

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de tesis

ONTOGENIA DEL COMPLEJO RECEPTOR GABA_A EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE LAS AVES: MODULACION POR
BARBITURICOS, NEUROESTEROIDES Y FACTORES ENDOGENOS.

Autor

Lic. Mariano Sebastián Viapiano

Director de Tesis

Dra. Sara Fiszer de Plazas

Lugar de trabajo

Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. Dr. Eduardo De Robertis”

Facultad de Medicina

Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1998

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer, en primer lugar, a mi Directora de Tesis, Dra. Sara Fiszler de Plazas, por el constante estímulo y dedicación brindados a lo largo de mi actividad en su laboratorio, que han permitido establecer entre nosotros una muy buena relación superando el ámbito profesional.

A mis compañeros de trabajo y amigos personales, Leonardo Pignataro y María Clara Gravielle, por su invaluable apoyo y colaboración profesional y personal, por su paciencia, buen humor y alegría a lo largo de tantas experiencias que hemos vivido juntos. Agradezco también a mi compañero de trabajo Diego Rodríguez Gil, nuevo integrante de nuestro equipo, por la incesante colaboración y ayuda provistas en las etapas finales de esta tesis así como por su amistad y buena sintonía personal.

A mi “segunda jefa” y compañera Alba Mitridate de Novara, de la mano de quien aprendí los secretos de cocina de un laboratorio de investigación. Agradezco su dedicación en las etapas iniciales de mi formación, así como la colaboración permanente en nuestra actividad diaria.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Biología Celular y Neurociencias, por las pequeñas (y grandes) cosas de todos los días que nos han hecho un grupo unido al cual valoro enormemente. Agradezco muy especialmente a Lisandro Giráldez por su invaluable amistad, su apoyo profesional y personal, y por haberme enseñado a descubrir los sabores sutiles y ocultos de los mejores momentos de mi vida que, en su ausencia, habrían pasado desapercibidos.

Agradezco asimismo a todos los investigadores, muchos de cuyos nombres escapan a mi memoria, gracias a cuya solidaridad desinteresada pudieron llevarse a cabo etapas experimentales del presente trabajo. Especialmente a los Licenciados Walter Mac Cormack y María Victoria Miranda de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA), gracias a quienes se pudo realizar la preparación de las muestras (SN) utilizadas en la etapa final de la tesis, así como a la Dra. Edda Adler de Graschinsky, Directora del Instituto

de Investigaciones Farmacológicas (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) y al Dr. Diego Golombek, de la Cátedra de Fisiología (Facultad de Medicina, UBA), por la amable provisión de drogas requeridas para el presente estudio.

Deseo agradecer además a las autoridades del Instituto de Biología Celular y Neurociencias, por haberme aceptado como integrante estable del mismo y haber apoyado mis investigaciones en todo momento. Asimismo, agradezco a las Instituciones que financiaron mi actividad de investigación: Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y Fundación Antorchas.

Un reconocimiento muy especial, en lo personal, a mi familia, por su constante apoyo a lo largo de mis años dedicados al estudio y la investigación. Por su comprensión permanente, su presencia, y por el valor especial que poseen en mi vida.

Finalmente, si bien en la realidad ocupa el primer lugar en mi existencia, a la persona que me apoya, me ilumina y me acompaña en el sendero de vida. Sin ella no tendría el orgullo y la alegría de haber llegado hasta mi posición actual, en todos sus aspectos -más allá del profesional-. En su casa comenzó el tipeo tímido de las primeras páginas de la presente tesis. Por todas aquellas cosas que trascienden las palabras, gracias Moriana.



A mis padres, con profundo orgullo

A Moriana, con el amor más absoluto
que mi alma puede ofrecerle.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE TESIS

3 α ,5 α -P	5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona
3 β ,5 α -P	5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona
3 α ,5 β -P	5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona
3 β ,5 β -P	5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona
Abs	absorbancia
Ae	actividad específica
ANOVA	análisis de varianza
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Bmax	número máximo de sitios receptores
BZD	benzodiazepina/s
°C	grados centígrados
Ci	Curie
Da	Dalton
DBI	Diazepam binding inhibitor (Inhibidor de la unión de Diazepam)
DHEA-S	dehidroepiandrosterona sulfato
dpm	desintegraciones por minuto
Ed14	embriones de 14 días de incubación
Ed16	embriones de 16 días de incubación
EC ₅₀	concentración de droga que causa el 50% de la estimulación máxima
E _{max}	máximo % de aumento en la unión del radioligando
EN	esteroide/s neuroactivo/s
g	aceleración de la gravedad
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	glutamato decarboxilasa
GAT	transportador de GABA
[³ H]	Tritio
IC ₅₀	concentración de droga que causa el 50% de la inhibición máxima
Ka	constante de asociación aparente

Kd	constante de disociación aparente
KDa	Kilodalton
Ki	Ka del inhibidor en un ensayo de competencia
LO	lóbulo óptico
log	logaritmo decimal
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
M	molar
NE	neuroesteroide/s
nm	nanometros
nM	nanomolar
PB	pentobarbital
PM	peso molecular
pmol	picomol
PS	pregnenolona sulfato
PTX	picrotoxina
RN	animales recién nacidos
SEM	error estandar del promedio
SN	sobrenadante
SNC	Sistema Nervioso Central
SNp	sobrenadante extraído de tejido sedimentado congelado
SNs	sobrenadante extraído de tejido congelado en suspensión
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
UV	ultravioleta

INDICE

	Página
Índice de Figuras	
Índice de Tablas	
INTRODUCCION	1
1. Neurotransmisión GABAérgica	1
1.1. El ácido γ -aminobutírico	1
1.2. Metabolismo del GABA	2
1.3. Receptores GABAérgicos: Subtipos	5
1.4. El complejo receptor GABA _A	7
2. Farmacología del complejo receptor GABA _A	10
2.1. Los moduladores clásicos del receptor GABA _A : Benzodiazepinas y Barbitúricos.	13
2.1.1. Benzodiazepinas	13
2.1.2. Barbitúricos	14
2.2. Nuevos moduladores del receptor GABA _A : Neuroesteroides	17
2.2.1 Biosíntesis de neuroesteroides	17
2.2.2 Mecanismos de acción de los neuroesteroides	20
2.2.3 Mecanismos de acción de los neuroesteroides	22
en el receptor GABA _A	
2.2.4 Otros sitios de acción de los neuroesteroides	24
2.2.5 Significancia fisiológica y psicofarmacológica	25
de los neuroesteroides	

3. Microambiente del receptor GABA _A . Factores endógenos y estructura de la membrana sináptica	27
3.1 Factores endógenos que actúan a nivel del receptor GABA _A	27
3.2 Preparación de membranas sinápticas	29
4. La vía visual de las aves	30
4.1. Estructura y desarrollo del lóbulo óptico	31
4.2. Neurotransmisión GABAérgica en el lóbulo óptico	33
4.3. Estudio de los receptores GABA _A en el lóbulo óptico	36
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS	39
1. Drogas y reactivos químicos	39
2. Animales	40
3. Preparación de membranas sinápticas	40
4. Ensayos de unión de radioligando	41
5. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes de los sitios receptores	43
6. Determinación del efecto de distintos moduladores sobre la unión del [³ H]GABA a sus sitios receptores	44
7. Determinación de competición entre neuroesteroides por análisis de Schild	46
8. Determinación de proteínas	46
9. Preparación de sobrenadantes de lavado de membranas sinápticas	47
10. Cromatografía en geles moleculares de los sobrenadantes	47
11. Análisis estadístico de los resultados	49

RESULTADOS	50
1. Sitios receptores GABAérgicos y efecto de la congelación de membranas sinápticas.	50
1.1 Peso del lóbulo óptico y contenido de proteínas totales a lo largo del desarrollo.	50
1.2 Unión específica de [³ H]GABA a lo largo del desarrollo.	52
1.3 Análisis del aumento de unión [³ H]GABA en membranas congeladas	54
2. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos.	58
2.1 Efecto del pentobarbital sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad.	58
2.2 Efecto del pentobarbital sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad.	61
2.3 Caracterización de los sitios moduladores de alta afinidad.	63
2.4 Mecanismo farmacológico de acción del pentobarbital sobre los sitios receptores GABAérgicos.	65
3. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por neuroesteroides	69
3.1 Efecto de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad.	69
3.2 Efecto de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad.	72
3.3 Mecanismo farmacológico de acción de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos.	74
3.4 Análisis del efecto de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad detectados con concentraciones decrecientes de [³ H]GABA .	78
3.5 Estudio de relación estructura-actividad para diversos neuroesteroides moduladores del receptor GABA _A .	80

3.6 Efecto moduladorio de la 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad.	82
3.7 Mecanismo farmacológico de acción de la 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos	84
3.8 Desplazamiento del efecto estimuladorio de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona por la 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona.	87
3.9 Análisis de Schild de la competición entre 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona y 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona.	89
4. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos y neuroesteroides aplicados conjuntamente.	91
4.1 Presencia de efectos aditivos entre barbitúricos y neuroesteroides aplicados conjuntamente.	91
4.2 Desplazamiento diferencial de barbitúricos y neuroesteroides en distintas preparaciones de membranas sinápticas.	96
5. Posibles factores endógenos que afectan la modulación de los sitios receptores GABAérgicos.	99
5.1 Sobrenadantes obtenidos en la preparación de membranas sinápticas congeladas.	99
5.2 Efecto de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores.	101
5.3 Efecto de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas sobre la modulación de la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores.	103
5.4 Cromatografía en Sephadex G100 de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas.	106
DISCUSION	108

- ¿Es el GABA una buena elección para marcar al receptor GABA _A ?	108
- ¿Cuál es la ventaja de congelar las membranas sinápticas?	110
- Análisis de los sitios receptores y correlación ontogenética de los parámetros obtenidos.	111
- Perfil de aparición de los sitios receptores GABAérgicos a lo largo del desarrollo.	113
- Sitios receptores de alta afinidad: ¿población real o artefacto?	115
- Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos	116
- Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por neuroesteroides	119
- Relación estructura-actividad para neuroesteroides	121
- Agonistas totales y parciales de los sitios moduladores de neuroesteroides	122
- ¿Hay más de un sitio de unión para neuroesteroides?	124
- Relevancia biológica de los neuroesteroides 5β-reducidos	126
- Barbitúricos y neuroesteroides: ¿sitio de acción común o sitios diferentes?	127
- Remoción de factores endógenos durante la congelación-descongelación de las membranas sinápticas.	132
- Posibles factores moduladores del receptor GABA _A	133
- Consideraciones metodológicas finales	135
- Consideraciones ontogenéticas finales	137
CONCLUSIONES	141
RESUMEN	143

SUMMARY 146

BIBLIOGRAFIA 148

-- 000 ---

INDICE DE FIGURAS:

	Página
Figura 1: Esquema simplificado de las vías de síntesis y degradación del GABA en el terminal sináptico.	4
Figura 2: Estructura molecular del complejo receptor GABA _A	8
Figura 3: Relación entre los sitios de unión para distintos ligandos del complejo receptor GABA _A	11
Figura 4: Fórmula molecular genérica de BZD y barbitúricos	15
Figura 5: Principales vías de síntesis de neuroesteroides en el SNC	18
Figura 6: Neuroesteroides originados por metabolismo de la progesterona	20
Figura 7: Vista lateral de las principales estructuras encefálicas de las aves.	31
Figura 8: Perfil de laminación del LO a lo largo del desarrollo	34
Figura 9: Evolución del peso del LO y el contenido de proteínas de la fracción de membranas sinápticas a lo largo del desarrollo	51
Figura 10: Evolución de la unión específica de [³ H]GABA a lo largo del desarrollo.	53
Figura 11: Gráficos de Scatchard representativos de la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores en distintos estadios del desarrollo.	55
Figura 12: Estimulación por PB de la unión de [³ H]GABA a sus sitios de baja afinidad en distintos estadios del desarrollo.	59

Figura 13: Estimulación por PB de la unión de [³ H]GABA a sus sitios de alta afinidad en distintos estadios del desarrollo.	62
Figura 14: Efecto de antagonistas GABAérgicos sobre la unión de [³ H]GABA estimulada por PB.	64
Figura 15: Gráficos de Scatchard representativos de la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores en ausencia y presencia de PB	66
Figura 16: Estimulación por 3 α ,5 α -P de la unión de [³ H]GABA a sus sitios de baja afinidad en distintos estadios del desarrollo.	70
Figura 17: Estimulación por 3 α ,5 α -P de la unión de [³ H]GABA a sus sitios de alta afinidad en distintos estadios del desarrollo.	73
Figura 18: Gráficos de Scatchard representativos de la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores en ausencia y presencia de 3 α ,5 α -P.	75
Figura 19: Efecto de concentraciones de [³ H]GABA decrecientes en la acción estimuladora de 3 α ,5 α -P.	79
Figura 20: Efecto de distintos NE sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores.	81
Figura 21: Estimulación por 3 β ,5 β -P de la unión de [³ H]GABA a sus sitios de baja afinidad en distintos estadios del desarrollo.	83
Figura 22: Gráficos de Scatchard representativos de la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores en ausencia y presencia de 3 β ,5 β -P.	85
Figura 23: Desplazamiento de la estimulación de 3 α ,5 α -P sobre la unión de [³ H]GABA mediante concentraciones crecientes de 3 β ,5 β -P.	88

Figura 24: Análisis de Schild de la competencia entre $3\alpha,5\alpha$ -P y $3\beta,5\beta$ -P	90
Figura 25: Estimulación de la unión de [3 H]GABA por un rango de concentraciones de $3\alpha,5\alpha$ -P más PB en concentración saturante.	92
Figura 26: Estimulación de la unión de [3 H]GABA por un rango de concentraciones de $3\alpha,5\alpha$ -P más PB en baja concentración.	95
Figura 27: Desplazamiento producido por PTX del efecto estimulador de PB y $3\alpha,5\alpha$ -P.	97
Figura 28: Perfiles de elución cromatográficos para SNp y SNs	100
Figura 29: Aumento de la unión de [3 H]GABA por concentraciones crecientes de SNp o SNs.	102
Figura 30: Disminución del efecto estimulador de PB y $3\alpha,5\alpha$ -P por concentraciones crecientes de SNp o SNs.	104
Figura 31: Disminución del efecto estimulador de PB y $3\alpha,5\alpha$ -P por SNp y SNs aplicados conjuntamente.	105
Figura 32: Cromatografía de SNp en Sephadex G100. Acción inhibitoria de la fracción recuperada sobre el efecto estimulador de PB y $3\alpha,5\alpha$ -P.	107
Figura 33: Modelo final de interacción entre los sitios receptores GABAérgicos y los sitios moduladores a lo largo del desarrollo.	140

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I: Ligandos específicos para los tres tipos de receptores GABAérgicos conocidos.	7
Tabla II: Algunos compuestos con acción directa sobre el complejo receptor GABA _A .	12
Tabla III: Análisis de la unión específica de [³ H]GABA a sus sitios 56 receptores en distintos estadios del desarrollo.	56
Tabla IV: Efecto de PB sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad.	60
Tabla V: Efecto de PB sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores de alta afinidad.	62
Tabla VI: Análisis de la unión específica de [³ H]GABA a sus sitios receptores en presencia y ausencia de PB.	67
Tabla VII: Efecto de 3α,5α-P sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad.	71
Tabla VIII: Efecto de 3α,5α-P sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores de alta afinidad.	73
Tabla IX: Análisis de la unión específica de [³ H]GABA a sus sitios receptores en presencia y ausencia de 3α,5α-P.	76
Tabla X: Efecto de 3β,5β-P sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad.	83

Tabla XI: Análisis de la unión específica de [³ H]GABA a sus sitios receptores en presencia y ausencia de 3β,5β-P.	86
Tabla XII: Análisis de Schild de la competición entre 3α,5α-P y 3β,5β-P.	89
Tabla XIII: Efecto conjunto de PB y 3α,5α-P sobre la unión de [³ H]GABA a sus sitios receptores.	93

INTRODUCCION

El funcionamiento del Sistema Nervioso está organizado sobre una serie de principios rectores básicos. Uno de los más importantes es la inhibición tónica del mismo, siendo la desinhibición el proceso por el cual los circuitos neurales reciben señales, las interpretan y generan respuestas en una forma optimizada.

1. Neurotransmisión GABAérgica

La neurotransmisión inhibitoria posee un rol fundamental para el procesamiento de información a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). Actuando a través de proyecciones inhibitorias, o en interneuronas de circuitos locales, la misma permite el ajuste de temporalización, sensibilidad y versatilidad de los sistemas que procesan información, estableciendo frecuencias y secuencias de actividad e impidiendo que los mismos entren en un estado caótico de descarga paroxística o agotamiento e inactividad. La comunicación apropiada entre neuronas a través de neurotransmisores inhibitorios es por lo tanto esencial para el mantenimiento de ese estado de funcionamiento ordenado.

Bioquímicamente, la neurotransmisión inhibitoria se basa en la liberación de compuestos que disminuyen la actividad despolarizante en las neuronas receptoras. Los más importantes neurotransmisores inhibitorios son los aminoácidos ácido γ -aminobutírico (GABA) y glicina.

1.1 El ácido γ -aminobutírico

Desde que fuera hallado por primera vez en el SNC en 1950 (Awapara y col.; Roberts y Frankel; Underfriend), numerosos trabajos experimentales postularon la acción del GABA como molécula neurotransmisora (por ej. Kuffer y Edwards, 1958;

Dudel y Kuffler, 1961). En ellos se lo sugería como un posible transmisor inhibitorio, capaz de producir hiperpolarización en las células a las cuales era aplicado iontoforéticamente. Actualmente se lo considera el más importante neurotransmisor inhibitorio en el SNC de vertebrados, habiéndose estimado que se halla presente en un 20 a 50% de todas las sinapsis (Bloom e Iversen, 1971).

Químicamente es un aminoácido con una serie de propiedades que lo hacen muy particular como molécula neurotransmisora. Por ejemplo su neutralidad eléctrica a pH fisiológico (se comporta como un zwitterion, con un $pI=7,3$) permite que su liberación o recepción se vea inalterada por los campos eléctricos que rodean a las neuronas, evitando de esa forma distorsiones entre el número de moléculas liberadas presinápticamente y la fracción que efectivamente alcanza los sitios receptores postsinápticos (Roberts y Sherman, 1993). Asimismo su estructura espacial posee propiedades termodinámicas -mínima energía conformacional- que lo optimizan para unirse a sus posibles sitios receptores con respecto a cualquier otro aminoácido de estructura similar. Esto hace que la transmisión GABAérgica se vea poco afectada por “ruido” inespecífico generado por otros compuestos en el tejido neuronal. De hecho, sólo un análogo del GABA (el muscimol, un análogo natural semirrígido) posee mayor eficacia que el propio GABA para unirse a los sitios receptores (Roberts y Sherman, 1993).

1.2 Metabolismo del GABA.

La biosíntesis del GABA se produce con exclusividad en el SNC debido a que el mismo no atraviesa la barrera hematoencefálica. La principal vía biosintética es a partir de otro aminoácido, el ácido L-glutámico (Roberts y Frankel, 1950). La reacción es catalizada por la enzima L-glutamato decarboxilasa (GAD), de la cual existen dos isoformas (Erlander y Tobin, 1991), y cuya localización tisular mediante técnicas inmunohistoquímicas es considerada un parámetro de identificación de neuronas GABAérgicas (Wolff y col., 1984).

Actualmente se conocen otras vías menores de biosíntesis de GABA, como por ejemplo a partir de ornitina (Yoneda y col., 1982) a través de γ -aminobutiraldehído (Asakura y col., 1983).

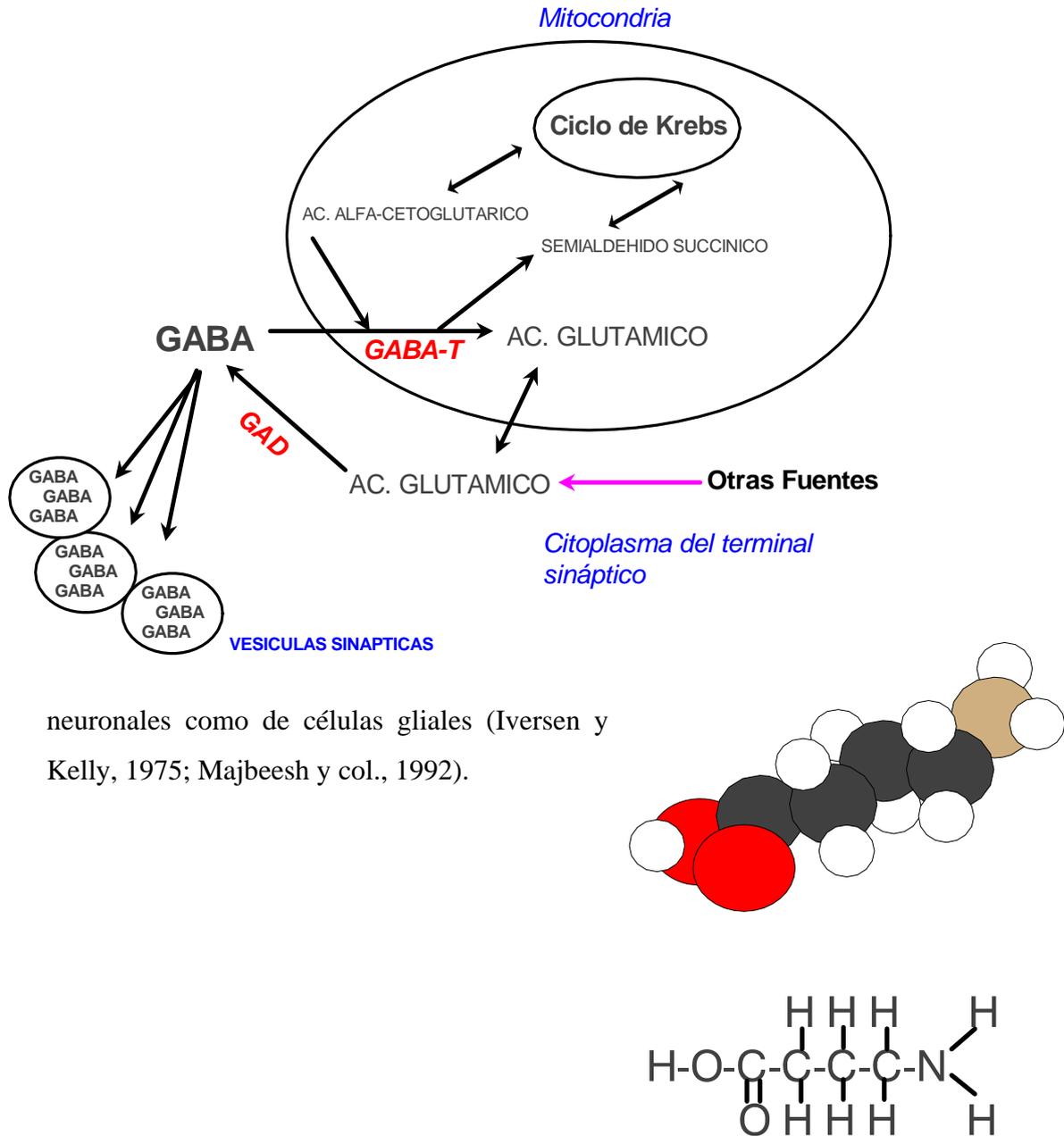
El metabolismo del GABA en los terminales pre y postsinápticos neuronales es llevado a cabo por la enzima GABA transaminasa (GABA-T), la cual a partir de GABA y ácido α -cetoglutárico produce semialdehído succínico y nuevamente ácido L-glutámico (Roberts, 1986). Subcelularmente los procesos de biosíntesis y degradación de GABA se encuentran separados, localizándose la síntesis en el citoplasma -especialmente en los terminales sinápticos-, mientras que la transformación a semialdehído succínico es una reacción que forma parte del metabolismo “de mantenimiento” mitocondrial que provee intermediarios para el ciclo de Krebs.

En condiciones fisiológicas las actividades de GAD y GABA-T son virtualmente idénticas (Roberts y Sherman, 1993). Este equilibrio puede modificarse rápidamente en condiciones metabólicas que alteren el pH celular, aumentando la actividad de una de las enzimas y disminuyendo la de la otra. Teniendo en cuenta esta relación y el hecho de que la GABA-T está además relacionada con el metabolismo mitocondrial se pone de manifiesto cómo el balance de niveles GABA-Glutamato se encuentra regulado por las necesidades metabólicas celulares (Martin y Rimvall, 1993). Considerando que estos aminoácidos son los dos principales neurotransmisores del SNC, con acciones diametralmente opuestas, el balance GABA-Glutamato celular de cierta manera se ha considerado como un reflejo del equilibrio inhibición-excitación en el cerebro (Roberts y Sherman, 1993).

El GABA liberado al espacio sináptico desaparece rápidamente del mismo no sólo por su metabolización, sino previamente por su incorporación a los terminales pre y postsinápticos. Para dicha incorporación existen dos mecanismos: Los transportadores de membrana plasmática para GABA y los complejos receptores GABAérgicos, estos últimos actuando como disparadores de las respuestas celulares a este neurotransmisor.

El mecanismo de transporte de membrana para GABA se realiza mediante proteínas transportadoras de alta afinidad (GAT1 a GAT4) (Guastella y col., 1990;

Liu y col., 1993), las cuales actúan en forma Na⁺-dependiente tanto en las membranas



neuronales como de células gliales (Iversen y Kelly, 1975; Majbeesh y col., 1992).

Figura 1. Esquema simplificado de las principales vías de síntesis y degradación del GABA en un terminal presináptico. A la derecha: fórmula molecular del GABA.

1.3 Receptores GABAérgicos: Subtipos.

Una serie de parámetros comparativos, tales como sensibilidad farmacológica diferencial, estructura molecular, tipo de conductancia iónica asociada, etc., permite actualmente hablar de tres receptores GABAérgicos distintos, denominados GABA_A, GABA_B y GABA_C. (Johnston, 1986). Dado que el receptor GABA_A es objeto de estudio en esta tesis se lo describirá a continuación en forma muy somera, para ser detallado más adelante.

El receptor GABA_A es un complejo formado por diferentes subunidades proteicas con sitios de unión a ligandos, asociadas a un canal de iones cloruro (Cl⁻), siendo por lo tanto un receptor de tipo ionotrópico. La activación de este complejo por el GABA produce un cambio conformacional que da como resultado la apertura del canal asociado y por lo tanto un aumento de la conductancia a iones Cl⁻ y HCO₃⁻. En general, estos iones tienden a entrar al citoplasma neuronal, produciendo un incremento neto de carga negativa y por lo tanto una rápida hiperpolarización. (para una revisión de este complejo receptor puede verse McDonald y Olsen, 1994). No obstante, dado que los iones se mueven a favor del gradiente electroquímico local, se han descrito algunos casos de receptor GABA_A en vertebrados en los cuales la apertura del canal produce una despolarización, la cual estaría mediada por salida de iones Cl⁻ (Cherubini y col., 1991; Hosokawa y col., 1994).

El receptor GABA_B, en cambio, pertenece al grupo de los receptores metabotrópicos, estando conformado por un único polipéptido que posee la estructura típica de siete segmentos transmembrana y dominio de asociación a proteína G transductora (Kaupmann y col., 1997). La transducción de la señal iniciada en este receptor sigue aparentemente las vías de AMP cíclico y de inositol-trifosfato, produciendo finalmente la apertura de canales de K⁺ y llevando a una hiperpolarización lenta de la neurona (una descripción funcional del receptor GABA_B se encuentra en Kerr y Ong, 1995).

Finalmente el receptor GABA_C pertenece también al grupo de los ionotrópicos, compartiendo varias propiedades con el receptor GABA_A. Su estructura

molecular es mucho más simple, siendo un homo-oligómero formado por subunidades de tipo ρ (rho) (Johnston, 1996). Farmacológicamente posee una respuesta diferencial frente a los agonistas y antagonistas GABAérgicos clásicos, careciendo asimismo de la sensibilidad al gran número de drogas modulatorias que afectan al receptor GABA_A (Johnston, 1996; Cherubini y Stratta, 1997). Su localización en el Sistema Nervioso es mucho más restringida que la del GABA_A y fue aislado originalmente sólo en neuronas específicas (bipolares y horizontales) de la retina. (Djamgoz, 1995).

La clasificación original de los distintos receptores se hizo en base a sus diferentes afinidades por agonistas y antagonistas de las respuestas GABAérgicas. Esta clasificaciación muchas veces determina una nomenclatura y agrupación de los receptores en tipos y subtipos que posteriormente resulta incompatible con la complejidad molecular de los complejos hallados, pero ha sido la norma para casi todos los receptores conocidos -con la excepción del receptor metabotrópico para glutamato, cuyos subtipos fueron clonados y nomenclaturizados aún antes de que se les conocieran ligandos específicos (Pin y Duvoisin, 1995)-.

En base a este criterio clasificatorio, los receptores GABA fueron originalmente divididos en “bicuculina sensibles” (bloqueables por bicuculina, un alcaloide con carácter de antagonista específico para los GABA_A) y “bicuculina insensibles”, división que derivó luego en GABA_A y GABA_B respectivamente. Posteriormente se determinaron ligandos específicos para marcar solamente receptores GABA_A (como muscimol, isoguvacina, bicuculina) y GABA_B (baclofen, phaclofen, 2-hidroxi-saclofen). Los GABA_C se hallaron al observarse que entre los “bicuculina insensibles” había también una población de receptores “baclofén insensibles” -una revisión de esta clasificación puede verse en Johnston, 1986-. La Tabla I indica algunos de los principales ligandos agonistas y antagonistas específicos para los tres tipos de receptores.

Tabla I: Ligandos específicos para los tres tipos de receptores GABAérgicos conocidos.

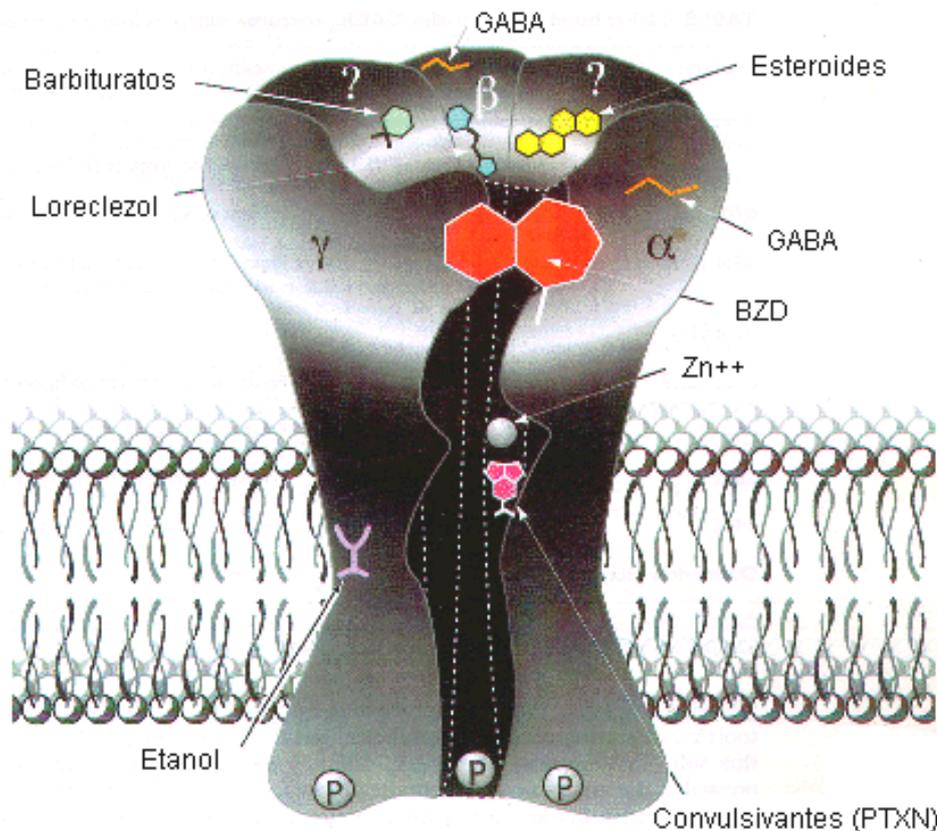
	GABA _A	GABA _B	GABA _C
agonistas específicos	muscimol isoguvacina	baclofén	ác. cis-amino-crotónico
antagonistas competitivos	bicuculina SR-95531	2-OH-saclofen phaclofen	SR-95531
antagonistas no competitivos	picrotoxina	?	picrotoxina
bloqueantes del canal	TBPS	no posee	?

(? = no conocido)

1.4 El complejo receptor GABA_A

El receptor GABA_A es, como ya se indicara, un complejo hetero-oligomérico formado por subunidades proteicas que conforman los sitios receptores para ligandos y el canal para los iones Cl⁻. Los primeros trabajos de análisis de composición en subunidades -inmunoprecipitación y purificación- revelaron la presencia de dos subunidades diferentes, denominadas α y β de pesos moleculares entre 53 y 58 KDa (Sigel y col., 1983; Sigel y Barnard, 1984). Sus genes fueron clonados y expresados en oocitos de *Xenopus sp.* (Schofield y col., 1987), permitiendo postular un primer modelo molecular del receptor, con una estructura tetramérica y estequiometría $(\alpha)_2(\beta)_2$ (Mamalaki y col., 1987). Posteriormente se encontraron otras subunidades formando parte del receptor, denominadas γ (Shivers y col., 1989), δ (Pritchett y col., 1989b) y más recientemente ϵ (Whiting y col., 1997), lo que incrementó la complejidad molecular del complejo. Actualmente se postula que este receptor tiene una estructura de tipo pentamérica, con una estequiometría probable de tipo $(\alpha)_2(\beta)_2(x)$ siendo x alguna de las otras subunidades, predominantemente la γ (Pritchett y col., 1989b; Backus y col., 1993), si bien, la estequiometría exacta aún no se ha determinado con precisión (Farrant y col., 1990).

Figura 2. Representación gráfica de la posible estructura molecular del complejo receptor GABA_A, según McKernan y Whiting (1996). Se encuentran representadas las subunidades α , β y γ , con los distintos ligandos que putativamente unirían a cada una de ellas. El loreclezol es un anticonvulsivante al cual se le ha descubierto recientemente un sitio de acción específico en el receptor.



La complejidad estructural del receptor es aún mayor por el hecho de existir variantes para la mayoría de las subunidades, provenientes en general de múltiples genes -existen más de 15 genes aislados-. Al presente, se han aislado y clonado seis variantes para la subunidad α ($\alpha 1$ a $\alpha 6$), cuatro para la β ($\beta 1$ a $\beta 3$ en mamíferos y $\beta 1$ a $\beta 4$ en aves), y cuatro variantes para la γ ($\gamma 1$ a $\gamma 4$). Existen incluso isoformas producidas por procesamiento diferencial del ARN (por ejemplo $\gamma 21$ y $\gamma 2s$). Una revisión de la mayoría de dichas variantes moleculares puede verse en Olsen y Tobin (1990) y Luddens y Wisden (1991). Esta diversidad de variantes genera la posibilidad teórica de un enorme número de combinaciones funcionales en un pentámero (hay

120 variantes posibles combinando dos subunidades α , dos β y una tercera subunidad). Más aún, si fuera posible una combinación libre entre cinco subunidades cualesquiera -de un conjunto de quince- las reglas combinatorias elevan enormemente el número de variantes posibles (McKernan y Whiting, 1996). El panorama se vuelve inclusive más complejo si se consideran las evidencias de receptores funcionales formados como homo-oligómeros de un sólo tipo de subunidad (Blair y col., 1988; Sanna y col., 1995).

La complejidad estructural del receptor GABA_A inmediatamente sugiere una gran complejidad funcional. Esto se debe a que las combinaciones existentes pueden tener diferentes afinidades por ligandos y capacidad de respuesta a los mismos, dando como consecuencia todo un espectro de sensibilidades para un ligando dado, desde máxima respuesta hasta insensibilidad absoluta (Sigel y col., 1990; Puia y col., 1991; Harris y col., 1995; Thompson y col., 1996). A esto se suma la especialización regional para la expresión de las distintas subunidades en el SNC (Möhler y col., 1995), dando como consecuencia que las respuestas del receptor no sean idénticas en las distintas regiones estudiadas.

La capacidad de unión de ligandos parece residir principalmente en las subunidades α y β . Los sitios específicos de unión de GABA aparentemente no estarían restringidos a una sola subunidad, existiendo estudios que demuestran su unión tanto a las subunidades α como a las β (Casalotti y col., 1986; Bureau y Olsen, 1988).

Las otras subunidades intervendrían en funciones de transactivación, permitiendo que otros ligandos potencien o disminuyan la afinidad del receptor por el GABA (Pritchett y col., 1989b). No obstante, se ha llegado a reportar la obtención de un complejo funcional formado solamente por las subunidades γ y δ (Mertens y col., 1993).

En base a lo anteriormente expuesto, el complejo GABA_A es actualmente el receptor que posee mayor número de isoformas conocidas, siendo por lo tanto muy difícil establecer un correlato entre las propiedades farmacológicas del único “receptor GABA_A” y las numerosas variantes moleculares que se agrupan bajo ese nombre.

2. Farmacología del Complejo Receptor GABA_A:

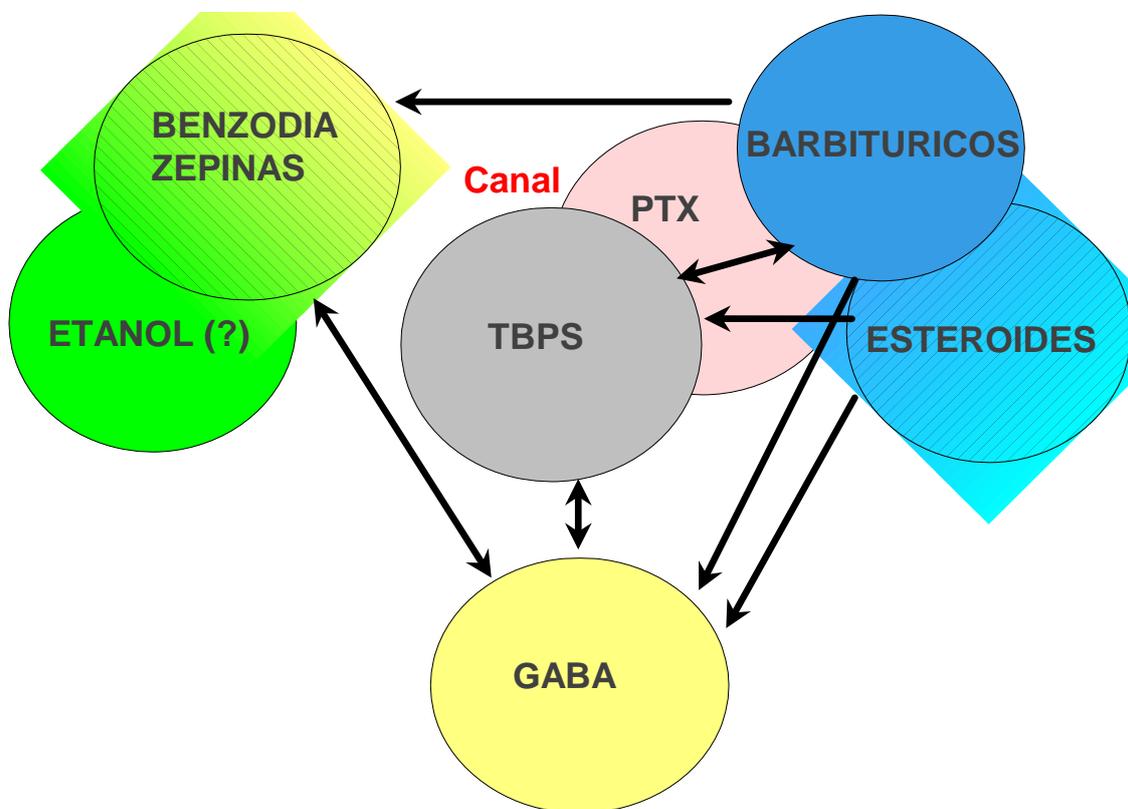
La determinación de las propiedades farmacodinámicas de los compuestos que afectan la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica es sumamente importante no solamente en el campo de la investigación básica sino especialmente por sus aplicaciones y proyecciones clínicas. Numerosas patologías y estados neurológicos han sido correlacionados con alteraciones en la transmisión GABAérgica. Entre ellas, las más conocidas son las que afectan al control del sistema motor, tales como estados epilépticos (Snodgrass, 1992), convulsivos (DeFeudis, 1983), enfermedad de Parkinson (Lloyd y col., 1977) y corea de Huntington (Enna y col., 1976). Por otro lado, estados de ansiedad y stress han sido clásicamente asociados a una deficiencia en la transmisión GABAérgica (Hoehn-Saric, 1982) y la industria farmacéutica ha apuntado siempre a ligandos GABAérgicos en las terapias ansiolíticas, si bien actualmente la relación entre el GABA y los mecanismos de ansiedad se considera menos evidente (Paredes y Agmo, 1992).

