNC de las aves (Tabla III) mayores que los reportados en los mamíferos. Por otro lado, a pesar que la alopregnanolona es menos potente en la aves que en los mamíferos, su eficacia fue considerablemente mayor (E_{max} de 89±10,1% vs. 44,52±2,18% (Prince y Simmonds, 1993) y 58±8% (Hawkinson y col., 1994)). Lamentablemente no hay trabajos disponibles acerca de la modulación neuroesteroidea del receptor GABA_A realizados durante la ontogenia del SNC de mamíferos para poder comparar los resultados obtenidos en el DE14 y el RN.

El análisis estadístico de las eficacias de los neuroesteroides alopregnanolona y alotetrahidrodesoxicorticosterona reveló que las mismas varían a lo largo del desarrollo pero que no presentan diferencias significativas entre ellas para un mismo estadio. También se observa que en el RN y el adulto, la alopregnanolona resultó ser más potente que la alotetrahidrodesoxicorticosterona para modular la unión de [³H]flunitrazepam (Tabla III), lo que concuerda con reportes previos donde se demostró que la CI_{50} (concentración que produce la mitad de la inhibición máxima) para desplazar la unión del [³⁵S]TBPS y la concentración mínima efectiva en experimentos electrofisiológicos fueron de 275 ± 29 y 100 nM vs. 480 ± 79 y 300 nM para la alopregnanolona y la alotetrahidrodesoxicorticosterona, respectivamente (Harrison y col., 1987).

Respecto del mecanismo de acción de estos neuroesteroides para potenciar la unión del [³H]flunitrazepam a las membranas sinápticas de aves, las curvas de saturación mostraron que este efecto se debió a un aumento de la afinidad aparente del ligando por su sitio receptor sin cambios significativos en el número máximo de sitios de unión (Figura 9 y Tabla IV). Esto fue observado en todos los estadios estudiados sugiriendo que el mecanismo de acción de estos compuestos es el mismo durante la ontogenia. Resultados similares se han obtenido con ratas adultas (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987; Giusti y col., 1993), lo que indica que no sólo la modulación neuroesteroidea, sino además el mecanismo de acción farmacológico parecen haberse conservado entre las dos clases evolutivamente más cercanas de subfilo de los vertebrados, las aves y los mamíferos.

La validez de los resultados obtenidos para predecir la actividad de los neuroesteroides sobre el funcionamiento del receptor $GABA_A$ se ve apoyada por un trabajo que indica que existe una muy buena correlación entre el aumento de la amplitud del pico de la corriente evocada por GABA en oocitos de *Xenopus* que expresan el receptor $GABA_A$ humano ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 2 L$) y la potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas de corteza de rata por 300 nM y 1 μ M de esteroide, con coeficientes de correlación de $0,93$ y $0,94$, respectivamente (Hawkinson y col., 1994b). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la alopregnanolona también

potencia la unión del neurotransmisor ($[^3\text{H}]\text{GABA}$) a las membranas sinápticas del lóbulo óptico (Viapiano y col., 1998; Viapiano y Fiszer de Plazas, 1998).

Respecto de la influencia del solvente usado para disolver a los esteroides, cabe aclarar que el efecto estimulador de la unión de $[^3\text{H}]\text{flunitrazepam}$ observado es improbable que sea debido al etanol, el cual estuvo presente en todos los tubos en igual concentración molar ($171\ \mu\text{M}$, 1% v/v), ya que hemos visto que esa concentración de etanol no afecta la unión basal de este ligando (Pignataro y col., 1996). En concordancia, otros investigadores reportaron que concentraciones de etanol de hasta 40 mM (200 veces mayor que la utilizada por nosotros) no modificaron las corrientes de Cl^- evocadas por GABA en experimentos electrofisiológicos (Harrison y col., 1987). Por lo tanto, consideramos que los efectos estimuladores *in vitro* de los neuroesteroides presentados en la presente Tesis son exclusivamente debidos a estos compuestos y no al solvente en que fueran disueltos.

1.2. Bases moleculares de las variaciones farmacológicas de los receptores GABA_A a lo largo del desarrollo

El GABA está presente en el SNC durante la embriogénesis muy temprana donde no sólo ejerce sus funciones como neurotransmisor, sino como un factor para el crecimiento, desarrollo y diferenciación neuronal. Se ha establecido que la presencia de GABA extracelular durante el desarrollo temprano fortalece la formación de sinapsis y aumenta la expresión de los receptores GABA_A . El mecanismo de estas acciones involucra la activación de receptores GABA_A pre-existentes, por lo tanto, es muy probable que estos efectos neurotróficos y neurodiferenciadores del GABA estén asociados con algún receptor GABA_A particular con una farmacología determinada presente preferentemente en estadios tempranos del desarrollo del SNC (Schousboe y Redburn, 1995). Estudios con receptores recombinantes han establecido que el funcionamiento y la farmacología del receptor GABA_A depende de su composición de subunidades (Lüdens y Wisden, 1991; Olsen y Tobin, 1990).

Efectivamente, los datos presentados en esta Tesis indican la presencia de receptores GABA_A con una farmacología diferencial para la modulación neuroesteroidea a lo largo del desarrollo. En particular, se ha demostrado que el receptor GABA_A presente en estadios tempranos del lóbulo óptico en desarrollo es significativamente más sensible al efecto potenciador de los neuroesteroides.

Los primeros trabajos que investigaron la influencia de la composición de subunidades de este receptor sobre la modulación neuroesteroidea fueron llevados a cabo en oocitos de *Xenopus* y demostraron que la expresión de las combinaciones binarias $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ fueron más sensibles que la $\alpha 2\beta 1$ a la modulación por alopregnanolona de las corrientes de Cl⁻ evocadas por GABA, mientras que la presencia de la subunidad $\gamma 2$ aumentó la potencia de este esteroide sólo en las combinaciones $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$, pero no en la $\alpha 3\beta 1$ (Shingai y col., 1991). Un trabajo similar reveló que la introducción de las subunidades $\beta 2$ tanto como $\beta 3$ en células WSS-1 (una línea celular humana derivada de riñón) que expresaban $\alpha 1\gamma 2$ fue indispensable para observar un aumento dependiente de la concentración de la unión de [³H]flunitrazepam por alfaxalona (Bradford y col., 1995). La potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam por alopregnanolona demostró ser mayor en las células HEK293 (otra línea celular humana de riñón) expresando las subunidades $\alpha 3\beta 1\gamma 2$ que en las que fueron transfectadas con $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ y $\alpha 2\beta 1\gamma 2$ (Lan y col., 1991). Otros trabajos reportaron una potenciación por alopregnanolona excepcionalmente aumentada de la corriente de Cl⁻ inducida por GABA con la combinación $\alpha 5\beta 1\gamma 2$ (Puia y col., 1993). Además, la introducción de la subunidad $\gamma 2L$ produjo una reducción del efecto estimulador de la alfaxalona en células que expresaban $\alpha 1\beta 1$ (Horne y col., 1993). Sin embargo, en otro trabajo, la subunidad $\gamma 2L$ junto con $\alpha 6\beta 1$ demostró ser la combinación que mayor respuesta presentó a la modulación por alopregnanolona (Lambert y col., 1996)

Por otro lado, la expresión de diferentes subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$) en combinación con $\alpha 1\gamma 2$ no demostró ningún efecto significativo sobre la modulación de la respuesta de GABA por alopregnanolona ni por pregnanolona (Hadingham y col., 1993). Esto fue confirmado por otro estudio llevado a cabo en oocitos de *Xenopus*, donde se

observó el mismo efecto estimulador de las corrientes de GABA con las combinaciones $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$, $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ y $\alpha 1\beta 3\gamma 2S$ (Sanna y col., 1997).

En resumen, estas evidencias revelan que la subunidad β es necesaria para observar la modulación neuroesteroidea del receptor, pero que el tipo de subunidad β no tiene influencia en la magnitud de este efecto. En contraposición, se deduce que particularmente el tipo de subunidad α y en menor medida γ , presentes en el receptor $GABA_A$ son de gran importancia para el efecto modulador neuroesteroideo.

Los estudios de la expresión de subunidades de los receptores $GABA_A$ nativos en el colículo superior, el análogo funcional del lóbulo óptico en los mamíferos, revelaron la presencia de ARNm de $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ y δ (Persohn y col., 1992) distribuidos de la siguiente manera: $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ en todos los niveles del colículo; $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ en las capas superficiales; $\alpha 4$ en la capa donde arriban los nervios ópticos (sublámina f del estrato gris y fibroso superficial); $\beta 1$ en el estrato óptico y $\beta 3$ también en todo el colículo superior (Wisden y col., 1992). Por lo tanto, existiría en dicha estructura una variedad muy grande de subtipos de receptor $GABA_A$ representativos prácticamente de todos los tipos de farmacología posibles.

A lo largo del desarrollo del colículo se observa que la subunidad $\alpha 1$ va aumentando sus niveles desde el DE15 hasta el adulto y que $\alpha 2$ y $\alpha 5$ aparecen recién a partir del DE17 (Poulter y col., 1992) incrementando también su expresión durante la ontogenia. En cultivos de neuronas de corteza cerebral de pollo se midió un aumento de 4 veces en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 1$ y de dos veces para $\beta 2S$ y $\beta 4S$ desde el segundo día de cultivo *in vitro* hasta el décimo, sin cambios en $\gamma 1$ ni en $\gamma 2S$ (Baumgartner y col., 1994). Parece ser una característica general que la subunidad $\alpha 1$ aumenta sus niveles con el desarrollo, lo que muy probablemente resultará en una mayor proporción de receptores $GABA_A$ conteniendo esa subunidad. Esto concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio acerca de la ontogenia de los subtipos de receptores benzodiazepínicos en el lóbulo óptico, hallando un 98.23% de receptores del subtipo II (de baja afinidad por la triazolopiridazina CL218872) en el DE13, con un mínimo de receptores de tipo I que van aumentando hasta alcanzar en el adulto un

62,88% de los sitios receptores benzodiazepínicos totales (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1995). Se sabe que estos dos tipos de receptores son consecuencia de la presencia de distintas subunidades α , conteniendo los de tipo I $\alpha 1$ y los de tipo II $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (Wisden y col., 1989). Esto nos permite especular que los receptores GABA_A presentes en el DE13 contendrán $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$, pero muy escasamente $\alpha 1$, que irá aumentando con el desarrollo. Por lo tanto, el receptor GABA_A presente en el lóbulo óptico de embriones de pollo, más sensible al efecto potenciador de los neuroesteroides, estaría relacionado con receptores conteniendo $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ y la disminución de este efecto modulador lo estaría con un aumento en la proporción de los mismos conteniendo la subunidad $\alpha 1$.

1.3. Implicancias fisiológicas de la existencia de diferentes tipos de receptor GABA_A durante el desarrollo

Como se describió en la Introducción, el GABA produce una despolarización de las neuronas embrionarias de rata por una inversión en el gradiente del ion Cl⁻ (Cherubini y col., 1991). Alternativamente, es posible que en las neuronas inmaduras el GABA evoque una conducta iónica diferente que resulte en una despolarización. En cultivos de neuronas fetales de hipocampo el GABA causa un aumento intracelular de Ca²⁺ reversible que presenta un perfil farmacológico típico de desensibilización único de estos receptores que se pierde con los días de incubación, sugiriendo la existencia de un receptor particular que podría estar regulado por el desarrollo (Segal, 1993).