El complejo receptor GABA_A no solamente une GABA, sino que además se encuentra modulado por un elevado número de compuestos que unen a sitios receptores específicos dentro del mismo, los cuales modifican por lo tanto el estado de excitación o inhibición del SNC (Olsen, 1981a). Entre ellos figuran agentes que potencian la actividad GABAérgica tales como benzodiazepinas -BZD- (Costa y Guidotti, 1979; Skerrit y Johnston, 1983), barbitúricos (Asano y Ogasawara, 1981; Willow y Johnston, 1981) y ciertos esteroides (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987), así como otros fármacos que bloquean la función del complejo causando excitación, como por ejemplo picrotoxinina (revisado en Ito, 1989), bicuculina (Möhler y Okada, 1977; Costa y Guidotti, 1979), bloqueantes del canal de cloruro (Squires y col., 1983) y agonistas inversos del sitio receptor benzodiazepínico (Braestrup y Nielsen, 1983; Corda y col., 1986).

La relación entre los sitios de unión para estos ligandos es compleja, ya que por lo general los mismos tienen relaciones alostéricas unos con otros (Knapp y col., 1990). De ellos, la picrotoxinina y otros fármacos con propiedades convulsivantes (como el t-butil-biciclofosforotionato, TBPS) aparentemente unen a sitios que co-

mapean con el canal de cloruro, la bicuculina al propio sitio de unión de GABA y el resto de los ligandos a sitios de modulación. La figura 3 -adaptada de Knapp y col., 1990- detalla algunas de las principales relaciones conocidas entre los sitios de unión a ligandos.

Figura 3: Relaciones demostradas entre los distintos ligandos del complejo receptor GABA_A. Las flechas indican modulaciones de una determinada droga sobre un sitio específico. Los círculos indican sitios putativos de unión. La variación de color para benzodiazepinas y esteroides indica heterogeneidad de sitios de unión. (PTX: Picrotoxina, TBPS: t-butil-biciclofosforotionato)



Picrotoxina, TBPS: t-butil-biciclofosforotionato)

Otros compuestos que presentan sitios de unión demostrados en el receptor incluyen penicilina (Greenlee y col., 1978a; Tsuda y col., 1994), estriquina (Johnston, 1978; Puka y Lazarewicz, 1993) y avermectina B_{1a} (Supavilai y Karobath, 1981). Para algunos de ellos hasta se ha postulado una heterogeneidad de sitios de unión

(avermectina, Huang y Casida, 1997). En general estos sitios se superponen con alguno de los indicados en la Figura 3.

Hay también una cantidad de sustancias que tendrían acción directa sobre el receptor sin tener un sitio específico de acción demostrado. Estas incluyen varios anestésicos volátiles (Huidobro-Toro y col., 1987; Prince y Simmonds, 1992; Harris y col., 1993) y hasta lípidos de la membrana (Koenig y Martin, 1992; Samochocki y Strosznajder, 1993). Con respecto al etanol, algunos autores postulan que su acción es inespecífica en el receptor (Greenberg y col., 1984), probablemente como consecuencia de modificación en la fluidez de membrana, mientras que otros trabajos indican que interactuaría con el sitio receptor BZD (Davis y Ticku, 1981; Reynolds y col., 1992).

La tabla II indica una serie de compuestos con acción demostrada en el complejo receptor.

Tabla II: Algunos compuestos con acción directa sobre el complejo receptor GABA_A

Compuesto	Sitio receptor específico	Efecto sobre la función del complejo
Benzodiazepinas	Sitio receptor BZD	+
β-carbolinas	Sitio receptor BZD	--
Etanol	Sitio receptor BZD?	+
Barbitúricos	Sitio de unión de barbitúricos	+/-- (dependiente del barbitúrico)
Avermectina 1A	Sitio de unión de barbitúricos	+/-- (concentración dependiente)
Neuroesteroides	Sitios de unión específicos pero no determinados (co-mapean con barbitúricos?)	+/-- (dependiente del esteroide)
Bicuculina	Sitio de unión al GABA	--
Picrotoxina	Canal de cloruro (?)	--
TBPS	Canal de cloruro	--
Propofol / Halotano	Sin sitio de unión postulado	+
Cafeína	Sin sitio de unión postulado	-
Estricnina	Sitio de unión específico	-
Penicilina	Sitio de unión específico	-
Iones Zn ⁺⁺	Sin sitio de unión postulado	-

(+: estimula la transmisión GABAérgica --: inhibe la transmisión GABAérgica)

De los distintos ligandos previamente citados, las benzodiazepinas y los barbitúricos han sido los más estudiados por su efecto modulador alostérico sobre los sitios receptores GABAérgicos, dada su relevancia farmacológica como hipnosedantes, anticonvulsivantes y en el caso de las BZD, ansiolíticos (Costa y Barnard, 1988). Más recientemente se ha dado una gran importancia a los neuroesteroides moduladores del receptor por su posible rol de moduladores endógenos, intervinientes en estados de stress y ansiedad, como se describirá más adelante

2.1 Los moduladores clásicos del receptor GABA_A: Benzodiazepinas y Barbitúricos

La farmacología oficial de los moduladores del receptor GABA_A comenzó a principios de siglo con la introducción del barbital en terapias de sedación (estado de calma y somnolencia) e hipnosis farmacológica (inducción del sueño). Los barbitúricos fueron los agentes terapéuticos dominantes para estas prácticas clínicas hasta la década del 60, a partir de la cual fueron desplazados masivamente por las benzodiazepinas, con nuevas propiedades farmacológicas y mayor seguridad terapéutica.

2.1.1. Benzodiazepinas

Las BZD comenzaron a sintetizarse y a probarse en la práctica clínica en la década del 50 como alternativa a los barbitúricos, por sus efectos tranquilizantes que no llegaban a la extensa sedación e hipnosis producidas por estos últimos. La primera BZD introducida en la terapia clínica fue el clordiazepóxido en 1961, con un espectro de acciones único, presentando un elevado poder ansiolítico sin depresión de las funciones del SNC. Si bien pueden utilizarse por sus efectos hipnóticos y sedantes, el uso principal de las BZD en la práctica clínica actual está orientado al tratamiento de

la ansiedad así como en terapias anticonvulsivantes y de relajación muscular. Su índice terapéutico es mucho mayor que el de los barbitúricos, siendo por lo tanto drogas mucho más seguras en su utilización (una descripción más detallada de la farmacología de BZD puede verse en Goodman Gilman y col., 1995).

A nivel del SNC poseen como sitios de acción principales los sitios receptores específicos -conocidos como receptores BZD- en el complejo receptor GABA_A (Costa y Guidotti, 1979). Existe una heterogeneidad para sus sitios receptores, pudiendo clasificarse los mismos en sitios BZD₁ y BZD₂ (Squires, 1983). La diferenciación entre dichos sitios se logró utilizando ligandos con afinidades diferenciales para cada uno de ellos (Regan y col., 1981) y actualmente se asume que corresponden a distintas combinaciones de subunidades del receptor (Pritchett y col., 1989a). Existen también sitios receptores BZD no asociados al complejo receptor GABA_A, conocidos como sitios periféricos de acción (Villiger, 1985; Anholt y col., 1986) los cuales aparentemente no estarían relacionados con las propiedades farmacológicas y terapéuticas normalmente asociadas a BZD.

Molecularmente es difícil establecer una correlación única entre esos sitios receptores, distinguibles farmacológicamente, y la variedad de subunidades del receptor GABA_A, pero se ha podido determinar mediante estudios de fotomarcado (marcación con ligandos que unen covalentemente a residuos aminoacídicos al ser estimulados con luz UV) que las BZD unen a las subunidades α del complejo (ver por ej., Bureau y Olsen, 1993), mientras que la subunidad γ es necesaria para transmitir activación al sitio de unión de GABA (Pritchett y col., 1989b; Sigel y col., 1990; Horne y col., 1993), potenciando de esa manera la apertura del canal de cloruro. La aplicación de BZD conjunta con GABA produce un aumento en la frecuencia de apertura del canal, sin variación en los tiempos de apertura (Study y Barker, 1981; Rogers y col., 1994). Ese efecto potenciador de la neurotransmisión GABAérgica es siempre GABA-dependiente, siendo las BZD inefectivas *per se* sobre el canal (MacDonald y Barker, 1978; Study y Barker, 1981)

2.1.2. Barbitúricos

Este conjunto de sustancias derivadas del ácido barbitúrico comenzó a utilizarse clínicamente a principios de siglo, con la introducción del barbital en 1903 para la inducción de sedación y sueño. Hoy en día han sido masivamente reemplazados en la práctica clínica por las BZD excepto para usos terapéuticos especializados. Su menor índice terapéutico, los efectos de tolerancia y la mayor posibilidad de intoxicación fueron condiciones tendientes a este reemplazo (puede verse una referencia a su aplicabilidad clínica en Goodman Gilman y col., 1995).

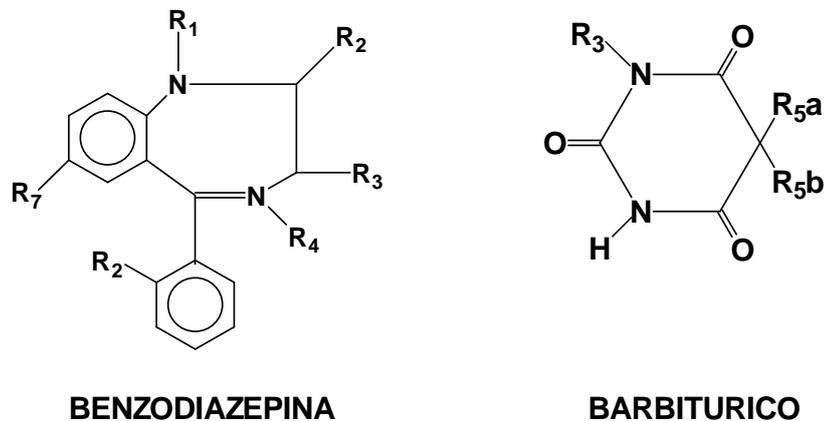


Figura 4: Fórmula molecular genérica de BZD y barbitúricos. Los grupos R indican distintos sustituyentes según el tipo de compuesto. Para el barbitúrico pentobarbital: R₃=H, R_{5a}=etilo y R_{5b}=1-metilbutilo

Durante su apogeo, fueron suministrados con frecuencia a mujeres embarazadas y a recién nacidos para prevenir una serie de alteraciones tales como convulsiones epilépticas (Hill, 1973a), hiperbilirrubinemias, ictericias (Trolle, 1968; Thomas, 1976) y convulsiones febriles (Wallace, 1980). Estudios clínicos demostraron síndromes de dependencia (Desmond y col., 1972) y un retraso mental en los recién nacidos de mujeres que habían ingerido estos medicamentos anticonvulsivantes durante su embarazo (Speidel y Meadow, 1972; Hill, 1973a). Además, estudios realizados en roedores describieron que la administración prenatal de barbitúricos producía efectos de larga duración en la morfología cerebral (Hill, 1973b), cambios en los paradigmas de comportamiento y sensibilidad a depresiones del SNC (Zemp y Middaugh, 1975; Yanai y col., 1979; Fishman y Yanai, 1983;

Yanai, 1984). Estos efectos adversos determinaron su reemplazo en la práctica clínica, pero a la vez los mostraron como drogas de sumo interés en la investigación básica por el espectro de efectos que presentaban en el SNC, especialmente durante el desarrollo.

En relación a los mecanismos bioquímicos de acción en el SNC, los barbitúricos anestésicos y anticonvulsivantes actúan también sobre sitios receptores específicos en el complejo receptor GABA_A (Asano y Ogasawara, 1981; Leeb-Lundberg y col., 1981; Olsen, 1981a; Johnston y Willow, 1982), incrementando la unión del GABA y BZD a sus sitios receptores y aumentando de esa forma la conductancia al ion cloruro (Leeb-Lundberg y col., 1980; Allan y Harris, 1986; Carlston y col., 1992; Mihic y col., 1992). Su mecanismo alostérico de acción es distinto al de las BZD, pues fundamentalmente producen un aumento del tiempo en que el canal de Cl⁻ permanece abierto, sin alteración de la frecuencia de apertura (Study y Barker, 1981; MacDonald y col., 1989).

Si bien su función consiste en modular positivamente la acción del GABA, en altas concentraciones pueden producir apertura del canal en forma GABA-independiente (Robertson, 1989), hecho del cual no se conoce aún el mecanismo subyacente aunque se piensa que sería una acción directa sobre el canal (Rho y col., 1996). También se ha demostrado que la acción de la mayoría de los barbitúricos es bifásica, teniendo efectos opuestos a medias y altas concentraciones (Willow y Johnston, 1981; Schwartz y col., 1986).

En el estudio farmacológico de estos compuestos, se pensó originalmente que poseían un sitio común de acción en el receptor con otros fármacos que presentan propiedades opuestas (convulsivantes, como la picrotoxina) (Ticku y Olsen, 1978; Olsen, 1981b), pero luego se demostró que los sitios de acción no eran idénticos sino en todo caso superpuestos y con una relación alostérica entre ellos (Trifiletti y col., 1984)

A nivel molecular el sitio receptor de barbitúricos en el complejo no está aún bien definido (McKernan y Whiting, 1996). Actualmente se postula que residiría en las subunidades α (Amin y Weiss, 1993), si bien se ha visto que el tipo de subunidad β que conforma al receptor también influye en los efectos de estas drogas (Thompson

y col., 1996). La subunidad γ por otro lado, no sería necesaria para el efecto de los barbitúricos (Horne y col., 1993; Sanna y col., 1995).

2.2 Nuevos moduladores del receptor GABA_A: Neuroesteroides.

El término **neuroesteroide** (NE) fue utilizado por primera vez en 1987 por Etienne Baulieu y Paul Robel (revisado en Baulieu y Robel, 1990) para referirse a una serie de esteroides (pregnenolona y derivados) que se sintetizaban en el SNC a partir de colesterol, independientemente de fuentes exógenas, y ejercían una modulación de funciones cerebrales. En un sentido más amplio se define actualmente como NE a todo esteroide que pueda sintetizarse en el SNC (Majewska, 1991, Mellon; 1994). Conjuntamente al concepto de neuroesteroides, se utiliza también el de **esteroides neuroactivos** (EN) para referirse a todo esteroide con actividad biológica en el SNC, independientemente de si ha sido generado o no en el tejido neural (Mellon, 1994). Existen EN que no son NE pues provienen de otras fuentes tisulares: es el caso de los metabolitos de la deoxicorticosterona, con función demostrada en el SNC (Majewska y col., 1986) y con origen en las glándulas adrenales. La definición de EN alcanzaría también a todo esteroide sintético con acción demostrada en el SNC, lo que permite incluir una serie de conocidos anestésicos sintéticos, como por ejemplo el derivado de la progesterona 5 α -pregnan-3 α -ol-11,20-diona (alfaxalona, Gee y col., 1988).

Hasta el presente no se ha encontrado ningún NE que no sea a la vez neuroactivo. Teniendo esto en cuenta y dado que en el resto de esta introducción se hablará casi exclusivamente de los esteroides sintetizados en el SNC por su importancia en la neurotransmisión GABAérgica, se continuarán describiendo las propiedades solamente de NE y no se seguirá diferenciando entre NE y EN, a menos que se mencione un esteroide activo en SNC pero específicamente no sintetizado en tejido nervioso, en cuyo caso se lo remarcará apropiadamente.

2.2.1. Biosíntesis de Neuroesteroides.

El postulado de biosíntesis específica de NE en el SNC surgió con la demostración de la presencia de pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-ona) y dehidroepiandrosterona (5-androsten-3 β -ol-17-ona, DHEA) en cerebro (Corpéchet y col., 1981; 1983), excediendo las concentraciones plasmáticas y permaneciendo en altas concentraciones aún después de removidas otras glándulas esteroidogénicas. La vía de síntesis que lleva de colesterol a pregnenolona (reacción mediada por el citocromo P450_{scc}) es el paso inicial de biosíntesis de NE, dando origen luego a progesterona y finalmente a los metabolitos reducidos de ésta, entre los cuales se hallan los NE más potentes conocidos (Majewska, 1991). Un resumen de las vías de síntesis de NE puede verse en la Figura 5, adaptado de Akwa y col., 1991 y Mellon, 1994. La pregnenolona *per se* parece ser inactiva en tejido nervioso, pero da origen a derivados sulfatados con importante actividad (Akwa y col., 1991)

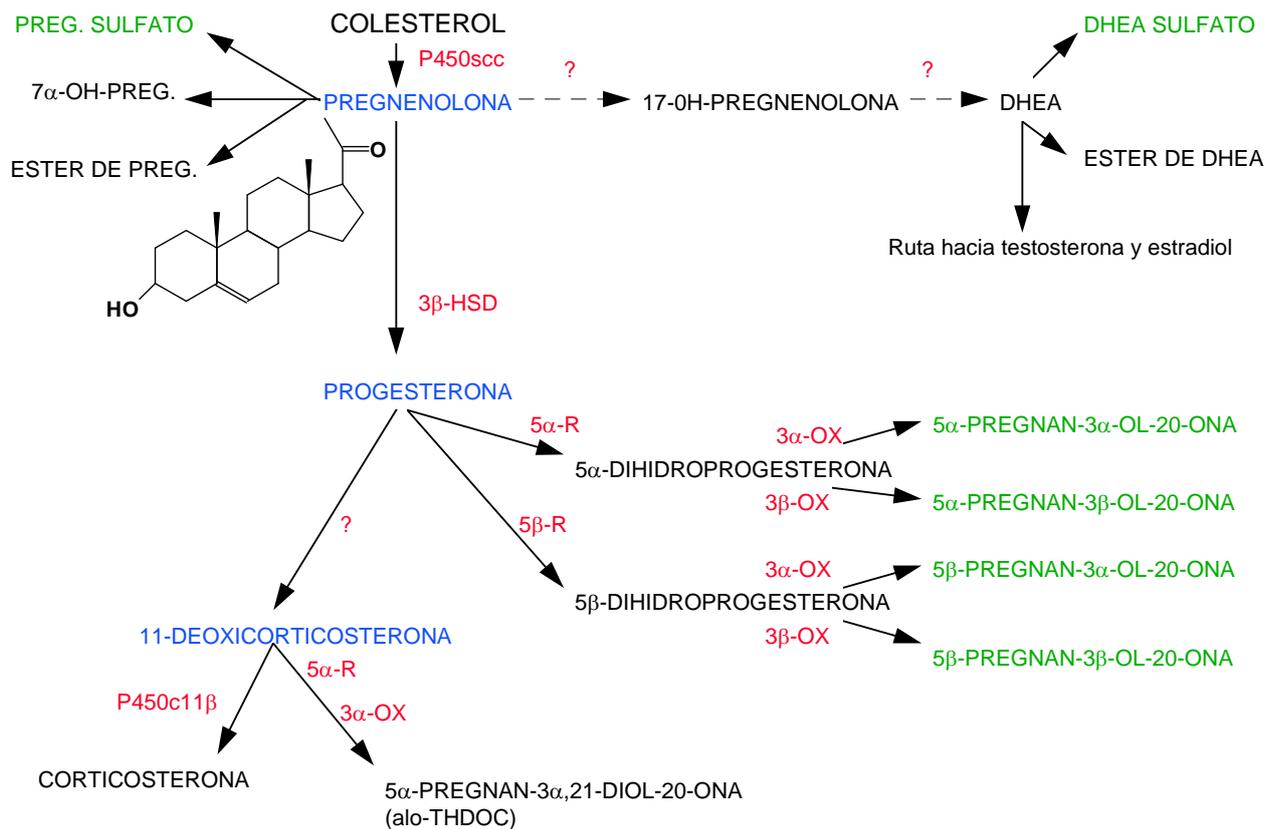


Figura 5. Principales vías de síntesis propuestas para NE en SNC a partir de colesterol, en mamíferos. Se han omitido algunos pasos intermedios. Algunas vías

específicas difieren en aves. Algunos esteroides, como alo-THDOC, aunque pueden sintetizarse en SNC parecen provenir mayoritariamente de otros tejidos esteroideogénicos. En color verde se indican los principales NE; en azul, sus precursores inmediatos; en rojo, las enzimas involucradas en la síntesis. Referencias: *P450_{scc}*, citocromo que cliva la cadena lateral del colesterol; *3 β -HSD*: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; *5 α -R*, 5 α -reductasa; *5 β -R*, 5 β -reductasa -cuya actividad ha sido demostrada solamente en algunas especies-; *3 α -OX*, 3 α -hidroxiesteroide oxidorreductasa; *3 β -OX*, 3 β -hidroxiesteroide oxidorreductasa; *P450_{c11 β}* , 11 β -hidroxilasa; *PREG*, Pregnenolona (cuya fórmula molecular está graficada)

Actualmente la síntesis de NE se ha demostrado en forma específica tanto en neuronas (Prasad y col., 1994) como en células gliales (Hu y col., 1987; Jung-Testas y col., 1989), habiéndose identificado la mayoría de las actividades enzimáticas necesarias para la producción de los distintos NE observados (detalladas en Mellon, 1994; Rupprecht y col. 1996). De ellas, las más importantes son las que intervienen en el metabolismo de la progesterona, reduciendo su doble enlace entre los carbonos 4 y 5, e hidroxilando el grupo carbonilo de la posición 3 (Krause y col., 1980; Celloti y col., 1992). Estos dos procesos son producidos por diferentes enzimas, las que originan metabolitos que son entre sí estereoisómeros. Los mismos se han detallado en la Figura 6 por la relevancia de su estructura en relación a su actividad sobre el complejo receptor GABA_A.

Uno de los pocos NE cuya biosíntesis no ha sido aún completamente dilucidada en mamíferos es la DHEA, pues no se han encontrado en el SNC las enzimas necesarias para la formación a partir de pregnenolona (Mellon, 1994), si bien sus concentraciones en SNC exceden ampliamente los niveles sanguíneos sugiriendo que debe tener una fuente endógena de síntesis (Akwa y col., 1991).

Por último, algunos NE no sólo se sintetizan en el SNC sino que también se almacenan en las membranas plasmáticas de las células, bajo la forma de NE esterificados con ácidos grasos. Se han descubierto bajo esta forma esterificada a la pregnenolona y a la DHEA (Corpéchet y col., 1983; Jo y col., 1989), y la

funcionalidad de este almacenamiento no se encuentra aún totalmente determinada (Akwa y col., 1991).

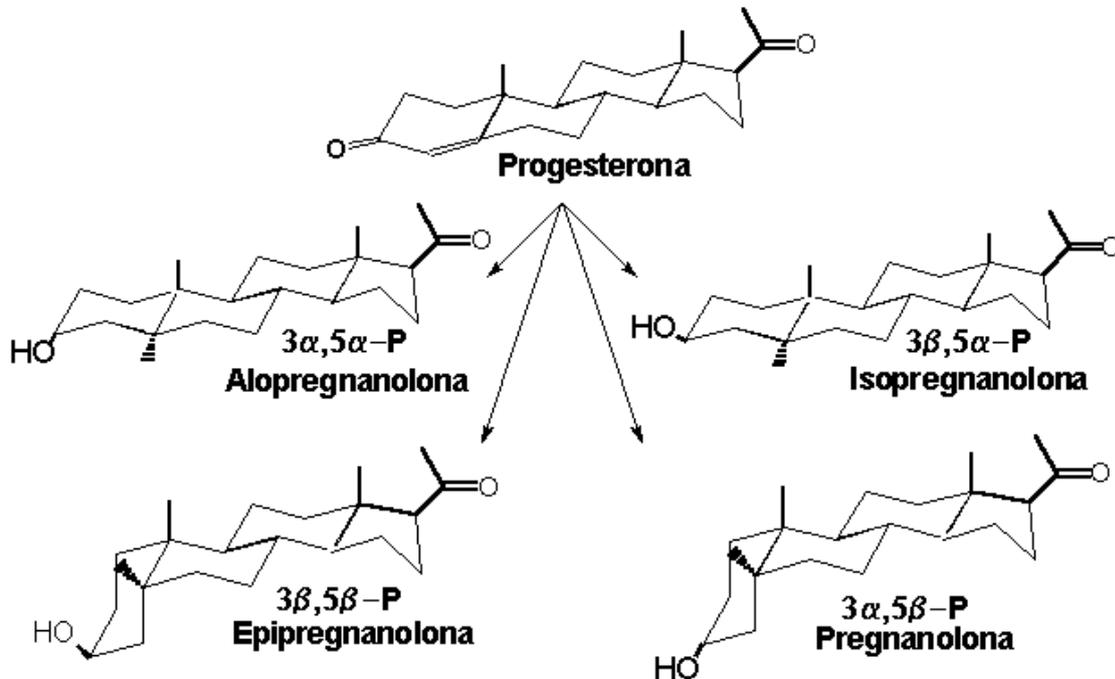


Figura 6. Los NE originados por metabolismo de la progesterona. La nomenclatura de todos ellos es 5-x-pregnan-3x-ol-20-ona, donde “x” indica la conformación α (por debajo del plano del enlace) o β (por encima del mismo). Puede verse la gran diferencia conformacional entre los isómeros 5 α - y 5 β -reducidos.

2.2.2 Mecanismos de acción de los neuroesteroides.

Es importante remarcar que la definición de esteroides como EN o NE no hace referencia en ningún momento a sus posibles mecanismos de acción en el SNC.

Clásicamente, las hormonas esteroideas han sido asociadas con mecanismos de acción mediados por receptores citosólicos o nucleares que actúan como factores transcripcionales (Evans, 1988). Estos mecanismos “lentos” de respuesta a esteroides

-que se desenvuelven en términos de horas- se conocen como mecanismos *genómicos* (McEwen, 1988).

Sin embargo ya en 1927 existían reportes del rápido efecto anestésico observado con la inyección endovenosa de colesterol (Cashim y Moravek, 1927), y en 1942 Hans Selye reportaba mecanismos de acción extremadamente rápidos para el esteroide progesterona actuando como anestésico y anticonvulsivante. En ese reporte los tiempos de acción parecían incompatibles con un posible efecto genómico del esteroide a través de síntesis de ARN o proteínas, si bien el hecho de que la respuesta observada no tuviera una latencia de horas no era suficiente para discriminar entre efectos genómicos y no-genómicos. Posteriormente la demostración inequívoca de efectos de esteroides en SNC por vías no genómicas permitió postular que los NE podían actuar en el SNC a nivel de la membrana plasmática, y más específicamente, a nivel de receptores de membrana y no por simple perturbación de la bicapa lipídica (McEwen, 1988). Entre las líneas de demostración cabe destacar el uso de bloqueantes de los receptores intracelulares a esteroides (Dluzen y Ramirez, 1989; Petitti y Etgen, 1992), el empleo de preparaciones de células sin núcleos (Drouva y col., 1985) y la utilización de inhibidores para la síntesis de proteínas (Nabekura y col., 1986; Schumacher y col., 1990).

El hecho de que los esteroides pudieran actuar rápidamente a través de receptores de membrana expuso un campo de nuevos sitios de acción para los NE a un nivel diferente al intracelular. En 1984 (Harrison y Simmonds) se reportó la acción de un EN sintético sobre el complejo receptor GABA_A y en 1986 (Majewska y col.) se describió por primera vez y con mayor detalle la acción de dos esteroides endógenos sobre el mismo complejo receptor: el metabolito reducido de la progesterona 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona (3 α ,5 α -P o alopregnanolona, actualmente reconocido como el más potente NE), y el esteroide 5 α -pregnan-3 α ,21-diol-20-ona (llamado alo-THDOC), metabolito del mineralocorticoide deoxicorticosterona y un potente EN de origen adrenal. La acción de estos dos esteroides era rápida, no genómica, consistente en una modulación alostérica positiva del complejo receptor. Estos esteroides producían un aumento en la unión de ligandos a sus sitios receptores (muscimol a los sitios de unión de GABA y flunitrazepam a los sitios receptores

BZD), causando finalmente un aumento de la conductancia al Cl^- (Majewska y col., 1986).

Actualmente, se conoce un gran número de NE que actúan a nivel de membrana plasmática, con acción sobre varios sistemas de neurotransmisores, siendo aparentemente el sistema GABAérgico el blanco principal de los mismos (Majewska, 1991)

2.2.3. Mecanismo de acción de los neuroesteroides en el receptor GABA_A

En el complejo receptor GABA_A los NE actúan como efectores alostéricos (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987), existiendo NE que modulan positiva o negativamente la unión de GABA y BZD a sus sitios receptores. Los distintos metabolitos de la progesterona pertenecen al primer grupo (Harrison y col., 1987), mientras que entre los moduladores negativos más importantes se encuentran la pregnenolona sulfato y la DHEA sulfato (DHEA-S) (Majewska y col., 1990b; Akwa y col., 1991).

La modulación positiva produce un aumento de afinidad de los sitios receptores de GABA y BZD por agonistas específicos (muscimol y GABA para los sitios GABAérgicos, flunitrazepam para los sitios de unión de BZD) (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987; Peters y col., 1988) y un desplazamiento de antagonistas del receptor GABAérgico tales como bicuculina o TBPS (Gee y col., 1987; 1988). Esta modulación alostérica se traduce en un aumento de la conductancia para los iones Cl^- , lo cual ha sido demostrado mediante experimentos de captación de ^{36}Cl en sinaptoneurosomas (Morrow y col., 1989) como también por mediciones electro-fisiológicas (Callachan y col., 1987; Harrison y col., 1987; Peters y col., 1988). El aumento de conductancia a este ion se debe a un incremento en el tiempo de apertura del canal (Callachan y col., 1987), mientras que a mayores concentraciones de NE también existe un aumento en la frecuencia de apertura (Harrison y col., 1987). A concentraciones suficientemente altas ($> 30 \mu\text{M}$), los NE pueden producir una apertura del canal en forma GABA-independiente (Callachan y col., 1987; Peters y col., 1988), efecto que se pensó como indirecto o mediado por GABA endógeno en

las preparaciones de trabajo (Im y col., 1989), pero que actualmente se reconoce como una acción directa de los esteroides en el sitio receptor de GABA (Hill-Venning y col., 1994).

Los NE que actúan como moduladores negativos del complejo receptor (pregnenolona sulfato, DHEA-S) tienen efectos diametralmente opuestos, disminuyendo la unión específica de agonistas GABAérgicos y produciendo por lo tanto una inhibición de esta neurotransmisión (Majewska y col., 1990b; Demirgoren y col., 1991; San Martín y col., 1996).

Al actuar como moduladores alostéricos del receptor, actualmente se acepta que los NE poseen un sitio específico de acción en el complejo. Resultados indicativos de la variación de efectos observada para distintos estereoisómeros (Harrison y col., 1987; Gee y col., 1988) y la posibilidad de actuar aún sobre el receptor solubilizado (Giusti y col., 1993) apoyan la existencia de dicho sitio específico. También se ha demostrado que aunque los esteroides puedan atravesar la membrana plasmática -debido a su lipofilidad- dicho sitio debe hallarse en el dominio extracelular del receptor, pues la aplicación de NE intracelularmente es inefectiva para modular las funciones GABAérgicas (Hill-Venning y col., 1994).

Los primeros trabajos que evaluaron el modo de acción de los NE sugirieron que estos ejercían su acción a nivel de los sitios moduladores de los barbitúricos, dada la elevada semejanza de efectos que producían a nivel bioquímico y electrofisiológico, incluyendo la posibilidad de apertura del canal en forma GABA-independiente (Callachan y col., 1987; Harrison y col., 1987). Aún más, algunos barbitúricos y NE compiten por sitios de unión, reforzando la posible existencia de sitios comunes (Majewska y col., 1990).

Sin embargo, un número posterior de trabajos dirigidos a profundizar en este aspecto indicaron que los sitios de acción de ambos tipos de moduladores debían ser distintos, ya que ellos presentaban aditividad de efectos y eran diferencialmente desplazados por otros ligandos (Kirkness y Turner, 1988; Gee y col., 1988; Peters y col., 1988; Turner y col., 1989). No obstante esa discusión aún no está cerrada (Majewska, 1991) pues la posibilidad de diferenciar entre sitios de unión de barbitúricos y de neuroesteroides es críticamente dependiente de los ligandos elegidos y las condiciones de preparación de las membranas sinápticas empleadas.

La complejidad del análisis aumenta con el hallazgo de diferentes sitios de acción para los NE (Morrow y col., 1990) -de los cuales algunos serían compartidos con barbitúricos-, incluyendo poblaciones con selectividad para determinados NE (Prince y Simmonds, 1993) y otras con distinta afinidad para un mismo NE (Hawkinson y col., 1994; Goodnough y Hawkinson, 1995).

Molecularmente no se ha llegado aún a una definición de la subunidad o subunidades del receptor pasibles de contener los sitios de acción de NE (McKernan y Whiting, 1996). Algunos estudios han inclusive descartado la posibilidad de que haya alguna subunidad que sea esencial para el efecto de estos esteroides (Puia y col., 1992) mientras que otros sugieren que el tipo de subunidad α influiría en los efectos observables (Shingai y col., 1990; Lan y col., 1991). Las subunidades con función de transactivación también intervendrían en la modulación observada, pues se ha observado un mayor efecto con determinadas subunidades γ (Shingai y col., 1990) y una inhibición cuando el complejo está constituido con subunidades δ (Zhu y col., 1996). Como ejemplo extremo de variabilidad se han llegado a demostrar ciertas combinaciones de subunidades, expresadas en líneas celulares, con las cuales los NE positivos más potentes ($3\alpha,5\alpha$ -P) se comportan como moduladores negativos del receptor (Hauser y col., 1996).

2.2.4 Otros sitios de acción de los neuroesteroides.

Si bien el principal blanco de acción de todos los NE conocidos parece ser el complejo receptor $GABA_A$ se han demostrado acciones en otros receptores a neurotransmisores, especialmente el de glicina (Wu y col., 1990; 1993; Prince y Simmonds, 1992b) y el de glutamato tipo NMDA (Wu y col., 1991; Irwin y col., 1992). En estos receptores los NE poseen efectos opuestos a los que presentan en el receptor $GABA_A$. Por ejemplo, NE moduladores negativos ya citados como la pregnenolona sulfato, que inhiben la conductancia a Cl^- en el receptor $GABA_A$ aumentan la conductancia al Ca^{++} del receptor NMDA. No obstante, dado que estos efectos se han visto por lo general a altas concentraciones de NE (100 μ M) se los ha planteado como poco específicos.

Otro sitio de acción descripto serían los canales de Ca^{++} voltaje-dependientes, sobre los cuales los NE producirían un bloqueo, también actuando en concentraciones en el orden micromolar (Ffrench-Mullen y Spence, 1991).

Un posible sitio de acción de NE sobre el cual se renovó el interés en los últimos años son los propios receptores intracelulares a hormonas esteroideas. Desde los primeros trabajos con NE representativos, como los metabolitos de la progesterona y de la corticosterona, se demostró (Gee y col., 1988) que los mismos no unían a receptores intracelulares. Por ese motivo resultó muy novedoso el hallazgo de que NE como la alo-THDOC o la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ podían inducir transcripción de genes -en forma mediada por el receptor intracelular de progesterona- al agregarse a células en cultivo (Rupprecht y col., 1993). Finalmente se demostró que dichos NE no actuaban *per se* sino vía metabolización intracelular, dando derivados más oxidados que eran los que directamente unían a los receptores intracelulares (Rupprecht y col., 1993; 1996). Dado que las concentraciones necesarias de esos NE para actuar intracelularmente son similares a las que presentan actividad en el receptor GABA_A , el descubrimiento de ese nuevo sitio de acción abre un nuevo campo de estudio sobre la “comunicación cruzada” entre los efectos de estos moduladores a niveles nucleares y de membrana.

2.2.5 Significancia fisiológica y psicofarmacológica de los neuroesteroides.

Desde los trabajos de Selye ya citados quedó manifiestamente demostrado que las hormonas esteroideas estaban involucradas en funciones depresoras del SNC, como eran los procesos de sedación y anestesia. De hecho, el planteo de esta asociación dio origen al desarrollo de anestésicos de tipo esteroideo que más tarde resultaron ser similares estructuralmente a los NE conocidos.

Dado que los NE actúan fundamentalmente a nivel de la neurotransmisión GABAérgica, es lógico establecerles una relación con eventos fisiológicos o con estados patológicos en los que interviene esta transmisión inhibitoria (Majewska, 1991). Las tres funciones del SNC en las cuales interviene la transmisión

GABAérgica y en las que se ha establecido una fuerte acción moduladora de los NE son las de ansiólisis, sedación y anestesia.

En 1991 se demostró que distintos NE aumentaban en SNC en respuesta a condiciones de stress (Purdy y col., 1991) y más tarde se observó que en dichas condiciones los NE variaban su perfil de modulación alostérica sobre el receptor GABA_A (Deutsch y col., 1994). Desde esos descubrimientos iniciales varios NE - todos ellos metabolitos reducidos de la progesterona- fueron identificados como ansiolíticos al ser administrados en tests comportamentales (Bitran y col., 1991; Wieland y col., 1991; 1995). Asimismo, se ha demostrado que el efecto ansiolítico de la administración de progesterona, el cual era bien conocido (Rodríguez Sierra y col., 1984) se debe a su transformación a nivel del SNC en el potente NE 3 α ,5 α -P (Bitran y col., 1995).

Por otro lado, esos mismos NE derivados de la progesterona han demostrado poseer importantes propiedades sedativas y anticonvulsivantes (Belelli y col., 1989; Kokate y col., 1994; Wieland y col., 1995).

De la misma manera, las propiedades anestésicas de los progestágenos que son conocidas desde Selye, han sido recientemente asociadas a los metabolitos de la progesterona, que poseen esa actividad actuando directamente a nivel de la neurotransmisión GABAérgica (Mok y Krieger, 1990; Mok y col., 1991).

La importancia de los NE como ansiolíticos, anticonvulsivantes y anestésicos los transforma en compuestos de enorme interés en el campo de la neuropsicofarmacología, especialmente por tratarse de sustancias de origen endógeno y con metabolismo conocido. No obstante, hasta el presente, su pobre solubilidad en soluciones acuosas continúa siendo el mayor obstáculo para su desarrollo como agentes terapéuticos (Rupprecht y col., 1996).

Más allá de su posible aplicación, los NE resultan de interés como sustancias neuromoduladoras que establecerían una conexión entre los mecanismos de regulación nervioso y hormonal de diversas funciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha relacionado a los NE con la modulación de la transmisión GABAérgica en comportamientos tales como la conducta agresiva (Kavaliers, 1988) o de receptividad sexual (Corpéchet y col., 1985; Akwa y col., 1990). Además, a nivel clínico, está postulado que los niveles de NE estarían relacionados con una serie de estados

neurológicos, tales como la tendencia a convulsiones, la depresión postparto y la tensión pre-menstrual (Majewska, 1991; Mellon, 1994).

Los NE con función inhibitoria de la transmisión GABAérgica también intervendrían en procesos comportamentales, deduciblemente con efectos opuestos a los que poseen los derivados de la progesterona (Steiger y col., 1993; Lancel y col., 1994). Algunos NE con estas propiedades, tales como la pregnenolona sulfato o la DHEA-S han sido inclusive involucrados en procesos cognitivos, con una función mejoradora de los procesos de memoria (Flood y col., 1988; 1992; Frye y Sturgis, 1995).

3. Microambiente del Receptor GABA_A. Factores endógenos y estructura de la membrana sináptica.

El hecho de que el receptor GABA_A presente varios sitios específicos a los cuales se unen drogas que no están presentes in vivo en SNC, tales como BZD y barbitúricos, ha generado siempre un interés en la búsqueda de posibles ligandos endógenos para dichos sitios, que pudieran actuar como co-transmisores o moduladores de la transmisión GABAérgica. En este contexto, los NE resultaron sumamente novedosos como primeros ligandos endógenos demostrados que unían a sitios específicos en el receptor y modulaban su función (justificando así el interés en relacionarlos con los sitios de unión de barbitúricos).

3.1 Factores endógenos que actúan a nivel del receptor GABA_A

El estudio de ligandos endógenos del receptor comenzó con la observación de que diferentes tratamientos de la membranas sinápticas permitían exponer sitios que unían GABA con alta afinidad (Enna y Snyder, 1976). Los mismos se pensaban por lo tanto “enmascarados” por factores endógenos asociados al receptor (Greenlee y col. 1978b), de los cuales el más obvio era el propio GABA endógeno acumulado en la preparación de membranas sinápticas (Napias y col., 1980). No obstante, varios

investigadores reportaron el aislamiento de otros factores endógenos, distintos del propio GABA (Toffano y col., 1978; Yoneda y Kuriyama, 1980; Massotti y col., 1981b). De estos estudios el más representativo fue en su momento el de Guidotti y col. que comenzó en 1978 y finalizó en 1982 con el aislamiento de una pequeña proteína básica (PM=14 KDa) llamada “GABA-modulina”. Sin embargo, el estudio de la funcionalidad biológica de esta proteína -aparte de su capacidad para inhibir la unión de GABA a sus sitios receptores- nunca fue profundizado (el último reporte es de Vaccarino y col., 1985) y en poco tiempo otros autores (Lagos y col., 1983) ya no la reportaban. Reportes más recientes (Yarom y col., 1992; Tang y col., 1993) ya no hacen siquiera referencia a ella y se focalizan en la posibilidad de existencia de otros factores endógenos de menor peso molecular.

Otro punto de interés fue el de los ligandos endógenos específicos del receptor BZD, pues la posibilidad de encontrar una “BZD endógena” resultaba importante por su aplicabilidad farmacológica. Se han descrito varias sustancias de bajo peso molecular capaces de unirse a los sitios receptores BZD (Asano y Spector, 1979; Möhler y col., 1979; Peña y col., 1986), incluyendo posibles BZD endógenas (De Blas y Sangameswaran, 1986). Los factores endógenos que más interés suscitaron fueron compuestos proteicos (Davis y Cohen, 1980; Woolf y Nixon, 1981), de los cuales el más relevante es una proteína conocida como DBI (“Diazepam Binding Inhibitor”, Inhibidor de la unión de Diazepam, Massotti y col., 1981a), purificado en 1983 (Guidotti y col.). Esta proteína de 105 aminoácidos (PM=11 KDa) actúa como un agonista de los sitios receptores BZD y está postulado que en realidad el compuesto de mayor actividad es un péptido de 18 aminoácidos surgido por proteólisis de la proteína original (Ferrero y col., 1986). Esta proteína, por su baja afinidad al receptor GABA_A y su mayor afinidad a los sitios receptores BZD periféricos, se descartó originalmente como un factor complementario de la transmisión GABAérgica (Haefely, 1988). No obstante, actualmente se ha retomado el interés en la misma a la luz de nuevos resultados que la sugieren como un modulador de ciertas funciones GABAérgicas (Matsumoto y col., 1996; Ojima y col., 1997), y por su posible rol regulador en los procesos de biosíntesis de NE (Costa y col., 1994).

3.2 Preparación de membranas sinápticas

La preparación de membranas sinápticas es un factor clave en el estudio de cualquier receptor a neurotransmisores ya que el objetivo de la misma es eliminar la mayor cantidad posible de neurotransmisor endógeno a fin de exponer sus sitios receptores. Para el GABA, existe una complejidad adicional causada por las elevadas cantidades de este aminoácido que pueden encontrarse en las preparaciones de membranas (2 a 4 micromoles por gramo de tejido cerebral, concentración que es unos tres órdenes de magnitud superior a la de otros neurotransmisores -Gardner y col., 1981-). El nivel de GABA endógeno, que inhibe la unión de GABA agregado exógenamente, es por tanto un factor que siempre debe considerarse en dichas preparaciones (Gardner y col., 1981; Napias y col., 1980).

Numerosos estudios han demostrado cómo la determinación de los sitios receptores GABAérgicos es fuertemente dependiente del tipo de preparación de membranas sinápticas. En dichos estudios se han aplicado procedimientos tales como el repetido lavado de las membranas, la congelación de las mismas, o incluso su tratamiento con detergentes (Chiu y Rosenberg, 1979; Olsen y col., 1981; Flores y col., 1986; Fiszer de Plazas y col., 1993); todo lo cual altera la composición proteica o lipídica de la membrana, modificando por lo tanto el microambiente del receptor (Toffano y col., 1981; Yang y Olsen, 1987). También se ha visto como diferentes iones en las soluciones de trabajo influyen directamente en la unión de GABA a sus sitios receptores (Enna y Snyder, 1975; 1976; Corda y Guidotti, 1983; Madtes, 1984). Se asume que estos tratamientos, al alterar la composición y estructura de la membrana, ayudan a la remoción de GABA y otros factores endógenos y por lo tanto “desenmascaran” sitios receptores GABAérgicos (Lester y col., 1981; Fiszer de Plazas y col., 1993).

Las modificaciones observadas al tratar las membranas sinápticas de esta forma generalmente se manifiestan como la aparición de varias poblaciones de sitios receptores GABAérgicos: Unos de baja afinidad por GABA y alta capacidad de unión, observables aún en condiciones de suave o nulo tratamiento de las membranas (Kurioka y col., 1981), y otros de alta afinidad y baja capacidad de unión, detectables sólo en membranas exhaustivamente tratadas (Guidotti y col., 1979; Horng y Wong,

1980; Olsen y col., 1981; Flores y col., 1986). Existe actualmente discrepancia sobre si dichos sitios de alta afinidad existen realmente y se encuentran *in vivo* saturados por GABA -con lo cual su rol fisiológico no quedaría claro (Egdar y Schwartz, 1992)- o si son meros artefactos de técnica.

Está comprobado asimismo que la metodología empleada no sólo altera el perfil de presentación de sitios receptores al neurotransmisor, sino que también se ven afectados los sitios que unen al resto de los ligandos moduladores, tales como BZD (Chiu y Rosenberg, 1979; Palacios y col., 1979; Sábato y col., 1981; Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990) o barbitúricos (Asano y Ogasawara, 1981; Willow y Johnston, 1981). Especialmente, las primeras evidencias bioquímicas de que el receptor GABA_A debía ser un complejo multimérico provinieron de trabajos que demostraban cómo la unión de BZD y GABA quedaba diferencialmente afectada por el tratamiento de la membrana (Chiu y Rosenberg, 1979; Skerit y col., 1982), sugiriendo que los dos ligandos podían unir a distintas unidades proteicas que eran diferencialmente removidas o alteradas.

Estos datos previos indican que las alteraciones que pueden introducir las técnicas de preparación de membranas sinápticas es un factor que debe tenerse en cuenta al comparar variaciones en la unión de ligandos a este complejo receptor o al estudiar la modulación de dicha unión por distintas drogas.

4. La vía visual de las aves.

La vía visual en las aves, así como en los demás vertebrados, puede dividirse en tres centros principales de procesamiento de información: la retina, los núcleos mesencefálicos de procesamiento y finalmente la corteza visual en el cerebro.

En los mamíferos, la estructura mesencefálica que actúa como “estación de relevo” es el núcleo geniculado lateral (NGL) junto a su “techo” dorsal -colículo superior- (Ingle y Sprague, 1975). En las aves, el mesencéfalo dorsal (tectum óptico) que tiene equivalencia anátomo-funcional al NGL y colículo superior de los mamíferos está mucho más desarrollado anatómicamente, formando dos grandes estructuras globulares a ambos lados de la línea media del encéfalo, conocidas como

lóbulos ópticos (LO), cubiertas parcialmente por los hemisferios cerebrales y por el cerebelo (para una descripción morfológica completa ver La Vail y Cowan, 1971; Güntürkün, 1991). La ubicación de estas estructuras se detalla en la figura 7.

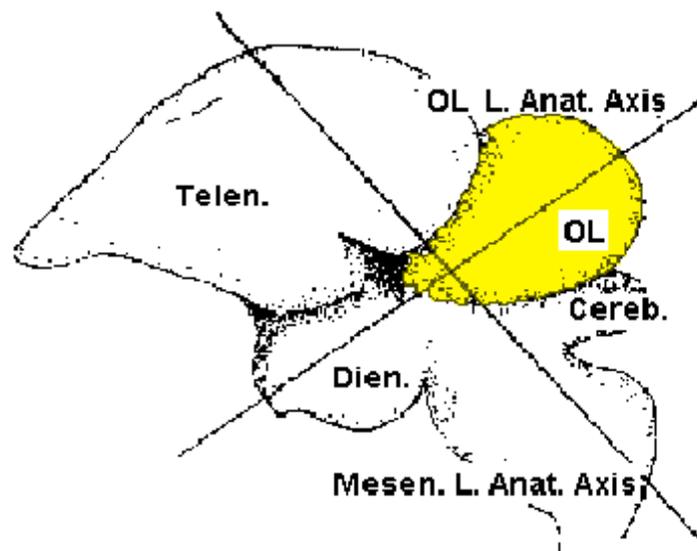


Figura 7: Esquema representativo de las principales estructuras encefálicas en las aves, vista lateral. Se representa un estadio temprano del desarrollo, en el cual los LO son más prominentes (en animales adultos quedan mucho más cubiertos por el cerebelo). Las líneas cruzadas representan los dos ejes anatómicos principales del mesencéfalo. Referencias: *Telen*, telencéfalo; *Dien*, diencéfalo; *Cereb*, cerebelo; *OL*, lóbulo óptico; *OL L. Anat. Axis*, Eje anatómico longitudinal del lóbulo óptico; *Mesen L. Anat. Axis*, eje anatómico longitudinal del mesencéfalo. (Reproducido con autorización de Scicolone y col., 1995)

4.1 Estructura y desarrollo del Lóbulo Óptico

La información visual captada por las células fotosensibles de la retina (conos y bastones) es procesada en las sinapsis con las células bipolares y amácrinas retinianas antes de arribar a las células ganglionares (Hughes y La Velle, 1974), que proyectan sus axones hacia el siguiente centro de procesamiento. La retina de las aves

presenta tipos celulares similares a los de mamíferos, si bien posee una citoarquitectura mucho más compleja así como adaptaciones en el número de células fotosensibles y propiedades bioquímicas de dichas células que la hacen óptima para la visión diurna (Govadorsky y Zueva, 1977; Boemaker, 1980).

Los axones de las células ganglionares que salen de la retina se empaquetan formando los nervios ópticos, que se dirigen hacia los LO donde realizarán la siguiente sinapsis (Rager y Von Oeynhausens, 1979). A diferencia de los NGL de mamíferos, que reciben cada uno un número similar de aferencias provenientes de ambos ojos, cada LO de las aves recibe la mayor parte de las aferencias del ojo contralateral (De Long y Coulombre, 1965, Crossland y col., 1974).

El LO es una estructura laminada que presenta en el adulto seis estratos principales:

1. Estrato óptico
2. Estrato gris y fibroso superficial (subdividido)
3. Estrato gris central
4. Estrato blanco central
5. Estrato gris periventricular
6. Estrato fibroso periventricular

El estrato gris y fibroso superficial se encuentra muy desarrollado y diferenciado internamente (Grüsser y col., 1978), presentando diez subláminas, por lo que cada LO posee en total una estructura laminada concéntrica de quince capas.

El desarrollo embrionario de esta estructura puede dividirse en tres fases principales (La Vail y Cowan, 1971): En la primera fase (días 3 a 6 de incubación del huevo) hay una intensa proliferación celular y una ausencia de laminación pues todas las células neuronales se están originando y diferenciando en una única zona de generación (neuroepitelio).

En la segunda fase (hasta el día 12 de incubación) cesa la proliferación celular y migran las células diferenciadas, originándose los 6 estratos principales y varias de las subláminas del estrato gris y fibroso superficial. Durante esta fase las fibras retinianas invaden el LO iniciando la conexión desde la retina.

Por último, en la tercera fase (desde el día 12 de incubación hasta el nacimiento en el día 21 de incubación) se produce un crecimiento celular en todas las capas y una mayor diferenciación celular en las mismas. En esta última etapa, a partir del día 17 de incubación se establecen las primeras sinapsis funcionales sensibles a influencias lumínicas en el ojo del embrión (La Vail y Cowan, 1971). Un estudio reciente y detallado sobre el curso temporal del desarrollo y laminación del LO puede verse en Scicolone y col. (1995), del cual se ha representado en la figura 8 un esquema resumido de dicho desarrollo.

4.2 Neurotransmisión GABAérgica en el Lóbulo Óptico

Los LO resultan las estructuras con mayor proporción de sinapsis GABAérgicas en el SNC de las aves (Vischer y col., 1982), especialmente en el estrato gris y fibroso superficial (Dietl y col., 1988). Varias evidencias han demostrado que el tipo de receptor principalmente encontrado en los LO es el GABA_A, ya sea mediante ensayos de unión de [³H]muscimol (Batuecas y col., 1987a,b) o radioautografía con [³H]Flunitrazepam (Dietl y col., 1988). Una serie de estudios han demostrado la importancia de las neuronas GABAérgicas en el funcionamiento de los circuitos locales de estas estructuras (Scholes y Roberts, 1964; Cuenod y Streit, 1980).

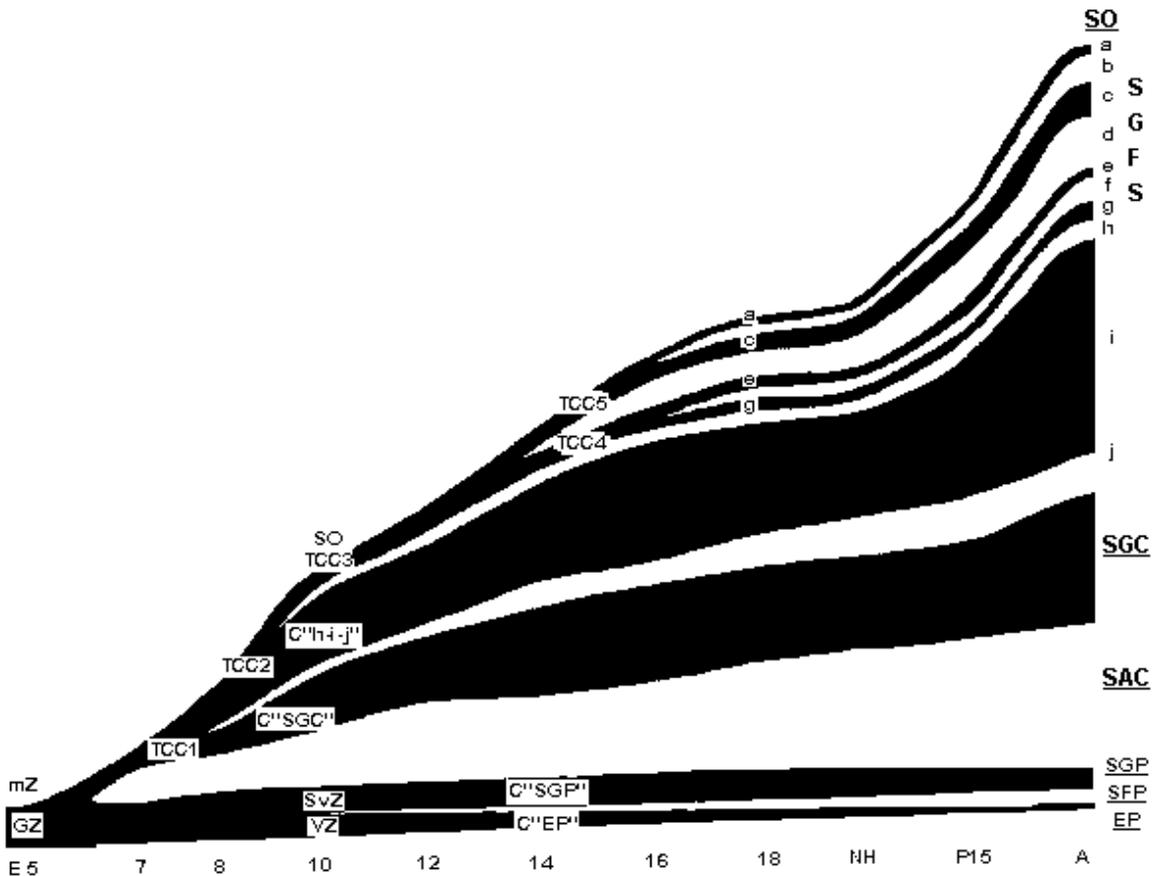


Figura 8: Ilustración esquemática del perfil de laminación en el tectum óptico representado como un proceso dinámico y continuo producido por segregación y compartimentalización celular. En el eje horizontal se representa el estadio de desarrollo, desde embrión de 5 días de incubación (*E5*), hasta animales recién nacidos (*NH*), postnatales jóvenes (*P15*) y adultos (*A*). **Referencias:** *mZ*: zona marginal; *GZ*: zona generativa; *TCC*: compartimento celular transiente (numerados de 1 a 5 de acuerdo a su orden cronológico de aparición); *VZ*: zona ventricular; *SvZ*: zona subventricular. Capas definitivas: *SO*, estrato óptico; *SGFS*, estrato gris y fibroso superficial; *SGC*, estrato gris central; *SAC*, estrato blanco central; *SGP*, estrato gris periventricular; *SFP*, estrato fibroso periventricular; *Ep*, epitelio endodermio. Las letras “a” hasta “j” indican las subláminas del *SGFS*. Las posiciones indicadas con una letra “C” y a continuación con el nombre de una lámina o sublámina representan compartimentalizaciones reconocidas en determinado estadio del desarrollo como precursoras de dicha lámina o sublámina (ejemplo: “C-h-i-j”, compartimentalización precursora de las subláminas “h-i-j” del *SGFS*). Reproducido con autorización de Scicolone y col., 1995.

La presencia de receptores GABA_A (Flores y col., 1986; Ríos y col., 1987), así como de la enzima biosintética del GABA, la GAD (Sisken y col., 1961; González y col., 1990), ha sido demostrada en preparaciones de LO a lo largo del desarrollo ontogenético y sus perfiles de aparición han sido utilizados como indicadores bioquímicos de maduración sináptica (Fiszer de Plazas y col., 1986). Asimismo, se ha comprobado la aparición de heterogeneidad en los sitios receptores GABAérgicos, debida a la presencia de dos poblaciones de sitios receptores -de alta y baja afinidad- durante el desarrollo embrionario, a partir del día 16 de incubación del embrión (Flores y col., 1986). La unión de GABA a sus sitios receptores y la actividad de la enzima GAD alcanzan su pico máximo en el período postnatal inmediato, sugiriendo que la maduración sináptica continúa un tiempo más después del nacimiento, cuando los contactos neuronales ya se han establecido.

Durante el desarrollo postnatal, las alteraciones en propiedades bioquímicas de estos sitios receptores se han podido correlacionar con alteraciones en la información recibida por la vía visual, como por ejemplo las producidas por sutura unilateral de un ojo, mantenimiento de animales con determinados patrones visuales, adaptación a determinadas condiciones de iluminación, etc. (Ali y col., 1983; Ríos y col., 1987; Fiszer de Plazas y col., 1991). Esto ha permitido sugerir que las alteraciones en los receptores GABA_A de los LO representan indicadores bioquímicos de eventos de plasticidad en la vía visual.

Los receptores GABA_A en el LO poseen sitios de unión de BZD asociados cuyo curso de desarrollo durante la ontogenia también ha sido determinado, mediante estudios de marcación con BZD marcadas radioactivamente (Batuecas y col., 1987b; Gravielle y Fiszer de Plazas, 1991). El día del nacimiento -y probablemente el período postnatal inmediato- corresponde al momento en el cual se alcanza el máximo número de sitios receptores a BZD (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1991).

Estos sitios moduladores presentan heterogeneidad durante el desarrollo, existiendo dos poblaciones de sitios receptores a BZD a partir del nacimiento (Gravielle y Fiszer de Plazas, 1995). El rol de estos sitios receptores a BZD es el de ejercer una modulación sobre los sitios receptores a GABA (Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990), tal como se observado en otros modelos, presentando un claro perfil edad-dependiente en dicha modulación.

Los resultados alcanzados hasta el presente sobre los sitios receptores a GABA y BZD muestran cómo las propiedades bioquímicas de los receptores GABA_A varían en el LO de las aves durante el desarrollo ontogenético estando estas variaciones correlacionadas con estadios de desarrollo y procesos de maduración neuronal específicos.

4.3 Estudio de los receptores GABA_A en el Lóbulo Óptico

Por lo expuesto anteriormente, los LO son estructuras muy interesantes para el estudio bioquímico del desarrollo del sistema visual por presentar propiedades anatómicas y funcionales relevantes:

- Son estructuras laminadas, con un patrón de estratificación bien establecido durante el desarrollo ontogenético, lo cual resulta de interés en estudios citológicos y de regulación de la proliferación y diferenciación celular.
- Las proyecciones retinianas se encuentran representadas en forma precisa en los lóbulos ópticos, lo cual los hace un sistema apropiado para el estudio de patrones de conexión y respuestas evocadas.
- Los nervios ópticos presentan una decusación casi completa, lo cual vuelve a los LO estructuras ideales para estudios de deaferentación y reconexión neuronal (Kelly y Cowan, 1972; Por y Bondy, 1982).
- Presentan un tejido rico en sinapsis GABAérgicas y receptores del tipo GABA_A, involucrados en la funcionalidad de los circuitos de procesamiento visual.
- Las variaciones bioquímicas de estos receptores a lo largo de la ontogenia son representativas de eventos de plasticidad en las conexiones neuronales durante el desarrollo.

OBJETIVOS

En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto *in vitro* que ejercen una serie de sustancias modulatorias sobre el complejo receptor GABA_A en la vía visual de las aves a lo largo de la ontogenia, centralizando el estudio en el lóbulo óptico del pollo. A tal fin se seleccionaron los barbitúricos, como moduladores característicos de este receptor y a la vez drogas de relevancia clínica, y neuroesteroides, por su papel como moduladores endógenos putativos del receptor GABA_A. Asimismo se evaluó la presencia de factores endógenos o factores estructurales lábiles que afectaran la acción moduladora de dichos ligandos.

Los objetivos puntuales de la presente investigación fueron:

- Determinar los mecanismos bioquímicos de la acción moduladora que presentan barbitúricos hipnosedantes sobre el complejo receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia del modelo elegido.
- Dilucidar, en forma similar, el mecanismo de acción de neuroesteroides derivados de la progesterona durante la ontogenia del complejo receptor GABA_A.
- Determinar las posibles interacciones de la aplicación conjunta de ambos tipos de drogas, con el objeto de verificar si en el modelo seleccionado las mismas utilizan un único o diferentes mecanismos o sitios de acción.
- Determinar las variaciones producidas en la expresión de los sitios receptores GABAérgicos utilizando diferentes técnicas de preparación de las membranas sinápticas en distintos estadios del desarrollo.
- Determinar las variaciones que dichas técnicas de preparación de membranas sinápticas producen en el efecto modulador de las drogas seleccionadas, actuando en forma separada o conjunta. En conjunto con el punto anterior, la utilización de diferentes técnicas y la observación de alteraciones producidas por ellas sirven como método para determinar diferencias en los receptores entre estadios del desarrollo, además de las reveladas por el seguimiento ontogenético de los mismos.
- Evaluar, por lo tanto, la posible existencia de factores endógenos o factores estructurales lábiles necesarios para mediar la acción moduladora de barbitúricos o

neuroesteroides en distintos estadios del desarrollo de la vía visual, los cuales podrían tener relevancia en el campo farmacológico como mediadores de la acción de drogas neuromoduladoras.

Como se desprende de los objetivos indicados, estos estudios abordaron el mecanismo de acción de sustancias modulatorias sobre el complejo receptor GABA_A a lo largo del desarrollo. La descripción de estos mecanismos y de su variación durante la ontogenia del SNC tiene relevancia para comprender la utilidad de estos compuestos en el campo de la investigación básica así como por sus posibles aplicaciones farmacológicas.

En el caso de los barbitúricos, los resultados podrán correlacionarse con los efectos bioquímicos, fisiológicos y/o patológicos que se conocen para dichas sustancias cuando son administradas durante la ontogenia temprana. En relación a los neuroesteroides, este estudio permitirá ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción de estos ligandos a nivel neuroquímico, lo cual es de gran interés teniendo en cuenta que son sustancias endógenas del SNC que han sido postuladas como elementos de conexión entre la regulación de la transmisión nerviosa y el control hormonal de diversas funciones.

Por otro lado, los resultados obtenidos podrán ser comparados con trabajos previos en los cuales se analizó la expresión bioquímica de los receptores GABAérgicos y de BZD a lo largo del desarrollo en esta misma área del sistema visual. En conjunto, estos resultados proveerán una visión más completa de las propiedades de los sitios receptores GABAérgicos y sus sitios modulatorios durante la ontogenia.

Se espera que el estudio de los mecanismos bioquímicos de acción de estos moduladores permita un avance en el conocimiento de las bases neuroquímicas de funcionamiento del Sistema Nervioso Central a lo largo de su desarrollo.

MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS

1. Drogas y reactivos químicos

Los ligandos radioactivos ácido 4-Amino-[2,3³H(N)]-butírico ([³H]GABA), con una Ae de 85-95 Ci/mmol y 5 α -[9,11,12³H(N)]-pregnan-3 α -ol-20-ona, con una Ae de 50 Ci/mmol fueron adquiridos a New England Nuclear, USA.

Las distintas drogas utilizadas en el estudio de modulación del complejo receptor GABA_A fueron adquiridas a Sigma Chemical Co., USA. Ellas incluyen:

- El modulador GABAérgico pentobarbital (PB), bajo la forma de sal sódica de la mezcla racémica (\pm)-PB.

- Los NE pregnenolona sulfato (5-pregnen-3 β -ol-20-ona sulfato) y DHEA sulfato (5-androsten-3 β -ol-17-ona sulfato), bajo la forma de sal sódica.

- El antagonista GABAérgico no competitivo picrotoxinina (PTX).

- El antagonista GABAérgico competitivo metil-ioduro de (-)bicuculina.

- Los distintos NE derivados de la progesterona: 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona (3 α ,5 α -P), 5 β -pregnan-3 α -ol-20-ona (3 α ,5 β -P), 5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona (3 β ,5 α -P) y 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona (3 β ,5 β -P).

Todos los otros reactivos utilizados en las soluciones de trabajo, buffers, etc., fueron adquiridos con el mayor grado de pureza analítica disponible. En la preparación de las diferentes soluciones se utilizó agua bidestilada con la mínima conductancia iónica obtenible.

El PB fue preparado por disolución en agua bidestilada a temperatura ambiente (para evitar su cristalización en agua fría). Los distintos NE y la picrotoxinina fueron disueltos en todos los casos en etanol absoluto. Las restantes drogas fueron disueltas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

2. Animales.

Se utilizaron embriones y pollos de la especie *Gallus gallus domesticus*, pertenecientes a la raza White Leghorn -con condiciones de endocría estandarizadas-.

Los embriones fueron colocados en una incubadora Franken (fabricación nacional), sin iluminación -excepto durante su manipulación- a una temperatura constante de 38°C y una humedad ambiente aproximada del 70%. El volteo automático de los huevos se realizó cada hora, a fin de permitir un correcto desarrollo de las membranas extraembrionarias (Tazawa, 1980).

A partir de su nacimiento -día 21 de incubación-, los animales fueron mantenidos en un bioterio, con elevada temperatura ambiente durante la primera semana de vida postnatal -para reducir la mortandad de recién nacidos-. La iluminación se mantuvo en un nivel constante y se ajustó a un ciclo de doce horas día/noche (encendido de luces: 6:00 am). Los animales fueron provistos *ad libitum* de agua corriente y alimento balanceado para pollos.

3. Preparación de membranas sinápticas.

Los animales fueron sacrificados en diferentes estadios del desarrollo pre y postnatal por decapitación. En todos los casos las cabezas fueron colocadas en hielo para realizar la remoción de los LO.

La preparación de membranas sinápticas se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por De Robertis y col. (1962a,b), adaptado según Fiszer de Plazas y Mitridate de Novara (1990). Los LO fueron homogeneizados al 10 % p/v en sacarosa 0,32 M, pH 7,4. El procedimiento se realizó en frío en un homogeneizador Potter-Elvehjen de vidrio con émbolo de teflon en giro moderado (Homogeinizador Tri-R Instruments, Modelo K41, USA, velocidad de giro aproximada 1.500 rpm) durante un minuto. El homogenato se centrifugó a 900 g durante 10 minutos para sedimentar núcleos, fibras y restos celulares. El sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y se recentrifugó a 12.000 g durante 20 minutos. El segundo sobrenadante obtenido se aspiró y descartó, mientras que el sedimento fue resuspendido al 10% p/v en agua bidestilada, pH 7,4, -shock osmótico- y centrifugado

nuevamente a 20.200 g por 30 minutos. Este paso de shock osmótico produce la ruptura de los sinaptosomas y además una masiva remoción del GABA endógeno (McCabe y col., 1987). En el procedimiento de fraccionamiento subcelular se utilizaron centrífugas refrigeradas Sorvall RC2B y RC5C (USA).

El sedimento final obtenido (sedimento M1) es una fracción mitocondrial enriquecida en membranas sinápticas. Este sedimento adecuadamente tratado para remover GABA endógeno fue utilizado para los experimentos de unión de ligandos.

La preparación de membranas sinápticas fue sometida a dos procedimientos diferenciales para remover GABA y otros posibles factores endógenos:

a) 8 a 10 ciclos de lavado, mediante resuspensión al 10 % p/v en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, y centrifugación a 100.000 g durante 30 minutos (ultracentrífugas refrigeradas Beckman modelos L5 y L8, USA).

b) 8 a 10 ciclos de lavado como en el caso anterior, seguido de dos ciclos de congelación a -20 °C y descongelación. En el último paso de congelación, el tejido se guardó en suspensión a -20 °C hasta su uso. En ningún caso se utilizó para los experimentos tejido de más de 20 días de antigüedad desde la preparación de membranas.

En la recolección de sobrenadantes del lavado de los tejidos congelados -ver más adelante-, utilizados para detectar posibles factores endógenos, se reemplazó el buffer Tris-HCl 50 mM por buffer 10 mM a fin de disminuir la concentración de sales en el liofilizado de estas fracciones.

4. Ensayos de unión de radioligando

Los sedimentos finales de cada preparación fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4, conteniendo 50 mM de KCl, a una concentración de proteínas de 400-500 µg/ml y utilizados para los ensayos de unión de radioligando. En estos ensayos se aplicó una técnica convencional de centrifugación, descrita originalmente por Enna y Snyder (1975). Alícuotas de membranas fueron incubadas en tubos de polipropileno con [³H]GABA por un lapso de 15 minutos, en hielo (0 -

4°C). El volumen final de incubación fue de 0.6 ml. Todas las determinaciones en los distintos ensayos fueron realizadas por cuadruplicado.

En los ensayos realizados, el tiempo y temperatura de incubación fueron parámetros fijos, previamente puestos a punto en estudios de unión de [³H]GABA (Fischer de Plazas, 1982). La concentración final de iones Cl⁻ en el buffer Tris-HCl utilizado (100 mM) fue seleccionada durante las primeras fases de trabajo de la presente tesis, después de ensayarse soluciones con diferentes concentraciones de Cl⁻ (50, 100, 150 y 200 mM) y elegirse aquella que proveía la mejor relación entre unión específica y unión inespecífica.

Para realizar determinaciones en la población de sitios GABAérgicos de baja afinidad se utilizó una concentración final de GABA 100 nM, mientras que las determinaciones en los sitios GABAérgicos de alta afinidad se realizaron con una concentración final de GABA 10 nM. Estas concentraciones se alcanzaron mediante la mezcla de [³H]GABA como trazador y GABA frío -aportando masa-.

Con el objeto de determinar la unión inespecífica se preincubaron las muestras de membrana con 1 mM de GABA durante 15 minutos previamente al agregado de [³H]GABA. Los diversos ligandos ensayados (PB, NE, etc.) fueron agregados a las muestras de membrana 5 minutos antes del [³H]GABA.

Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron en un rotor Sorvall SM24 de ángulo fijo a 20.800 g por 10 minutos, para separar las fracciones de radioligando unido (sedimento) y libre (sobrenadante). El sobrenadante fue aspirado por vacío y el sedimento fue lavado superficialmente con 1 ml de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 en frío.

Los sedimentos fueron disueltos con 200 µl de un solvente comercial cuya fórmula contiene sales de amonio cuaternario (Solvable, fórmula NEF 910, New England Nuclear, USA) durante toda la noche en estufa a 37°C. A los sedimentos disueltos se les agregó 3 ml de un líquido de centelleo comercial (Fórmula 989, New England Nuclear, USA) y después de dos horas en oscuridad -para eliminar efecto de fluorescencia- la radioactividad retenida fue medida en un contador de centelleo líquido (Tracor Analytic serie 6892, USA) con una eficiencia de 25 a 30 %.

La unión específica de [³H]GABA a sus sitios receptores fue calculada mediante la substracción de la radioactividad retenida en presencia del exceso de

GABA frío (unión inespecífica) a la radioactividad retenida en presencia de [³H]GABA solo (unión total).

5. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes de los sitios receptores.

Los parámetros cinéticos aparentes determinados para las poblaciones de sitios receptores GABAérgicos fueron la máxima capacidad de unión (Bmax) y la constante de disociación aparente (Kd). Para ello se realizaron ensayos de saturación, por desplazamiento de [³H]GABA con concentraciones crecientes de GABA frío. Para el estudio exclusivo de la población de sitios de unión de baja afinidad el rango de concentraciones de GABA fue de 20 a 600 nM, mientras que para el estudio de las poblaciones de sitios de unión de alta y baja afinidad el rango utilizado fue de 2,5 a 600 nM.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de regresión no lineal de las curvas de saturación obtenidas (según se describe en Roodbard y col., 1980), realizando un ponderamiento de los datos en base a la desviación standard de cada punto de las curvas.

Los resultados experimentales fueron modelados por computadora con las siguientes funciones:

Para una población de sitios receptores:

$$B = \frac{B_{max} \cdot [L]}{Kd + [L]}$$

B = unión de radioligando, pmol/mg proteína

[L] = concentración total del radioligando, nM

Bmax = máxima capacidad de unión, pmol/mg proteína

Kd = constante aparente de disociación, nM

Para dos poblaciones de sitios receptores:

$$B = \frac{B_{max1} \cdot [L]}{Kd1 + [L]} + \frac{B_{max2} \cdot [L]}{Kd2 + [L]}$$

B y L representan lo mismo que en la ecuación anterior. Los parámetros de las dos poblaciones de sitios receptores son respectivamente (Bmax1, Kd1) y (Bmax2, Kd2)

Cada punto de un gráfico fue el promedio de por lo menos tres datos experimentales independientes, cada uno de ellos medido por cuadruplicado. La representación gráfica de los resultados se realizó mediante transformación lineal de Scatchard (Scatchard, 1949). La misma no se utilizó en la estimación de los parámetros cinéticos aparentes dado su mayor error (Roodbard y col., 1980), pero se aplicó para ilustrar gráficamente los resultados por ser mucho más clara para presentar una o varias poblaciones de sitios receptores.

En aquellas condiciones en las que fueron reveladas dos poblaciones de sitios receptores, el cálculo final de los parámetros cinéticos aparentes fue reajustado mediante un análisis computarizado aplicando algoritmos iterativos (Feldman, 1972), para considerar el aporte de unión de cada población de sitios receptores sobre la otra. Este ajuste es necesario aun cuando se considere a las dos poblaciones como independientes, debido a que el trazador marca a ambas poblaciones simultáneamente. La omisión de este ajuste lleva a resultados sesgados, obteniéndose un sitio de baja afinidad con afinidad sobreestimada y uno de alta afinidad con mayor capacidad de unión que la real.

6. Determinación del efecto de distintos moduladores sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores.

Para determinar el efecto de los distintos moduladores estudiados se realizaron curvas concentración-efecto, con una concentración fija de [³H]GABA y concentraciones variables del modulador utilizado. Nuevamente cada punto de un gráfico fue el promedio de por lo menos tres datos experimentales independientes, cada uno de ellos medido por cuadruplicado. En el estudio de sitios GABAérgicos de alta afinidad la concentración final de GABA utilizada fue 10 nM, mientras que para

los sitios de baja afinidad se utilizó una concentración final de GABA 100 nM. Las distintas drogas estudiadas (PB, NE) se utilizaron en un rango de concentraciones nanomolar a milimolar (o micromolar para esteroides).

La representación gráfica de los resultados fue ajustada por análisis computarizado evaluando en todos los casos la presencia de uno o dos sitios moduladores -los cuales producen curvas concentración-efecto con un doble plateau de efecto-. Para ello se ajustaron las siguientes curvas a los datos experimentales:

Para una población de sitios moduladores:

$$Y = E_{min} + \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + 10^{(\log EC50 - x) \cdot n}}$$

Y = efecto obtenido, % de variación sobre el control

E_{max}: máximo efecto obtenido, % de variación sobre el control

E_{min}: mínimo efecto obtenido

EC50 = concentración de ligando que produce la mitad del máximo efecto

x = log de la concentración del ligando

n = coeficiente de Hill

(esta fórmula es la “ecuación logística de cuatro parámetros” y representa la clásica curva sigmoide de efecto a concentraciones crecientes del ligando).

Para dos poblaciones de sitios moduladores:

$$Y = E_{min} + \frac{(E_{max} + E_{min}) \cdot frac1}{1 + 10^{(\log EC50_1 - x)}} + \frac{(E_{max} + E_{min}) \cdot (1 - frac1)}{1 + 10^{(\log EC50_2 - x)}}$$

frac1 = representa la fracción de sitios correspondiente a una de las poblaciones.

(1-frac1) = representa la fracción de sitios correspondiente a la otra población

EC50_1 y *EC50_2*: *EC50* para cada una de las dos poblaciones de sitios

(el resto de los parámetros se identifican igual que en la ecuación anterior).