Esta acción del GABA sobre la homeostasis del Ca²⁺ intracelular puede ser de importancia para el crecimiento y la diferenciación de las neuronas durante el desarrollo temprano (Segal, 1993) y la comprensión de este fenómeno puede ser relevante para la elucidación de las acciones tróficas del GABA (Schousboe y Redburn, 1995). Además, se ha reportado que el agonista GABAérgico muscimol despolariza células embrionarias de hipocampo en cultivo, pero esta respuesta cambia a un efecto mixto de hiperpolarización-despolarización durante el desarrollo (Fizman y col., 1990), lo que

podría estar evidenciando cambios en los tipos de receptores GABA_A (Barker y col., 1998).

Una de las contribuciones de esta Tesis fue la demostración de la existencia de receptores GABA_A con una farmacología de la modulación neuroesteroidea que varía a lo largo del desarrollo, probablemente debido principalmente al cambio en la expresión del subtipo de subunidad α . Estos datos nos permiten especular que el tipo de receptor GABA_A presente en el DE14, más sensible al efecto modulador de los neuroesteroides, podría estar más relacionado con los efectos tróficos del GABA que con sus funciones como neurotransmisor.

2. ESTUDIO DEL SITIO DE RECONOCIMIENTO ESTEROIDEO PRESENTE EN EL RECEPTOR GABA_A

2.1. Modulación alostérica del receptor GABA_A por diferentes neuroesteroides

El concepto de modulación alostérica es bien conocido en enzimología e involucra la noción de que la unión de un ligando a un sitio específico diferente y distante de otro puede alterar a ese segundo sitio. Por analogía, los neuroesteroides son moduladores alostéricos del receptor GABA_A y en este caso se estudió el efecto de los mismos sobre el sitio benzodiazepínico. Los neuroesteroides, como cualquier otro ligando están caracterizados por dos propiedades inherentes: *afinidad* y *eficacia intrínseca*. La afinidad es la propiedad estructural (tamaño, estructura tridimensional, orientación de grupos funcionales) que determina la relación entre la concentración y la ocupación fraccional del receptor (número de complejos receptor-ligando en el equilibrio). La eficacia intrínseca es la habilidad del ligando de inducir un cambio conformacional en la molécula receptora que genere una alteración funcional. Esta propiedad relaciona la ocupación fraccional del receptor y la amplitud del efecto (Haefely, 1989a; Haefely, 1989b).

En el caso particular de los neuroesteroides el efecto medido fue el aumento de la unión de [³H]flunitrazepam a su sitio receptor. Los resultados demostraron que tanto la alopregnanolona como al alotetrahidrodesoxicorticosterona produjeron grandes incrementos de dicha unión a las membranas sinápticas de lóbulo óptico (Tabla III), sugiriendo que ellos se comportarían como “agonistas totales” del sitio de reconocimiento esteroideo. El término agonistas, no sería exactamente aplicable ya que los neuroesteroides no generan directamente una respuesta biológica mediada por un receptor, sino que modulan la unión de otro ligando a un receptor como ya se explicó en la introducción. Sin embargo, si se considera que ellos se unen a un sitio de reconocimiento (“receptor neuroesteroideo”) y que dicha unión genera una respuesta, el aumento de la unión de un ligando marcado, se puede excepcionalmente hablar de agonistas, antagonistas y agonistas inversos.

El agregado *in vitro* de epipregnanolona, un neuroesteroide 5β-reducido, 3β-hidroxilado produjo un aumento de la unión de [³H]flunitrazepam a las membranas obtenidas de pollos adultos mucho más pequeño ($15,11 \pm 2,67\%$) que el de los esteroides antes mencionados, demostrando ser un agonista mucho más débil que ellos. La presencia conjunta de concentraciones crecientes de epipregnanolona con 4 μM de alopregnanolona, concentración que produce el efecto estimulador máximo ($89,54 \pm 4,50\%$), resultó en una reducción dependiente de la concentración en la potenciación por alopregnanolona de la unión de [³H]flunitrazepam (Figura 10). El efecto estimulador fue reducido hasta un porcentaje que no fue significativamente diferente de la estimulación máxima producida por la epipregnanolona solamente.

Este antagonismo podría deberse a que la alopregnanolona compite con la epipregnanolona por los mismos sitios pero debido a la menor eficacia intrínseca de la epipregnanolona, la unión de este último produciría una menor potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam. A concentraciones máximas de epipregnanolona, casi todas las moléculas de alopregnanolona serían desplazadas y se obtendría el mismo efecto estimulador que con epipregnanolona solamente. Los resultados de la Figura 10 corroboran que la epipregnanolona antagoniza competitivamente la potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam producida por una concentración máxima de

alopregnanolona. Sin embargo, este esteroide no puede ser considerado un antagonista del sitio de reconocimiento esteroideo ya que es capaz de modular positivamente la unión de [³H]flunitrazepam; este comportamiento dual característico de antagonista-agonista (Haefely, 1989a) define a la epipregnanolona como un “agonista parcial” del sitio modulador esteroideo presente en el receptor GABA_A. Resultados similares se obtuvieron con el agonista parcial del receptor benzodiazepínico Ro 16-6028 y el diazepam, un agonista total de dicho sitio, donde el agregado de dosis crecientes de Ro 16-6028 junto con una dosis efectiva máxima de diazepam, producen una reducción del efecto del diazepam sobre los niveles cerebelares de GMPc hasta que el efecto de la combinación llega al obtenido por Ro 16-6028 solamente (Haefely, 1988b).

Los agonistas parciales poseen una menor eficacia intrínseca que los totales pero mayor que los antagonistas, requiriendo de una mayor ocupación fraccional del receptor para producir el efecto máximo y dependiendo de la eficacia intrínseca y de la densidad receptora, pueden ser incapaces de producir tal efecto aun a concentraciones saturantes (Haefely, 1989a), lo que se observa en la Figura 10 para la epipregnanolona.

Por otro lado, los resultados presentados en la Figura 11 y la Tabla V, muestran que 16 μM de epipregnanolona producen un corrimiento (*shift*) hacia la izquierda de las curvas concentración-efecto de alopregnanolona y alfaxalona que se ve reflejado por la reducción de sus CE₅₀ (de 1,25±0,13 y 3,75±0,70 a 0,54±0,08 y 1,26±0,15 μM, respectivamente), lo que evidencia los efectos agonistas de la epipregnanolona.

De acuerdo a los requerimientos estructurales de los neuroesteroides para su actividad sobre el receptor GABA_A presente en el SNC de mamíferos, los compuestos neuroactivos presentan un esqueleto pregnano reducido, siendo los 5α-reducidos mucho más potentes que los 5β. Un grupo ceto en el C-20 es más favorable que un hidroxilo o un etilendioxido y una hidroxilación en el C-3 en orientación α es esencial para la neuroactividad, resultando los isómeros 3β-hidroxilados muy poco potentes y eficaces (Gee y col., 1988; Harrison y col., 1987). En concordancia con estos requerimientos, se demostró que la CI₅₀ de la epipregnanolona para desplazar la unión de [³⁵S]TBPS a membranas sinápticas de corteza de rata fue 100 veces mayor que la de alopregnanolona

y que la primera no fue capaz de producir un desplazamiento total de ese ligando (Gee y col., 1988). Registros electrofisiológicos de célula entera (*whole cell*) revelaron que 30 μM de epipregnanolona no produjeron ningún efecto sobre células cromafines bovinas (Hill-Venning y col., 1984). Prince y Simmonds (1992) realizaron estudios de unión de [^3H]flunitrazepam a membranas de cerebro de rata hallando una estimulación de dicha unión por 60 μM de epipregnanolona de $9,8 \pm 3,19\%$ y que las CE_{50} de alopregnanolona, alfaxalona y pregnanolona fueron aumentadas por el agregado de esa concentración de epipregnanolona. Estos datos indican claramente que este compuesto se comporta como un antagonista del sitio modulador esteroideo del receptor GABA_A presente en el SNC de los mamíferos, coincidiendo con los estudios de relación estructura-actividad, sin embargo nosotros hemos demostrado que la epipregnanolona se comporta como una agonista parcial de su sitio de reconocimiento en el receptor GABA_A del SNC de las aves y no como un antagonista. Esto indicaría que los requerimientos para la neuroactividad de los esteroides en la aves no son exactamente los mismos que en los mamíferos.

La comparación de las curvas concentración-efecto de la Figura 11 reveló que la alopregnanolona fue más potente y eficaz que la alfaxalona para modular la unión del [^3H]flunitrazepam (Tabla V). Trabajos previos reportaron similares resultados en cuanto a la potencia de estos dos neuroesteroides en experimentos de desplazamiento de unión de [^3S]TBPS y de potenciación de [^3H]flunitrazepam, aunque no observaron diferencias en sus eficacias máximas (Gee y col., 1988; Prince y Simmonds, 1992).

En resumen, los resultados presentados hasta aquí confirman los obtenidos en mamíferos en cuanto a que los neuroesteroides 5α -reducidos, 3α -hidroxilados son los moduladores más potentes del receptor GABA_A del SNC de las aves y también coinciden en que los isómeros 5β -reducidos, 3β -hidroxilados resultan reducidos en su eficacia, pero no concuerdan con la reducción de la potencia observada en los mamíferos. Además, se ha demostrado que la epipregnanolona, un derivado 5β -reducido, 3β -hidroxilado de la progesterona, se comporta como un agonista parcial del sitio esteroideo del receptor GABA_A presente en el SNC de las aves.

2.2 El sitio modulador neuroesteroideo en la molécula del receptor GABA_A

Estudiando la modulación del receptor GABA_A en diferentes áreas del SNC de ratas se observó que las potencias de varios neuroesteroides para desplazar la unión de [³⁵S]TBPS a membranas de la corteza frontal y la médula espinal eran de diferente órdenes de magnitud para estas dos áreas, lo que sugirió la existencia de heterogeneidad en estos sitios moduladores (Gee y Lan, 1991). Otros autores, utilizando membranas de cerebro bovino demostraron que la pregnanolona desplazó la unión de [³⁵S]TBPS y potenció la de [³H]flunitrazepam con componentes de alta y baja afinidad. Estos datos pueden ser interpretados como diferentes afinidades de este neuroesteroide por diferentes sitios localizados en la molécula receptora (Hawkinson y col., 1994a), aunque podrían representar también dos efectos diferentes de estos compuestos, uno sobre el receptor GABA_A y otro sobre los lípidos de la membrana plasmática (Makriyannis y col., 1991).

Los resultados de la modulación por alopregnanolona, alotetrahidrodesoxicorticosterona, alfaxalona y epipregnanolona sobre la unión de [³H]flunitrazepam a las membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico presentaron en todos los casos curvas de estimulación de un sólo componente, lo que sugeriría la existencia de un sitio de reconocimiento esteroideo homogéneo en nuestra preparación de membranas. Esta hipótesis se sustenta además en el desplazamiento competitivo que ejerce la epipregnanolona por los sitios de unión de alopregnanolona. De todos modos para estudiar la posible existencia de diferentes sitios de reconocimiento para los diferentes neuroesteroides, se realizaron los estudios de aditividad con alopregnanolona y alfaxalona. La Figura 12 muestra que los efectos moduladores de 16 μM de alfaxalona no son aditivos a los de alopregnanolona, sugiriendo que ambos esteroides ejercen sus efectos a través de un sitio común de acción.