Para determinar si la curva que mejor ajustaba a los datos era la correspondiente a uno o dos sitios moduladores se aplicó un test F comparativo

(compara las sumas de cuadrados de ambas curvas de regresión, indicativas de la bondad de ajuste), y se consideró como mejor ajuste el modelo de dos sitios solamente cuando el test rindió un resultado significativo ($p < 0,05$).

7. Determinación de competición entre neuroesteroides por análisis de Schild.

Para estudiar la posibilidad de que ciertos NE compitieran por sitios comunes de acción, se realizó un análisis de Schild (Arunlakshana y Schild, 1949) que permitió obtener información sobre la naturaleza de dicha competición. Para ello se realizaron varias curvas concentración-efecto para un NE en presencia de concentraciones crecientes del otro -que van produciendo desplazamiento del primero-. Se definió el parámetro dr como:

$$dr_x = \frac{(\text{EC}_{50} \text{ para el NE1 en presencia de una concentración } x \text{ del NE2})}{(\text{EC}_{50} \text{ para el NE1 actuando solo})}$$

El gráfico de dr versus la concentración del NE2 permite obtener información sobre la naturaleza de la interacción entre los NE (Kenakin, 1993), como se detallará en los resultados .

8. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas en todas las fracciones utilizadas se determinó por el micrométodo colorimétrico de Lowry y col. (1955) usando seroalbúmina bovina como standard. La Absorbancia de la preparación a 750 nm se midió en un espectrofotómetro Metrolab 325BD (fabricación nacional).

9. Preparación de sobrenadantes de lavado de membranas sinápticas.

La congelación de las membranas sinápticas se realizó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en dos pasos sucesivos. Estos dos pasos implicaron una primera congelación del sedimento de membranas (por un plazo mínimo de 24 horas), seguida de descongelación, dos lavados con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) y posterior centrifugación. El sedimento obtenido fue resuspendido y congelado. Esta fracción congelada en suspensión se descongeló y lavó nuevamente en el día del ensayo con membranas congeladas.

Como consecuencia de los dos pasos de congelamiento, se obtuvieron dos tipos de sobrenadantes (SN) de lavados posteriores a las congelaciones: un primer sobrenadante de los lavados del sedimento congelado (SNp) y un segundo sobrenadante de los lavados del tejido congelado en suspensión (SNs).

Los sobrenadantes de lavado de un número suficiente de membranas sinápticas provenientes de animales adultos (que proveen el mayor rendimiento de tejido) fueron recolectados después de cada paso de descongelación y lavado de las mismas. Dichos sobrenadantes fueron liofilizados en capas delgadas para su concentración. Posteriormente el liofilizado fue resuspendido en agua bidestilada, pH 7.4, hasta tener una concentración 180 a 200 veces superior a la del material original, y centrifugado a 100.000 g durante 30 minutos para remover impurezas concentradas (sedimentadas).

Esos sobrenadantes concentrados (SNp y SNs) se utilizaron como fuente de material para estudiar la presencia de factores endógenos que pudieran afectar la modulación del receptor GABA_A.

10. Cromatografía en geles moleculares de los sobrenadantes.

Con objeto de eliminar GABA y sales de Tris concentradas, los SN fueron cromatografiados mediante tamiz molecular en una columna de Sephadex G25 medium (Pharmacia, Suecia), en las siguientes condiciones: altura de columna: 30 cm; flujo: 1 ml/min; buffer de equilibrio y elución: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, temperatura de trabajo: temperatura ambiente. Las especificaciones generales de la columna y el protocolo de cromatografía fueron preparados acorde a indicaciones de bibliografía especializada (Determan, 1968). Todas las columnas utilizadas fueron

mantenidas en cámara fría mientras no se utilizaban, y en la preparación e hidratación del Sephadex se agregó azida sódica (Na_3N) 1 mM para evitar crecimiento de microorganismos en el gel. El volumen eluido fue recogido en alícuotas de 1 ml, las cuales fueron monitoreadas por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm y 230 nm (espectrofotómetro Beckman DU-65, USA).

La determinación de los volúmenes de exclusión y total para la columna se realizó sembrando conjuntamente y eluyendo Blue-Dextrano (PM aprox. $4 \cdot 10^6$ Da) y CoCl_2 (PM= 130 Da) respectivamente. La elución de estas sustancias se monitoreó en las alícuotas recogidas midiendo la absorbancia de las mismas a 540 nm. La posición de elución del GABA se determinó sembrando y eluyendo una muestra de [^3H]GABA, monitoreando las alícuotas eluidas en el contador de centello líquido. En todos los casos los volúmenes de siembra oscilaron entre 0.75 y 2 ml.

Las fracciones de SN eluidas del Sephadex y con absorbancia a 280 nm fueron reconcentradas por liofilización (5 veces, para que la concentración final de Tris-HCl no superara 50 mM) y centrifugadas para remover impurezas y partículas de Sephadex. Una vez eliminado el sedimento de impurezas, esas fracciones de SNp o SNs fueron utilizadas en los ensayos de unión de radioligando.

En un segundo paso de cromatografía, las fracciones eluidas del Sephadex G25m con absorbancia a 280 nm fueron colectadas, concentradas y sembradas en una columna de Sephadex G100 con el objeto de intentar realizar un subfraccionamiento. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: altura de columna: 60 cm; flujo: 0.6 ml/min; buffer de equilibrio y elución: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. El volumen eluido fue recogido en alícuotas de 1,5 ml, las cuales fueron monitoreadas por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm. La determinación de los volúmenes de exclusión y total para la columna se realizó nuevamente eluyendo Blue-Dextrano y CoCl_2 . Las alícuotas con absorbancia a 280 nm fueron concentradas 5 veces, centrifugadas y utilizadas en ensayos de unión de radioligando.

11. Análisis estadístico de los resultados.

Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron mediante pruebas paramétricas utilizándose, según fuera requerido, test t de Student o ANOVA de 1, 2 o 3 vías con tests post-hoc -detallados en los resultados-. Para el análisis de varianza se eligió en general el test post-hoc de Tukey-Kramer, por su potencia y buena restricción en la detección de resultados significativos (está situado en un punto medio siendo más restringido que el test de Bonferroni y menos que el de Student-Neuman-Keuls). Para las pruebas de bondad de ajuste se aplicó el test F comparativo.

En todos los casos se asumió como significativo un valor $p < 0.05$.

Todo el análisis estadístico o de ajuste de curvas se realizó utilizando los siguientes programas comerciales: InPlot, InStat, Prism (todos ellos de GraphPad Software Inc.), Microcalc Origin (Microcalc Software), SPSS (SPSS Inc.), y algoritmos diseñados *ad hoc* para aplicación de ajustes según método de Feldman.

RESULTADOS

Para concretar los principales objetivos de la presente tesis, la descripción de los mecanismos de acción farmacológica de barbitúricos y NE sobre el receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia en la vía visual de las aves, se analizó previamente la aparición de los propios sitios receptores GABAérgicos en el modelo estudiado, evaluando las modificaciones que producían las diferentes técnicas utilizadas en la preparación de membranas sinápticas.

1. Sitios receptores GABAérgicos y efecto de la congelación de membranas sinápticas.

1.1 Peso del lóbulo óptico y contenido de proteínas totales a lo largo del desarrollo.

La figura 9 muestra la evolución en peso húmedo del tejido estudiado a lo largo del desarrollo ontogenético, así como la cantidad total de proteínas mensurable en la fracción de membranas sinápticas de dicho tejido. Puede verse un aumento rápido del peso del LO a lo largo del desarrollo prenatal del animal, entre los 10 días de incubación y el nacimiento (21 días de incubación), lapso en el cual el peso del tejido se incrementó al doble (de 41 ± 4 mg a 83 ± 8 mg). Posteriormente, durante el desarrollo postnatal continuó dicho incremento, inicialmente con una tasa elevada, llegando finalmente a una estabilización en animales adultos a partir de los 40 días de edad.

Evaluando comparativamente el contenido de proteínas en la fracción de membranas sinápticas frescas lavadas para eliminar factores endógenos -no sometidas a congelación-, también se observó un importante incremento durante la etapa del desarrollo prenatal del animal, existiendo un aumento de casi cinco veces en el contenido proteico (2.3 ± 0.25 mg/gramo de tejido fresco en el día 10 de incubación a

12.0 ± 1.0 mg en el momento del nacimiento) en el mismo lapso en que el peso total del tejido aumentó al doble. Postnatalmente continuó dicho aumento en el contenido relativo de proteínas, pero el mismo rápidamente se estabilizó, a partir de los 20-25 días de edad.

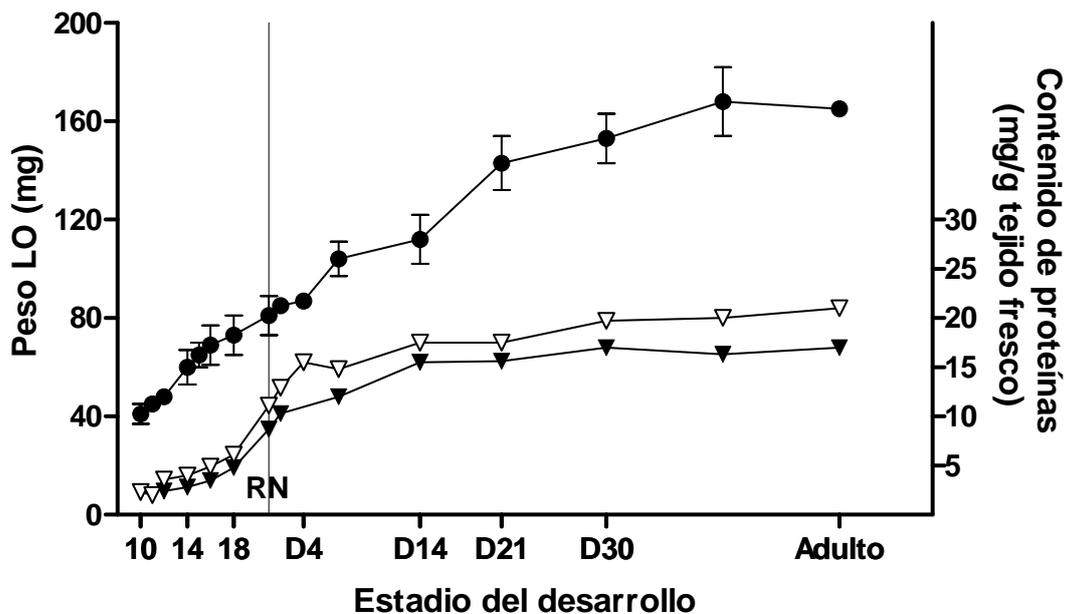


Figura 9: Evolución del peso y contenido en proteínas de la fracción de membranas sinápticas del LO a lo largo del desarrollo ontogenético. Los círculos negros representan el peso húmedo del tejido, los triángulos blancos el contenido de proteínas por gramo de tejido fresco en membranas sinápticas frescas lavadas y los triángulos negros el contenido de proteínas en membranas lavadas y congeladas. Cada punto representa el promedio ± SEM (error estándar del promedio) de 6 determinaciones independientes para cada estadio. El SEM para las mediciones de proteínas representa menos del 10% de cada valor y fue omitido para mayor claridad. RN= Recién Nacidos. Los estadios de desarrollo indicados a la izquierda de RN representan días de incubación -estadios prenatales-, los indicados a la derecha con la letra D representan días de edad -postnatales-

La congelación de las membranas sinápticas produjo, como ya ha sido descrito, una pérdida en la cantidad de proteínas totales, siendo el perfil ontogenético para la masa relativa de proteínas en el tejido congelado muy similar al perfil del

tejido fresco. En estadios prenatales se observó la mayor pérdida, que varió desde un 33% para embriones de 12 días de incubación hasta un 23% de pérdida para embriones de 18 días de incubación. Para los animales recién nacidos la pérdida proteica por la congelación de las membranas fue de un 20% y postnatalmente este parámetro se estabilizó entre los 14 y 21 días de edad, resultando en una pérdida proteica de 12 a 15% en los animales adultos.

1.2 Unión específica de [³H]GABA a lo largo del desarrollo.

Mediante ensayos de unión de radioligando se determinó la unión específica de [³H]GABA a las membranas sinápticas del LO a lo largo del desarrollo, siendo este parámetro un índice representativo de aparición de los sitios receptores GABAérgicos en el LO. Las condiciones del ensayo fueron específicamente optimizadas para revelar la aparición de sitios receptores correspondientes a complejos del tipo GABA_A.

Los resultados, graficados en la Figura 10, muestran que hay un claro perfil edad-dependiente en la aparición de dichos sitios receptores. Es remarcable el aumento escalonado producido a lo largo del desarrollo prenatal, alcanzándose el pico máximo de expresión de los receptores en el nacimiento y período postnatal inmediato. Posteriormente se produjo una reducción en la unión específica de [³H]GABA que alcanzó valores estables en animales a partir de los 30 días de edad. Estas variaciones en la unión observada del radioligando se desarrollaron en forma paralela al aumento de la cantidad total de proteínas en las membranas sinápticas, representado en la Figura 9.

Este perfil descripto se observó en igual forma en membranas sinápticas frescas y en aquellas sometidas a congelación. La principal diferencia producida por la congelación de membranas consistió en un aumento de la unión específica de [³H]GABA en relación a las membranas no congeladas. Este incremento fue proporcionalmente mayor en estadios prenatales (50% de aumento a los doce días de incubación, 37% a los 16 días de incubación), y disminuyó en los postnatales (21 a 25% de aumento a partir de los 21 días de edad).

La congelación de membranas produjo un aumento en la unión específica de [3 H]GABA no sólo debido al incremento de unión total del radioligando sino también por una mayor relación entre unión específica y unión inespecífica. El porcentaje de unión inespecífica fue dependiente de la edad, siendo máximo en estadios prenatales (hasta un 60 % para los estadios más tempranos de desarrollo, membranas frescas), disminuyendo luego en los recién nacidos (35%) para finalmente volver a aumentar ligeramente y mantenerse estable en animales adultos (40-45 %). En todos los estadios estudiados, la congelación-descongelación repetida de las membranas sinápticas produjo una disminución de un 10 a 15% en el total de unión inespecífica de [3 H]GABA.

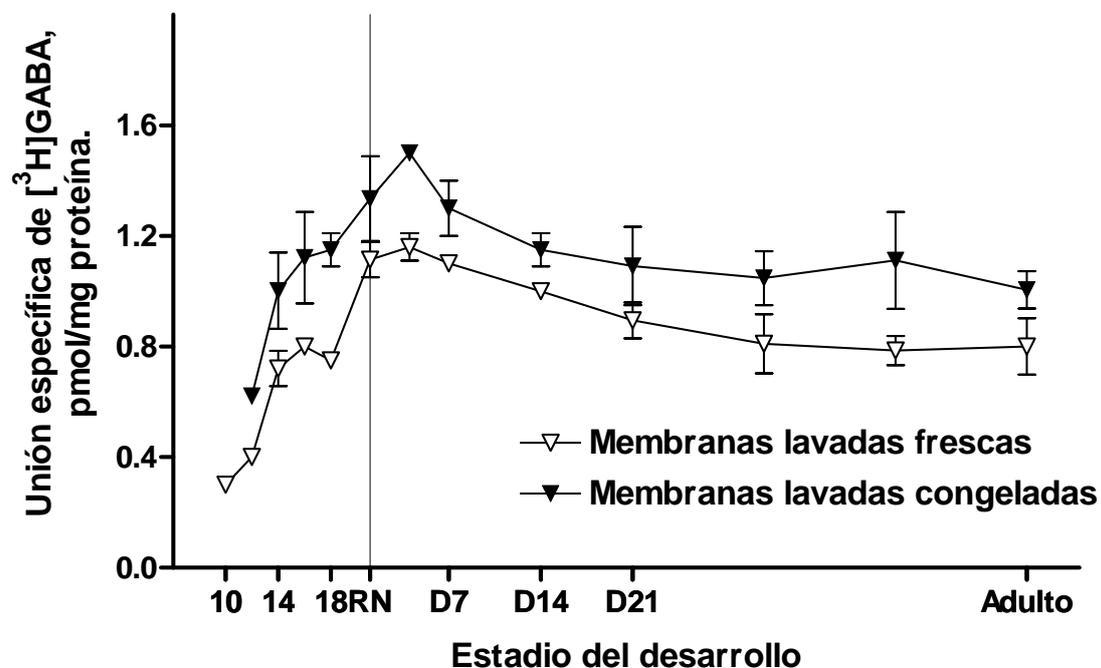


Figura 10: Evolución de la unión específica de [3 H]GABA a sus sitios receptores a lo largo del desarrollo ontogenético. Los datos representan el promedio \pm SEM. de 6 determinaciones independientes para cada estadio. RN= Recién Nacidos. Los estadios de desarrollo se indican de la misma manera que en la Figura 9.

Este aumento en la unión específica de [3 H]GABA puede haberse debido a una remoción de factores endógenos causada por la congelación -incluyendo GABA

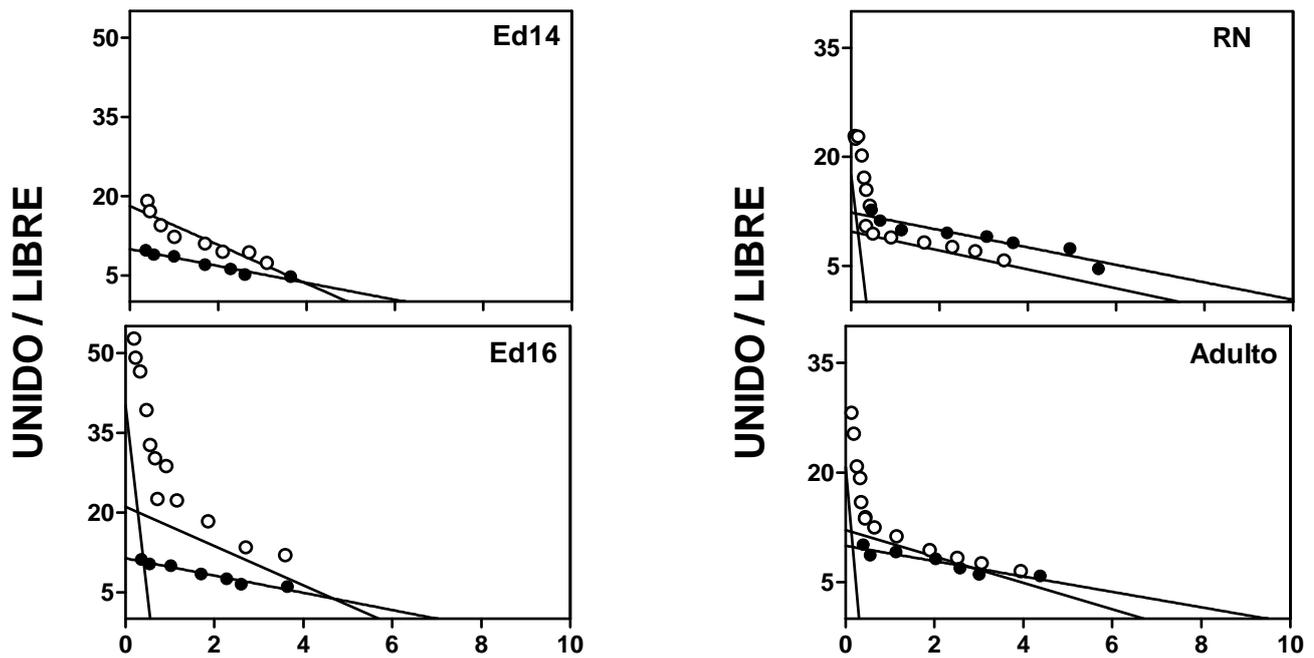
endógeno que enmascara sitios receptores- o a otra variación que haya producido un aumento del número de sitios receptores, de la afinidad de los mismos por GABA, o de ambos parámetros.

1.3 Análisis del aumento de unión de [³H]GABA en membranas congeladas.

A fin de determinar si el aumento en la unión específica de [³H]GABA en las membranas congeladas con respecto a las membranas frescas se debió a un aumento en la afinidad de los sitios receptores por el ligando o a un incremento en la densidad de dichos sitios receptores, se realizaron ensayos de desplazamiento del [³H]GABA de sus sitios receptores con GABA frío. Para ello se seleccionaron estadios de desarrollo representativos, eligiéndose dos estadios prenatales, animales recién nacidos, y un estadio de animales adultos (de más de 30 días de edad). Los estadios prenatales seleccionados fueron los de embriones de 14 y 16 días de incubación (Ed14 y Ed16 respectivamente).

Los resultados de estos ensayos fueron analizados mediante algoritmos computarizados y su representación gráfica puede verse en la Figura 11, la cual muestra la transformación lineal de los resultados, conocida como gráfico de Scatchard.

Esta transformación, si bien inexacta para el cálculo de parámetros -el cual se hace en forma separada mediante los algoritmos- da una rápida idea visual de la máxima densidad de sitios receptores -indicada por la intersección de la recta de regresión con el eje horizontal- y de la afinidad de los mismos por GABA -directamente proporcional a la pendiente de la recta-. Asimismo, resulta una representación óptima para revelar la presencia de una única población de sitios receptores -Scatchard rectilíneo- o de varias poblaciones -Scatchard curvilíneo-, cada una de ellas con su propia afinidad y máxima capacidad de unión.



Unión específica de [³H]GABA, pmol/ mg. proteína

Figura 11: Gráficos de Scatchard representativos de la unión específica de [³H]GABA a membranas sinápticas del lóbulo óptico de pollo, frescas (círculos negros) o sometidas a congelación (círculos blancos). Las membranas fueron incubadas con concentraciones finales de GABA variando entre 2.5 y 600 nM. *Ed14*: embriones de 14 días de incubación, *Ed16*: embriones de 16 días de incubación, *RN*: animales recién nacidos. Para *Ed14* el uso de bajas concentraciones de GABA (2.5 a 20 nM) produjo una unión no distinguible de la unión inespecífica.

Los parámetros resultantes del análisis de estos ensayos de desplazamiento se encuentran resumidos en la Tabla III. Para su determinación se realizó un ajuste a modelos de una y dos poblaciones de sitios receptores, según se observara en la representación de Scatchard, y el cálculo final se corrigió considerando el aporte de cada población a la unión observada en la otra.

Tabla III: Resultados obtenidos del análisis por regresión no-lineal de la unión específica de [³H]GABA a membranas sinápticas frescas o congeladas:

Estadio	Bmax1	Kd1	Bmax2	Kd2
<i>Ed14</i>				
membranas frescas	---	---	6.23±0.25	624.0±10.3
membranas congeladas	---	---	5.05±0.19 ^a	377.6±8.70 ^a
<i>Ed16</i>				
membranas frescas	---	---	7.11±0.18 ^b	648.1±39.0
membranas congeladas	0.63±0.03	16.9±0.43	5.08±0.27 ^a	359.6±2.76 ^a
<i>Recién Nacidos</i>				
membranas frescas	---	---	11.2±0.26 ^b	838.2±19.0 ^b
membranas congeladas	0.60±0.05	21.9±0.52 ^b	7.10±0.82 ^{a,b}	718.5±10.0 ^{a,b}
<i>Adultos</i>				
membranas frescas	---	---	9.02±0.19 ^b	760.0±29.0 ^b
membranas congeladas	0.30±0.04 ^b	14.0±0.52	6.40±0.25 ^{a,b}	509.5±1.65 ^{a,b}

Bmax1, *Bmax2* (pmol/mg proteína): número máximo de sitios receptores para las poblaciones de alta y baja afinidad, respectivamente. *Kd1*, *Kd2* (nM): constante aparente de disociación para las poblaciones de alta y baja afinidad, respectivamente. Los valores representan el promedio ± SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis global de los parámetros obtenidos se realizó por ANOVA de 2 vías y tests post-hoc.

^a: valores significativamente diferentes entre membranas frescas y congeladas para un dado estadio. ^b: valores significativamente diferentes entre estadios para un dado tipo de membranas.

Los gráficos en la Figura 11, así como los resultados detallados en la Tabla III indican una importante asociación entre la aparición de los sitios receptores GABAérgicos y el estadio de desarrollo estudiado o la técnica de preparación de membranas empleada. En el estadio prenatal más temprano analizado (Ed14) se observó una única población de sitios receptores de baja afinidad, la cual disminuye en densidad máxima (Bmax) pero aumenta significativamente en afinidad (disminución de Kd) cuando las membranas sinápticas son congeladas. A partir del siguiente estadio prenatal (Ed16) y en estadios posteriores del desarrollo se detectó en membranas sinápticas frescas una única población de sitios receptores de baja

afinidad, mientras que el proceso de congelación-descongelación produjo un aumento de complejidad, revelándose dos poblaciones de sitios receptores, de alta y baja afinidad (heterogeneidad de sitios receptores). En todos los casos la congelación causó una disminución en el máximo número de sitios receptores de baja afinidad con respecto a la misma población en membranas frescas, conjuntamente con un aumento en su afinidad por GABA. Estos cambios fueron más marcados para los estadios prenatales, especialmente Ed16 que presenta un aumento de afinidad (disminución en Kd_2) de un 80 % junto a una reducción de B_{max2} de un 40 %.

Si se analizan los resultados de acuerdo con su variación ontogenética se observa que la máxima unión de GABA va aumentando en los estadios prenatales, alcanza un máximo en el estadio de animales recién nacidos y posteriormente vuelve a decaer en los adultos. Este patrón se presenta tanto para membranas sinápticas frescas como congeladas y concuerda con el observado en la Figura 10.

A fin de estudiar en las secciones subsiguientes el efecto de drogas modulatorias sobre las distintas poblaciones de sitios receptores GABAérgicos durante la ontogenia, se eligieron como representativos tres estadios de desarrollo - Ed16, recién nacidos y adultos- en los cuales se detectan, luego de un tratamiento apropiado de las membranas sinápticas, las poblaciones de sitios receptores de alta y baja afinidad.

2. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos.

2.1. Efecto del pentobarbital sobre sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad:

Dado que en el tejido estudiado se observó la presencia de sitios receptores GABAérgicos de alta y baja afinidad, se evaluó separadamente el efecto modulador de un barbitúrico representativo sobre ambas poblaciones de sitios receptores, ensayándose en primer lugar su efecto sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad. Los resultados correspondientes pueden observarse en la Figura 12, la cual muestra la relación concentración-efecto para el barbitúrico PB ensayado en distintos estadios del desarrollo y con las dos técnicas diferenciales de preparación de membranas sinápticas. La tabla IV resume los parámetros obtenidos del análisis de las curvas observadas, siendo los más importantes: E_{max} (máximo porcentaje de aumento en la unión de [3 H]GABA en relación al control sin PB) y EC_{50} (concentración de PB que produce la mitad del aumento máximo).

Para determinar el incremento en la unión de [3 H]GABA producido en los sitios receptores de baja afinidad, la máxima unión del radioligando a los sitios de alta afinidad fue previamente sustraída de la unión total observada.

Clásicamente la curva que representa la relación entre la concentración de un ligando y su efecto, al ser representada en un gráfico semilogarítmico adquiere una forma sigmoidea, representativa generalmente de una acción sobre un sitio único receptor. En este caso el PB actuando en estadios tempranos del desarrollo (prenatal y recién nacidos) presentó una relación concentración-efecto más compleja, ajustándose a un modelo de doble sigmoidea o curva con doble plateau de efecto. Esta curva es indicativa de una heterogeneidad de sitios de reconocimiento para el barbitúrico, existiendo por lo tanto sitios moduladores de alta y baja afinidad por PB.

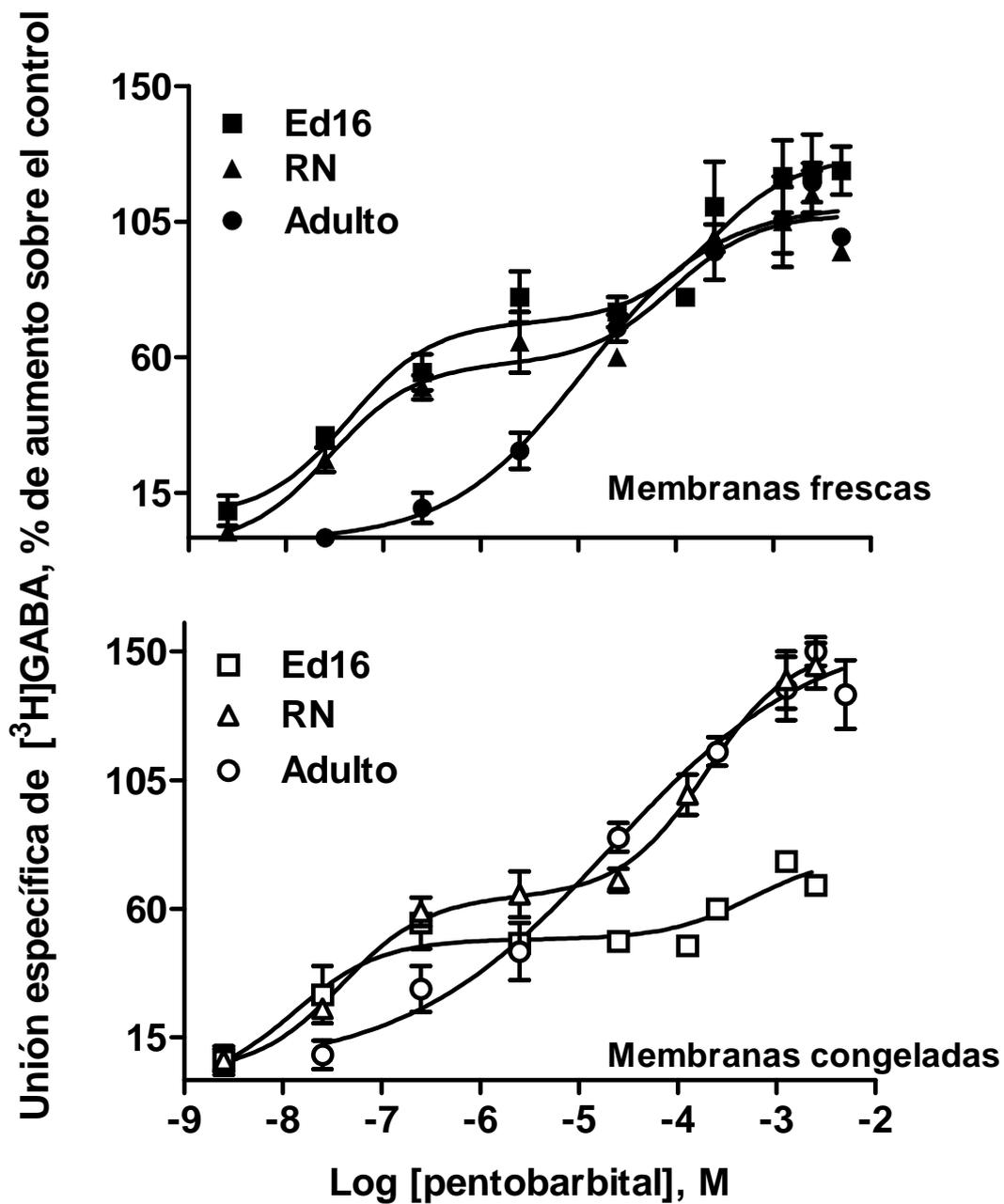


Figura 12: Estimulación de la unión de [³H]GABA a sus sitios de baja afinidad por pentobarbital en forma concentración-dependiente durante el desarrollo del LO de pollo. La unión específica de [³H]GABA se determinó en membranas frescas (símbolos negros) o congeladas (símbolos blancos) utilizándose una concentración final de GABA 100 nM. Los datos están expresados como porcentaje de incremento por encima de la unión control en ausencia del barbitúrico y representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Tabla IV: Efecto del pentobarbital sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios de baja afinidad en tres estadios de desarrollo del lóbulo óptico del pollo.

Estadio	EC _{50_1} (nM)	EC _{50_2} (μM)	E _{max} (% de aumento)	% población de alta afinidad	coefic. de Hill
<i>Ed16</i>					
membranas frescas	44 ± 3	231 ± 18	126 ± 7	54 ± 3	n.d.
membranas congeladas	15 ± 2 ^a	550 ± 21 ^a	80 ± 8 ^{a,b}	63 ± 5 ^a	n.d.
<i>Recién nacidos</i>					
membranas frescas	28 ± 2 ^b	91 ± 10 ^b	108 ± 7	55 ± 3	n.d.
membranas congeladas	39 ± 4 ^{a,b}	196 ± 12 ^{a,b}	131 ± 13	42 ± 8 ^b	n.d.
<i>Adultos</i>					
membranas frescas	-----	11 ± 3 ^b	111 ± 6	----	0.68 ± 0.18
membranas congeladas	-----	21 ± 5 ^{a,b}	138 ± 6	----	0.58 ± 0.14

EC_{50_1} y EC_{50_2}: concentración de PB requerida para la mitad de la estimulación máxima (valores para las poblaciones de sitios moduladores de alta y baja afinidad respectivamente). % población de alta afinidad: porcentaje del incremento observado producido por los sitios que unen PB con alta afinidad.

El modelo de dos sitios moduladores se verificó como mejor ajustado a los datos experimentales que el de un sitio modulador mediante un test F de bondad de ajuste. El análisis de los parámetros fue realizado por ANOVA de 2 vías. ^a: valores significativamente diferentes entre membranas frescas y congeladas para un dado estadio. ^b: valores significativamente diferentes entre estadios para un dado tipo de membranas.

(n.d.: no determinable).

Dicha heterogeneidad de sitios moduladores observada durante los estadios tempranos del desarrollo desapareció posteriormente en las curvas concentración-efecto para el estadio adulto. No obstante estas últimas poseen un coeficiente de Hill bajo, significativamente menor a la unidad, indicativo de una posible heterogeneidad no resuelta en el ajuste de las curvas a los datos experimentales. Esta población aparentemente única de sitios de baja afinidad por PB detectada en el estadio adulto, corresponde a la que ya ha sido descrita en la literatura preexistente.

El patrón de dos poblaciones de sitios moduladores se encontró tanto en tejido fresco como congelado, produciéndose notorias variaciones durante el congelamiento, como puede verse en los resultados listados en la Tabla IV.

El estadio prenatal registró los cambios más marcados -disminución del efecto estimulador de PB en membranas congeladas y aumento del porcentaje de sitios moduladores de alta afinidad-, reforzando la característica del mismo como el más afectado por el tratamiento de las membranas sinápticas.

Realizando una comparación ontogenética, el congelamiento disminuyó en todos los estadios de desarrollo ensayados la potencia del barbitúrico -indicado por el aumento en su EC_{50} -, sin afectar simultáneamente su máximo efecto estimulador, con excepción del estadio prenatal. Variaciones en otros parámetros debidas a la congelación, como por ejemplo el porcentaje de sitios moduladores de alta afinidad, fueron específicas para cada estadio estudiado, sin seguir un patrón ontogenético común.

2.2. Efecto del pentobarbital sobre sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad:

El siguiente paso en la caracterización del efecto estimulador del barbitúrico empleado consistió en verificar su acción sobre la población de sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad. Para ello, se realizaron también curvas concentración-efecto de PB, en presencia de una baja concentración final de GABA (10 nM), que revela solamente la unión a los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad. Los resultados obtenidos para distintos estadios del desarrollo pueden verse en la Figura 13 y los parámetros representativos de las curvas observadas se encuentran detallados en la Tabla V. Se emplearon en todos los casos membranas sinápticas sometidas a congelación y descongelación, dado que esta es la condición requerida para revelar los sitios GABAérgicos de alta afinidad.

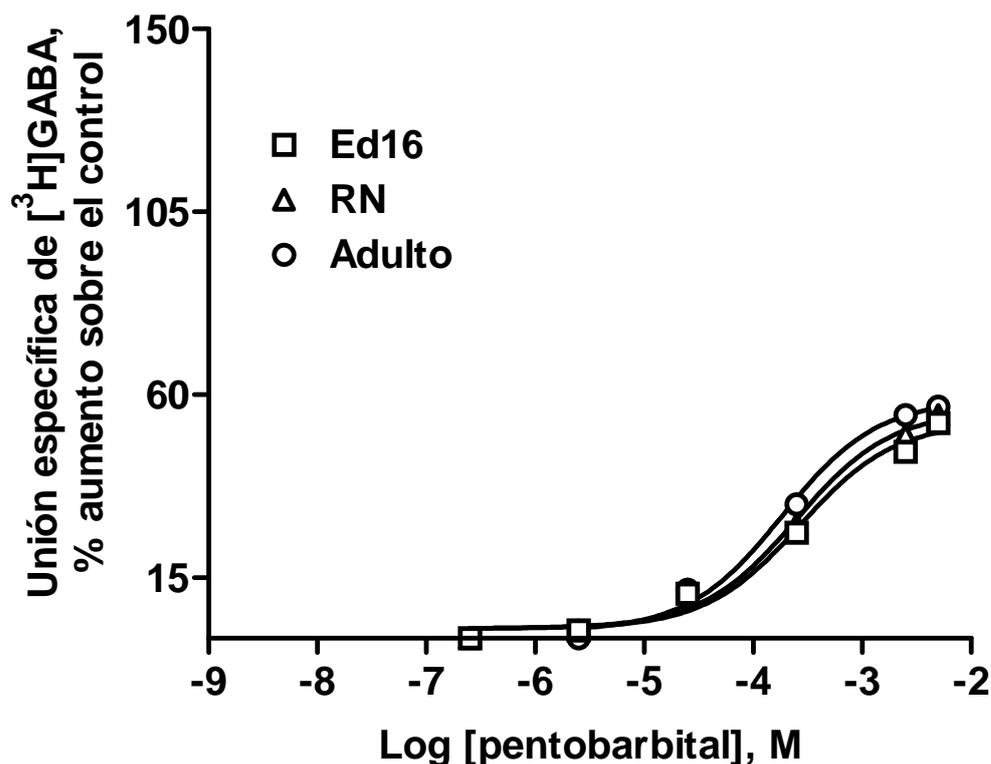


Figura 13: Estimulación de la unión de GABA a sus sitios de alta afinidad por pentobarbital en forma concentración-dependiente durante el desarrollo. La unión específica de [³H]GABA se determinó en membranas congeladas utilizándose una concentración final de GABA 10 nM. Los datos están expresados como % de incremento por encima de la unión control en ausencia del barbitúrico y representan el promedio de cuatro experimentos independientes.

Tabla V: Efecto del pentobarbital sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios de alta afinidad en tres estadios de desarrollo del lóbulo óptico del pollo.

Estadio	EC ₅₀ (μ M)	E _{max} (% de aumento)	coeficiente de Hill
<i>Ed16</i>	270 \pm 17	53 \pm 12	0.45 \pm 0.07
<i>Recién nacidos</i>	250 \pm 11	58 \pm 8	0.49 \pm 0.07
<i>Adultos</i>	190 \pm 13*	56 \pm 7	0.58 \pm 0.14

EC₅₀: concentración de PB requerida para la mitad de la estimulación máxima
El análisis de los parámetros fue realizado por ANOVA de 1 vía. (*):valores significativamente diferentes entre estadios.

Los resultados obtenidos muestran un perfil de modulación producido por el barbitúrico sobre los sitios GABAérgicos de alta afinidad completamente diferente al obtenido sobre la población de baja afinidad. El PB causó nuevamente un aumento en

la unión de [^3H]GABA en forma concentración-dependiente, pero en este caso no se observaron diferencias a lo largo de la ontogenia, dado que las curvas resultantes fueron muy similares para todos los estadios de desarrollo evaluados. Además, la heterogeneidad de sitios moduladores determinada previamente por las curvas de doble plateau no se detectó en este caso en ningún estadio de desarrollo, demostrándose en cambio una única población de sitios moduladores, si bien los coeficientes de Hill obtenidos para las curvas concentración-efecto son significativamente inferiores a la unidad.