Por otro lado, la estereoselectividad de ese sitio respecto de la configuración espacial de los esteroides, el desplazamiento competitivo de la alopregnanolona por epipregnanolona y los resultados de la adición conjunta de alopregnanolona y alfaxalona

apoyan la hipótesis de que estos compuestos actuarían a nivel de la molécula receptora y no sobre los lípidos de la membrana plasmática.

Para confirmar la existencia de este sitio modulador en el receptor GABA_A y descartar cualquier influencia de la membrana plasmática, se estudió si la modulación de la unión de [³H]flunitrazepam por alopregnanolona desaparecía al solubilizar a los receptores GABA_A y obtenerlos en una preparación libre de membrana. Los resultados presentados en la Figura 13 demuestran que dicha modulación es prácticamente idéntica a la observada en los receptores unidos a membrana. Aun más, los valores de CE₅₀ y E_{max} no presentaron diferencias significativas entre estas dos preparaciones de receptores (CE₅₀ de 1,26±0,72 vs. 1,14±0,03 μM y E_{max} de 100±8,7 vs 89±10,1%, para los receptores solubilizados y unidos a membrana, respectivamente). Los ensayos de saturación de unión probaron que el mecanismo de acción de esta modulación también fue el mismo, una reducción de la K_d sin cambios en el número de sitios de unión, en ambas preparaciones. Estos datos confirman la presencia del sitio modulador esteroide en la molécula receptora y además indican que la modulación ejercida por los neuroesteroides no es influenciada por la membrana plasmática.

Todavía no se han identificado los aminoácidos que contribuyen a la formación del sitio de unión de los neuroesteroides en el receptor GABA_A. Sin embargo, se ha propuesto que estos compuestos tendrían dos puntos de contacto con el receptor a través de sus dos grupos funcionales polares, probablemente por puentes de hidrógeno, y que los residuos hidrofóbicos lo harían con las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos que rodean al receptor. Tales interacciones tendrían requerimientos estructurales muy específicos, ya que los dos grupos polares deberían estar en una orientación espacial particular (Im y col., 1990).

3. BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DERIVADOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO

3.1. Neuroesteroides derivados de la [¹⁴C]progesterona en el lóbulo óptico en desarrollo

Se ha demostrado que el cerebro de las aves es capaz de metabolizar colesterol a pregnenolona, localizándose una proteína del tipo citocromo P450_{scc} en neuronas y células gliales (Tsutsui y Yamazaki, 1995; Usui y col., 1995), mientras que otros autores probaron que la progesterona era convertida en 5 α -pregnanediona y luego en alopregnanolona al ser incubada con homogenatos de cerebro de pollos adultos (Nakamura y Tanabe, 1974).

Contrastando con esos resultados, nosotros hallamos que los metabolitos 5 β -reducidos y también los 3 β -hidroxilados son los productos más abundantes derivados de la progesterona incubada *in vitro* con homogenatos de lóbulo óptico de embriones y de pollos adultos jóvenes (Figura 15A). En principio, estos resultados parecerían contradecir hallazgos anteriores, sin embargo, Nakamura y Tanabe además de hallar compuestos 5 α -reducidos y 3 α -hidroxilados en el cerebro de pollos adultos, determinaron que la testosterona y la androstenediona eran metabolizadas a 5 β -dihidrotestosterona (5 β -androstan-17 β -ol-3-one) y epiandrosterona (5 α -androstan-3 β -ol-17-one), respectivamente, demostrando que las actividades enzimáticas 5 β -reductasa y 3 β -hidroxiesteroidehidrogenasa/oxidoreductasa están también presentes en el cerebro de aves adultas (Nakamura y Tanabe, 1974).

Por otro lado, existe numerosa evidencia que indica que la actividad 5 β -reductasa es importante en el SNC de las aves desde etapas tempranas del desarrollo (Antila y col., 1984). La actividad de 5 β -reductasa ha sido ampliamente demostrada en tejidos neuroendócrinos de diversas especies de aves (Massa y Sharp, 1981; Schlinger y col., 1989; Balthazart, 1991; Wade y col., 1995). Más aun, se vio que la misma declina desde niveles embrionarios muy altos en todas las áreas del cerebro de codornices en forma

continúa hasta luego del nacimiento (Hutchison y col., 1990). Otros autores vieron además que su V_{max} disminuye desde los animales jóvenes hasta los adultos (Balthazart y col., 1986). Esto resultó evidente en los resultados obtenidos en la presente Tesis donde se ve que la producción de epipregnanolona es mayor en los DE11 a 16 y menor en los estadios más desarrollados (Figura 15A).

Por último, la comparación entre las actividades 5α - y 5β -reductasa en el cerebro de la codorniz Japonesa demostró que la producción de esteroides 5β -reducidos es siempre superior que la de 5α -reducidos (Schlinger y Callard, 1987), lo que podría explicar nuestros hallazgos de una extremadamente pequeña proporción de progesterona metabolizada a 5α -pregnanediona (Figura 15A).

Además, como se deduce de nuestros resultados, la producción de 17β -estradiol a partir de progesterona, demuestra que el cerebro de las aves parece poseer las actividades de 17α -hidroxilasa- 17β -20-desmolasa/ C_{17-20} -liasa, 17α -cetoesteroide reductasa y aromatasa. Esto significa que el SNC de las aves puede transformar esteroides de 21 átomos de carbono en compuestos de 19 átomos de carbono, lo que no fue demostrado aun en los tejidos nerviosos de los roedores (Akwa y col., 1991; Baulieu y Robel, 1990; Mellon, 1994).

3.2. Importancia de la presencia de metabolitos 5β -reducidos en el SNC de las aves

Se ha postulado que la vía de la 5β -reducción sería un mecanismo de inactivación de los andrógenos circulantes, en especial la testosterona, que ejercería un rol protector durante la diferenciación sexual de las aves y de esta forma prevenir la masculinización del sistema del canto de las hembras debido a los altos niveles de andrógenos (Balthazart y col., 1986). También se supone que la 5β -reductasa tendría efectos sobre el comportamiento copulatorio masculino (Schlinger y col., 1989) y sobre la agresividad de los machos (Schlinger y Callard, 1989). Además, el dimorfismo sexual del plumaje entre machos y hembras de algunas especies de aves podría estar en parte influenciado por la

5 α - y 5 β -reductasa ya que en las hembras no se detecta actividad de aromataasa en la piel, pero si niveles significativamente altos de estas enzimas (Schlinger y col., 1989).

Nosotros hemos detectado que la actividad 5 β -reductasa es muy importante durante el desarrollo embrionario y postnatal del lóbulo óptico de pollo. Además, el metabolito 5 β -reducido de la progesterona es subsecuentemente 3 β -hidroxilado dando como producto final epipregnanolona (5 β -pregnan-3 β -ol-10-ona), el cual hemos demostrado se comporta como un agonista parcial del sitio modulador esteroideo del receptor GABA_A del SNC de las aves. Los otros metabolitos producidos a partir de la progesterona no tienen ninguno de los requerimientos estructurales para ser neuroactivos, lo que nos llevo a focalizar nuestra atención en el derivado epipregnanolona.

Sin embargo la relevancia de la síntesis de epipregnanolona endógena dependerá de demostrar que estas mismas actividades enzimáticas son importantes *in vivo* y, considerando que la 5 β -reducción actúa principalmente para inactivar a la testosterona, de la presencia de niveles altos de progesterona en el lóbulo óptico.

Los resultados de la incubación de [¹⁴C]progesterona *in vivo* en el lóbulo óptico de embriones de pollo indicaron que al igual que lo que ocurre *in vitro*, la 5 β -reducción parece ser la actividad más importante del lóbulo óptico. Lamentablemente no se pudieron ver metabolitos 3 β -hidroxilados, probablemente debido a la difusión de los esteroides de dicha estructura (Figura 15C). Por otro, lado los niveles endógenos de progesterona en el lóbulo óptico de embriones de pollo demostraron ser más altos comparativamente que en el cerebro y en el cerebelo (1,98; 0,78 y 0,43 ng/g tejido fresco), mientras que los de testosterona fueron <0,1 ng/g tejido fresco en las mismas áreas. Esto indicaría junto con las actividades enzimáticas demostradas, que podrían existir en el lóbulo óptico niveles altos de epipregnanolona a concentraciones que pudieran modular endógenamente a los receptores GABA_A.

A fin de confirmar esta hipótesis se estudió la modulación *in vitro* por epipregnanolona de la unión de [³H]flunitrazepam a membranas sinápticas del lóbulo óptico obtenidas de embriones y pollos adultos jóvenes. En la Figura 16 se muestran y en

la Tabla VII se resumen los resultados obtenidos. Se puede observar que la epipregnanolona es significativamente más potente para modular la unión de [³H]flunitrazepam en los estadios embrionarios y el RN y que los mayores aumentos sobre esta unión también se obtienen en estos mismos estadios.

Estos datos refuerzan nuestra hipótesis de que la epipregnanolona podría ser el modulador endógeno del receptor GABA_A en el lóbulo óptico en desarrollo. Por otro lado, considerando que se han reportado efectos genómicos de los neuroesteroides y que tratamientos crónicos con los mismos resultan en una alteración de las interacciones alostéricas del receptor GABA_A, este compuesto podría ejercer alguna de estas funciones durante la ontogénesis del lóbulo óptico.

Los últimos experimentos de esta Tesis fueron llevados a cabo a fin de estudiar los efectos *in vivo* de la epipregnanolona sobre la farmacología y funcionamiento del receptor GABA_A.

4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO *IN OVO* CON NEUROESTEROIDES SOBRE EL RECEPTOR GABA_A

4.1. Estudio del efecto de la administración crónica de epipregnanolona sobre el lóbulo óptico

En la tabla VIII se muestra que este neuroesteroide no produjo cambios en el peso del tejido fresco del lóbulo óptico, ni en el contenido total de proteínas, en comparación con los embriones administrados crónicamente con vehículo, con ninguna de las concentraciones utilizadas (15 a 50 μ M). Aun más, los resultados no mostraron diferencias significativas en estos parámetros entre embriones intactos (embriones que fueron solamente incubados), tratados con vehículo y tratados con esteroide, indicando que la abertura en la cáscara no tuvo efectos evidentes. Resultados similares se obtuvieron tratando cultivos de neuronas corticales de ratón con 2 μ M de alopregnanolona por 5 días (Yu y Ticku, 1995a). Los estudios morfológicos del lóbulo

óptico revelaron que la compleja citoarquitectura del mismo, así como la inmunorreactividad para el GABA no fueron alteradas por la presencia de 30 μM de epipregnanolona (Figura 17, 18 y 19). Considerando que otros autores vieron cambios inducidos por alopregnanolona en el número de filopodios, el área y el largo de las neuritas de neuronas de hipocampo en cultivo (Brinton, 1994), puede especularse que la conformación de los esteroides sería un factor determinante para esta actividad que sólo poseerían los neuroesteroides más activos.

La morfología, el contenido proteico total o el peso del tejido fresco de lóbulo óptico permanecieron inalterados luego del tratamiento crónico con este neuroesteroide. Por lo tanto, en la siguiente serie de experimentos se estudió el receptor GABA_A para evaluar si la epipregnanolona tuvo algún efecto sobre este receptor.