Como puede observarse por los valores de E_{max} y EC_{50} indicados en la Tabla V, el efecto del barbitúrico resultó mucho menos potente sobre los sitios GABAérgicos de alta afinidad, en comparación con su efecto ya descrito sobre los sitios GABAérgicos de baja afinidad.

2.3 Caracterización de los sitios moduladores de alta afinidad.

Dado que la población de sitios moduladores de alta afinidad no ha sido descrita previamente, se profundizó en su caracterización farmacológica a fin de verificar si su comportamiento era similar al de los ya conocidos sitios moduladores de baja afinidad. Para ello se evaluó el aumento en la unión específica de [^3H]GABA producido por una baja concentración de PB (250 nM), que afecta exclusivamente a los sitios moduladores de alta afinidad. Dicho incremento se ensayó en presencia de drogas que actúan como antagonistas GABAérgicos, tales como (-)bicuculina y picrotoxina.

Los resultados que se muestran en la Figura 14 han sido seleccionados para un estadio temprano del desarrollo (Ed16) en el cual la heterogeneidad de sitios moduladores es representativa. Se utilizaron membranas sinápticas frescas a fin de evitar la presencia de la población de sitios GABAérgicos de alta afinidad, estableciendo así una estrategia simplificadora con el objetivo de contar con una única población de sitios GABAérgicos detectables y una única población de sitios moduladores estimulados. En dicha Figura puede verse que el barbitúrico aumentó la unión específica de GABA en un 50% aproximadamente sobre el control, siendo

dicho efecto completamente abolido por la picrotoxina (10 μ M). Esta droga no presentó ningún efecto sobre la unión control de GABA, como ya ha sido descrito, dado que es un bloqueante no competitivo de la transmisión GABAérgica. En contraste, el alcaloide (-)bicuculina (50 μ M) redujo la unión de GABA aproximadamente en un 50%, disminuyendo asimismo la unión de GABA estimulada por PB.

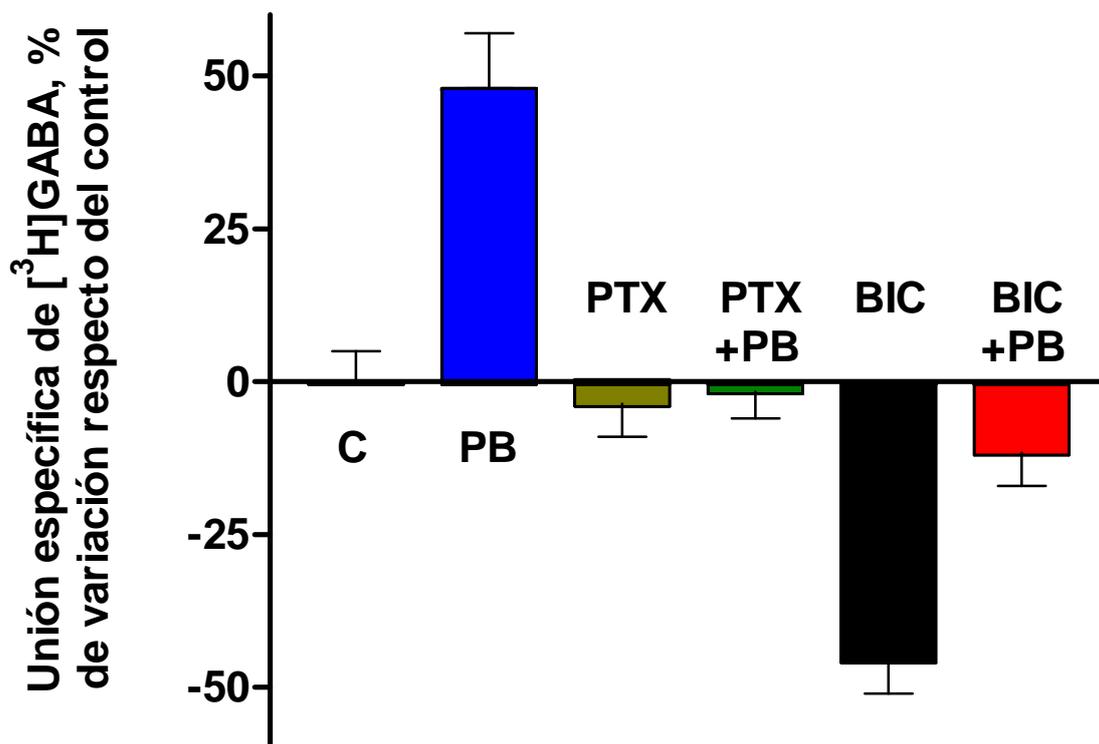


Figura 14: Efecto de antagonistas GABAérgicos sobre la unión específica de [³H]GABA estimulada por PB. Los experimentos se realizaron en membranas sinápticas frescas provenientes de un estadio embrionario. La unión específica de [³H]GABA se determinó con una concentración final de GABA 100 nM, en presencia del barbitúrico y/o las distintas drogas convulsivantes. Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. C: control, sin moduladores, PB: pentobarbital (250 nM), PTX: picrotoxina (10 μ M), BIC: bicuculina (50 μ M)

La disminución relativa que la (-)bicuculina causó en la unión control de [³H]GABA fue similar a la disminución que este alcaloide produjo en la unión del

radioligando estimulada por el barbitúrico -comparada con el efecto del PB actuando solo-.

En conjunto estos resultados mostraron un comportamiento farmacológico de los sitios moduladores de alta afinidad por PB similar al que presentan los sitios de baja afinidad previamente conocidos.

2.4 Mecanismo farmacológico de acción del pentobarbital sobre los sitios receptores GABAérgicos

A fin de determinar el mecanismo farmacológico por el cuál el PB produce un incremento en la unión específica de [³H]GABA, se realizaron ensayos de desplazamiento del radioligando en los distintos estadios del desarrollo estudiados. Los mismos fueron llevados a cabo utilizando una concentración saturante de PB (2.5 mM), que producía una respuesta estimuladora máxima en las curvas concentración-efecto.

La caracterización farmacológica del barbitúrico fue nuevamente llevada a cabo tanto en membranas sinápticas frescas como congeladas. En las primeras, más simples de analizar por presentar una única población de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad, se probó además una segunda concentración de PB (250 nM), capaz de actuar solamente sobre sitios moduladores de alta afinidad.

Los resultados de los ensayos de desplazamiento pueden verse en la Figura 15 (representaciones gráficas de Scatchard) y los parámetros obtenidos por análisis de los datos se encuentran tabulados en la Tabla VI.

En las membranas sinápticas frescas, con una única población de sitios receptores GABAérgicos, el barbitúrico causó un aumento en la afinidad de los mismos por GABA (disminución de K_d), mientras que la máxima capacidad de unión (B_{max}) permaneció inalterada. Los gráficos de Scatchard concuerdan con los resultados obtenidos para una única concentración de [³H]GABA en las curvas representadas en la Figura 12. En este caso puede verse que la baja concentración de PB ensayada solamente produjo un aumento en la afinidad de los sitios receptores GABAérgicos para los estadios tempranos del desarrollo, en los cuales están

presentes los sitios modulatorios que unen PB con alta afinidad. En contraste, en el estadio adulto el uso de PB 250 nM no produjo ninguna modificación significativa de los parámetros de unión de GABA a sus sitios receptores.

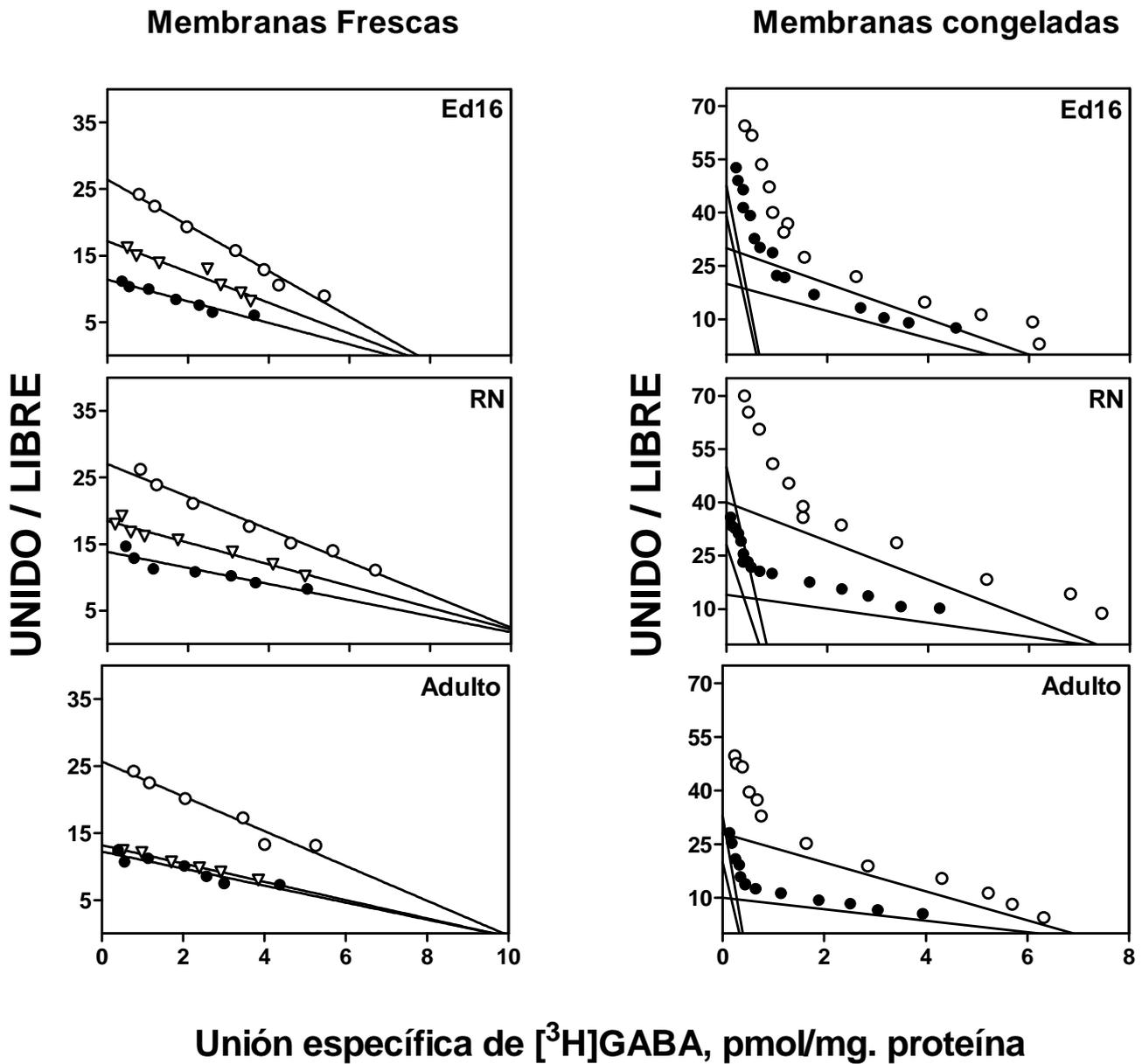


Figura 15: Gráficos de Scatchard representativos de la unión específica de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ a sus sitios receptores en membranas sinápticas frescas (izquierda, una población de sitios receptores) o congeladas (derecha, dos poblaciones). Las membranas fueron incubadas con concentraciones finales de GABA variando entre 2.5 y 600 nM. La denominación de los estadios de desarrollo es igual a la de figuras anteriores. Círculos negros: unión control -sin PB-; círculos blancos: PB 2.5 mM; triángulos: PB 250 nM.

Tabla VI: Resultados de la unión específica de [³H]GABA a membranas sinápticas frescas o congeladas, en ausencia y presencia de PB.

<i>Membranas congeladas</i>				
Estadio	Bmax1	Kd1	Bmax2	Kd2
<i>Ed16</i>				
control	0.63±0.03	16.9±0.43	5.12±0.27	360±3
PB 2.5 mM	0.73±0.08	16.0±0.65	6.19±0.38	190±6 ^b
<i>Recién Nacidos</i>				
control	0.60±0.05	24.1±0.78 ^a	7.20±0.90 ^a	710±12 ^a
PB 2.5 mM	0.70±0.26	22.0±0.52	7.40±1.30	336±17 ^b
<i>Adultos</i>				
control	0.30±0.04 ^a	14.0±0.52	6.40±0.20 ^a	515±6 ^a
PB 2.5 mM	0.35±0.10	11.2±0.55	6.96±0.82	310±4 ^b
<i>Membranas frescas</i>				
Estadio			Bmax	Kd
<i>Ed16</i>				
control			7.11±0.18 ^c	630±35 ^c
PB 250 nM			7.42±0.30	302±27 ^b
PB 2.5 mM			7.89±0.28	200±30 ^b
<i>Recién Nacidos</i>				
control			11.0±0.20 ^{a,c}	818±20 ^{a,c}
PB 250 nM			11.3±0.33	614±15 ^b
PB 2.5 mM			10.9±0.20	405±20 ^b
<i>Adultos</i>				
control			8.99±0.19 ^{a,c}	760±29 ^{a,c}
PB 250 nM			9.65±0.14	735±58
PB 2.5 mM			9.91±0.30	430±40 ^b

Bmax1, Bmax2 (pmol/mg proteína), Kd1, Kd2 (nM): idem Tabla III

Los valores representan el promedio ± SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis global de los sitios GABAérgicos de baja afinidad se hizo por ANOVA de tres vías (factores: estadio del desarrollo, tipo de membrana y presencia de PB). El análisis entre pares de factores se hizo por ANOVA de dos vías, usando el error total del ANOVA de tres vías. El análisis final entre estadios se hizo por ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer.

El análisis global de los sitios GABAérgicos de alta afinidad se realizó por ANOVA de dos vías (factores: estadio de desarrollo y presencia de PB) y tests post-hoc. El análisis entre estadios se hizo mediante ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer, utilizando el error total del ANOVA de dos vías.

^a: valores control significativamente diferentes entre estadios. ^b: valores significativamente diferentes entre control y PB. ^c: valores control significativamente diferentes entre membranas frescas y congeladas.

En las membranas sinápticas sometidas a congelación se observó el mismo efecto del PB sobre la población de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad que el producido en membranas frescas, es decir, un aumento en la afinidad por GABA sin alteración del número máximo de sitios receptores.

Analizando en la Tabla VI el efecto producido por el barbitúrico sobre los sitios GABAérgicos de baja afinidad a lo largo del desarrollo, puede observarse que el máximo incremento en afinidad (definido como $100 \cdot (Kd_{\text{control}} - Kd_{\text{PB}}) / Kd_{\text{PB}}$) entre la unión control y estimulada por PB se presenta para el estadio de animales recién nacidos, tanto en membranas sinápticas frescas (101% de aumento de afinidad) como congeladas (111%). El estadio en el cual se produjeron las menores variaciones de parámetros es el adulto, en coincidencia con lo observado en las curvas concentración-efecto.

El análisis del efecto de PB sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad indicó que no había alteración significativa de dichos sitios en presencia del barbitúrico. En efecto, si bien hay ciertas variaciones de un estadio a otro en afinidad o densidad máxima, el análisis estadístico muestra que los parámetros de dichos sitios receptores no se modificaron por el agregado de una concentración saturante de PB. Este resultado aparentemente no concuerda con las curvas concentración-efecto observadas en la Figura 13, que mostraban un aumento en la unión de [³H]GABA a sus sitios de alta afinidad en presencia del barbitúrico. Es importante destacar que una inspección visual de los gráficos de Scatchard genera la impresión de una variación producida por el barbitúrico (aumento de Bmax), pero el resultado final proveniente del análisis de los datos permite descartarla. Esto se logra al considerar el aporte que hace la población de sitios receptores de baja afinidad a la unión de GABA registrada en la población de alta afinidad, el cual no puede ser matemáticamente eliminado en las curvas concentración-efecto de la Figura 13. No obstante, este resultado permanece contradictorio y requiere un análisis más detallado, como se verá más adelante.

3. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por neuroesteroides.

3.1 Efecto de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad.

De la misma manera en que se caracterizó el efecto de un barbitúrico sobre los sitios receptores GABAérgicos, se procedió a la caracterización del efecto de NE sobre dichos sitios. Si bien se emplearon varios esteroides para realizar un estudio de relación estructura-actividad, la caracterización más detallada de la modulación de NE sobre el receptor GABA_A se llevó a cabo con el NE 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona (3 α ,5 α -P) como representativo, ya que el mismo está demostrado como el más potente NE estimulador en otros modelos animales.

En primer lugar se evaluó el efecto de este NE sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad en membranas sinápticas obtenidas del LO de pollo, frescas o sometidas a congelación. Los resultados pueden verse en la Figura 16, que muestra la relación concentración-efecto para la 3 α ,5 α -P ensayada en distintos estadios del desarrollo pre y postnatal. La tabla VII resume los parámetros obtenidos del análisis de las curvas. Nuevamente para determinar el incremento en la unión de [³H]GABA producido en los sitios receptores de baja afinidad, la máxima unión de GABA a los sitios de alta afinidad fue sustraída de la unión total observada en cada caso.

Dado que los NE fueron disueltos en todos los casos en etanol absoluto (el cual alcanzó una concentración final de 1.5% v/v -aproximadamente 230 μ M- en el volumen final de reacción), se comparó además la unión específica control de GABA en presencia y ausencia de dicha concentración de alcohol. En todos los estadios de desarrollo y preparaciones de membranas estudiados se observó una ausencia total de efecto para esa concentración de etanol sobre la unión específica de GABA.

A diferencia de lo observado con el barbitúrico PB, la 3 α ,5 α -P produjo las típicas curvas concentración-efecto sigmoideas en todos los estadios del desarrollo, las cuáles poseen coeficientes de Hill cercanos a la unidad, indicativos de una población simple de sitios moduladores que reconocen al NE.

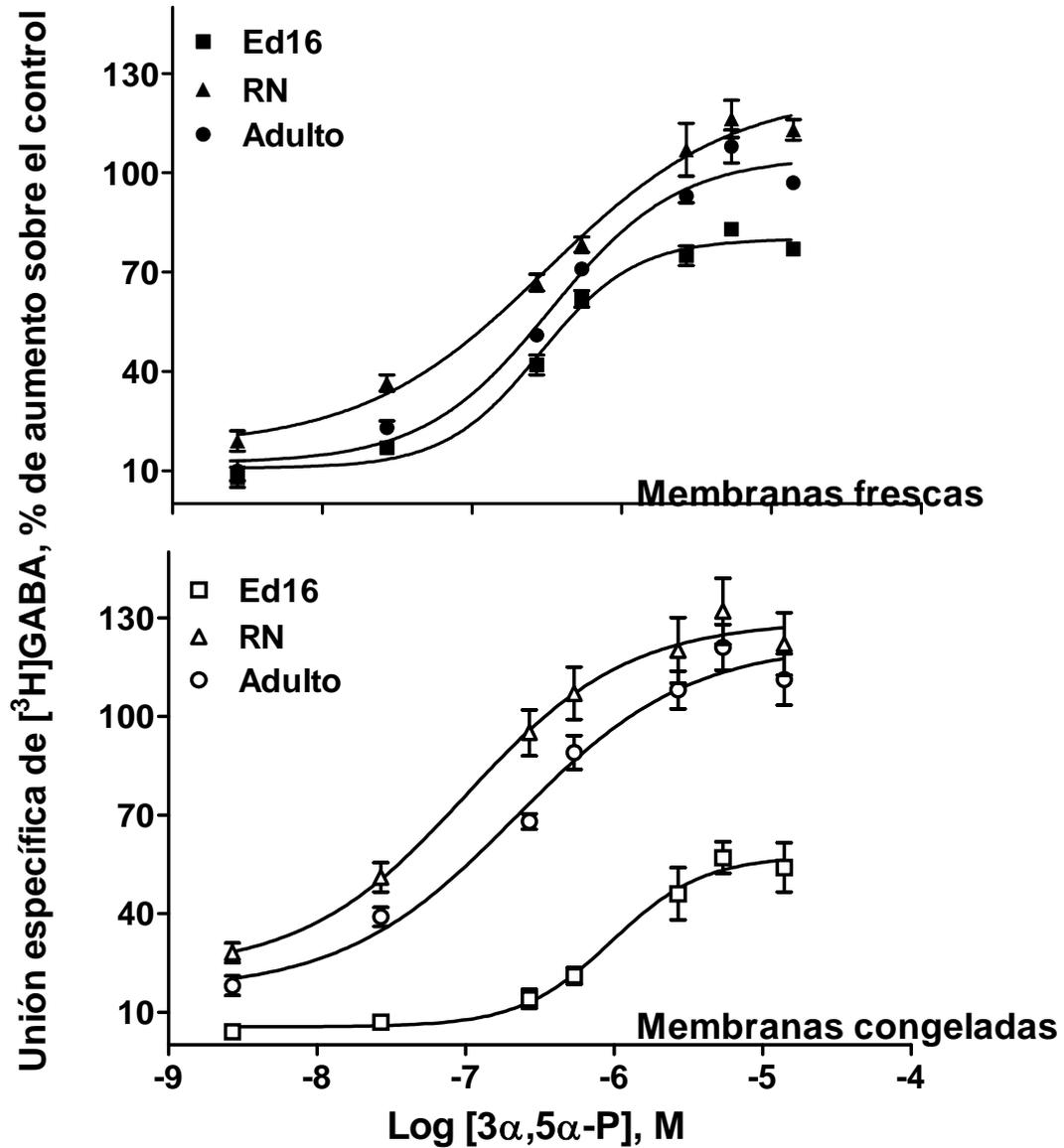


Figura 16: Estimulación de la unión de GABA a sus sitios de baja afinidad por $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ en distintos estadios de desarrollo del LO de pollo. La unión específica de [³H]GABA se determinó en membranas sinápticas frescas (símbolos negros) o congeladas (símbolos blancos), utilizándose una concentración final de GABA 100 nM. Los datos se expresan como % de aumento con respecto a la unión control y representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Tabla VII: Efecto concentración-dependiente de $3\alpha,5\alpha$ -P sobre la unión específica de [3 H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad a lo largo de la ontogenia

Estadio	EC ₅₀ (10 ⁻⁷ M)	E _{max} (%)	Coefficiente de Hill
<i>Ed16</i>			
membranas frescas	2.8 ± 0.50 ^a	80.0 ± 3.50 ^{a,b}	1.40 ± 0.33 ^b
membranas congeladas	9.6 ± 0.30 ^b	57.4 ± 3.72 ^b	1.36 ± 0.39
<i>Recién Nacidos</i>			
membranas frescas	1.0 ± 0.02 ^b	129.0 ± 5.20	0.75 ± 0.21
membranas congeladas	3.1 ± 0.20 ^a	124.4 ± 9.50	0.85 ± 0.20
<i>Adulto</i>			
membranas frescas	2.2 ± 0.31	122.2 ± 10.9	1.02 ± 0.10
membranas congeladas	3.3 ± 0.40	104.8 ± 8.1	0.80 ± 0.31

Los valores representan los promedios ± SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis global de los datos fue realizado mediante ANOVA de dos vías (factores: estadio del desarrollo y tipo de membranas) y tests post-hoc. El análisis entre estadios para cada tipo de membranas se realizó mediante ANOVA de 1 vía y tests de Tukey-Kramer, usando el error total del ANOVA de dos vías. ^a: Valores significativamente diferentes entre membranas frescas y congeladas para un dado estadio. ^b: valores significativamente diferentes entre estadios.

Si se comparan los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo, se observa que en las membranas sinápticas frescas la potencia del esteroide para estimular la unión de [3 H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad cambió significativamente entre los tres estadios de desarrollo estudiados, siendo el estadio de animales recién nacidos el más sensible al esteroide (menor EC₅₀). En contraste, en las membranas sometidas a congelación no hubo diferencias significativas para la potencia del NE a lo largo del desarrollo. En forma similar a lo observado en la modulación producida por barbitúricos, el estadio prenatal nuevamente mostró las variaciones más marcadas entre membranas sinápticas frescas y congeladas, siendo por lo tanto el estadio más sensible al procedimiento de preparación de membranas.

En la comparación de los valores de E_{max}, el análisis estadístico no demostró diferencias significativas entre estadios o preparaciones de membranas a partir del nacimiento, sugiriendo por lo tanto que el máximo efecto -evaluando globalmente E_{max} y EC₅₀ - de la $3\alpha,5\alpha$ -P sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad

se alcanza en los animales recién nacidos, para mantenerse estable en estadios posteriores del desarrollo.

Por último, un análisis comparativo de la modulación producida por NE y barbitúricos muestra que los primeros poseen mayor potencia, dado que sus valores de EC_{50} para producir el efecto estimulador son comparativamente menores, mientras que los segundos originan un mayor incremento máximo en la unión de [3H]GABA a sus sitios receptores. Ontogenéticamente, el máximo efecto modulador de ambas drogas posee un desfase, obteniéndose dicho máximo en estadios prenatales para el barbitúrico y en animales recién nacidos para el esteroide.

3.2 Efecto de la 5α -pregnan- 3α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad.

Para caracterizar completamente el efecto del NE sobre las poblaciones de sitios receptores GABAérgicos, se procedió a verificar su acción sobre la población de alta afinidad, de manera similar a la realizada con barbitúricos. Se realizaron curvas concentración-efecto de $3\alpha,5\alpha$ -P en presencia de una baja concentración final de GABA (10 nM), que revela solamente la unión a sitios receptores de alta afinidad. Los resultados obtenidos para los distintos estadios del desarrollo se representan en la Figura 17 y los parámetros de las curvas obtenidas se han resumido en la Tabla VIII. Para estudiar la modulación sobre estos sitios se emplearon, tal como se había hecho con barbitúricos, solamente membranas sinápticas congeladas.

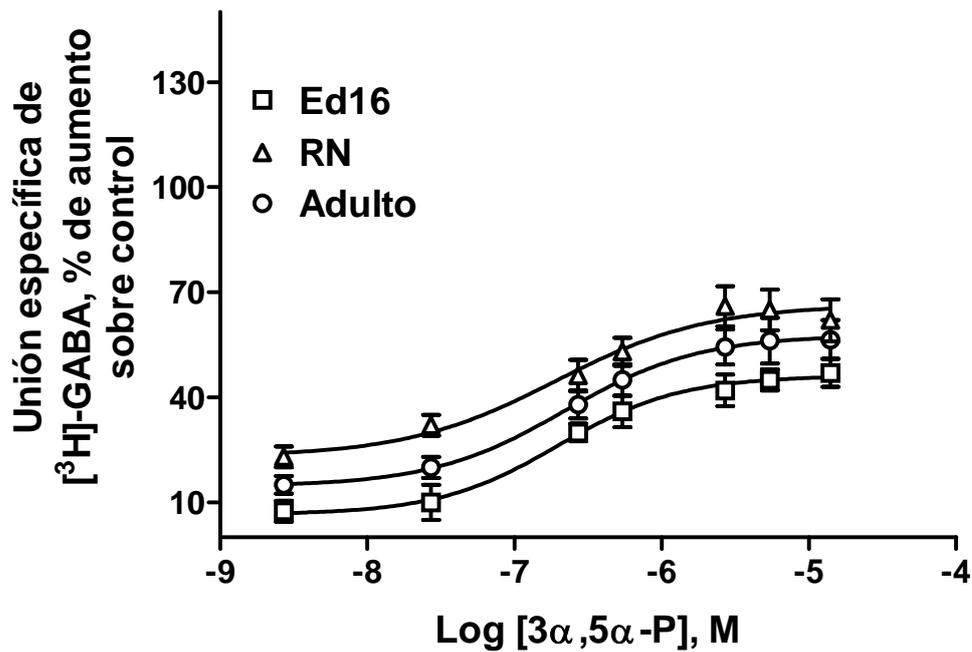


Figura 17: Estimulación de la unión de GABA a sus sitios receptores de alta afinidad por 3α,5α-P a lo largo del desarrollo del LO de pollo. La unión específica de [³H]GABA se determinó en membranas congeladas con una concentración final de GABA 10 nM. Los datos se expresan de la misma forma que en la Figura 16 y representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes

Tabla VIII: Efecto concentración-dependiente de 3α,5α-P sobre la unión específica de [³H]GABA a sus sitios receptores de alta afinidad a lo largo de la ontogenia

Estadio	EC ₅₀ (10 ⁻⁷ M)	E _{max} (%)	Coefficiente de Hill
<i>Ed16</i>	2.0 \pm 0.20	46.1 \pm 1.30*	1.05 \pm 0.36
<i>Recién Nacidos</i>	2.0 \pm 0.40	66.4 \pm 3.90	0.86 \pm 0.15
<i>Adultos</i>	2.2 \pm 0.10	57.8 \pm 0.50	0.96 \pm 0.06

Los valores representan los promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. *: valores significativamente diferentes entre estadios. El análisis global de los datos fue realizado mediante ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer

Los resultados obtenidos indican que no hubo ningún cambio en la potencia del esteroide para estimular la unión de [^3H]GABA a sus sitios receptores de alta afinidad durante la ontogenia. La única diferencia significativa fue obtenida en el valor de máximo efecto producido (E_{max}) entre el estadio prenatal y el nacimiento, sin diferenciación posterior entre este estadio y el adulto. Los coeficientes de Hill obtenidos son cercanos a la unidad, nuevamente indicando una población única de sitios moduladores que unen al NE.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos con PB actuando sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad. El efecto estimulador es bajo, aproximadamente la mitad del que produce el modulador sobre la población de sitios receptores de baja afinidad, y sin diferencias notables a lo largo del desarrollo.

3.3 Mecanismo farmacológico de acción de la 5α -pregnan- 3α -ol- 20 -ona sobre los sitios receptores GABAérgicos.

A fin de determinar el mecanismo por el cual el NE empleado produce un aumento en la unión específica de GABA a sus sitios receptores, lo que además permitiría su comparación con el mecanismo observado para el PB, se realizaron ensayos de desplazamiento en los distintos estadios de desarrollo estudiados. Los mismos fueron llevados a cabo empleando una concentración saturante de $3\alpha,5\alpha$ -P ($5\ \mu\text{M}$), que produce una respuesta máxima en las curvas concentración-efecto para todos los estadios de desarrollo analizados. La caracterización farmacológica del mecanismo de acción se realizó tanto en membranas sinápticas frescas como sometidas a congelación.

Los resultados de estos ensayos de desplazamiento para los sitios receptores GABAérgicos se encuentran graficados en la Figura 18 (representaciones gráficas de Scatchard) y los parámetros obtenidos del análisis por regresión no lineal de los datos se han resumido en la Tabla IX.

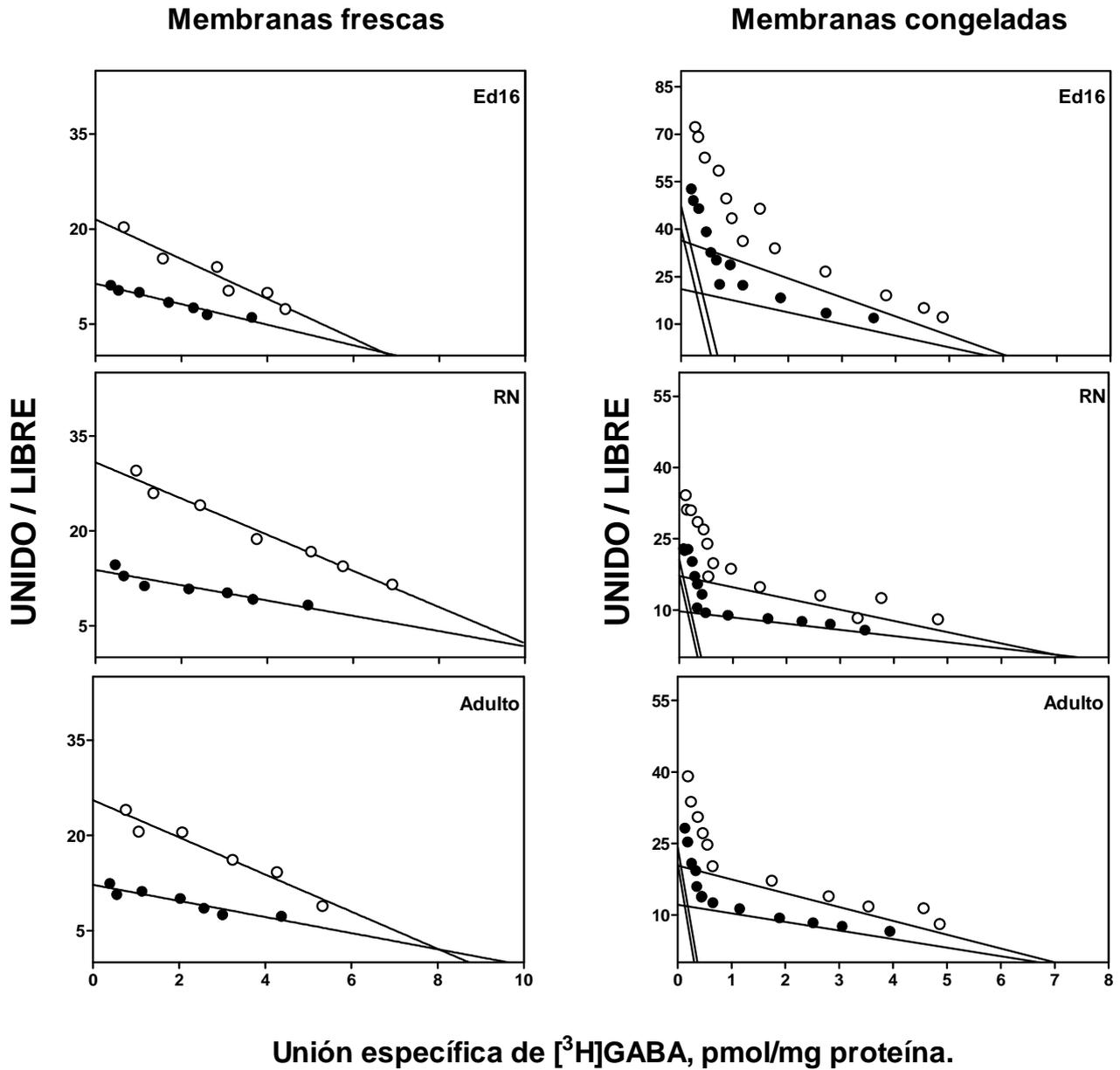


Figura 18: Gráficos de Scatchard representativos de la unión específica de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ a sus sitios receptores en membranas sinápticas frescas (una población de sitios receptores) o congeladas (dos poblaciones). Las membranas fueron incubadas con concentraciones finales de GABA variando entre 2.5 y 600 nM. La denominación de los estadios de desarrollo es igual a la de figuras anteriores. Círculos negros: unión control -sin $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ -; círculos blancos: $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ 5 μM .

Tabla IX: Resultados del análisis por regresión no lineal de la unión específica de [³H]GABA a membranas sinápticas frescas o congeladas, en ausencia y presencia de 3 α ,5 α -P (5 μ M).

<i>Membranas congeladas</i>				
Estadio	Bmax1	Kd1	Bmax2	Kd2
<i>Ed16</i>				
control	0.63 \pm 0.13	17.0 \pm 3.4	5.08 \pm 0.27	259.6 \pm 2.8
3 α ,5 α -P	0.76 \pm 0.15	17.0 \pm 1.6	6.00 \pm 0.05	169.3 \pm 1.2 ^b
<i>Recién Nacidos</i>				
control	0.60 \pm 0.05	21.0 \pm 3.5	7.10 \pm 0.82 ^a	718.5 \pm 10 ^a
3 α ,5 α -P	0.60 \pm 0.17	24.2 \pm 4.0	6.75 \pm 0.28	404.5 \pm 1.5 ^b
<i>Adultos</i>				
control	0.28 \pm 0.04 ^a	14.0 \pm 0.4 ^a	6.40 \pm 0.24 ^a	509.5 \pm 1.7 ^a
3 α ,5 α -P	0.22 \pm 0.02	11.5 \pm 3.4	5.10 \pm 0.57	251.3 \pm 20 ^b
<i>Membranas frescas</i>				
Estadio			Bmax	Kd
<i>Ed16</i>				
control			7.11 \pm 0.18 ^c	648.0 \pm 30 ^c
3 α ,5 α -P			6.26 \pm 0.45	347.6 \pm 37 ^b
<i>Recién Nacidos</i>				
control			11.1 \pm 0.56 ^{a,c}	830.8 \pm 19 ^{a,c}
3 α ,5 α -P			10.9 \pm 0.20	336.7 \pm 13 ^b
<i>Adultos</i>				
control			9.12 \pm 0.19 ^{a,c}	760.0 \pm 27 ^{a,c}
3 α ,5 α -P			8.39 \pm 0.92	347.8 \pm 16 ^b

Bmax1, *Bmax2* (pmol/mg proteína), *Kd1*, *Kd2* (nM): idem Tabla III

Los valores representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis global de los sitios GABAérgicos de baja afinidad se hizo por ANOVA de tres vías (factores: estadio de desarrollo, tipo de membrana y presencia del esteroide). El análisis entre pares de factores se hizo por ANOVA de dos vías, usando el error total del ANOVA de tres vías. El análisis final entre estadios se hizo por ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer.

El análisis global de los sitios GABAérgicos de alta afinidad se realizó por ANOVA de dos vías (factores: estadio de desarrollo y presencia de PB) y tests post-hoc. El análisis entre estadios se hizo mediante ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer, utilizando el error total del ANOVA de dos vías.

^a: valores control significativamente diferentes entre estadios. ^b: valores significativamente diferentes entre control y 3 α ,5 α -P. ^c: valores control significativamente diferentes entre membranas frescas y congeladas.

En las membranas sinápticas frescas que presentan, como ya se demostrara, solamente la población de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad, el NE produjo un aumento en la afinidad de dichos sitios por el radioligando, sin alterar su

máxima capacidad de unión. El mismo resultado se observó para los sitios receptores de baja afinidad en membranas congeladas. Los resultados del análisis de varianza indican que el aumento en afinidad (disminución de K_d) fue diferente entre los distintos estadios analizados, siendo máximo para recién nacidos (149% de aumento) en las preparaciones de membranas sinápticas frescas y máximo para adultos (100% de aumento) en las preparaciones de membranas congeladas. Se encontró una variación notable en el incremento de afinidad cuando se comparaban las membranas frescas y congeladas para los estadios prenatal y de recién nacidos, nuevamente reforzando la propiedad de dichos estadios tempranos del desarrollo como los más afectados por el tratamiento de las membranas.

Los valores obtenidos y representados en la Tabla IX mostraron que los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad mantuvieron sus parámetros K_d y B_{max} inalterados en presencia del esteroide, similarmente a lo ya registrado con el barbitúrico, siendo este resultado discrepante con las curvas concentración-efecto observadas en la Figura 17.

Comparando los resultados de los ensayos de desplazamiento obtenidos para PB y $3\alpha,5\alpha$ -P se observa que el mecanismo modulador de ambas drogas es similar, basado en un aumento de la afinidad de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad por su ligando. En ambos casos los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad resultaron aparentemente insensibles a la presencia de la droga moduladora, requiriéndose por lo tanto un análisis más detallado del efecto de moduladores en dichos sitios.

3.4 Efecto de la 5α -pregnan- 3α -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad detectados con concentraciones decrecientes de [3 H]GABA.