4.2. El tratamiento crónico *in ovo* con epipregnanolona sobre el sitio receptor benzodiazepínico y su interacción con el sitio modulador esteroideo

A pesar de no modificar la unión de basal de [³H]flunitrazepam, la administración de este compuesto esteroide endógeno produjo una reducción del efecto estimulador de la alopregnanolona sobre dicha unión que fue dependiente de la dosis utilizada. Esta reducción de las interacciones alostéricas entre los sitios benzodiazepínicos y esteroides (Figura 20) fue interpretada como un desacoplamiento que sólo fue significativo con dosis en el rango de 20 a 50 μM . Al desacoplamiento se lo clasificó, según trabajos previos, como **homólogo** cuando éste efecto fue inducido por el tratamiento crónico con una droga que actúa sobre alguno de los dos sitios acoplados y **heterólogo**, cuando fue producido por una droga que actúa a través de un sitio diferente (Friedman y col., 1993, 1996). El desacoplamiento homólogo inducido por la epipregnanolona también fue observado con otros neuroesteroides en neuronas en cultivo (Friedman y col., 1993; Friedman y col., 1995 Yu y Ticku, 1995b). Esos datos tienen, a nuestro entender, un menor significado fisiológico que los aquí presentados ya que no toman en cuenta la existencia de posibles mecanismos compensatorios a nivel del animal entero y los

cambios reportados podrían no verse reflejados a dicho nivel. Friedman y col postulan que la habilidad de los esteroides para inducir este efecto está en relación directa con su capacidad para modular la unión de [^3H]flunitrazepam, hallando a la epipregnanolona inactiva en los ensayos de unión y consistentemente incapaz de inducir algún tipo de desacoplamiento (Friedman y col., 1993). Resultados previos de nuestro laboratorio y los presentados en esta Tesis indican que la epipregnanolona es capaz de modular positivamente la unión de [^3H]flunitrazepam y [^3H]GABA a las membranas sinápticas del lóbulo óptico (Viapiano y Fiszer de Plazas, 1997; Viapiano y Fiszer de Plazas, 1998) y consecuentemente de producir desacoplamiento. Las curvas concentración-efecto de alopregnanolona revelaron que el tratamiento produjo una reducción de la eficacia de este compuesto (Figura 21 y Tabla X).

El estudio de los sitios benzodiazepínicos por medio de ensayos de saturación de unión de flunitrazepam demostró que su afinidad y densidad receptora no fueron afectados por la administración crónica de neuroesteroide (Figura 22 y Tabla XI).

Los datos hasta aquí presentados demuestran que, contradiciendo los requerimientos estructurales para la neuroactividad de los esteroides hallados en maíferos, la epipregnanolona no sólo modula al receptor benzodiazepínico, sino que también es capaz de inducir un desacoplamiento homólogo entre su sitio de reconocimiento y dicho sitio receptor.

4.3. Efectos de la administración de epipregnanolona sobre el sitio receptor GABA y su interacción alostérica con los sitios moduladores esteroideo, benzodiazepínico y de barbitúricos

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la unión de [^3H]GABA a las membranas sinápticas del lóbulo óptico de pollo es modulada por benzodiazepinas (Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990), barbitúricos (Fiszer de Plazas y col., 1995) y neuroesteroides (Viapiano y Fiszer de Plazas, 1998; Viapiano y col., 1998). A fin de estudiar el efecto del tratamiento de los embriones con

epipregnanolona sobre estas interacciones alostéricas, se investigó la modulación de la unión de [^3H]GABA por alopregnanolona, diazepam y pentobarbital sódico. Nuevamente, este esteroide provocó un desacoplamiento homólogo entre los sitios de GABA y esteroideos (Figura 23A y Tabla XII) debido a una reducción de la eficacia de la alopregnanolona.

Por otro lado, este compuesto produjo efectos heterólogos entre los sitios benzodiazepínicos y GABAérgicos ya que se vió que la eficacia del diazepam aumentó y su potencia disminuyó significativamente (Figura 23A y Tabla XII). El efecto sobre la modulación del pentobarbital sódico estuvo restringido sólo a la potencia del sitio modulador de baja afinidad, la cual resultó reducida por el tratamiento crónico.

Otros autores también reportaron efectos heterólogos de los neuroesteroides luego de su administración crónica pero ninguno encontró efectos facilitatorios entre el acoplamiento alostérico de los sitios del receptor GABA_A como los hallados aquí entre los sitios GABAérgicos y los benzodiazepínicos y de barbitúricos. A este respecto, Ticku y col. demostraron que el tratamiento crónico de neuronas corticales con alopregnanolona produjo una reducción de la eficacia del GABA y el pentobarbital sódico para modular la unión de [^3H]flunitrazepam (Yu y Ticku, 1995a). Una posible explicación de estas discrepancias podría sustentarse en los diferentes neuroesteroides y preparaciones utilizadas, alopregnanolona, un “agonista total” de sitio esteroideo, para tratar crónicamente neuronas en cultivo vs. epipregnanolona, un “agonista parcial”, administrado *in ovo* en nuestro caso. Esto podría sugerir que dependiendo de la configuración, algunos neuroesteroides podrían inducir solamente desacoplamiento homólogo, mientras que otros producirían efectos mixtos de desacoplamiento homólogo y efectos facilitatorios heterólogos.

También en contraposición con resultados previos que observaron una reducción en el número máximo de sitios de unión de GABA (B_{max}) de baja afinidad luego del tratamiento crónico con neuroesteroides (Yu y Ticku, 1995a), nosotros demostramos que no hubieron cambios en dicho sitio receptor. Este dato además asegura que no quedó esteroide residual particionado en las membranas sinápticas, ya que en nuestro

laboratorio se probó que el agregado *in vitro* de epipregnanolona aumenta la afinidad del GABA por su sitio receptor (Viapiano y Fiszer de Plazas, 1998).

En resumen, se puede concluir que el tratamiento de los embriones con esta esteroide endógeno produce desacoplamiento homólogo entre el sitio de reconocimiento neuroesteroideo y los sitios GABAérgicos y benzodiazepínicos, y heterólogo entre los sitios moduladores benzodiazepínicos y de barbitúricos con el sitio receptor de GABA.

4.4. Exposición crónica de los embriones a epipregnanolona y su efecto sobre las características funcionales del receptor GABA_A

A fin de investigar la influencia de la administración de epipregnanolona sobre los aspectos funcionales de la neurotransmisión GABAérgica, se midió la captación de CI⁻ inducida por GABA en una preparación de micosacos obtenida del lóbulo óptico.

El tratamiento produjo una reducción estadísticamente significativa de la eficacia del GABA para inducir esta captación (Figura 25 y Tabla XIV). Considerando que no existieron cambios en la afinidad de este ligando por su sitio, ni en su densidad receptora (Figura 24 y Tabla XIII), este último resultado indica que la administración crónica *in ovo* de epipregnanolona reduce la eficacia del GABA para inducir respuestas funcionales mediadas por el receptor en el lóbulo óptico, lo que podría verse reflejado en una alteración de la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria. El tratamiento de neuronas corticales con alopregnanolona produjo resultados similares evaluados con este mismo tipo de experimento (Yu y Ticku, 1995) y con estudios electrofisiológicos (Yu y Ticku, 1995c)

4.5. Mecanismos de epipregnanolona para afectar las interacciones alostéricas entre los sitios del receptor GABA_A

Respecto de los cambios moleculares responsables de los efectos crónicos sobre el receptor GABA_A, los mismos podrían ser: 1) Alteraciones en el estado de fosforilación del receptor o 2) cambios en la composición de las subunidades del mismo que como ya se describió tienen una gran influencia sobre la farmacología de este receptor.

En cuanto al primer mecanismo propuesto se demostró que varias de las subunidades del receptor GABA_A poseen secuencias consenso de fosforilación para proteína quinasa A (PKA), PKC y proteína tirosina quinasa (Macdonald y Olsen, 1994). Sin embargo el rol fisiológico de la fosforilación no está del todo aceptado ya que no se ha probado aun que este receptor sufra algún tipo de fosforilación *in vivo* (Schousboe y Redburn, 1995). Además, se ha reportado que la activación de la PKC no tiene efectos sobre la modulación neuroesteroidea de las corrientes de GABA en receptores humanos recombinantes (Leidenheimer y Chapell, 1997).

Mayor número de evidencias sustentan la segunda hipótesis, demostrándose que la progesterona y la corticosterona regulan los niveles del ARNm de las subunidades del receptor GABA_A en el hipocampo (Weiland y Orchinik, 1995; Orchinik y col., 1995). En particular para el caso de los neuroesteroides, se vio que su administración crónica reduce los niveles de ARNm de α_2 , α_3 , β_2 y β_3 , pero no de γ_2S (Yu y col. 1996). Como la combinación de subunidades $\alpha\beta$ es suficiente para formar receptores funcionales (Gunther y col., 1995), la reducción en la subunidad β explicaría la reducción en el número de sitios de unión de GABA de baja afinidad observado por Yu y Ticku en similares experimentos (Yu y Ticku 1995a). En los resultados presentados en esta Tesis se demuestra que el tratamiento no modifica el número de sitios de unión sugiriendo que las subunidades β no serían particularmente afectadas por la administración crónica de epipregnanolona. Por otro lado, el tipo de subunidad α ha demostrado ser un determinante muy importante para la modulación neuroesteroidea del receptor GABA_A (véase punto 1.2 de la Discusión), estos resultados junto con la reducción de los niveles

de ARNm de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ observada por otros autores luego de tratamiento crónico por alopregnanolona hacen pensar que cambios similares estarían ocurriendo en el lóbulo óptico luego de la exposición crónica a epipregnanolona.

Por último es importante destacar que los datos presentados en esta sección, junto con la demostración de las características de “agonista parcial” de la epipregnanolona sobre el sitio de reconocimiento esteroideo en el receptor GABA_A de las aves, su síntesis endógena particularmente importante en los estadios embrionarios y la mayor sensibilidad de este receptor a los neuroesteroides en esos mismos estadios, apoyan la hipótesis que este neuroesteroide sería un modulador endógeno del receptor del receptor GABA_A en el SNC en desarrollo de las aves que podría estar regulando las interacciones alostéricas entre los diferentes sitios de este receptor.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se ha demostrado que los neuroesteroides también modulan positivamente la unión del [^3H]flunitrazepam al receptor GABA_A presente en las membranas sinápticas de las aves, siendo este efecto mayor en los estadios más tempranos del desarrollo. El mecanismo para potenciar esta unión está mediado, al igual que en los mamíferos, por un aumento en la afinidad del ligando por sus sitios receptores sin cambios en la densidad receptora. Los receptores GABA_A presentes en las etapas embrionarias podrían evidenciar un tipo de receptor más relacionados con las acciones tróficas del GABA que con sus efectos como neurotransmisor.

Los datos también confirman los requerimientos para la neuroactividad de los esteroides, hallando a los compuesto 5α -reducidos, 3α -hidroxilados entre los moduladores más potentes del receptor GABA_A y a los isómeros 5β -reducidos, 3β -hidroxilados mucho menos eficaces. Sin embargo, estas investigaciones demostraron que un derivado 5β -reducido, 3β -hidroxilado de la progesterona, la epipregnanolona no fue menos potente que los 3α -hidroxilados y más aun, su caracterización farmacológica probó que se comporta como un agonista parcial de sitio modulador esteroideo presente en el receptor GABA_A de las aves. Además, se comprobó que los esteroides neuroactivos alopregnanolona y alfaxalona actuarían a través de un sitio de reconocimiento común el cual sería parte de la molécula receptora y se descartó que la membrana plasmática tenga influencias sobre la modulación ejercida por estos compuestos.

Los estudios de biosíntesis de los derivados de la progesterona revelaron que la misma es metabolizada principalmente a compuestos 5β -reducidos, los cuales son luego hidroxilados en el C-3 en orientación β , resultando en el derivado epipregnanolona. La síntesis de este compuesto estuvo también inversamente relacionada con la edad y fue mayor en los estadios embrionarios. La medición del contenido endógeno de progesterona demostró niveles mucho mayores en el lóbulo óptico que en otras áreas del SNC, lo que hace pensar que la epipregnanolona estará presente en forma endógena

especialmente durante el desarrollo embrionario de la vía visual de las aves. La ontogenia de la modulación de la unión de [³H]flunitrazepam por epipregnanolona en el lóbulo óptico se correlacionó directamente con la síntesis de este neuroesteroide en dicha estructura.

Los efectos del tratamiento crónico *in ovo* con este neuroesteroide evidencian que el mismo es capaz de reducir el acoplamiento alostérico entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas con los sitios moduladores esteroideos. La epipregnanolona además produjo efectos facilitatorios de la interacción alostérica entre los sitios receptores GABAérgicos y los sitios moduladores benzodiazepínicos y de barbitúricos. Por último, la administración crónica de este esteroide endógeno redujo la eficacia del GABA para inducir la captación de Cl⁻ en una preparación de microsacos, lo que indica que las respuestas funcionales del GABA mediadas por el receptor GABA_A resultarán afectadas. Estos datos apoyan la hipótesis de que la epipregnanolona podría ser un modulador endógeno de este receptor en el SNC en desarrollo de las aves, el cual actuaría a nivel de las interacciones alostéricas de los sitios de este complejo receptor

La mayor parte de los datos aquí presentados ha sido publicada en Revistas Internacionales con referato:

-“NEUROSTEROID MODULATION OF THE BENZODIAZEPINE RECEPTOR IN DEVELOPING CHICK OPTIC LOBE”

Leonardo Pignataro, María Clara Gravielle y Sara Fiszler de Plazas
Neurochemistry International, 29: 405, 1996.

-“EPIPREGNANOLONE ACTS AS A PARTIAL AGONIST ON A COMMON NEUROSTEROID MODULATORY SITE OF THE GABA_A RECEPTOR COMPLEX IN AVIAN CNS”

Leonardo Pignataro y Sara Fiszer de Plazas

Neurochemical Research, 22: 221, 1997.

-“BIOSYNTHESIS OF PROGESTERONE DERIVED NEUROSTEROIDS BY DEVELOPING AVIAN CNS: *IN VITRO* EFFECTS ON THE GABA_A RECEPTOR COMPLEX”


Leonardo Pignataro, Alejandro A. Colman Lerner, J. Lino Barañao y Sara Fiszer de Plazas

International Journal of Developmental Neuroscience, 16: 433, 1998.

-“*IN OVO* CHRONIC NEUROSTEROID TREATMENT AFFECTS THE FUNCTION AND ALLOSTERIC INTERACTIONS OF GABA_A RECEPTOR MODULATORY SITES”

Leonardo Pignataro y Sara Fiszer de Plazas

Developmental Brain Research, 2000 (enviado para su publicación)



Lic. Leonardo Pignataro



Dra. Sara Fiszer de Plazas

BIBLIOGRAFIA

Akwa Y., Young J., Kabbadj K., Sancho M.J., Zucman D., Vourch C., Jung-Testas I., Hu Z.Y., Le Goascogne C., Jo D.H., Corpéchet C., Simon P., Baulieu E.E., Robel P., Neurosteroids: Biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain, *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 71-81.

Allan A.M., Harris R.A., Anesthetic and convulsant barbiturates alter γ -aminobutyric acid-stimulated chloride flux across brain membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 (1986) 763-768.

Allan A.M., Harris R.A., Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 27 (1987) 665-670.

Anholt R.R., Pedersen P.L., De Souza E.B., Snyder S.H., The perypheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 576-583.

Antila E., Leikola A., Tähkä S., Early steroid metabolism by chick blastoderm *in vitro*, *Steroids* 43 (1984) 315-323.

Asano T., Ogasawara N., Stimulation of GABA receptor binding by barbiturates, *Eur. J. Pharmacol.* 77 (1981) 355-357.

Backus K.H., Arigoni M., Drescher U., Scheurer L., Malherbe P., Möhler H., Bneson J.A., Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification, *NeuroReport* 5 (1993) 285-288.

Balthazart J., Schumacher M., Pröve E., Brain testosterone metabolism during ontogeny in Zebra Finch, *Brain Res.* 378 (1986) 240-250.

Balthazart J., Testosterone metabolism in the avian hypothalamus, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 557-570.

Barker J.L., Behar T., Li Y.-X., Liu Q.-Y., Ma W., Maric D., Marc I., Schaffner A.E., Serafini R., Smith S.V., Somogyi R., Vautrin J.Y., Wen X.-L., Xian H., GABAergic cells and signals in CNS development, *Persp. Devl. Neurobiol.* 5 (1998) 305-322.

Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Möhler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A.N. Langer S.Z. International Union of Pharmacology: XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 291-313.

Bateson A.N., Lasham A., Darlison M.G., γ -Aminobutyric acid_A receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel β -subunit gene transcript, *J. Neurochem.* 56 (1991) 1437-1440.

Baulieu E.-E., Robel P., Neurosteroids: A new brain function?, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37 (1990) 394-403.

Baumgartner B.J., Harvey R.J., Darlison M.G., Barnes Jr. E. M., Developmental up-regulation and agonist-dependent down-regulation of GABA_A receptor subunit mRNAs in chick cortical neurons, *Mol. Brain Res.* 26 (1994) 9-17.

Beekman M., Ungard J.T., Gasior M., Carter R.B., Dijkstra D., Goldberg S.R., Witkin J.M., Reversal of behavioral effects of pentylentetrazole by the neuroactive steroid ganaloxxona, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284 (1998) 868-877.

Benke D., Fritschy J.-M., Trzeciak A. Bannawarth W., Möhler H., Distribution, prevalence and drug binding profile of GABA_A receptor subtypes differing in β -subunit variant, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27100-27107.

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

Borman J., Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes, *Trends Neurosci.* 11 (1988) 899-907.

Bormann J, Feigenspan A., GABA_C receptors, *Trends Neurosci.* 18 (1995) 515-519.

Bowery N.G., GABA_B receptor pharmacology, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33 (1993) 109-147.

Bowery N.G., Hudson A.L., Price G.W., GABA_A and GABA_B receptor site distribution in rat central nervous system, *Neurosci.* 20 (1987) 365-383.

Bradford D.H., Wong G., Moody E.J., Skolnick P., Different subunit requirements for volatile and nonvolatile anesthetics at γ -aminobutyric acid type A receptors, *Mol Pharmacol.* 47 (1995) 363-367.

Braestrup C., Squires R.F., Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity [³H]diazepam binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 (1977) 3805-3809.

Burt D.R., Kamatchi G.L., GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology, *FASEB J.* 5 (1991) 2916-2923.

Butler A.B., Hodos W., Overview of the Midbrain y Optic tectum. En *Comparative Vertebrate Neuroanatomy-Evolution and Adaptation*, Wiley-Liss Inc., New York, EE.UU. de América (1996), pág. 201-205 y pág. 235-255.

Calkin P.A., Baumgartner B.J., Barnes Jr. E.M., Agonist administration in ovo down-regulates cerebellar GABA_A receptors in the chick embryo, *Mol. Brain Res.* 26 (1994) 18-25.

Callachan H., Cottrell G.A., Hather N.Y., Lambert J.J., Nooney J.M., Peters J.A., Modulation of the GABA_A receptor by progesterone metabolites, *Proc. R. Soc. Lond.* B231 (1987) 359-369.

Carter R.B., Wood P.L., Wieland S., Hawkinson J.E., Belelli D., Lambert J.J., White H.S., Wolf H.H., Mirsadeghi S., Tahir S.H., Bolger M.B., Lan N.C., Gee K.W., Characterization of the anticonvulsant properties of ganaxolone (CCD 1042; 3 β -hydroxy-3 β -methyl-5 α -pregnan-20-one), a selective, high affinity, steroid modulator of the γ -aminobutyric acid_A receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1997) 1284-1295.

Cherubini E., Gaiarsa J.L., Ben-Ari Y., GABA: an excitatory neurotransmitter in early postnatal life, *TIPS* 14 (1991) 515-519.

Colman Lerner A.A., Salamone D.F., Chiappe M.E., 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 (1995) 395-403.

Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L.R., Mellon S.H., Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the Central and Peripheral Nervous System during rodent embryogenesis, *Endocrinology* 136 (1995) 2689-2696.

Costa T., Rodbard D., Pert C.B., Is the benzodiazepine receptor coupled to a chloride anion channel?, *Nature* 277 (1979) 315-317.

Costa E., Guidotti. A., Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepine, *Ann. Rev. Pharmac.Toxicol.* 19 (1979) 531-545.

Cowan W.M., Adamson L., Powell T.P.S., An experimental study of the avian visual system, *J. Anat.* 95 (1961) 545-562.

Crawley J.N., Glowa J.L., Majewska M.D., Paul S.M., Anxiolytic activity of endogenous adrenal steroid, *Brain Res.* 339 (1986) 382-386.

Cuenod M., Streit P., Aminoacids transmitters and local circuitry in optic tectum. En *The Neurosciences* (F.O. Schmidt, F.G. Warden, editores), MIT Press, Cambridge, EE.UU. de América (1980) pág. 989-1004.

Cutting G.R., Curristin S., Zoghbi H., O'Hara B., Seldin M.F., Uhl G.R., Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunit ρ 2 cDNA and colocalization of the genes encoding ρ 2 (GABAR2) and ρ 1 (GABAR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4, *Genomics* 12 (1992) 801-806.

Cutting G.R., Lu L., O'Hara B.F. Kasch L.M., Montrosefzadeh C., Donovan D.M., Shimada S., Antonarakis S.E., Guggino W.B., Uhl G.R., Kazazian H.H., Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 2673-2677.

De Blas A.L., Brain GABA_A receptor studied with subunit-specific antibodies, *Mol. Neurobiol.* 12 (1996) 55-71.

De Lorey T.M. y Olsen R.W., GABA and Glycine. En *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medial Aspects* (G.J. Siegel, editor), 5ta. edición, Raven Press, New York, EEUU de América (1994) pág. 389-399.

De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodriguez de Lores Arnaiz G., Salganicoff L., Cholinergic and noncholinergic nerve-endings in rat brain, *J. Neurochem.* 9 (1962) 23-35.

De Vries C.P., De Jong P.J.M., Chromatographic separation and mass spectrometric behaviour of two isomers of aldosterone, *J. Steroid Biochem.* 13 (1980) 387-394.

Demirgoren S., Majewska M.D., Spivak C.E., London E.D., Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA_A receptor, *Neuroscience* 45 (1991) 127-135.

Dietl M.M., Cortés R., Palacios J.M., Neurotransmitter receptors in the avian brain. III. GABA-benzodiazepine receptors, *Brain Res.* 439 (1988) 366-371.

Fiszer de Plazas S., Mitridate de Novara A., Effect of diazepam on the low affinity GABA binding sites at different developmental stages of the chick optic lobe, *Neurochem. Int.* 17 (1990) 381-387.

Fiszer de Plazas S., Viapiano M.S., Mitridate de Novara A., Pentobarbital modulatory effect on GABA binding sites in developing chick optic lobe, *Int. J. Devl. Neurosci.*, 13 (1995) 783-789.