En secciones precedentes se observó un efecto estimulador de PB y del NE $3\alpha,5\alpha$ -P sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad (Figuras 13 y 17

respectivamente), identificados por la unión de GABA con una concentración final 10 nM. No obstante, en el análisis de los ensayos de desplazamiento, dichos sitios receptores de alta afinidad no resultaban afectados en ninguno de sus parámetros al aplicarse la droga moduladora, resultado que discrepaba con las curvas concentración-efecto obtenidas. Dado que la concentración final de GABA que se utilizó en las curvas concentración-efecto se obtuvo mediante la adición de [³H]GABA -trazador- y GABA frío -masa-, y considerando que el ligando radioactivo puede unir a ambas poblaciones de sitios receptores (alta y baja afinidad), se testeó el efecto de una concentración fija y saturante del esteroide (5μM) con concentraciones decrecientes de [³H]GABA, mucho menores que la K_a (1/Kd) de los sitios de baja afinidad, a fin de descartar completamente la unión a estos sitios.

Los resultados de dicho ensayo pueden verse en la Figura 19 y muestran que el efecto estimulador del esteroide disminuye a medida que lo hace la concentración de [³H]GABA, indicando por lo tanto que los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad son realmente insensitivos al esteroide, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de desplazamiento. Una prueba similar repetida con una concentración fija de PB (1.25 mM) rindió resultados similares, indicando que los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad son insensitivos a las drogas modulatorias.

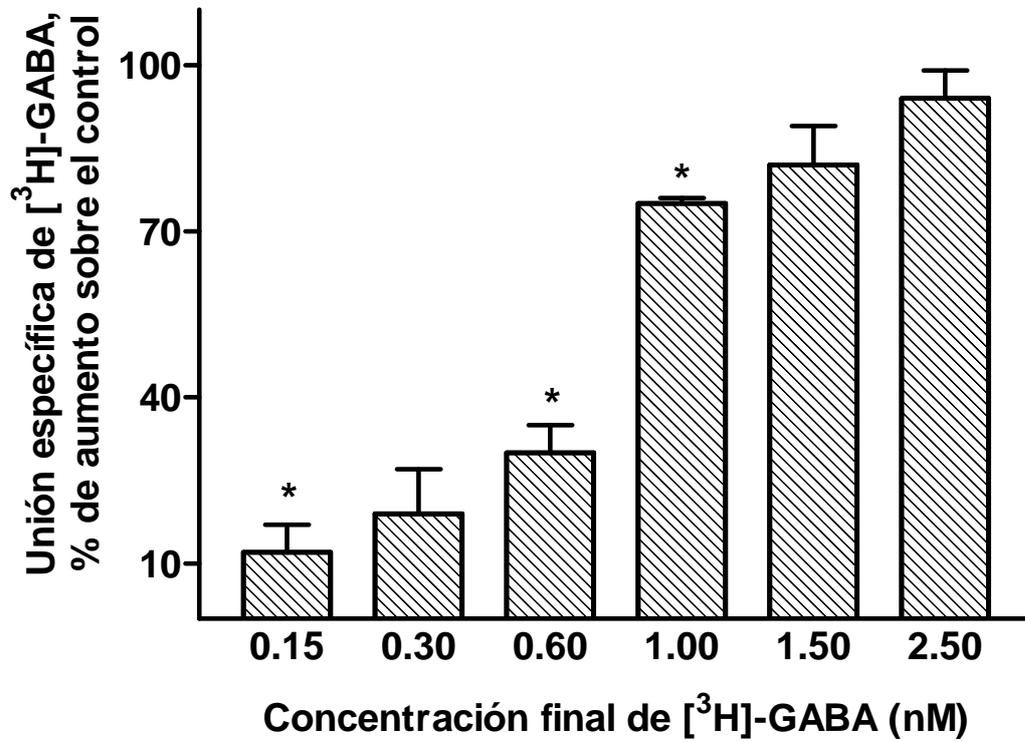


Figura 19: Efecto de concentraciones de [³H]GABA decrecientes en la acción estimuladora de 3 α ,5 α -P (5 μ M). Los experimentos se realizaron en membranas de animales adultos, sometidas a congelación. Los valores representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (*): valores significativamente diferentes, según ANOVA de 1 vía.

3.5 Estudio de relación estructura - actividad para diversos neuroesteroides moduladores del receptor GABA_A

A fin de realizar una descripción más completa del efecto modulador de NE sobre el complejo receptor GABA_A, pues los mismos son sustancias moduladoras menos conocidas que los barbitúricos y algunas de sus propiedades aún se hallan en fase de caracterización, se testeó el efecto de varios NE sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores. Se seleccionaron principalmente los distintos isómeros que se obtienen por reducción de la progesterona, la cual es el precursor de la mayoría de los NE activos en el SNC.

Los cuatro posibles estereoisómeros ensayados -graficados en la Figura 6-, que responden a la fórmula 5-(α/β)-pregnan-3-(α/β)-ol-20-ona difieren entre sí en la configuración del grupo hidroxilo unido al carbono 3 y de un átomo de hidrógeno unido al carbono 5. Los mismos se denominan 3 α ,5 α -P (alopregnanolona según su nombre común, previamente caracterizado), 3 α ,5 β -P (pregnanolona), 3 β ,5 α -P (isopregnanolona) y 3 β ,5 β -P (epipregnanolona)

Para determinar la relación entre estructura y actividad de estos moduladores en el modelo experimental del LO de pollo, se eligieron animales adultos en los cuales se probó el efecto de varias concentraciones de cada esteroide. Se utilizaron además para comparación dos NE conocidos como antagonistas del complejo receptor GABA_A, que no poseen actividad estimuladora sobre la unión de GABA: 5-pregnen-3 β -ol-20-ona sulfato (pregnenolona sulfato, PS) y 5-androsten-3 β -ol-17-ona sulfato (dehidroepiandrosterona sulfato, DHEA-S). Los resultados de los ensayos realizados pueden verse en la Figura 20.

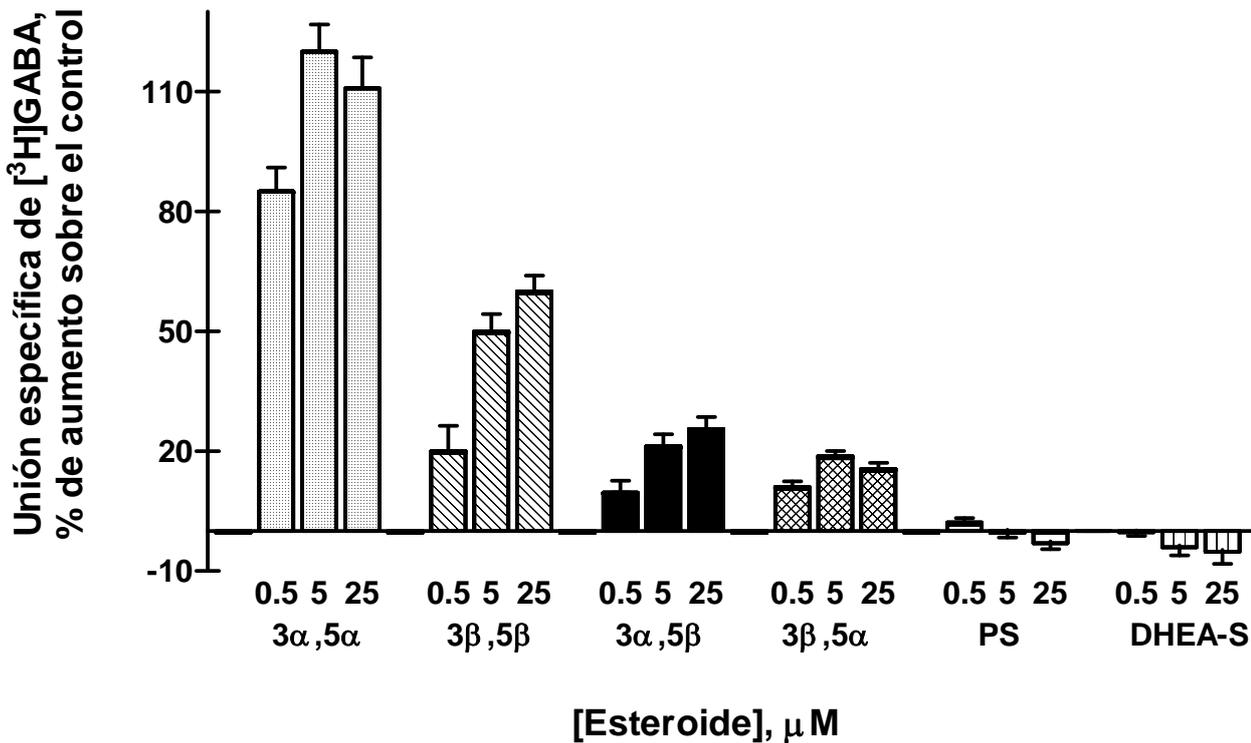


Figura 20: Efecto de distintos NE sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores en membranas sinápticas congeladas del LO de animales adultos. Se ensayaron los distintos metabolitos reducidos de la progesterona (indicados en el texto) y los NE pregnenolona sulfato (PS) y dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S). La concentración final de GABA fue 100 nM. Las barras representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que el NE 3α,5α-P es el modulador positivo más eficaz del complejo receptor, produciendo la mayor estimulación en la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores, resultado coincidente con datos experimentales obtenidos en modelos de mamíferos. También en coincidencia con dichos modelos, el NE 3β,5α-P resultó muy poco eficaz como modulador, produciendo un pequeño aumento en la unión de GABA a sus sitios receptores. En contraste, el NE 3α,5β-P, que en mamíferos produce un aumento importante en la unión de [³H]GABA se comportó en el presente modelo en forma similar a su isómero 3β,5α-P, produciendo sólo una pequeña estimulación del complejo receptor. El resultado más relevante es sin embargo el obtenido con el esteroide 3β,5β-P. Dicho

NE se comporta en mamíferos como un antagonista del sitio modulador de esteroides, es decir, no posee ningún efecto estimulador sobre el receptor. En cambio, en el presente modelo experimental, este esteroide produjo un importante aumento en la unión de [^3H]GABA a sus sitios receptores, aproximadamente el 50% del observado con la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$. Este resultado es el más contrastante con los que se han observado previamente en mamíferos y es por lo tanto el que se estudió en mayor detalle.

Por último, los esteroides sulfatados no produjeron ninguna estimulación en la unión de [^3H]GABA, presentando el mismo comportamiento en aves que el conocido en mamíferos.

3.6 Efecto modulador de la $5\beta\text{-pregnan-}3\beta\text{-ol-}20\text{-ona}$ sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad:

A fin de caracterizar más detalladamente el efecto estimulador previamente observado con el NE $3\beta,5\beta\text{-P}$, se realizaron curvas concentración-efecto para este NE en distintos estadios del desarrollo. Se eligió en todos los casos una preparación de membranas sinápticas congeladas -las cuales presentan ventajas teóricas y operativas para el trabajo experimental- y se evaluó el efecto de este NE sobre la unión de [^3H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad. El estudio sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad fue descartado después de los resultados obtenidos previamente con PB y con el NE $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ que mostraron a dicha población de sitios receptores como insensitiva a la acción de drogas modulatorias.

Los resultados de las curvas concentración-efecto pueden verse en la Figura 21, y los parámetros de las mismas se encuentran resumidos en la Tabla X.

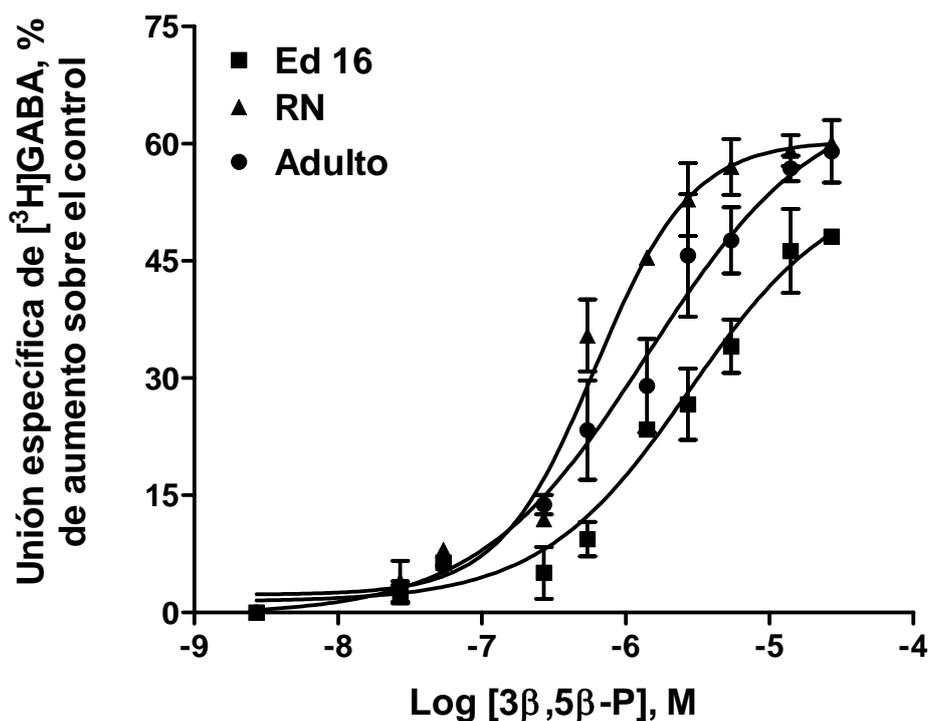


Figura 21: Estimulación de la unión de GABA a sus sitios de baja afinidad por $3\beta,5\beta\text{-P}$ en distintos estadios de desarrollo del LO de pollo. La unión específica de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ se determinó en membranas sinápticas congeladas, utilizándose una concentración final de GABA 100 nM. Los datos representados son el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Tabla X: Efecto concentración-dependiente de $3\beta,5\beta\text{-P}$ sobre la unión específica de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ a sus sitios receptores de baja afinidad a lo largo de la ontogenia.

Estadio	EC_{50} (μM)	E_{max} (%)	Coefficiente de Hill
<i>Ed16</i>	2.80 ± 0.18	55.4 ± 7.3	0.84 ± 0.23
<i>Recién Nacidos</i>	$0.60 \pm 0.08^*$	60.4 ± 2.5	$1.29 \pm 0.16^*$
<i>Adultos</i>	$1.40 \pm 0.12^*$	66.5 ± 5.7	0.80 ± 0.19

Los valores representan los promedios \pm SEM de cuatro experimentos independientes. *: valores significativamente diferentes entre estadios. El análisis global de los datos fue realizado mediante ANOVA de una vía y tests de Tukey-Kramer

Puede observarse que en todos los estadios estudiados el perfil modulador de este esteroide fue caracterizado mediante el ajuste de las curvas concentración-efecto a un modelo sigmoidal simple, con coeficientes de Hill en todos los casos cercanos a la unidad, si bien el plateau superior de las curvas fue apenas alcanzado tanto en el

estadio prenatal estudiado (Ed16) como en animales adultos (lo cuál dificulta la interpretación de los valores obtenidos para dichos coeficientes).

A diferencia de lo observado con el primer NE estudiado ($3\alpha,5\alpha$ -P), que produjo importantes diferencias en la estimulación máxima observada de los sitios receptores GABAérgicos en distintos estadios del desarrollo, el NE $3\beta,5\beta$ -P no originó dichas diferencias, siendo el E_{max} alcanzado similar en todos los estadios del desarrollo. Es interesante remarcar que dicho E_{max} es similar al de la $3\alpha,5\alpha$ -P para el estadio prenatal, mientras que este parámetro se diferencia para ambos NE a partir del estadio de animales recién nacidos (comparar Tablas VII y X).

Por otro lado, la potencia de la $3\beta,5\beta$ -P sí fue significativamente diferente a lo largo de la ontogenia, siendo el estadio de recién nacidos el más sensible al esteroide, resultado que también se había observado en la estimulación producida por $3\alpha,5\alpha$ -P.

3.7 Mecanismo farmacológico de acción de la 5β -pregnan- 3β -ol-20-ona sobre los sitios receptores GABAérgicos.

A fin de completar la caracterización de la acción moduladora del NE $3\beta,5\beta$ -P sobre los sitios receptores GABAérgicos, se realizaron ensayos de desplazamiento en los mismos estadios de desarrollo estudiados. Dichos ensayos se llevaron a cabo solamente sobre la población de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad, en membranas sinápticas congeladas empleando una concentración saturante del NE ($25 \mu\text{M}$). Los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad fueron sustraídos en el ajuste de las curvas a los datos experimentales. Los resultados de los ensayos pueden verse en la Figura 22, y los parámetros calculados se encuentran en la Tabla XI.

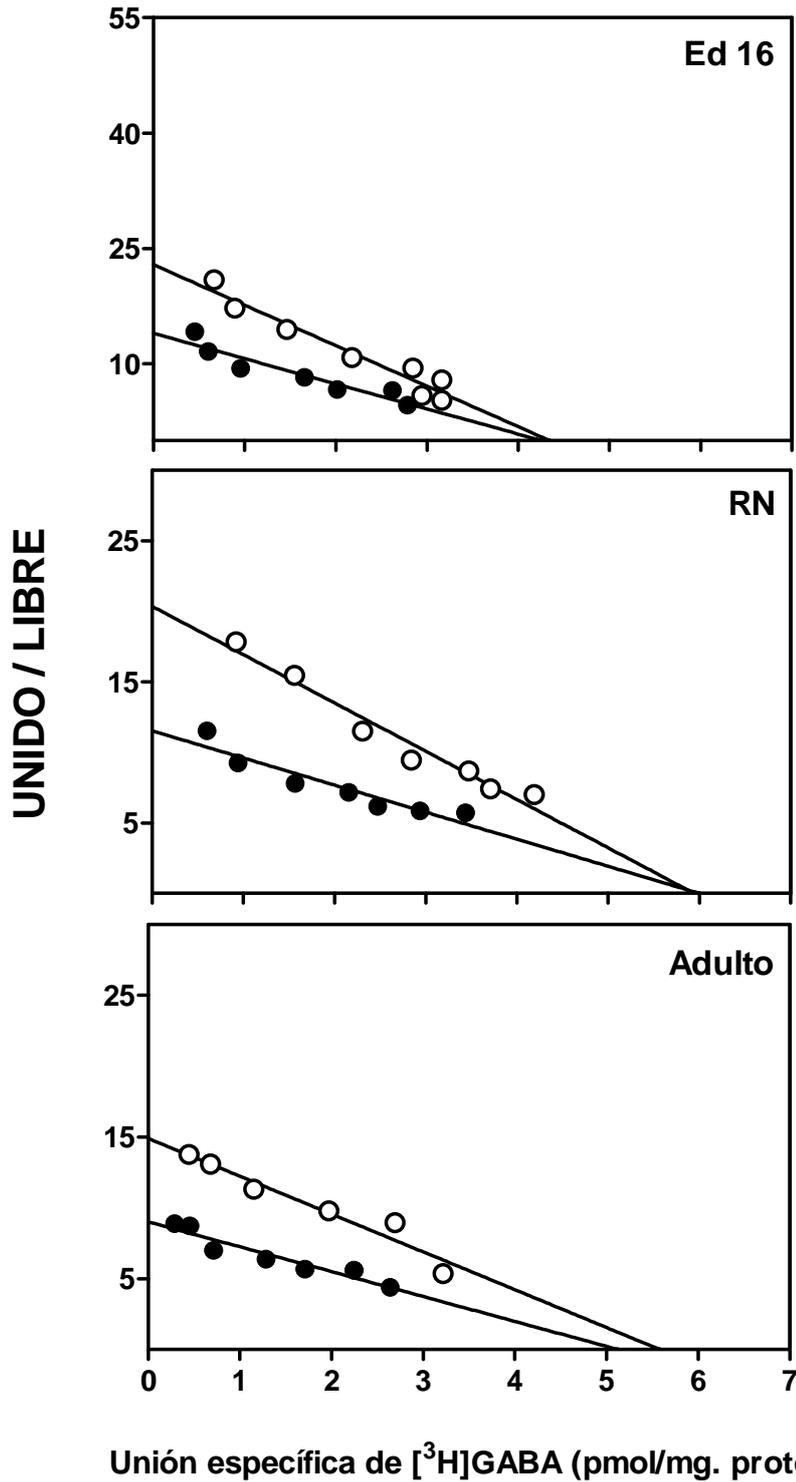


Figura 22: Gráficos de Scatchard representativos de la unión específica de [³H]GABA a sus sitios receptores en membranas sinápticas congeladas (los sitios de alta afinidad han sido descontados). Las membranas fueron incubadas con concentraciones finales de GABA variando entre 10 y 600 nM. Círculos negros: unión control; círculos blancos: unión estimulada por 3β,5β-P 25 μM

Tabla XI: Resultados del análisis por regresión no lineal de la unión específica de [³H]GABA a membranas sinápticas congeladas en ausencia y presencia de 3β,5β-P

Kd (nM)	Ed16	Rec. Nac.	Adulto
Control	267.6 ± 8.7	686.5 ± 18 ^b	529.2 ± 12 ^b
3β,5β-P	176.4 ± 13 ^a	382.0 ± 19 ^a	342.4 ± 31 ^a
Bmax (pmol/mg prot)	Ed16	Rec. Nac.	Adulto
Control	5.04 ± 0.90	7.03 ± 0.65 ^b	6.14 ± 0.16 ^b
3β,5β-P	4.52 ± 0.39	6.15 ± 0.56	5.28 ± 0.29

Los valores representan el promedio ± SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis para cada parámetro fue realizado por ANOVA de 1 vía y tests de Tukey-Kramer. ^a valores significativamente diferentes entre el control y 3β,5β-P; ^b valores control significativamente diferentes entre estadios.

Los resultados obtenidos muestran que el comportamiento modulador de este NE es similar al del NE 3α,5α-P ya ensayado, lo cual era esperable si ambos isómeros actuasen, como es de suponer, sobre un sitio modulador común que une NE. La 3β,5β-P produjo en todos los estadios de desarrollo estudiados un aumento en la afinidad de los sitios receptores GABAérgicos por el radioligando, sin afectar la máxima capacidad de unión de dichos sitios, comportamiento propio de una modulación alostérica positiva de los sitios receptores. En los estadios de recién nacidos y adultos, el incremento de afinidad producido fue menor con la 3β,5β-P que con la 3α,5α-P, mientras que en el estadio prenatal se obtuvieron resultados similares con ambos NE (comparar Tablas IX y XI), resultados que concuerdan con lo obtenido previamente en las curvas concentración-efecto.

Si se comparan globalmente los resultados de potenciación producidos con ambos NE estudiados, se concluye que dichos ligandos se comportan como agonistas del sitio modulador de NE, pudiendo en principio postularse a la 3α,5α-P como un agonista total de dicho sitio (produce la máxima respuesta entre los NE estudiados) y a la 3β,5β-P como un agonista parcial.

3.8. Desplazamiento del efecto estimulador de la 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona por la 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona.

Si, como fue postulado, los dos NE estudiados son agonistas de un sitio modulador común, es esperable que compitan en su efecto estimulador sobre los sitios receptores GABAérgicos. A fin de comprobar dicho comportamiento, se realizaron ensayos de competición del efecto producido por una concentración fija de 3 α ,5 α -P agregando concentraciones crecientes de 3 β ,5 β -P. Estos ensayos se efectuaron en dos estadios de desarrollo distintos: un estadio prenatal, en el cual ambos NE presentan un comportamiento modulador similar, y el estadio de animales adultos, en el cual la 3 α ,5 α -P es un claro agonista total y su isómero doble β un agonista parcial. Se emplearon membranas sinápticas congeladas y una concentración final de GABA que saturó los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad, a fin de descontarlos previamente al ajuste de las curvas.

Los resultados del ensayo de competición pueden verse en la Figura 23, la cual muestra como en el estadio prenatal el efecto estimulador de una concentración fija, saturante, de 3 α ,5 α -P va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de su isómero doble β , hasta alcanzarse el efecto máximo de este segundo NE. La IC₅₀ para la 3 β ,5 β -P en este estadio fue $1.32 \pm 0.36 \mu\text{M}$, valor que está en el orden de su EC₅₀.

En adultos la IC₅₀ para la 3 β ,5 β -P fue $2.42 \pm 0.37 \mu\text{M}$, observándose que, a diferencia del estadio prenatal, el efecto de disminución producido no alcanzó el E_{max} de la 3 β ,5 β -P, aún a la máxima concentración ensayada de este esteroide. Dicho efecto “residual” de la 3 α ,5 α -P no fue inespecífico, pues un antagonista bien caracterizado del receptor GABA_A, el NE pregnenolona sulfato (PS) lo desplazó completamente -con una IC₅₀ $8.45 \pm 0.23 \mu\text{M}$ -. Por lo tanto, la falta de un desplazamiento completo de la 3 β ,5 β -P sobre la 3 α ,5 α -P en animales adultos sugiere que probablemente los dos esteroides en este estadio del desarrollo ya no actúan en un único sitio modulador.

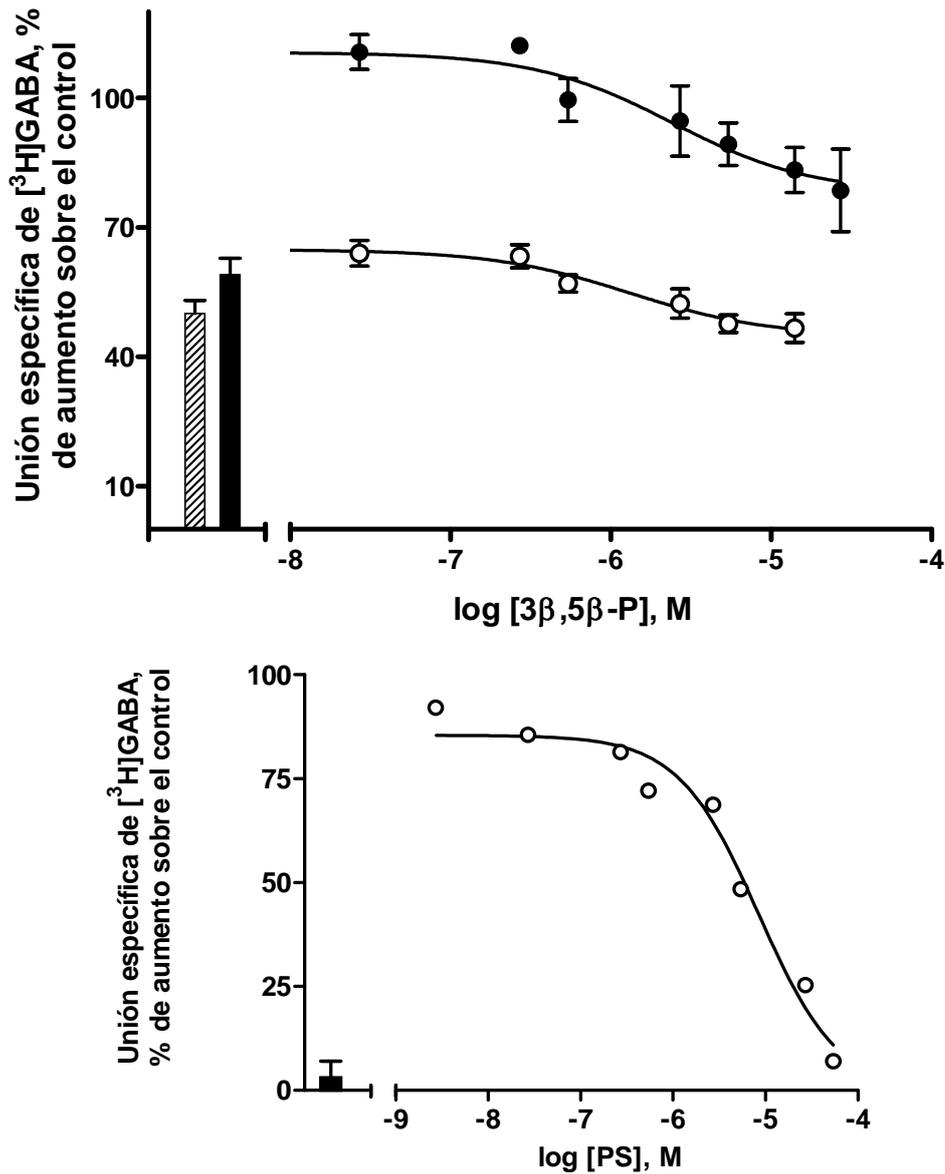


Figura 23 *Gráfico superior:* desplazamiento del máximo aumento en la unión de [³H]GABA producido por la 3α,5α-P (5μM) mediante concentraciones crecientes de 3β,5β-P. Datos obtenidos en membranas sinápticas congeladas de animales adultos (círculos negros) o Ed16 (círculos blancos). Las barras representan el E_{max} en la unión de [³H]GABA producido por 3β,5β-P. Ed16: barra rayada; adultos: barra negra. Todos los datos (promedios ± SEM) provienen de cuatro experimentos independientes.

Gráfico inferior: desplazamiento del máximo aumento en la unión de [³H]GABA producido por la 3α,5α-P (5 μM) mediante concentraciones crecientes de PS. La barra negra representa el efecto de PS 5 μM. Datos obtenidos en membranas sinápticas congeladas de animales adultos, provenientes de tres experimentos con menos de 10% de variación entre ellos.

En ambos ensayos la concentración final de GABA fue 100 nM.

3.9 Análisis de Schild de la competición entre 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona y 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona.

A fin de profundizar el estudio de la competición entre ambos NE en animales adultos se realizó un análisis de Schild (Arunlakshana y Schild, 1949), consistente en desarrollar curvas concentración-efecto para 3 α ,5 α -P en presencia de concentraciones crecientes de 3 β ,5 β -P. Se determinó -como se indica en la metodología- el cociente entre la EC₅₀ obtenida en cada caso y la EC₅₀ de 3 α ,5 α -P actuando sola (parámetro dr), y el mismo se graficó versus la concentración de 3 β ,5 β -P utilizada. Los resultados pueden observarse en la Figura 24, cuyos datos así como los parámetros resultantes del análisis se encuentran resumidos en la Tabla XII.

La Ki obtenida para la 3 β ,5 β -P (constante de afinidad aparente para este NE) coincidió dentro del orden de magnitud con la EC₅₀ para el mismo esteroide, y la pendiente de la recta de regresión obtenida fue significativamente menor a la unidad. Este último resultado indica que un simple mecanismo competitivo entre ambos NE en el estadio adulto no representa la situación real, siendo la misma más compleja.

Tabla XII: Análisis de Schild del desplazamiento producido por la 3 β ,5 β -P sobre las curvas concentración-efecto para 3 α ,5 α -P.

[3 β ,5 β -P] (μ M)	EC ₅₀ de 3 α ,5 α -P (10 ⁻⁷ M)	dr _x
0	2.06 \pm 0.08	----
0.025	2.84 \pm 0.12	1.38
0.25	3.56 \pm 0.39	1.73
2.5	6.68 \pm 0.60	3.24
25	11.9 \pm 0.59	5.78

El valor de Ki (obtenido del punto de intersección de la recta de regresión con el eje horizontal) es 0.42 \pm 0.047 μ M. La pendiente de la recta es 0.38 \pm 0.03 (significativamente menor a uno). Los resultados corresponden al análisis de los datos representados en la Figura 24.

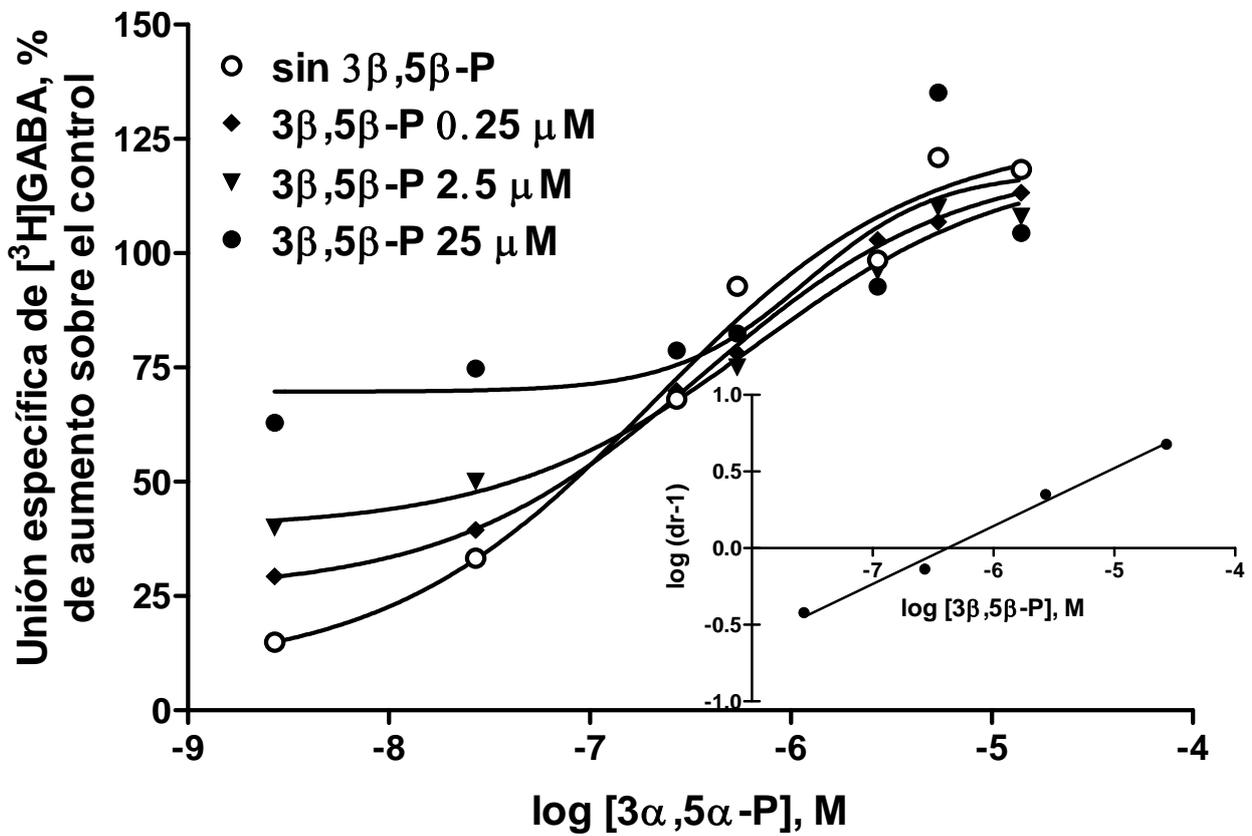


Figura 24: Desplazamiento del incremento producido por la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ aplicando concentraciones crecientes de $3\beta,5\beta\text{-P}$. Las concentraciones de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ variaron de 2.5 nM a $15 \mu\text{M}$ y la concentración final de GABA fue 100 nM . El ensayo fue realizado en membranas sinápticas congeladas del estadio adulto y se representa el promedio de tres experimentos. Los valores variaron menos de un 10% y las barras de error fueron omitidas para mayor claridad. *Gráfico interior:* representación de Schild del cociente de EC_{50} (dr) versus la concentración de $3\beta,5\beta\text{-P}$.

4. Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos y neuroesteroides aplicados conjuntamente.

4.1 Presencia de efectos aditivos entre barbitúricos y neuroesteroides aplicados conjuntamente.

En las secciones precedentes quedó demostrado el efecto estimulador que poseen los barbitúricos y NE sobre los sitios receptores GABAérgicos durante la ontogenia del LO de pollo. Ambos tipos de compuestos se comportan como moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A afectando solamente a los sitios receptores de baja afinidad. Asimismo, los dos moduladores empleados presentan heterogeneidad en sus propios sitios de reconocimiento, que queda manifestada para el PB por curvas concentración-efecto de doble plateau y en los NE por una interacción entre distintos isómeros que no es explicable mediante una simple competición por un único sitio de unión.

Dado que el comportamiento modulador de ambas sustancias sobre el complejo receptor GABA_A es muy similar, y considerando estudios previos (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987) que postulaban un posible mecanismo o sitio común de acción, se verificó la estimulación obtenida al aplicar conjuntamente ambas sustancias a la preparación de membranas sinápticas del LO de pollo. Se estudió la modulación solamente sobre los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad en membranas sinápticas frescas y congeladas preparadas en distintos estadios del desarrollo.

La primera aproximación metodológica consistió en ensayar el efecto estimulador de una concentración fija y saturante del barbitúrico PB aplicada conjuntamente con un rango creciente de concentraciones del NE 3 α ,5 α -P. Los resultados pueden verse en la Figura 25 y los datos correspondientes a dicha figura se encuentran en la Tabla XIII.

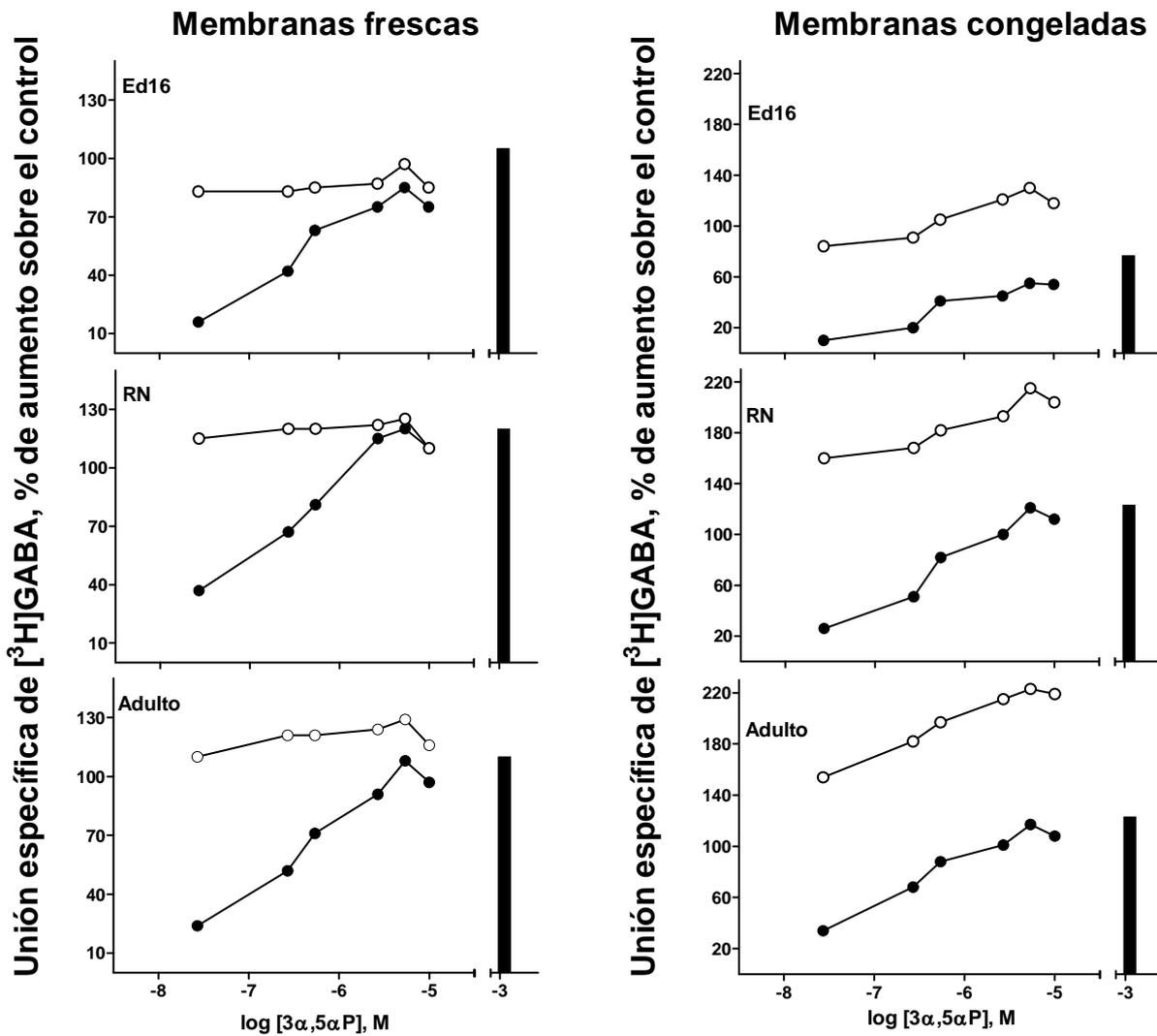


Figura 25: Estimulación de la unión de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ a sus sitios de baja afinidad por PB (1.25 mM) aplicado conjuntamente con un rango de concentraciones de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ variando de 25 nM a 25 μM . La concentración final de GABA fue 100 nM. Círculos negros: efecto de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ sin PB; círculos blancos: efecto de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ en presencia de PB; la barra negra representa el efecto estimulador obtenido con la concentración única de PB empleada. Los datos representados son el promedio de cuatro experimentos independientes, con menos de 10% de variación entre ellos.