Fiszer de Plazas S., Conterjnic D., Flores V., Effect of a simple visual pattern on the early postnatal development of GABA receptor sites in the chick optic lobe, *Int. J. Devl. Neuroscience* 9 (1991). 195-201.

Fiszer de Plazas S., Flores V., Ríos. H., GABA receptors in the developing chick visual system: influence of light and darkness. En *GABA and Neuroendocrine Function*, (E. Racagni, A. Donoso, editores.), Raven Press, New York, EE.UU. de América, (1986) pág. 25-38.

Fiszer de Plazas S., Viapiano M. S., Mitridate de Novara A. M., Pentobarbital modulatory effect on GABA binding sites in developing chick optic lobe, *Int. J. Devl. Neuroscience* 13 (1995) 783-789.

Fiszman M.L., Novonty E.A, Lange G.D., Barker J.L., Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentrations of muscimol, *Dev. Brain Res.* 54 (1990) 186-193.

Flood J.F., Morley J.E., Roberts E., Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 1567-1571.

Flores V., Ríos H., Fiszer de Plazas S., Development of GABA binding sites in chick embryo optic lobe: Effect of Triton X-100, *Int. J. Devl. Neuroscience* 4 (1986) 27-34.

Friedman L., Gibbs T.T., Farb D.H., γ -Aminobutyric acid_A receptor regulation: chronic treatment with pregnanolone uncouples allosteric interactions between steroid and benzodiazepine recognition sites, *Mol. Pharmacol.*, 44 (1993) 191-197.

Friedman L.K., Gibbs T.T., Farb D.H., γ -Aminobutyric acid_A receptor regulation: heterologous uncoupling of modulatory site interactions induced by chronic steroid, barbiturate, benzodiazepine, or GABA treatment in culture, *Brain Res.*, 707 (1996) 100-109.

Fritschy J.-M., Benke D., Johnston D.K., Möhler H., Rudolph U., GABA_A -receptor α -subunit is an essential prerequisite for receptor formation *in vivo*, *Neurosci.* 81 (1997) 1043-1053.

García-Segura L.M., Chowen J.A., Dueñas M., Parducz A., Naftolín F., Gonadal steroids and astroglial plasticity, *Cell Mol. Neurobiol.* 16 (1996) 225-237.

Gee K.W., Lan N.C., γ -Aminobutyric acid_A receptor complexes in rat frontal cortex and spinal cord show differential responses to steroid modulation, *Mol. Pharmacol.* 40 (1991) 995-999.

Gee K.W., Bolger M.B., Brinton R.E., Coirini H., McEwen B.S., Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246 (1988) 803-812.

Gee K.W., Chang W.C., Brinton R.E., McEwen B.S., GABA-dependent modulation of the Cl⁻ ionophore by steroids in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.* 136 (1987) 419-423.

Giusti L., Befiore M.S., Martini C., Lucacchini A., 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one modulation of solubilized GABA/benzodiazepine receptor complex, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45 (1993) 309-314.

Glencorse T.A., Bateson A.N., Darlison M.G., Differential localization of two alternatively spliced GABA_A receptor γ 2-subunit mRNAs in the chick brain, *Eur. J. Neurosci.* 4 (1992) 271-277

Glencorse T.A., Darlison M.G., Barnard E.A., Bateson A.N., Sequence and novel distribution of the chicken homologue of the mammalian γ -Aminobutyric acid_A receptor γ 1 subunit, *J. Neurochem.* 61 (1993) 2294-2302.

González N., Alfie J., Fiszler de Plazas, S., Glutamic acid decarboxylase in different areas of the developing chick Central Nervous System, *Neurochem. Res.* 15 (1990) 917-921.

Gravielle M.C., Fiszler de Plazas S., Benzodiazepine receptor sites in the chick optic lobe: development and pharmacological characterization, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 57-62.

Gravielle M.C., Flores V., Fiszer de Plazas S., The postnatal development of benzodiazepine receptor sites in the chick optic lobe is modulated by environmental lighting, *Neurochem. Int.* 20 (1992) 257-262.

Gravielle M.C., Fiszer de Plazas S. Ontogeny of two different benzodiazepine binding sites in the chick optic lobe, *NeuroReport* 6 (1995) 2510-2512.

Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Pavasant P., Piccoli F., Papadopoulos V., Neurosteroidogenesis in rat retinas, *J. Neurochem.* 63 (1994) 86-96.

Guastella J., Nelson N., Nelson H., Czyzyk L., Keynan S., Meidel M.C., Davidson N., Lester H.A., Kanner B.I., Cloning and expression of a rat brain GABA transporter, *Science* 249 (1990) 1303-1306.

Guennoun R., Fiddes R.J., Gonézon M., Lombès M., Baulieu E.-E., A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD), is expressed in rat brain., *Mol. Brain Res.* 30 (1995) 287-300.

Gunther U., Bneson J., Benke D., Fritch J.-M., Reyes G., Knoflach F., Crestani F., Aguzzi A., Arigoni M., Lang Y., Bluethmann H., Möhler H., Luscher B., Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the $\gamma 2$ subunit gene of the γ -aminobutyric acid type A receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7749-7753.

Gyernsek L., Soyka L.F., Steroid Anaesthetic, *Anaesthesiology* 42 (1975) 331-334.

Hadingham K.L., Wingrove P.B., Wafford K.A, Bain C., Kemp J.A., Palmer K.P., Wilson A.W., Wilcox A.S., Sikela J.M., Ragan C.I., Whiting P.J., Role of the β subunit determining the pharmacology of human γ -aminobutyric acid type A receptors, *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 1211-1218.

Haefely W., Benzodiazepines, *Int. Anestehsiol. Clin.* 26 (1988a) 262-272.

Haefely W., Benzodiazepines. Mechanisms of action. En *Atiepileptic drugs* (R. Levy, R. Mattson, B. Meldrum, J.K. Penry, F.E. Dreifus, editores), 3ra. edición, Raven Press Ltd. New York, EEUU de América (1989a) pág. 721-734.

Haefely W., Kyburz E., Gerecke M., Möhler H., Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and in the structure-activity relationships of their agonists and antagonists, *Advences in Drug Res.* 14 (1985) 165-322.

Haefely W., The GABA_A-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. En *Handbook of anxiety* (G.D Burrows, M. Roth, R. Noyes Jr., editores), Elsevier Science Co., New York, EEUU de América (1990) pág. 165-188.

Haefely W.E., Partial agonists of the benzodiazepine receptor: from animal data to results in patients. En *Chloride channels and their modulation by neurotransmitters and drugs* (G. Biggio, E. Costa, editores), Raven Press Ltd. New York, EEUU de América, (1988b), pág. 275-292.

Haefely W.E., Pharmacology of the benzodiazepine receptor, *Eur. Arch. Psychiatr. Neurol. Sci.* 238 (1989b) 294-301.

Hamburger V., *A Manual of Experimental Embryology*, University of Chicago Press, Chicago, EE. UU. de América (1960) pág. 143-149.

Harrison N.L., Majewska M.D., Harrington J.W., Barker J.L., Structure-activity relationship for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid_A receptor complex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241 (1987) 346-357.

Harvey R.J., Chinchetru M.A., Darlison M.G., Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of the chicken γ -aminobutyric acid_A receptor β 2 subunit, *J. Neurochem.*, 62 (1994) 10-16.

Harvey R.J., Darlison M.G., *In situ* hybridization localization of the GABA_A receptor β 2S- and β 2L-subunit transcripts reveals cell-specific splicing of alternate cassette exons, *Neurosci.* 77 (1997) 361-369.

Harvey R.J., Kim H.-C., Darlison M.G., Molecular cloning reveals the existence of a fourth γ subunit of the vertebrate brain GABA_A receptor, *FEBS Lett.* 331 (1993) 211-216.

Hawkinson J.E., Kinbrough C.L., Belevi D., Lambert J.J., Purdy R.H., Lan N.C., Correlation of neuroactive steroid modulation of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorotriate and [³H]flunitrazepam binding and γ -aminobutyric acid_A receptor function, *Mol. Pharmacol.* 46 (1994b) 977-985.

Hawkinson J.E., Kinbrough C.L., McCauley L.D., Bolger M.B., Yan N.C., Gee, K. W., The neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one is a two-component modulator of ligand binding to the GABA_A receptor, *Eur. J. Pharmacol.* 269 (1994a) 157-163.

Hedblom E., Kirkness E.F., A novel class of GABA_A receptor subunit in tissue of the reproductive system, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15346-15350.

Hill D.R., GABA_B receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices, *Br. J. Pharmacol.* 84 (1985) 249-257.

Hill-Venning C., Belelli D., Peters J.A., Lambert, J. J., Electrophysiological studies of neurosteroid modulation of γ -aminobutyric acid type A receptor. En *Neurobiology of Steroids: Methods in Neuroscience* (R.E. Dekloet, W. Sutanto editores.) Academic Press, San Diego, EE.UU. de América (1994) pág. 446-467,

Holtz G.G., Rance S.G., Dunlap K., GTP-binding protein mediates transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channel, *Nature* 319 (1986) 670-672.

Holzbauer M., Physiological aspects of steroid with anesthetic properties, *Med. Biol.* 22 (1976) 97-102.

Homanics G.E, Ferguson C., Quintan J.J, Daggett J., Snyder K., Langeaur C., Mi Z.-P., Wang X.-H., Grayson D.R., Firestone L.L., Gene knockout of the $\alpha 6$ subunit of the γ -aminobutyric acid typeA receptor: lack of effect on response to ethanol, pentobarbital, and general anesthetics, *Mol. Pharmacol.* 51 (1997a) 588-596.

Homanics G.E, DeLorey T.M., Firestone L.L., Quinlan J.J., Handford A., Harrison N.L., Krasowski M.D., Rick C.E.M., Korpi E.R., Makela R., Brilliant M.H., Hagiwara N., Ferguson C., Snyder K., Olsen R.W., Mice devoid of γ -aminobutyric typeA receptor $\beta 3$ subunit have epilepsy, cleft palate and hypersensitive behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997b) 4143-4148.

Horne A.L., Harkness P.C., Hadingham K.L., Whiting P., Kemp J.A., The influence of the $\gamma 2L$ subunit on the modulation of responses to GABA receptor activation, *Br. J. Pharmacol.* 108 (1993) 711-716.

Hunt S.P., Brecha N., The avian optic tectum: a synthesis of morphology and biochemistry. En *Comparative Neurology of the Optic Tectum* (H. Vanegas, editor), Plenum Press, New York, EE.UU. de América (1994) pág. 619-648.

Hunt S.P., Künzle H., Selective uptake and transport of label within three identified neuronal systems after injection of [³H]GABA into the pigeon optic tectum: an autoradiographic and Golgi study, *J. Comp. Neurol.* 170 (1976) 173-190.

Hutchison J.B., Schumacher M., Hutchison R.E., Developmental sex differences in brain aromatase activity are related to androgen level, *Dev. Brain Res.* 57 (1990) 187-195.

Im W.B., Blakeman D.P., Davis J.P., Ayer D.E., Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and γ -aminobutyric acid_A receptors, *Mol. Pharmacol.* 37 (1990) 429-434.

Inoue M., Matsuo T., Ogata N., Possible involvement of K⁺ conductance in the action of γ -aminobutyric acid in guinea-pig hippocampus, *Br. J. Pharmacol.* 86 (1985) 515-524.