Tabla XIII: Efecto de pentobarbital y 5 α -pregnan-3 α -ol-20-ona sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores a lo largo de la ontogenia del lóbulo óptico de pollo.

Estadio	EC ₅₀ (10 ⁻⁷ M)		E _{max} (% de aumento)		coeficiente de Hill	
	sin PB	+ PB	sin PB	+ PB	sin PB	+ PB
<i>Ed16</i>						
membranas frescas	7.9±1.2	6.7±0.3	68.1±10.4	78.1±7.1	1.14±0.08	n. d.
membranas congeladas	3.9±1.9	4.1±0.4	65.5± 8.6	120.3±9.6*	1.36±0.25	1.70±0.18
<i>Recién Nacidos</i>						
membranas frescas	1.4±0.3	1.7±0.3	117.5±18.2	119.4± 5.8	1.02±0.18	n. d.
membranas congeladas	4.2±0.5	5.3±1.5	113.2±12.0	212.4±11.1*	1.05±0.09	1.70±0.12*
<i>Adultos</i>						
membranas frescas	3.2±0.6	2.9±0.6	105.9± 8.1	122.8± 9.0	1.21±0.09	n. d.
membranas congeladas	2.9±0.3	3.9±1.6	111.7±11.0	222.0±14.0*	1.00±0.19	1.53±0.04*

Los resultados representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Se realizó un análisis por separado para cada estadio, comparando EC₅₀, E_{max} y el coeficiente de Hill en ausencia y presencia de PB mediante test de Student-Neuman-Keuls, *: valores significativamente diferentes en ausencia y presencia de PB -para cada estadio-. El coeficiente de Hill no fue calculado en presencia de PB en membranas frescas (n. d.) debido a la deformación de las curvas obtenidas -los puntos casi no varían del E_{max} de PB-, que impedían una interpretación del mismo.

Los resultados observados indican una notoria diferencia en el efecto obtenido para cada tipo de preparación de membranas sinápticas. En la preparación de membranas sinápticas congeladas hay un claro efecto aditivo de ambos compuestos, obteniéndose una curva concentración-efecto para el NE en presencia de PB con un E_{max} mucho mayor que el de la 3 α ,5 α -P actuando por si sola. Por otro lado, la afinidad del receptor por el esteroide no se modifica en presencia del barbitúrico, indicado por la falta de variación significativa en el EC₅₀ para el NE. Este resultado se repitió en los tres estadios de desarrollo analizados.

Por el contrario, en la preparación de membranas sinápticas que no fueron sometidas a congelación dicho efecto aditivo está ausente, obteniéndose un efecto máximo en presencia de ambas drogas que no se diferencia significativamente del E_{\max} del barbitúrico actuando aisladamente. De hecho, en todo momento el efecto obtenido para la $3\alpha,5\alpha$ -P en presencia de PB es similar al producido por el PB actuando solo, indicando una saturación de la respuesta medible. Nuevamente, este perfil fue constante en los diferentes estadios de desarrollo en los cuales se realizó el ensayo.

Dado que el efecto observado presenta una diferencia tan marcada entre ambos tipos de preparaciones de membranas sinápticas, se hace necesario descartar factores de técnica que pudieran ser su causa. Un posible elemento de sesgo en el análisis precedente podría depender del uso de concentraciones saturantes para el PB, las cuales pueden producir una “desensibilización” bioquímica del receptor, dando una diferencia entre unión específica y unión inespecífica del radioligando que no se ve significativamente incrementada por el NE. Si bien este posible impedimento no estuvo presente en las membranas congeladas, fue necesario descartar esta “desensibilización” en membranas frescas como la causante de la ausencia de aditividad. A tal fin se realizó un ensayo similar al anterior, en el cual se aplicó una baja concentración de PB, capaz de producir *per se* solamente un efecto estimulatorio muy pequeño. Dado que el ensayo se realizó nuevamente en distintos estadios del desarrollo, se eligieron concentraciones de PB apropiadas para cada estadio según los perfiles concentración-dependientes ya conocidos (Figura 12), las cuales fueron aplicadas nuevamente con un rango creciente de concentraciones del NE $3\alpha,5\alpha$ -P. Los resultados de este ensayo pueden verse en la Figura 26.

En dicha Figura se observa un claro desplazamiento de las curvas concentración-efecto del NE $3\alpha,5\alpha$ -P en presencia del PB aplicado en membranas sinápticas congeladas, mientras que dicho desplazamiento está ausente nuevamente en la preparación de membranas frescas.

Esta segunda serie de resultados demostró que la aditividad observada en las membranas sinápticas congeladas y ausente en las membranas frescas no se debía a diferencias causadas por la concentración saturante de PB utilizada, ya que dicha aditividad también se presenta en membranas sinápticas congeladas empleando

menores concentraciones del barbitúrico a la vez que está siempre ausente en las membranas que no fueron sometidas a congelación.

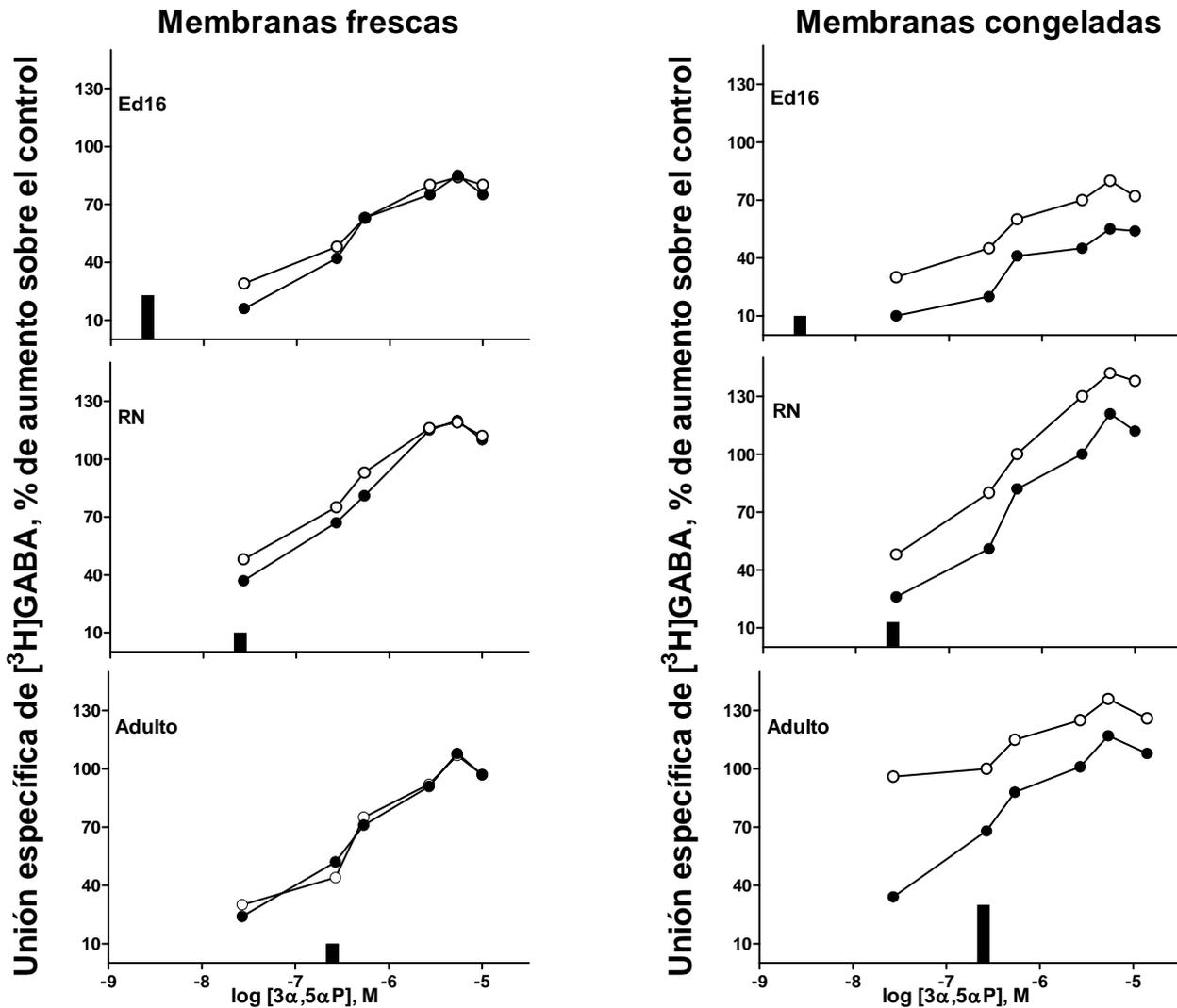


Figura 26: Estimulación de la unión de [^3H]GABA a sus sitios de baja afinidad por bajas concentraciones de PB aplicado conjuntamente con un rango de concentraciones de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ variando de 25 nM a 25 μM . La concentración final de GABA fue 100 nM. Círculos negros: efecto de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ sin PB; círculos blancos: efecto de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ en presencia de PB; las barras negras representan el efecto estimulador obtenido con la concentración única de PB empleada (que varió según el estadio de desarrollo analizado). Los datos representados son el promedio de cuatro experimentos independientes con menos de 10% de variación entre ellos.

Conjuntamente, los resultados de las Figuras 25 y 26 demuestran que durante la ontogenia ambos moduladores presentan efectos aditivos solamente en la preparación de membranas sinápticas congeladas, mientras que poseen un efecto estimulador único en membranas sinápticas frescas.

4.2 Desplazamiento diferencial de barbitúricos y neuroesteroides en distintas preparaciones de membranas sinápticas.

Con el objeto de completar la demostración de sitios comunes o diferentes de acción para barbitúricos y NE en distintas preparaciones de membranas sinápticas, se realizó una aproximación metodológica distinta a la de la sección precedente, estudiándose el efecto de drogas que pudieran desplazar a uno de los moduladores de sus sitios de reconocimiento. A tal fin se utilizó picrotoxina (PTX), que presenta un efecto de desplazamiento competitivo-mixto sobre los sitios de reconocimiento de barbitúricos, sin que se haya descrito hasta el presente una competición similar contra los NE. Por otro lado, dicha droga no posee efecto directo sobre la unión de [³H]GABA (ya observado en la Figura 14), excepto una pequeña disminución producida a altas concentraciones. Este hecho permitió analizar el desplazamiento que la PTX podía producir sobre el efecto estimulador de PB y 3 α ,5 α -P, descartando a la vez que una disminución en la estimulación observada se debiera a una caída en la unión basal de [³H]GABA causada por la propia PTX.

Los resultados de dichos ensayos fueron llevados a cabo en membranas sinápticas frescas y congeladas obtenidas en el estadio adulto y pueden verse en la Figura 27. En todos los casos se utilizaron concentraciones fijas de PB y 3 α ,5 α -P que producen *per se* un máximo efecto estimulador.

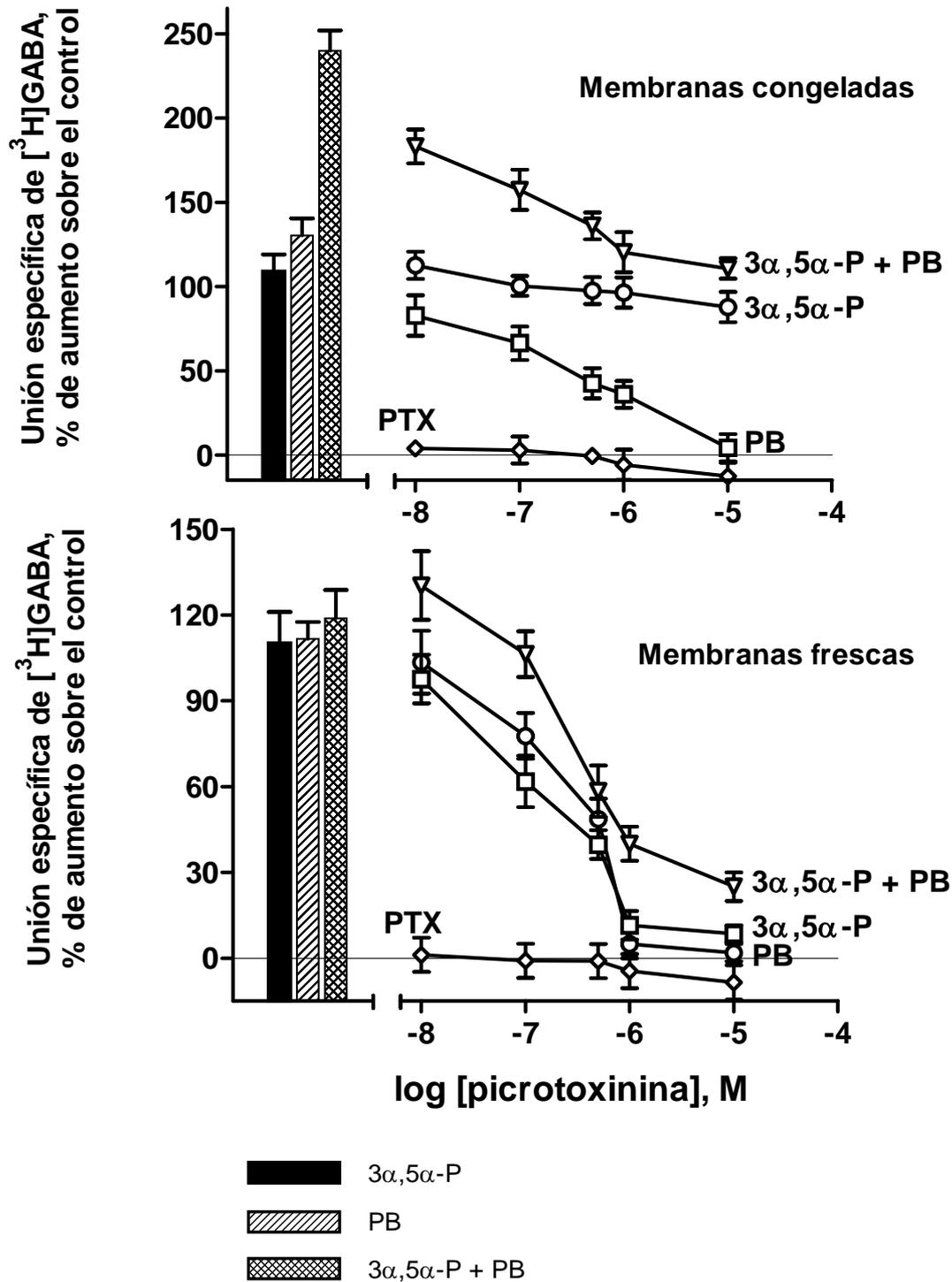


Figura 27: Desplazamiento producido por PTX del efecto estimulador que producen PB y 3 α ,5 α -P sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores en membranas sinápticas del LO de pollos adultos. Las concentraciones finales utilizadas fueron: 3 α ,5 α -P: 5 μ M, PB: 1.25 mM, GABA: 100 nM. Los resultados representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que la PTX por si sola no produjo una disminución significativa en la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad -como era esperado-. Por otro lado, en membranas sinápticas congeladas dicha droga causó un significativo descenso en el efecto estimulador de la unión de [³H]GABA producido por el PB, sin producir un descenso equivalente sobre el efecto estimulador de la 3 α ,5 α -P. Al aplicarse el barbitúrico y el esteroide en forma conjunta, la PTX también disminuyó la potenciación producida sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores. Esta disminución fue debida al desplazamiento del barbitúrico por la PTX, alcanzándose finalmente un valor de estimulación en presencia de ambos moduladores similar al presentado por el NE solo, no desplazado por el convulsivante.

En contraste, en membranas sinápticas frescas la PTX disminuyó tanto el efecto estimulador producido por el barbitúrico como el obtenido con el NE, provocando asimismo una caída en la potenciación producida por ambos moduladores aplicados conjuntamente. El desplazamiento por PTX del efecto del esteroide en membranas sinápticas frescas es la diferencia más relevante que contrasta con lo observado en las membranas congeladas.

Estas disminuciones en ningún caso fueron producidas por una caída en la unión basal de [³H]GABA y son por lo tanto resultantes de un desplazamiento de efecto que la PTX produce sobre los moduladores aplicados.

5. Posibles factores endógenos que afectan la modulación de los sitios receptores GABAérgicos.

5.1 Sobrenadantes obtenidos en la preparación de membranas sinápticas congeladas.

En la sección precedente quedó demostrado un efecto común de barbitúricos y NE actuando en membranas sinápticas frescas, mientras que dichos efectos podían diferenciarse y sumarse en las preparaciones de membranas sinápticas congeladas.

La diferencia entre ambas preparaciones de membranas está dada por los dos pasos de congelación-descongelación y lavado a los que se somete a las membranas frescas antes de su empleo como membranas congeladas. Dichos pasos permiten obtener sobrenadantes de lavado (SN) posteriores a la congelación del tejido sedimentado (SNp, primer paso de congelación) y a la congelación del tejido en suspensión (SNs, segundo paso de congelación), según fuera detallado en la metodología.

Dado que la remoción de componentes en esos sobrenadantes de lavado (SNp y SNs) representa una de las principales diferencias entre las membranas sinápticas frescas y congeladas -además de posibles alteraciones estructurales debidas a la congelación y descongelación-, dichos SN concentrados y cromatografiados en tamiz molecular fueron utilizados a fin de verificar el efecto de los mismos sobre la unión de [³H]GABA y su modulación, al ser aplicados a las membranas sinápticas congeladas (realizándose una “restitución” parcial de los componentes que se habían removido con la congelación). Los SN fueron preparados a partir de membranas sinápticas de aproximadamente 400 animales adultos -elegidos por el mayor rendimiento de tejido obtenido- y probados en todos los casos sobre membranas congeladas del mismo estadio de desarrollo.

La Figura 28 muestra cromatogramas característicos para SNp y SNs, siendo el primero el que posee mayor concentración de proteínas, según lo indicado por la absorbancia UV y confirmado posteriormente en el dosaje proteico de las fracciones recolectadas.

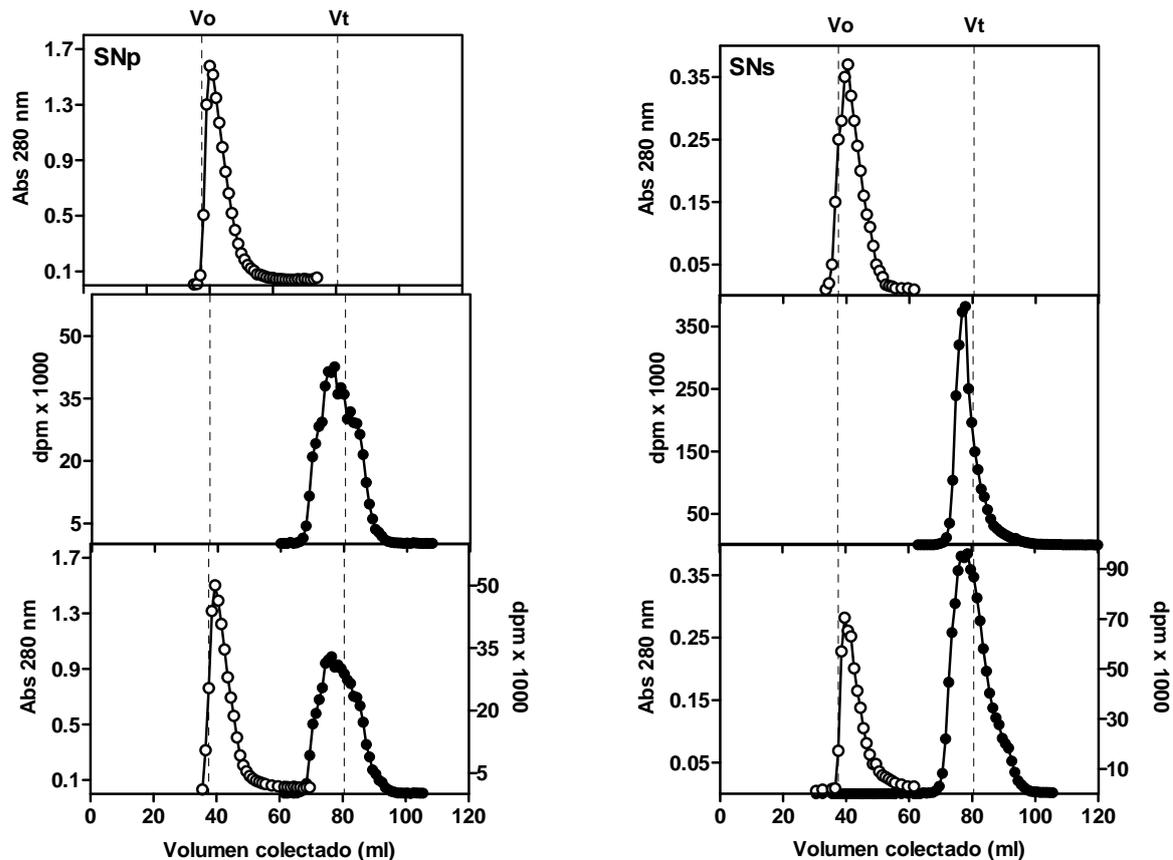


Figura 28: Perfiles de elución cromatográficos para SNp (izquierda) y SNs (derecha). *Gráfico superior:* SN; *gráfico intermedio:* [^3H]GABA; *gráfico inferior:* SN + [^3H]GABA. Las muestras fueron cromatografiadas a través de Sephadex G25m en las condiciones indicadas en la metodología. Las distintas escalas de dpm para [^3H]GABA se deben a distintas actividades totales sembradas en cada caso. Los dosajes proteicos antes y después de las cromatografías de los SN indicaron una recuperación de aproximadamente 50 % de la masa proteica total sembrada. Vo: volumen de exclusión de la columna; Vt: volumen total de la columna.

Simultáneamente puede verse en la misma Figura el perfil de elución del propio [^3H]GABA, que eluye en el volumen total de la columna. Ambos SN fueron además preincubados con [^3H]GABA por 20 minutos y la preparación [^3H]GABA+SN fue sembrada en las columnas de Sephadex, a fin de determinar si dichos SN captaban el radioligando (captación detectable por una deformación o corrimiento del perfil de elución de [^3H]GABA comparado con el perfil del radioligando puro). Se puede observar en la Figura 28 que ninguno de los dos SN

unió [³H]GABA pues el radioligando en presencia de los SN eluyó en la misma posición en que lo había hecho al ser cromatografiado solo, y sin deformaciones apreciables de su perfil de elución. Otros ensayos realizados incubando los SN con [³H]GABA y separándolos por filtración dieron resultados similares (no quedó radioactividad retenida en los filtros, que retenían la fracción proteica de los SN).

En todos los casos se comprobó que la fracción proteica de los SN se separaba del [³H]GABA en las cromatografías (presumiblemente por lo tanto del GABA endógeno) y no unía al neurotransmisor.

5.2 Efecto de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores.

Con el objeto de caracterizar el efecto de los SN preparados por cromatografía sobre la modulación de los sitios receptores GABAérgicos, se ensayó en primer lugar el efecto de los mismos sobre la propia unión de [³H]GABA. A tal fin, alícuotas de la fracción proteica de los SN obtenidos fueron aplicadas a preparaciones de membranas sinápticas congeladas provenientes de animales adultos, en las cuales se midió la unión control del radioligando en ausencia de drogas modulatorias.

La Figura 29 muestra el efecto de ambos tipos de SN sobre la unión específica de [³H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad. Puede verse que tanto la fracción proteica del SNp como del SNs produjeron un incremento en la unión del radioligando a sus sitios receptores en forma concentración-dependiente. Si bien se observó un pequeño incremento en la unión inespecífica de [³H]GABA, el aumento en la unión específica fue mucho mayor, indicando que el efecto producido por los SN no fue debido a una captación inespecífica del radioligando (al cual por otro lado, no unen por si solos). El máximo aumento en la unión basal de [³H]GABA a sus sitios receptores, alcanzado aplicando la mayor concentración proteica de SN obtenida, fue de un 30 % producido con 70 µg/ml de SNs y de un 40 % con 90 µg/ml de SNp.

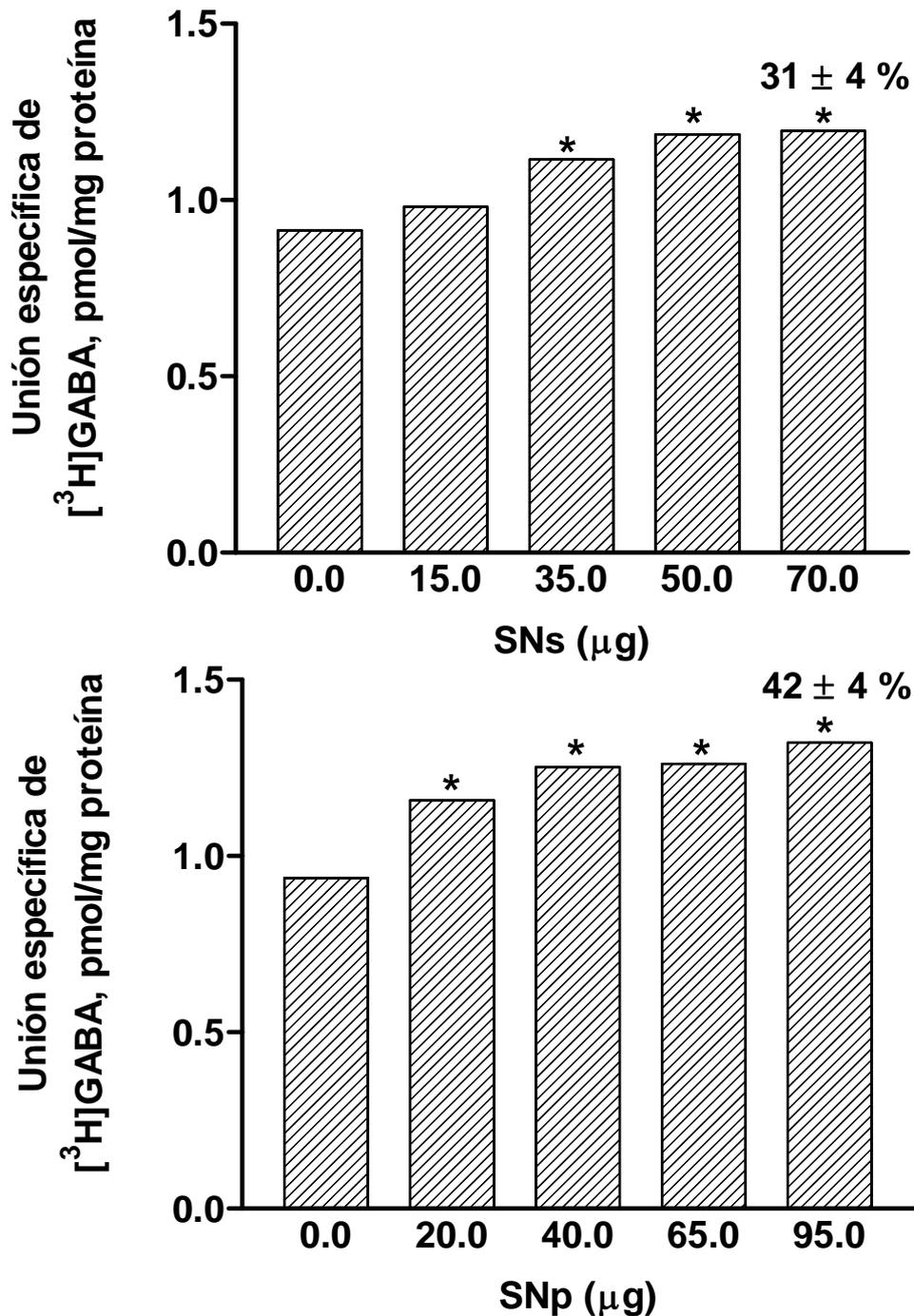


Figura 29: Incremento de la unión específica de [³H]GABA (100 nM) a sus sitios receptores de baja afinidad en presencia de concentraciones crecientes de SNp o SNs. (ensayo en membranas congeladas provenientes de animales adultos). Se indican las masas proteicas totales agregadas de cada SN, calculadas para un volumen final de reacción de 1 ml. Los resultados graficados representan el promedio de tres experimentos independientes con menos de 10% de variación entre ellos. Los porcentajes indican el máximo incremento obtenido para la unión de [³H]GABA. (*): Valores significativamente diferentes del control, según ANOVA de una vía y test de Dunnet.

5.3 Efecto de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas sobre la modulación de la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores.

A fin de verificar el efecto de las fracciones proteicas de los SN obtenidos sobre la modulación de la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores, dichas fracciones fueron aplicadas a membranas congeladas provenientes de animales adultos en las que se midió la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores de baja afinidad estimulada por PB, 3 α ,5 α -P o ambos moduladores aplicados conjuntamente.

Los resultados de dichos ensayos se encuentran representados en la Figura 30. En todos los casos, el cálculo de porcentaje de estimulación en presencia de una determinada concentración de SN se realizó contra la unión control de [³H]GABA en presencia de la misma concentración de SN.

Los resultados observados mostraron que los SN disminuyeron el efecto estimulador del barbitúrico, del NE y de ambos moduladores actuando conjuntamente en la preparación de membranas sinápticas congeladas, en forma concentración-dependiente. En todos los casos, el efecto estimulador de ambos moduladores aplicados conjuntamente en presencia de un SN fue menor a la suma de sus efectos por separado, indicando por lo tanto una reducción en la aditividad que se había observado en membranas sinápticas congeladas.

Estas disminuciones observadas no se corresponden en porcentaje con el aumento en la unión basal de [³H]GABA observado en la Figura 29, sino que son mucho mayores, indicando que los SN interfirieron directamente con el mecanismo modulador de las drogas ensayadas.

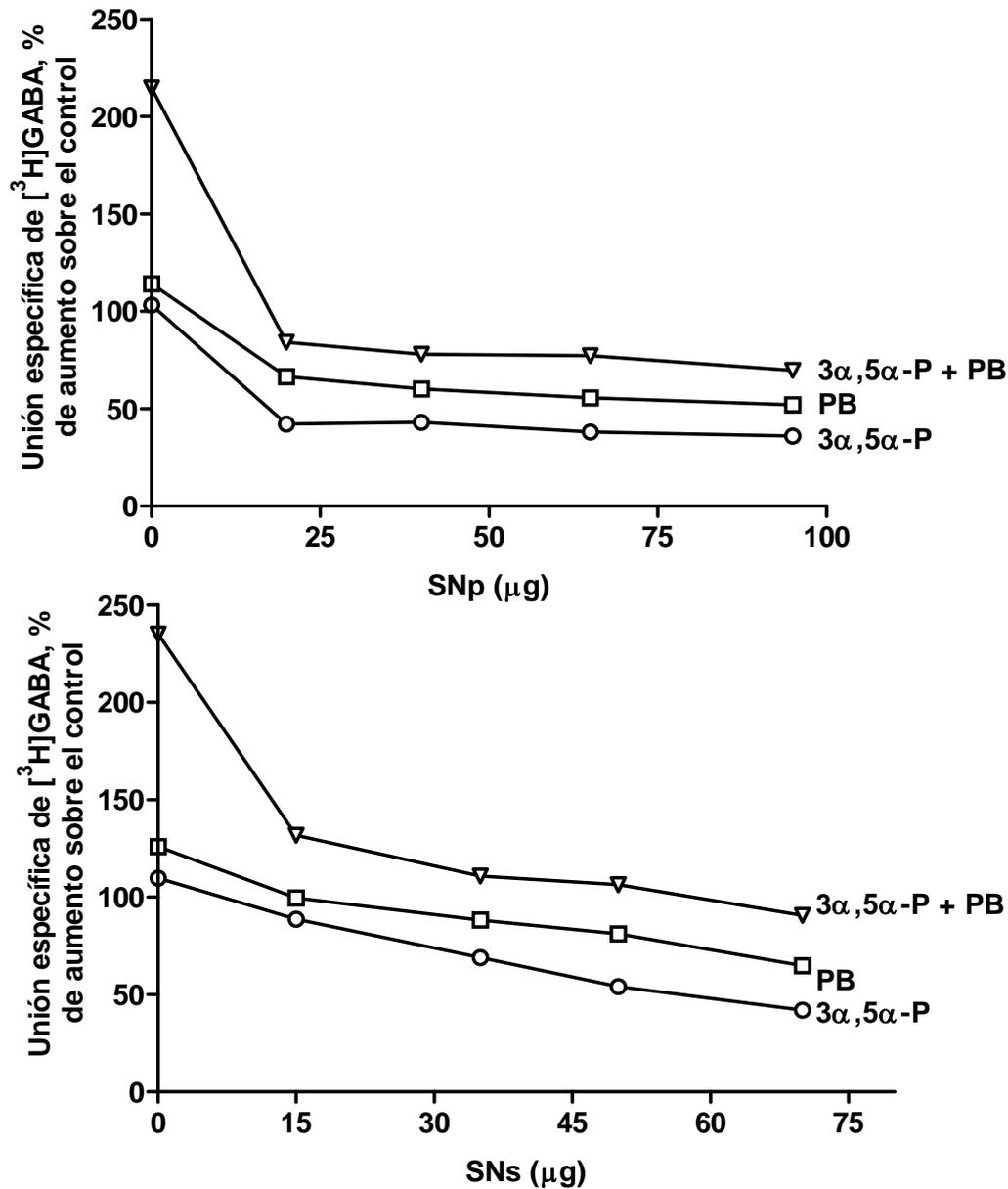


Figura 30: Disminución del efecto estimulador de PB, 3α,5α-P, o (PB + 3α,5α-P) en presencia de concentraciones crecientes de SNp o SNs (ensayo en membranas congeladas provenientes de animales adultos). Se indican las masas proteicas totales agregadas de cada SN, calculadas para un volumen final de reacción de 1 ml. La concentración final de [³H]GABA utilizada fue 100 nM. Los resultados graficados representan el promedio de tres experimentos independientes con menos de 10% de variación entre ellos. En todos los casos, el efecto estimulador en presencia de SN obtenido al aplicar conjuntamente PB + 3α,5α-P fue menor que la suma de los efectos de cada modulador por separado.

Si bien ambos SN ensayados produjeron una disminución similar del efecto estimulador de barbitúricos y NE sobre los sitios receptores GABAérgicos, se verificó la posibilidad de que las dos preparaciones de SN pudieran presentar componentes distintos que afectaran separadamente la modulación, produciendo al combinarse un efecto diferente al ya observado. Para ello se ensayaron similares concentraciones proteicas de ambos SN, aplicadas en forma separada y conjunta a las membranas sinápticas congeladas. Los resultados de dicho ensayo se representan en la Figura 31 y muestran que el perfil de disminución producido sobre el efecto estimulador del PB o la $3\alpha,5\alpha$ -P no varió significativamente al ser aplicados los SNp y SNs conjuntamente o por separado.

Este resultado sugiere una acción similar de los factores de naturaleza proteica encontrados en ambos SN, difiriendo los mismos sólo en su concentración.

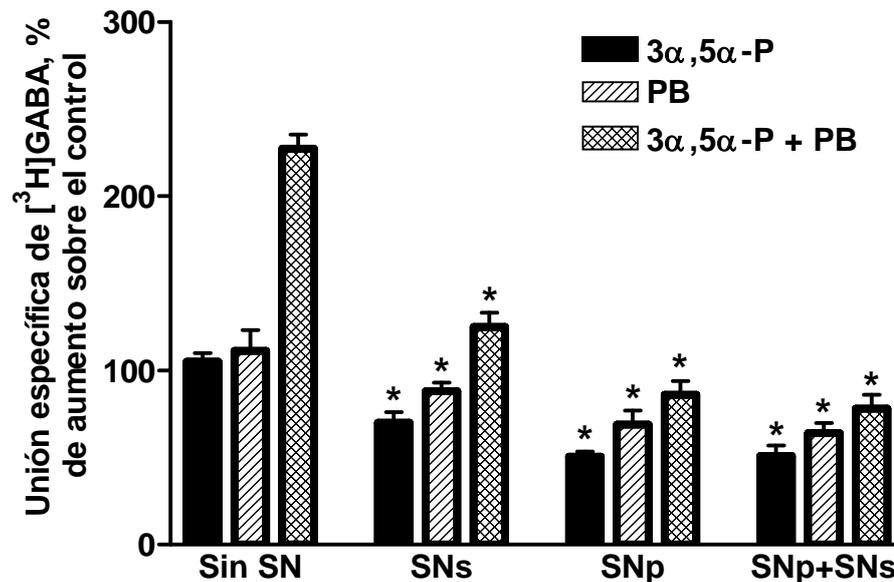


Figura 31: Disminución del efecto estimulador de PB, $3\alpha,5\alpha$ -P, o (PB + $3\alpha,5\alpha$ -P) en presencia de SNp (25 μ g/ml), SNs (20 μ g/ml), o ambos SN aplicados conjuntamente (ensayo en membranas congeladas provenientes de animales adultos). La concentración final de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ utilizada fue 100 nM. Los resultados graficados representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (*): valores significativamente diferentes para cada droga moduladora con respecto a los obtenidos en ausencia de SN, según ANOVA de una vía y tests de Dunnet.

5.4 Cromatografía en Sephadex G100 de los sobrenadantes obtenidos del lavado de membranas sinápticas congeladas.

Con el objeto de intentar un subfraccionamiento de la fracción proteica de los SN obtenidos se realizó un segundo paso de cromatografía a través de una columna de Sephadex G100, según se detalla en la metodología. Se utilizó solamente el SNp dado su mayor rendimiento de proteínas. La Figura 32 muestra el cromatograma resultante, en el cual se observa que no se logró un subfraccionamiento de la fracción proteica del SNp, ya que el perfil de elución reveló un único pico proteico con una cola no resuelta. El volumen recolectado correspondiente a dicho pico y su cola fue reunido en una única fracción, concentrado por liofilización y aplicado nuevamente sobre membranas sinápticas congeladas, en las que se ensayó la unión de [³H]GABA en presencia de PB y 3 α ,5 α -P.

En la misma Figura 32 puede verse que, si bien la fracción proteica eluida de la columna de Sephadex G100 (SNg100) no pudo ser resuelta, conservó su propiedad de disminuir la potenciación de los distintos moduladores sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores. Este efecto inhibitorio fue similar al de la propia fracción proteica del SNp no subfraccionada.

En conclusión, los distintos resultados obtenidos con la aplicación de SN a las membranas sinápticas congeladas mostraron una interferencia con los moduladores de los sitios receptores GABAérgicos, produciendo asimismo un aumento en la propia unión basal de [³H]GABA a dichos sitios receptores. El resultado más notorio es la disminución en el efecto aditivo de PB y 3 α ,5 α -P al agregarse SN que poseen componentes proteicos que habían sido removidos de dichas membranas por los sucesivos pasos de congelación-descongelación y posterior lavado.