Iversen L.L., Kelly J.S., Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells, *Biochem. Pharmacol.* 24 (1975) 933-938.

Johnston G.A., Willow M., GABA and barbiturate receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 3 (1982) 328-330.

Jones A., Korpi E.R., McKernan R.M., Pelz R., Nusser Z., Makela R., Mellor J.R., Pollard S., Bahn S., Stephenson F.A. Randall A.D., Sieghart W., Somogy P., Smith A.J.H., Wisden W., Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression, *J. Neurosci.* 17 (1997) 1350-1362.

Jung-Testas I., Hu Z.Y., Baulieu E.-E., Robel P., Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells, *Endocrinology* 125 (1989) 2083-2089.

Kabbadj K., El-Etr M., Baulieu E.-E., Robel P., Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes., *Glia* 7 (1993) 170-175.

Karbon E.W., Enna S.J., Characterization of the relationship between γ -aminobutyric acid_B agonists and transmitter coupled cyclic nucleotide-generating systems in rat brain, *Mol. Pharmacol.* 27 (1985) 53-59.

Khan Z.U., Fernando L., Escriba P., Busquets X., Mallet J., Miralles C., Filla M., De Blas A.L., Antibodies to the human γ 2-subunit of the γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine receptor, *J. Neurochem.* 60 (1993) 961-971.

Khan Z.U., Gutierrez A, De Blas A.L., The subunit composition of a GABA_A/benzodiazepine receptor from rat cerebellum, *J. Neurochem.* 63 (1994) 371-374.

Khan Z.U., Gutierrez A. De Blas A.L., The α 1 and α 6 subunits can coexist in the same cerebellar GABA_A receptor maintaining their individual benzodiazepine-binding specificities, *J. Neurochem.* 66 (1996) 685-691.

Kirkness E.F., Fraser C.M., A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human γ -aminobutyric acid type A receptor β 3 subunit (GABAR β 3), *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4420-4428.

Kofuji P., Wang J.B., Moss S.J., Hanganir R.L., Burt D.R., Generation of two forms of the γ -aminobutyric acid_A receptor γ 2-subunit in mice by alternative splicing, *J. Neurochem.* 56 (1991) 713-715.

Korpi E.R., Kuner T., Kristo P., Kohler M., Herb A., Luddens H., Seeburg P.H., Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar α 6 subunit abolishes GABA_A receptor function, *J. Neurochem.* 63 (1994) 1167-1170.

Pignataro L, Gravielle M.C., Fiszler de Plazas S., Neurosteroid modulation of the Benzodiazepine receptor in developing chick optic lobe, *Neurochem. Int.*, 29 (1996) 405-410.

La Vail, J. H., Cowan, W. M., The development of the chick optic tectum I. Normal morphology and cytoarchitectonic development, *Brain Res.* 28 (1971) 391-419.

Lambert J.J., Belelli D., Hill-Venning C., Callachan H., Peters J.A, Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA_A receptors, *Cell Mol. Neurobiol.* 16 (1996) 155- 174.

Lan N.C., Gee K.W., Bolger M.B., Chen J.S., Differential response of expressed recombinant human γ -aminobutyric acid_A receptors to neurosteroids, *J. Neurochem.* 57 (1991) 1818-1821.

Le Goascogne C., Robel P., Gouézou M., Sananes N., Baulieu E-E., Waterman M., Neurosteroids: Cytochrome P450_{scc} in rat brain, *Science* 237 (1987) 1212-1215.

Leeb-Lundberg F., Snowman A., Olsen R.W., Barbiturate receptors are coupled to benzodiazepine receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 (1980) 7468-7472.

Leeb-Lundberg F., Snowman A., Olsen R.W., Perturbation of benzodiazepine receptor binding by pyrazolopyridines involves picrotoxinin/barbiturate receptor sites, *J. Neurosci.* 1 (1981a) 471-477.

Leeb-Lundberg, F., Snowman, A. M., Olsen, R. W., Interaction of anticonvulsants with the barbiturate-benzodiazepine-GABA receptor complex, *Eur. J. Pharmacol.* 72 (1981b) 125-129.

Leff P., The two-state model of receptor activation, *TIPS* 16 (1995) 89-97.

Leidenheimer N.J., Chapell R., Effect of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA_A receptor, *Mol. Brain Res.* 52 (1997) 173-181.

Li M., De Blas A.L., Coexistence of two β subunit isoforms in the same γ -aminobutyric acid type A receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16564-16569.

Liu Q. R., Lopez Corcuera B., Madiyan S., Nelson H., Nelson N., Molecular characterization of four pharmacologically distinct γ -aminobutyric acid transporters in mouse brain, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2106-2112.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall P.J., Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Luddens H., Korpi E.R., Seeburg P.H., GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications, *Neuropharmacol.* 34 (1995) 245-254.

Lüdens, H., Wisden, W., Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits, *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 49-51.

Macdonald R., Olsen R.W., GABA_A receptor channels, *Ann. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 569-602.

Macdonald R., Barker J.L., Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons., *Nature* 271 (1978) 563-564.

Majbeesh N.J., Frese M., Ranen T., Jeserich G., Kanner B.I., Neuronal and glial γ -aminobutyric acid transporters are distinct proteins, *FEBS Lett.* 299 (1992) 99-102.

Majewsak M.D., Harrison N.L., Schwartz R.D., Barker J.L., Paul S.M., Steroid hormonemetabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor, *Science* 232 (1986) 1004-1007.

Majewska M.D., Demirgoren S., Spivak C.E., London E.D., The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA_A receptor, *Brain Res.* 526 (1990) 143-146.

Makriyannis A., DiMeglio C.M., Fesik S.W., Anesthetic steroid mobility in model membrane preparations as examined by high-resolution ¹H and ²H NMR spectrometry, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 1700-1706.

Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J., Myers R.M., Julius D., Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel, *Science* 254 (1991) 432-437.

Massa R, Sharp P.J., Conversion of testosterone to 5β-reduced metabolites in the neuroendocrine tissue of the maturing cockerel, *J. Endocrinol.* 88 (1981) 263-269.

McCauley L.D., Liu V., Chen J-S., Hawkinson J.E., Lan N.C., Gee K.W., Selective actions of certain neuroactive pregnenediols at the γ-aminobutyric acid type A receptor complex in rat brain, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 354-362.

McGeer P.L., McGeer E.G., Amino acid neurotransmitters. En *Basic Neurochemistry* (G.J. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers, P. Molinoff, editores), 4ta. edición, Raven Press, New York, EEUU de América (1989) pág. 311-332.

Mehta A.K., Ticku M.K., An update on GABA_A receptors, *Brain Res. Rev.* 29 (1999) 196-217.

Mellon S.H. Neurosteroids: Biochemistry, modes of action and clinical relevance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 1003-1008.

Mellon S.H., Deschepper C.F., Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain, *Brain Res.* 629 (1993) 283-292.

Morrow A.L., Pace J.H., Purdy R.H., Paul S.M., Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites, *Mol. Pharmacol.* 37 (1989) 263-270.

Nakamura T, Tanabe Y., In vitro metabolism of steroids by chicken brain, *Acta Endocrinol. Copenh.* 75 (1974) 410-416.

Ogurusu T, Shingai R., Cloning of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor rho3 cDNA. *Biochem, Biophys. Acta* 1305 (1996) 15-18.

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

Olsen R.W., Tobin A.J., Molecular biology of GABA_A receptors, *FASEB J.* 4 (1990) 1469-1480.

Orchinik M., Weiland N.G., McEwen B.S., Chronic exposure to stress levels of corticosterone alters GABA_A receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 35 (1995) 29-37.

Papadopoulos V., Guarneri R., Krueger K.E., Guidotti A., Costa E., Pregnenolone biosynthesis in C6 glioma cell mitochondria: Regulation by diazepam binding inhibitor mitochondrial receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 5113-5117.

Persohn E., Malherbe P., Richards J.G., Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA_A receptor subunits in the rat CNS, *J. Comp. Neurol.* 326 (1992) 193-216.

Petersen S.L., Reeves A. Keller M., Garder E., Mahan L.C., McCrone S., Effects of estradiol and progesterone on expression of mRNA encoding GABA_A receptor subunits, *Soc. Neurosci. Abstr.* 19 (1993) 489.13.

Pignataro L., Gravielle M.C., Fiszler de Plazas S., Neurosteroid modulation of the Benzodiazepine receptor in developing chick optic lobe, *Neurochem. Int.* 29 (1996) 405-410.

Poulter M.O., Barker J.L. O'Carroll A.-M., Lolait S.J., Mahan L.C., Differential and transient expression of GABA_A receptor α -subunit mRNAs in developing rat CNS, *J. Neurosci.* 12 (1992) 2888-2900.

Pregenzer J.F., Im W.B., Carter D.B., Thomsen D.R., Comparison of interactions of [³H]muscimol, t-butylbicyclophosphoro[³⁵S]thionate, and [³H]flunitrazepam with cloned γ -aminobutyric acid_A receptors of the $\alpha 1\beta 2$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ subtypes, *Mol. Pharmacol.*, 43 (1993) 801-806.

Prince R.J., Simmonds M.A., Differential antagonism by epipregnanolone of alphaxlone and pregnanolone potentiation of [³H]flunitrazepam binding suggests more than one class of binding site for steroids at GABA_A receptors, *Neuropharmacol.* 32 (1993) 59-63.

Prince R.J., Simmonds M.A., 5 β -Pregnan-3 β -ol-20-one, a specific antagonist at the neurosteroid site of the GABA_A receptor complex, *Neurosci. Lett.* 135 (1992) 273-275.

Puia G. Ducic I., Vicini S, Costa E., Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA_A receptor subunit composition?. En *Receptors and Channels*, Harwood Academic Press GmbH, Alemania (1993), pág. 135-142.

Pulvirenti L., Koob G.F., Dopamine receptor agonist, partial agonist and psychostimulant addiction, *TIPS* 15 (1994) 374-378.

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

Ragozzino D., Woodward R.M., Murata Y., Eusebi F., Overman L.E., Miledi R., Design and *in vitro* pharmacology of a selective γ -aminobutyric acidC receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 1024-1030.

Ramón y Cajal S. En *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*, Maloine, Paris, Francia (1911).

Rho J.M., Donevan S.D., Rogawski M.A., Direct activation of GABA_A receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons, *J. Physiol.* 497 (1996) 509-522.

Rios H., Flores V., Fiszer de Plazas S., Effect of light- and dark-rearing on the postnatal development of GABA receptor sites in the chick optic lobe, *Int. J. Devl. Neuroscience* 5 (1987) 319-325.

Robel P., Bourreau E., Corpéchet C., Dang D.C., Halberg F., Clarkes C., Hang M., Schlegel M.L., Synguelakis M., Vourc'h C., Baulieu E.-E., Neuro-steroids: 3 β -hydroxy- Δ^5 -derivatives in rat and monkey brain, *J. Steroid Biochem.* 27 (1987) 649-655.

Robertson B., Actions of anesthetics and avermectin on GABA_A chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurons, *Br. J. Pharmacol.* 98 (1989) 167-176.

Rogers C.J., Twynman R.E., MacDonald R.L., Benzodiazepine and β -carboline regulation of single GABA_A receptor channels of mouse spinal neurones in culture, *J. Physiol.* 475 (1994) 69-82.

Rodboard D., Munson P.J., Thakur A.K., Quantitative characterization of hormone receptor, *Cancer* 46 (1980) 2907-2918.

Rupprecht R., Hauser C.A., Trapp T., Holsboer F., Neurosteroids: molecular mechanisms of action and psychopharmacological significance, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 56 (1996) 163-168.

Rupprecht R., Reul J.M.H.M., Trapp T., vanSteensel B., Wetzel C., Damm K., Zieglgänsberger W., Holsboer F., Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids, *Neuron* 11 (1993) 523-530.

Sakmann B, Hamill O.P., 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 (1983) 83-95.

San Martín, S., Andrés-Trelles, F., Menéndez, L., Meana, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., Interaction among alfaxalone, pregnenolone sulfate and two GABA_A agonists on hippocampal slices, *Cell. Mol. Neurobiol.* 16 (1996) 427-431.

Sanna E., Murgia A., Casula A., Biggio G., Differential subunit dependence of the actions of the general anesthetics alfaxalone and etomidate at γ -aminobutyric acid type A receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes, *Mol. Pharmacol.* 51 (1997) 484-490.

Sanne J-L., Krueger K.E., Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat Central Nervous System: A study by Polymerase Chain Reaction and in situ hybridization, *J Neurochem.* 65 (1995) 528-536.

Scatchard B., The attraction of proteins for small molecular ions, *Ann. NY. Acad. Sci.* 51 (1949) 660-672.

Schlinger B.A., Callard G., V., Aromatase activity in quail brain: correlation with aggressiveness, *Endocrinol.* 124 (1989)437-443.

Schlinger B.A., Callard G.V., A comparison of aromatase, 5 α -, and 5 β -reductase activities in the brain and pituitary of male and female quail (*C. c. japonica*), *J. Exp. Zool.* 242 (1987) 171-180.

Schlinger B.A., Fivizzani A.J., Callard G.V., Aromatase, 5 α - and 5 β -reductase in brain, pituitary and skin of the sex-role reversed Wilson's phalarope, *J. Endocrinol.* 122 (1989) 573-581.

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

Schousboe A., Redburn D.A., Modulatory actions of gamma aminobutyric acid (GABA) and GABA type A receptor subunit expression, *J. Neurosci. Res.* 41 (1995) 1-7.

Schumacher M., McEwen B.S., Steroids and barbiturate modulation of the GABA_A receptor, *Mol. Neurobiol.* 3 (1989) 275-304.

Schumacher M., Robel P., Baulieu E.-E., Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids, *Dev. Neurosci.* 18 (1996) 6-21.

Schwartz R.D., Skolnick P., Seale T.W., Paul S.M., Demonstration of GABA/Barbiturate-Receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes: A functional assay of GABA receptor-effector coupling. En *GABAergic Transmission and Anxiety* (G. Biggio, E. Costa, editores), Raven Press, New York, EE. UU, de América (1986), pág. 33-49.

Scicolone G., Pereyra-Alfonso A., Brusco A., Pecci Saavedra J., Developmental of the laminated pattern of the chick tectum opticum, *Int. J. Devl. Neurosci.* 13 (1995) 845-858.

Seabrook G.R., Howson W., Lacey M.G., Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and post-synaptic GABA_B receptors on neurones in rat brain slices, *Brit. J. Pharmacol.* 101 (1990) 949-957.

Segal M., GABA induces a unique rise of $[Ca^{2+}]_i$ in cultured rat hippocampal neurons, *Hippocampus* 3 (1993) 229-238.

Seiler N., On the role of GABA in vertebrate polyaminemetabolism, *Physiol. Chem. Phys.* 12 (1980) 411-429.

Selye H., Anaesthetic effects of steroids hormones, *Prod. Soc. Exp. Biol. Med.* 46 (1941) 116-120.

Shimada S., Cutting G., Uhl G.R., γ -Aminobutyric acid A or C receptor? γ -Aminobutyric acid $\rho 1$ receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ -aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes, *Mol. Pharmacol.* 41 (1992) 683-687.

Shingai R., Sutherland M.L., Barnard E.A., Effects of subunit types of the cloned GABA_A receptor on the response to a neurosteroid, *Eur. J. Pharmacol.* 206 (1991) 77-80.

Siegel E., Baur R., Trube G., Möhler H., Malherbe P., The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function, *Neuron* 5 (1990) 703-711.

Silviotti L., Nistri A., GABA receptor mechanisms in the central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 36 (1991) 35-92.

Skolnick P., Moncada V., Barker J.L., Paul, S.M., Pentobarbital: Dual actions to increase brain benzodiazepine receptor affinity, *Science* 211 (1981) 1448-1450.

Skolnick P., Rice K., Barker J.L., Paul S.M., Interaction of barbiturates with benzodiazepine receptors in the central nervous system, *Brain Res.* 233 (1982) 143-155.

Squires R.F., Casida J.E., Richardson M., Saederup E., [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate binds with high affinity to brain-specific sites coupled to gamma-aminobutyric acid ion recognition site, *Mol. Pharmacol.* 23 (1983) 326-336.

Stephenson F.A., Duggan M.J., Pollard S., The γ 2-subunit is an integral component of the γ -aminobutyric acid_A receptor but the α 1-polypeptide is the principal site of the agonist benzodiazepine photoaffinity labelling reaction, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 21160-21165.

Stephenson F.A., Purification and molecular characterization of the γ -aminobutyric acid_A receptor. En *Receptor Biochemistry - A practical approach* (D. Rickwood y B. D. Hames, editores), IRL Press, Oxford, Inglaterra (1990) pág. 177-201.

Sternberger L.A., Hardy P.J.R., Cuculis J.J., Meyer H.G., The unlabeled antibody-enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradich peroxidase) and its use in identification of spirochetes, *J. Histochem. Cytochem.* 26 (1970) 971-991.

Stewart M.G., Bourne R.C., Chmielowska J., Kalman M., Csillag A., Stanford D., Quantitative autoradiographic analysis of the distribution of [³H]muscimol binding to GABA_A receptors in chick brain, *Brain Res.* 456 (1988) 387-391.

Strange P.G., Agonist binding to G-coupled recetors , *Br. J. Pharmacol* 129 (2000) 820-821.

Study, R. E., Barker J. L., Diazepam and (-)pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (1981) 7180-7184.

Tretter V., Ehya N., Fuchs K., Sieghart W., Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype, *J. Neurosci.* 17 (1997) 2728-2737.

Tsutsui K., Yamazaki T., Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail, *Brain. Brain Res.* 678 (1995) 1-9.

Turner D., Ransom R.W., Yang J.S-J., Olsen R.W., Steroid anaesthetics and anturally occurring analogs modulate the gamma-aminobutyric acid receptor complex at a site distinc from barbiturates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248 (1989) 960-966.

Unwin N., Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 229 (1993) 1101-1124.

Unwin N., The structure of ion channels in membranes of excitable cells, *Neuron* 3 (1989) 665-676.

Usui M., Yamazaki T., Kominami S., Tsutsui K., Avian neurosteroids. II. Localization of a cytochrome P450_{scc}-like substance in the quail brain, *Brain Res.* 678 (1995) 10-20.

Veenman C.L., Albin R.L., Richfield E.K., Reiner A., Distribution of GABA_A, GABA_B, and Benzodiazepine receptors in the forebrain and midbrain of pigeons, *J. Comp. Neurol.* 344 (1994) 161-189.

Viapiano M.S., Mitridate de Novara A. M., Fiszer de Plazas S., Neurosteroid modulation of GABA binding sites in developing avian central nervous system, *Neurochem Int.* 32 (1998) 291-298.

Viapiano M.S., Fiszer de Plazas S., 3 β -OH-5 β -Pregnan-20-one enhances [³H]GABA binding in developing chick optic lobe, *J. Receptor Signal Transd. Res.* 17 (1997) 585-597.

Viapiano M.S., Fiszer de Plazas S., Comparative modulation by 3 α ,5 α and 3 β ,5 β neurosteroids of GABA binding sites during avian central nervous system development, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 155-161.

Villinger J. W., Characterization of peripheral-type benzodiazepine recognition sites in the rat spinal cord, *Neuropharmacol.* 24 (1985) 95-98.

Wade J., Schlinger B.A., Arnold A.P., Aromatase and 5 β -reductase activity in cultures of developing Zebra Finch brain: an investigation of sex and regional differences, *J. Neurobiol.* 27 (1995) 240-251.

Weiland N., Orchinik M., Specific subunit mRNAs of the GABA_A receptor are regulated by progesterone in subfields of the hippocampus, *Mol. Brain Res.* 32 (1995) 271-278.

Wermuth C.G., Biziere K., Pyridazinyl-GABA derivatives: a new class of synthetic GABA_A antagonists, *TIPS* 7 (1986) 421-424.

Whiting P., McKernan R.M., Iversen L.L., Another mechanism for creating diversity in γ -aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of γ 2 phosphorylation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 9966-9970.

Wilkin G.P., Hudson A.L., Hill D.R., Bowery N.G., Autoradiographic localization of GABA_B receptors in rat cerebellum, *Nature* 294 (1981) 584-587.

Willow M., Johnston G.A.R., Enhancement of GABA binding by pentobarbitone, *Neurosci. Lett.* 18 (1980) 323-327.

Willow M., Johnston G.A., Dual actions of pentobarbitone on GABA binding: Role of binding site integrity, *J. Neurochem.* 37 (1981) 1291-1294.

Wisden W., Laurie D.J., Monyer H., Seeburg P.H., The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNA in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon, *J. Neurosci.* 12 (1992) 140-1062.

Wisden W., Morris B.J., Darlison M.G., Hunt S.P., Barnard, E.A., Localization of GABA_A receptor α -subunit mRNAs in relation to receptor subtypes, *Mol. Brain Res.* 5 (1989) 305-310.

Wojcik W.J., Neff N.H., γ -Aminobutyric acid_B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these may be associated with granule cells, *Mol. Pharmacol.* 25 (1984) 24-28.

Wong G., Sei Y., Skolnick P., Stable expression of type I γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine receptors in a transfected cell line, *Mol. Pharmacol.* 42 (1992) 996-1003.

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

Yu R., Follesa P., Ticku M.K., Down-regulation of the GABA receptor subunits mRNA levels in mammalian cultured cortical neurons following chronic neurosteroid treatment, *Mol. Brain Res.* 41 (1996) 163-168.

Yu R., Follesa P., Ticku M.K., Down-regulation of the GABA receptor subunits mRNA levels in mammalian cultures cortical neurons following chronic neurosteroid treatment, *Mol. Brain Res.* 41 (1996) 163-168.

Yu R., M.K. Ticku, Chronic neurosteroid treatment decreases the efficacy of benzodiazepine ligands and neurosteroids at the γ -Aminobutyric acid_A receptor complex in mammalian cortical neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275 (1995b) 784-789.

Yu R., M.K. Ticku, Chronic neurosteroid treatment produced functional heterologous uncoupling at the γ -aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptor complex in mammalian cortical neurons, *Mol. Pharmacol.* 47 (1995a) 603-610.

Yu R., Ticku M.K., Chronic neurosteroid treatment attenuates single cell GABA_A response and its potentiation by modulators in cortical neurons, *Brain Res.* 706 (1996) 160-162.

Zeuzula J., Slany A. Sieghart W., Interactions of allosteric ligands with GABA_A receptors containing one, two or three different subunits, *Eur. J. Pharmacol.* 301 (1996) 207-214.

Zhang D., Pan Z., Zhang X., Brideau A., Lipton S., Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 11756-11760.