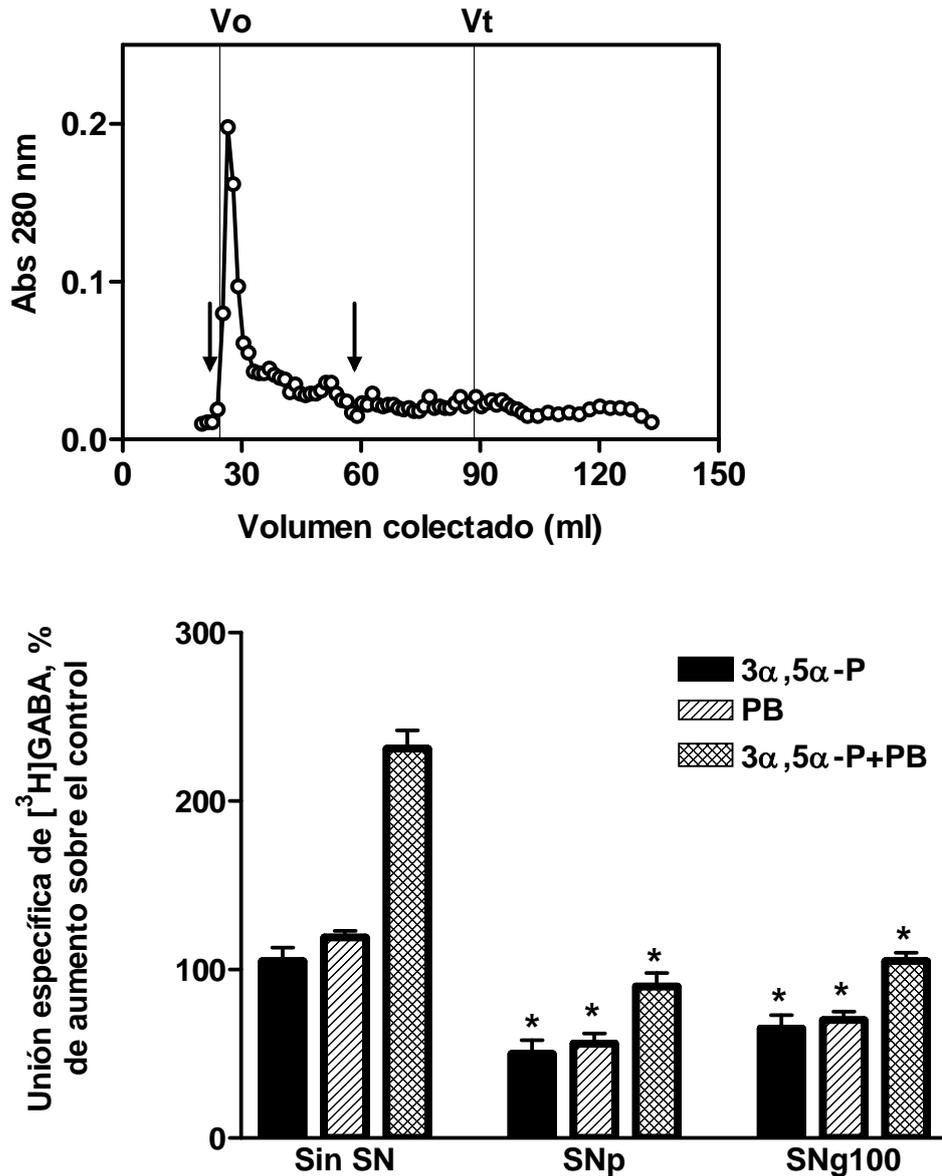


Figura 32: *Gráfico superior:* perfil de elución cromatográfica para SNp en Sephadex G100. Las flechas indican el intervalo de volumen colectado que fue reunido en una sola fracción para su ensayo sobre membranas sinápticas. Los dosajes proteicos antes y después de la cromatografía del SNp indicaron una recuperación de aproximadamente 45 % de la masa proteica total sembrada. Vo: volumen de exclusión de la columna; Vt: volumen total de la columna.

Gráfico inferior: Disminución del efecto estimulador de PB, 3α,5α-P, o (PB + 3α,5α-P) en presencia de SNp (25 μg/ml) o la fracción eluida de la columna de Sephadex G100 (SNg100, 20 μg/ml) -ensayo en membranas congeladas provenientes de animales adultos-. La concentración final de [³H]GABA utilizada fue 100 nM. Los resultados graficados representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes. (*): valores significativamente diferentes para cada modulador con respecto a los obtenidos en ausencia de SN, según ANOVA de una vía y tests de Dunnet.

DISCUSION

En el presente trabajo de tesis se realizó un estudio sobre la ontogénesis de los sitios receptores GABAérgicos y su modulación farmacológica por barbitúricos y neuroesteroides en un área del SNC de las aves, con el objetivo de describir y analizar parámetros relacionados con la plasticidad bioquímica del complejo receptor GABA_A a lo largo del desarrollo.

En este estudio se emplearon dos técnicas distintas en la preparación de las membranas sinápticas ensayadas, como estrategia para revelar diferencias en los parámetros estudiados entre estadios del desarrollo, que no habrían podido ser detectadas mediante el empleo de una única metodología.

Este enfoque permitió realizar un análisis ontogenético más detallado del modelo estudiado, integrando las diversas fuentes de variación observadas a lo largo del desarrollo.

¿Es el GABA un buena elección para marcar al receptor GABA_A ?

La utilización de [³H]GABA como radioligando en este estudio así como las condiciones en las que se midió su unión a sitios receptores son dos factores primordiales que deben considerarse, ya que de una correcta elección en estos aspectos depende la confiabilidad del análisis realizado.

Dado que el [³H]GABA es un radioligando que puede unir a los distintos subtipos de receptores GABA, ciertos ligandos más selectivos han sido preferidos para la detección específica de receptores GABA_A en otros estudios, como por ejemplo muscimol o isoguvacina. Sin embargo, y a pesar de la extensión de su uso, estos agonistas GABAérgicos implican ciertos riesgos metodológicos que hacen preferible al GABA como elección en los ensayos de unión a preparaciones de membranas sinápticas.

El muscimol, por ejemplo, ha sido utilizado para marcar en forma específica los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad, a causa de su mayor afinidad por

el receptor GABA_A con respecto al propio GABA. Sin embargo, el uso de este compuesto para detectar sitios de baja afinidad -como los presentes en este estudio- está sujeto a un mayor error que el que presenta el GABA (De Feudis y col., 1979, también comentado en Dunn y Thuynsma, 1994). Más aún, la inexistencia de [³H]muscimol de alta actividad específica en fuentes comerciales hace a este compuesto de baja aplicabilidad cuando se intenta revelar una población de sitios receptores de baja afinidad mediante ensayos de desplazamiento, debido al pequeño rango útil en que puede realizarse la dilución isotópica del trazador. Finalmente, trabajos clásicos (revisados en De Feudis, 1981) han postulado que el muscimol marca algunas poblaciones de sitios que no unen GABA, implicando por lo tanto que el uso de este compuesto y del propio neurotransmisor probablemente revelan sitios receptores diferentes.

Con respecto a la isoguvacina, se ha demostrado que este compuesto presenta una elevada unión inespecífica a bajas concentraciones (White y Snodgrass, 1983), la cual dificulta la estimación de sitios receptores de alta afinidad en forma apropiada. Por otro lado, este compuesto une a los sistemas transportadores de GABA (White and Snodgrass, 1983) tanto como el propio GABA, no teniendo por lo tanto mayores ventajas sobre este último.

El [³H]GABA de alta actividad específica es por lo tanto la mejor elección para marcar sitios receptores GABAérgicos de alta y baja afinidad simultáneamente, ya que refleja con exactitud el perfil de unión del propio ligando endógeno a los receptores GABA_A.

El segundo aspecto metodológico a considerar es la posibilidad de que el [³H]GABA utilizado, si bien preferible a los otros agonistas, pueda haber marcado junto a los receptores GABA_A otros sitios que lo unen en forma específica tales como receptores GABA_B o transportadores de GABA. Metodológicamente esta marcación específica de sitios diferentes a los propios receptores GABA_A fue evitada mediante el uso de soluciones buffer libres de Ca⁺⁺, requerido para la unión de GABA a receptores GABA_B (Hill y Bowery, 1981; Bowery y col., 1983) y de Na⁺, requerido para la unión a los transportadores, que son absolutamente Na⁺-dependientes (Tunnicliff y col., 1975; Lester y Peck, 1979). Aun más, trabajos llevados a cabo en el propio modelo experimental del LO de pollo (Bondy y Purdy, 1977) demostraron que

en ausencia de iones Na^+ o en membranas congeladas, la captación de [^3H]GABA por sistemas de transporte es virtualmente nula.

Puede concluirse, por lo tanto, que la elección de [^3H]GABA y las metodologías utilizadas representan las condiciones óptimas para revelar sitios receptores correspondientes a complejos del tipo GABA_A exclusivamente.

¿Cuál es la ventaja de congelar las membranas sinápticas?

Debido a las altas concentraciones de GABA en tejidos del SNC, una simple preparación cruda de membranas sinápticas contiene habitualmente demasiado neurotransmisor como para poder identificar correctamente sus sitios receptores (Napias y col., 1980). Por lo tanto, son necesarios procedimientos de remoción del mismo a fin de exponer dichos sitios, los cuales usualmente incluyen repetidos lavados de los sedimentos de membrana (Napias y col., 1980; Gardner y col., 1980), tratamiento con detergentes (Enna y Snyder, 1977; Kurioka y col., 1981; Lester y col., 1981) o congelación y descongelación (Van Ness y Olsen, 1979; Olsen y col., 1981).

Los tratamientos con detergentes -generalmente Triton X-100- o mediante congelación-descongelación se consideran más exhaustivos y remueven un porcentaje mucho mayor del GABA ocluido en las membranas sinápticas (Fischer de Plazas y col., 1993). Los primeros poseen la desventaja de producir una pérdida proteica importante en el tejido (Toffano y col., 1981; Fischer de Plazas y col., 1993) y por lo general los sitios receptores que se exponen con esta metodología pierden sensibilidad a diversas drogas modulatorias (Willow y Johnston, 1981; Fischer de Plazas y Mitridate de Novara, 1990), siendo por lo tanto la congelación de las membranas sinápticas la mejor alternativa para exponer sitios receptores sin que los mismos pierdan la capacidad de ser modulados farmacológicamente.

El uso de repetidos pasos de congelación y descongelación se ha utilizado más comúnmente que un único paso (Van Ness y Olsen, 1979; Gardner y col., 1981; Tehrani y Barnes, 1986) dado que remueve GABA y otros factores endógenos en mayor proporción y revela más extensamente los sitios receptores al neurotransmisor.

Análisis de los sitios receptores y correlación ontogenética de los parámetros obtenidos.

En el presente estudio se determinaron parámetros farmacológicos que identificaron dos tipos de sitios receptores GABAérgicos, caracterizados por sus densidades máximas (B_{max}) y sus constantes de afinidad aparentes (K_d). El cálculo de dichos parámetros fue realizado por ajustes de regresión no lineal a los datos experimentales aplicando correcciones indicadas en la bibliografía (Feldman, 1972), y su representación gráfica fue realizada por medio de la transformación de Scatchard. La aproximación matemática de Feldman fue necesaria para considerar la contribución de cada población de sitios receptores a la unión medible en la otra, aun cuando se asumen ambas poblaciones como independientes. La omisión de este cálculo habría producido una estimación sesgada en los resultados, con valores de B_{max} y K_d incorrectos como se indicó en la metodología.

La determinación de estos parámetros cinéticos aparentes sirve como indicador bioquímico de las variaciones observables en los receptores. Un aumento de B_{max} a lo largo del desarrollo, por ejemplo, puede relacionarse con un aumento del número de sitios de unión de GABA en los complejos receptores, del número de receptores GABA_A por célula, o del número de sinapsis inhibitorias totales, sugiriendo en todos los casos un incremento en la transmisión inhibitoria que puede ser verificado en sistemas funcionales (Meier y col., 1984). Por otro lado, una variación ontogenética en la K_d generalmente se relaciona con variaciones moleculares en el complejo receptor, que modifican su afinidad por el neurotransmisor (Sigel y col., 1990).

Por consiguiente, los parámetros determinados, si bien no pueden revelar la complejidad molecular del sistema, muestran cómo es la respuesta del mismo en términos globales y por lo tanto pueden correlacionarse directamente con estudios funcionales en el mismo modelo -que por su naturaleza, también describen al sistema en forma global-.

Para la determinación de los parámetros farmacológicos propios de las drogas modulatorias utilizadas (E_{max} , EC_{50} , heterogeneidad de sitios modulatorios), los sitios receptores GABAérgicos de alta y baja afinidad fueron diferenciados mediante el uso

de diversas concentraciones de radioligando, elegidas en base a las curvas de desplazamiento que identificaban cada población de sitios. Cuando se midió el efecto de moduladores en los sitios receptores de baja afinidad, la concentración de GABA utilizado saturó los sitios de alta afinidad de modo que su contribución a la unión total fue constante (de hecho era su valor B_{max}) y la misma pudo ser descontada. En contraste, la contribución de los sitios de baja afinidad al medir el efecto de los moduladores en los sitios de alta afinidad sólo pudo ser descontada al utilizarse concentraciones de [3H]GABA muy bajas, tales que el radioligando prácticamente no se uniera a sus sitios receptores de baja afinidad.

El análisis de dichos parámetros farmacológicos a lo largo del desarrollo también puede relacionarse con propiedades funcionales de los complejos receptores estudiados. Una variación en la potencia de un modulador entre distintos estadios del desarrollo está revelando una variación en la afinidad de los complejos receptores por el mismo. Los cambios en la afinidad con que los complejos receptores unen a sus moduladores son a su vez representativos de variaciones en la forma de regulación por ligandos de dichos complejos (Sigel y col., 1990) en distintas etapas ontogenéticas.

De la misma manera, la aparición o desaparición a lo largo de la ontogenia de una heterogeneidad de sitios moduladores puede correlacionarse con variaciones moleculares en los receptores, que afectan su sensibilidad a los elementos que los modulan en el microambiente sináptico. Un postulado similar, pero relacionado con variaciones regionales en el SNC en lugar de ontogenéticas, ha asociado cambios en parámetros de los receptores con la diversidad de funciones en los mismos (Guidotti y col., 1979; Olsen y col., 1981).

En resumen, el análisis matemático realizado así como la correcta elección de las distintas concentraciones de radioligando son por lo tanto condiciones que permiten estudiar por separado las distintas poblaciones de sitios receptores GABAérgicos y su diferente sensibilidad a los compuestos moduladores empleados. Los resultados obtenidos, al ser evaluados ontogenéticamente, reflejan modificaciones en las propiedades de los receptores, asociables a cambios funcionales o de regulación de los mismos.

Perfil de aparición de los sitios receptores GABAérgicos a lo largo del desarrollo.

Los primeros resultados obtenidos mostraron un importante incremento en la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores durante los estadios prenatales del desarrollo, alcanzándose la máxima unión en el período ubicado entre el nacimiento y postnatal inmediato (Figura 10). Este incremento prenatal fue paralelo al aumento simultáneo del contenido proteico de la fracción de membranas sinápticas del tejido, y corresponde a un período en el cual hay un marcado incremento del número de sinapsis inhibitorias en el LO (McGraw y McLaughlin, 1980).

Posteriormente al nacimiento, el peso del LO y contenido proteico de la fracción de membranas sinápticas continuaron aumentando hasta el estadio adulto (Figura 9), sin que la unión de [³H]GABA aumentase en la misma proporción, resultando una caída postnatal en la unión del radioligando al ser expresada por mg de proteína.

Este perfil de sobre-expresión transitoria de sitios receptores GABAérgicos con posterior disminución en los mismos posee significativas correlaciones bioquímicas ya que coincide con el patrón de aparición de la propia enzima biosintética del GABA, la GAD, en el LO de pollo. (González y col., 1990).

Esta sobre-expresión transitoria de sistemas receptores a neurotransmisores en el momento del nacimiento y postnatal inmediato ha sido descrita tanto para el receptor GABAérgico como en otros modelos (Schliebs y col., 1986; Batuecas y col., 1987a,b Gravielle y Fiszer de Plazas, 1991) y su posterior disminución coincidiría con el postulado de eliminación selectiva de sinapsis durante el establecimiento de circuitos funcionales (Changeux y Danchin, 1976).

A lo largo de la ontogenia, el tratamiento exhaustivo de las membranas sinápticas produjo una mayor unión de [³H]GABA a sus sitios receptores, conjuntamente con una pérdida proteica ya descrita (Fiszer de Plazas y col., 1993).

Los ensayos de desplazamiento de [³H]GABA, los cuales se realizaron en distintos estadios del desarrollo, tuvieron el objeto de dilucidar las causas de estas variaciones observadas en la unión del radioligando a sus sitios receptores. Dichos ensayos se realizaron tanto en membranas sinápticas frescas como congeladas a fin de

determinar si la metodología empleada influía significativamente en la descripción de las poblaciones de sitios receptores GABAérgicos durante la ontogenia (Figura 11).

En membranas sinápticas frescas pudo observarse una única población de sitios receptores GABAérgicos -de baja afinidad por [³H]GABA-, cuya máxima capacidad de unión aumentó en el nacimiento y disminuyó postnatalmente, conjuntamente con una disminución en la afinidad por el radioligando. En dicha preparación de membranas, el aumento de la capacidad receptora máxima fue la principal causa del aumento transitorio de unión de [³H]GABA observado alrededor del nacimiento.

En comparación, la congelación de las membranas sinápticas reveló, además de la población de sitios receptores de baja afinidad ya observada, una segunda población, de alta afinidad por [³H]GABA. En esta preparación de membranas sinápticas pudieron registrarse las mismas variaciones ontogenéticas en la población de sitios receptores de baja afinidad que las observadas en membranas frescas, mientras que la población de alta afinidad presentó escasos cambios a lo largo del desarrollo. En membranas congeladas, por consiguiente, la causa del aumento transitorio de unión de [³H]GABA en el nacimiento también debe atribuirse a variaciones en la capacidad receptora máxima de los sitios de baja afinidad.

Este aumento en el número total de sitios receptores durante el desarrollo como causa del aumento de unión del radioligando ha sido previamente descrito en estudios realizados en el mismo modelo del LO de pollo (Tehrani y Barnes, 1986; Batuecas y col., 1987a,b).

Por otro lado, en el estadio de desarrollo más temprano estudiado -Ed 14- la población de alta afinidad se encontró ausente al tratarse las membranas sinápticas mediante congelación y descongelación. Este resultado sugiere que en dicho estadio una fracción de receptores sensibles a la congelación aún no se ha expuesto en la sinapsis (Flores y col., 1986).

Una variación interesante introducida por la congelación de membranas sinápticas, además de la aparición de la población de receptores de alta afinidad, fue el aumento en afinidad y disminución en Bmax para los sitios receptores de baja afinidad, comparados con los mismos sitios en membranas frescas, siendo este patrón idéntico en todos los estadios del desarrollo estudiados. El congelamiento por lo tanto

afecta en una manera constante a la población de sitios receptores de baja afinidad detectable a lo largo de la ontogenia. Este efecto, junto a la aparición de los sitios receptores de alta afinidad, serían conjuntamente responsables por el aumento de unión de [³H]GABA en todas las preparaciones de membranas congeladas con respecto a las mismas membranas no congeladas.

Ontogénicamente los efectos del congelamiento tuvieron distinta magnitud, ya que los parámetros calculados se vieron diferencialmente afectados en distintos estadios del desarrollo. Los estadios prenatales fueron los que presentaron mayor variación en los parámetros que caracterizan a los sitios receptores GABAérgicos, siendo por lo tanto los más sensitivos a la congelación de las membranas sinápticas.

Sitios receptores de alta afinidad: ¿población real o artefacto?

La población de sitios receptores de alta afinidad revelada en el presente estudio con el proceso de congelación-descongelación de las membranas sinápticas fue originalmente postulada como una población enmascarada por GABA endógeno en las membranas frescas (Enna y Snyder, 1977; Fiszer de Plazas, 1982). Sin embargo ha sido objeto de controversia en la literatura sobre su posible funcionalidad en la neurotransmisión GABAérgica. Sólo un escaso número de evidencias han asociado a los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad con alguna funcionalidad biológica (Belhage y col., 1986, 1991).

En efecto, dado que las concentraciones de GABA en el espacio sináptico son muy elevadas, una población de sitios receptores de muy alta afinidad se encontraría permanentemente saturada, siendo por lo tanto insensible a variaciones menores en los niveles del neurotransmisor, requeridas para una regulación fina de la actividad inhibitoria.

Por otro lado, el hecho de que dicha población de sitios receptores sólo se detecte después de un tratamiento exhaustivo de las membranas sinápticas plantea la posibilidad de que los mismos no sean sitios receptores reales, enmascarados por GABA, sino sitios aceptores (Laduron, 1984) sin un correlato biológico, introducidos por la congelación.

Una tercera posibilidad consiste en considerar a estos sitios receptores de alta afinidad como una subpoblación real de los sitios receptores funcionales -de baja afinidad-, que se modifica por efecto del congelamiento (Edgar y Schwartz, 1992; Goodnough y Hawkinson, 1995). Se ha observado que los tratamientos exhaustivos causan en las membranas sinápticas una disminución de la densidad de sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad conjuntamente con un aumento en su afinidad por GABA (Lester y col., 1981), coincidiendo estos resultados con los obtenidos en el presente modelo.

Es probable por lo tanto que los sitios receptores de alta afinidad observados preexistan en las membranas sinápticas frescas, pero se transformen en sitios insensibilizados por el proceso de congelación. Al respecto ha sido demostrado que la congelación-descongelación de proteínas produce desnaturalización reversible de las mismas (Strambini y Gabellieri, 1996) pudiendo ser ese efecto el que genera los sitios detectados.

Los resultados obtenidos en la presente tesis, que demuestran escasas variaciones ontogénicas para dichos sitios de alta afinidad, así como una insensibilidad a sustancias modulatorias (barbitúricos y NE), apoyan la última posibilidad indicada. Esto permite postular a la población de sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad como un estado insensibilizado que es adquirido por una subpoblación del total de receptores GABA_A al ser congelados, perdiendo la capacidad de ser modulados farmacológicamente.

Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por barbitúricos.

El mecanismo de acción propuesto comúnmente para los barbitúricos involucra la modulación alostérica positiva del complejo receptor GABA_A (Olsen y col., 1986). Se ha demostrado previamente que estas sustancias estimulan la unión Na⁺-independiente de GABA a membranas sinápticas actuando en concentraciones con efecto farmacológico en el orden micromolar, presentando una buena correlación entre su capacidad estimuladora sobre el receptor GABA_A y su actividad anestésica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los de la literatura precedente, demostrando que el barbitúrico PB actúa como un modulador alostérico positivo, cuyo mecanismo de acción no involucró el aumento del número de sitios receptores a [³H]GABA sino el incremento de afinidad de los mismos por el radioligando (Figura 15).

El hallazgo más importante obtenido es la particular variación que esta modulación presentó a lo largo de la ontogenia (Figura 12). En estadios tempranos del desarrollo (prenatales y recién nacidos) fueron detectados dos sitios moduladores, de alta y baja afinidad por PB, constituyendo cada uno aproximadamente la mitad de la población total de sitios moduladores. En contraste, esta heterogeneidad no fue visible en el estadio adulto, obteniéndose para el mismo resultados que concuerdan con trabajos previos que demuestran un único sitio modulador -de baja afinidad por PB-, indicando que los sitios de alta afinidad desaparecen en alguna etapa intermedia entre el nacimiento y la madurez.

La acción del PB en la población de sitios moduladores de alta afinidad, estudiados detalladamente en un estadio prenatal, consistió también en una modulación alostérica positiva demostrada por el incremento en la afinidad por [³H]GABA de los receptores en presencia de bajas concentraciones de PB (Figura 15).

La población de sitios moduladores de alta afinidad presentó un comportamiento idéntico al de los sitios de unión de barbitúricos previamente conocidos. Se observó el desplazamiento del efecto estimulador del PB mediante la aplicación de la droga convulsivante PTX (Figura 14), en coincidencia con resultados previos que demuestran la acción opuesta de ambos compuestos (Ticku y Olsen, 1978; Twyman y col., 1989). Asimismo, se verificó una insensibilidad al alcaloide bicuculina, el cual disminuyó solamente la unión basal de [³H]GABA pero no impidió que el PB potenciara la unión remanente del radioligando, resultado que concuerda con la falta de competencia entre el barbitúrico y el alcaloide (Möhler y Okada, 1977).

La existencia de dos sitios moduladores no fue causada por variaciones en la preparación de membranas sinápticas empleada, ya que los mismos fueron detectados por igual en membranas sinápticas frescas o congeladas. Esto sugiere que la

heterogeneidad observada se relaciona -como se indicara- con posibles variaciones moleculares del receptor a lo largo del desarrollo, provenientes de la expresión o la combinación variable de las subunidades que forman el complejo. Un resultado que apoya esta hipótesis es el perfil ontogenético variable de expresión de los ARNm para las subunidades α a lo largo del desarrollo embrionario (Laurie y col., 1992), las cuales están involucradas en el efecto estimulador de los barbitúricos (Amin y Weiss, 1993; Thompson y col., 1996).

La congelación de las membranas sinápticas, que causa la aparición de dos sitios receptores GABAérgicos -de alta y baja afinidad- produjo un aumento en la complejidad del análisis ya que se contaba en estadios tempranos del desarrollo con **dos** sitios receptores -uniendo al radioligando- y **dos** sitios moduladores -uniendo al barbitúrico-. Sin embargo, la población de sitios receptores de alta afinidad mostró ser insensible al efecto estimulador del PB (Figura 15 y Tabla VI) reforzando la idea de la misma como una población de escasa o nula funcionalidad biológica.

Comparando el efecto de la congelación de membranas sinápticas a lo largo de la ontogenia, los estadios tempranos del desarrollo presentaron las variaciones más notorias entre membranas frescas y congeladas con respecto a los parámetros que identificaron la modulación del barbitúrico (E_{max} y EC_{50}), siendo por lo tanto los más afectados por la congelación-descongelación, en coincidencia con lo obtenido previamente para los propios sitios receptores GABAérgicos.

En conjunto, estos hallazgos contribuyen a explicar las variaciones en la sensibilidad a estas drogas modulatorias del receptor GABA_A observadas durante la ontogenia (Fischer de Plazas y col., 1995). Especialmente, la mayor sensibilidad al PB en estadios tempranos del desarrollo podría ser un resultado clínicamente relevante en mamíferos, en los cuales han sido descritos cambios profundos en el SNC de individuos inmaduros -morfología neuronal, comportamiento, sensibilidad a estados depresivos- por aplicaciones de dosis de barbitúricos que no afectan a los adultos (Yanai, 1984).

Modulación de los sitios receptores GABAérgicos por neuroesteroides.

A lo largo de la última década los NE han sido reconocidos como efectores de gran importancia en la transmisión GABAérgica, siendo actualmente considerados moduladores endógenos del receptor GABA_A (Rupprecht y col., 1996) debido a su biosíntesis demostrada en el SNC a partir de hormonas esteroideas o sus precursores.

En el presente trabajo se evaluó el efecto modulador de estos compuestos sobre los sitios receptores GABAérgicos durante la ontogenia. Gran parte de los resultados obtenidos demostraron un comportamiento farmacológico para los NE muy similar al que se había obtenido previamente con barbitúricos.

Dado que los NE se disolvieron en todos los casos en etanol absoluto, el cual alcanzó la concentración molar final de 230 μM (1,5 % v/v), se verificó el efecto del solvente en la propia unión control de [³H]GABA a sus sitios receptores. En ningún caso se observaron diferencias en dicha unión control en presencia de las concentraciones utilizadas de etanol, permitiendo descartar cualquier efecto del vehículo utilizado. Si bien existen numerosas evidencias demostrando el efecto del etanol en la transmisión GABAérgica, varios trabajos han reportado ausencia de efectos para este alcohol aún a concentraciones mucho mayores que las utilizadas en el presente estudio (Reggiani y col., 1980; Rohde y Harris, 1982). Dado que el etanol no presenta una acción molecularmente definida en el receptor GABA_A, sino que actúa principalmente modificando la funcionalidad de todo el sistema celular - incluyendo la estructura de membrana que rodea al receptor-, es más probable por lo tanto que los resultados *in vitro*, como los obtenidos en la presente tesis, sean menos afectados por esta substancia.

Las curvas concentración-efecto obtenidas con el NE utilizado para la caracterización, 3 α ,5 α -P, presentaron claras variaciones a lo largo del desarrollo, siendo en todos los casos el estadio de recién nacidos el más sensitivo al efecto estimulador del esteroide, de acuerdo con los valores de E_{max} y EC_{50} calculados (Figura 16 y Tabla VII).

No se obtuvieron en este caso curvas que indicaran la presencia de más de un sitio modulador para NE, dado que las mismas presentaron siempre un buen ajuste al modelo sigmoidal simple, indicativo de una única población de sitios a los que se unía el esteroide. No obstante este análisis no es concluyente ya que puede existir una

heterogeneidad de sitios moduladores no resuelta con el ligando empleado si los mismos presentaran iguales afinidades por ese esteroide en particular. De hecho, como se discutirá más adelante, los resultados obtenidos mediante la competencia de NE sí son indicativos de una posible heterogeneidad de sitios moduladores.

La congelación de membranas introdujo diferencias entre los distintos estadios del desarrollo ensayados, sin alterar el perfil sigmoidal de las curvas. Estas diferencias fueron más marcadas nuevamente en el estadio prenatal, en el cual la curva concentración-efecto del NE sufrió un importante desplazamiento hacia la derecha (según su valor de EC_{50}) al congelarse las membranas sinápticas.

El perfil ontogenético variable de modulación observado para el NE ensayado puede relacionarse, así como el de barbitúricos, con un perfil variable de expresión para las subunidades del complejo receptor (Laurie y col., 1992; Araki y col., 1992), si bien en este caso es más difícil intentar un correlato molecular-farmacológico ya que no hay una definición absoluta de alguna o algunas subunidades particulares que sean esenciales para el efecto de los NE (Lan y col., 1991; Puia y col., 1992).

Con respecto al mecanismo farmacológico de acción del NE sobre los sitios receptores GABAérgicos, los ensayos de desplazamiento dieron iguales resultados que los obtenidos previamente con PB: un aumento de afinidad de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad en presencia del esteroide, sin modificación del número máximo de sitios, correspondiente a una modulación alostérica positiva que se observó en ambas preparaciones de membranas sinápticas ensayadas (Figura 18).

Comparativamente, y también en coincidencia con lo obtenido anteriormente con el barbitúrico, los sitios receptores de alta afinidad no fueron significativamente afectados por el NE en ningún estadio del desarrollo (Figura 18 y Tabla IX). Un análisis más detallado de esta falta de efecto demostró que las curvas concentración-efecto sobre los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad que se habían obtenido previamente para PB o $3\alpha,5\alpha$ -P debían atribuirse a una contribución de los sitios receptores de baja afinidad, cuya estimulación había sido detectable aún con bajas concentraciones de GABA y sólo pudo ser descartada con muy bajas concentraciones del radioligando, como puede observarse en la Figura 19.

Estos resultados permitieron concluyentemente definir a los sitios GABérgicos de alta afinidad como una población careciente de relevancia biológica, dada su invariabilidad ontogenética y su falta de respuesta a varias sustancias modulatorias. Como consecuencia, dicha población de sitios de alta afinidad fue descartada en los estudios subsiguientes.

Relación estructura-actividad para neuroesteroides.

Con el objeto de caracterizar más detalladamente el efecto de los NE sobre los sitios receptores GABAérgicos se realizó un estudio de relación entre estructura y actividad -focalizado en animales adultos-, para detallar las características estructurales esenciales de los NE para actuar como moduladores del receptor GABA_A en aves. A tal fin se emplearon los distintos estereoisómeros producidos por reducción e hidroxilación de la progesterona, los cuales poseen configuraciones que difieren en la posición del grupo hidroxilo unido al carbono 3 del esqueleto pregnano (configuración 3 α o 3 β) y en la posición del átomo de hidrógeno unido al carbono 5, resultante de la reducción del doble enlace $\Delta_{4,5}$ de la progesterona (configuración 5 α o 5 β).

Todos los esteroides así obtenidos (3 α ,5 α -P, 3 α ,5 β -P, 3 β ,5 α -P y 3 β ,5 β -P) han sido caracterizados en mamíferos, para los cuales se ha demostrado que la presencia del grupo OH en 3 α y, en menor grado, el átomo de hidrógeno 5 α , representan las características estructurales más importantes relacionadas con su actividad como moduladores positivos del receptor GABA_A (Harrison y col., 1987; Gee y col., 1988). De acuerdo con estas evidencias, los isómeros con alguno de los dos grupos relevantes en posición β (3 β o 5 β) resultan menos activos que la 3 α ,5 α -P, y el isómero doble β ha sido demostrado como un ligando completamente inactivo sobre el receptor (Gee y col., 1988; Peters y col., 1988), utilizándose para antagonizar los efectos de los otros NE (Prince y Simmonds, 1993).

Los resultados obtenidos en el modelo de aves estudiado (Figura 20) demostraron que la 3 α ,5 α -P es el NE que produce la mayor estimulación en la unión

de [^3H]GABA a sus sitios receptores, en acuerdo con evidencias similares en mamíferos. Asimismo el NE $3\beta,5\alpha\text{-P}$ produjo una muy pequeña estimulación en los sitios receptores GABAérgicos, coincidente con la carencia del grupo hidroxilo en configuración 3α .

En contraste, la $3\alpha,5\beta\text{-P}$, que en mamíferos es un NE con un importante efecto estimulador sobre los sitios receptores GABAérgicos, resultó en el LO de pollo un estimulador débil de la unión de [^3H]GABA, indicando que el grupo hidroxilo en configuración 3α no parece ser por sí mismo el requisito esencial para la actividad de los NE en aves, como sí lo es en mamíferos.

El resultado más notorio fue, no obstante, el obtenido con el isómero $3\beta,5\beta\text{-P}$, el cual produjo una estimulación significativa de la unión de [^3H]GABA a sus sitios receptores, siendo la misma la más importante luego de la producida por $3\alpha,5\alpha\text{-P}$. Este resultado es absolutamente opuesto al conocido en mamíferos, en los cuales la $3\beta,5\beta\text{-P}$ no produce ninguna modificación en el receptor GABA_A , y muestra que en aves los requisitos estructurales de los NE para su actividad no concuerdan con los conocidos previamente. Todos estos datos permiten describir por primera vez una relación estructura-actividad diferente, en la cual los NE más activos son los que poseen los grupos funcionales de los carbonos 3 y 5 con igual configuración α o β .

Esta estimulación obtenida con los distintos esteroides fue isómero- y concentración-dependiente, no debida por lo tanto a un aumento inespecífico en la unión del [^3H]GABA. Una verificación de ello se obtuvo ensayando NE sulfatados (PS y DHEA-S), descriptos como antagonistas de las respuestas GABAérgicas en mamíferos (Majewska y Schwartz, 1987; Majewska y col., 1990b). Dichos NE presentaron ese mismo comportamiento en aves, sin causar ninguna estimulación del receptor y produciendo inclusive una ligera inhibición en la unión de [^3H]GABA al ser aplicados en altas concentraciones.

Agonistas totales y parciales de los sitios moduladores de neuroesteroides.

Dado que el resultado obtenido con la $3\beta,5\beta$ -P no había sido descrito previamente, se profundizó la caracterización de este NE como modulador del receptor GABAérgico a lo largo del desarrollo. Para ello se realizaron los ensayos en membranas sinápticas congeladas, descontando la presencia de los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad, debido a su insensibilidad a las drogas modulatorias empleadas.

El estudio ontogénico de la estimulación observada demostró que la $3\beta,5\beta$ -P posee el comportamiento de un modulador alostérico positivo, de la misma manera que su isómero doble α , aumentando la afinidad de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad por el radioligando sin modificar la capacidad receptora máxima (Figura 22 y Tabla XI).

Las curvas concentración-efecto analizadas en los distintos estadios del desarrollo estudiados (Figura 21) mostraron diferencias con las obtenidas para $3\alpha,5\alpha$ -P dado que para este último esteroide había importantes variaciones entre el estadio prenatal y el de animales recién nacidos, etapa en la que su efecto modulador sufría un notorio incremento en potencia y actividad máxima. En comparación, el efecto estimulador de la $3\beta,5\beta$ -P presentó escasas variaciones entre distintos estadios del desarrollo, obteniéndose curvas concentración-efecto muy similares para todos ellos, que solamente presentaron diferencias a nivel del EC_{50} (el cual alcanzó su valor mínimo en animales recién nacidos, indicando su mayor sensibilidad al NE).

Comparando las curvas obtenidas para ambos esteroides en los distintos estadios del desarrollo (Figuras 16 y 21), así como los resultados de los ensayos de desplazamiento (Figuras 18 y 22, Tablas IX y XI), se puede concluir que los dos isómeros presentan un comportamiento coincidente en estadios prenatales del desarrollo -en donde son similares aún en el E_{max} que producen-, para diferenciarse a partir del nacimiento y producir postnatalmente efectos estimuladores que difieren notoriamente en potencia y máxima estimulación alcanzada.

Esta diferencia de comportamiento permite postular inicialmente a ambos esteroides como distintos agonistas del sitio modulador de NE en el receptor, siendo la $3\alpha,5\alpha$ -P un agonista total -por producir las máximas respuestas observadas- y la $3\beta,5\beta$ -P un agonista parcial (Viapiano y Fiszer de Plazas, 1997).

¿Hay más de un sitio de unión para neuroesteroides?

Para confirmar si los dos NE estudiados actuaban en un sitio moduladorio común, siendo agonistas del mismo, se realizaron experimentos de competencia basados en producir una estimulación máxima de la unión de [^3H]GABA a sus sitios receptores con $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ para luego desplazarla con concentraciones crecientes de $3\beta,5\beta\text{-P}$. El resultado esperado consistía en obtener el desplazamiento del efecto desde la E_{max} de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ hasta la E_{max} de $3\beta,5\beta\text{-P}$ cuando ésta ocupara todos los sitios moduladorios.

Se observó que este desplazamiento se producía completamente en el estadio prenatal ensayado, coincidiendo con las curvas concentración-efecto para ambos esteroides, las cuales eran muy similares en dicho estadio. Por el contrario, en el estadio adulto no se logró un desplazamiento completo de la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ con su isómero doble β (Figura 23). La falta de desplazamiento no fue debida a efectos inespecíficos ya que la PS, antagonista del sitio moduladorio de NE, logró desplazar totalmente el efecto estimuladorio de la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$. Por consiguiente, en el estadio adulto el resultado observado indica un efecto de $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ sobre sitios moduladorios a los cuales no se une la $3\beta,5\beta\text{-P}$, sugiriendo una heterogeneidad de sitios de unión de NE.

Esta heterogeneidad no es la misma que la observada previamente con barbitúricos pues las curvas concentración-efecto para cada NE ($3\alpha,5\alpha\text{-P}$ o $3\beta,5\beta\text{-P}$) se ajustaron a modelos de un único sitio moduladorio. Si bien este resultado no descarta la posibilidad de que existan dos sitios no resueltos para cada NE -con similar afinidad-, dicho modelo no es probable ya que los coeficientes de Hill -un parámetro que se relaciona con la multiplicidad de sitios efectores (Kenakin, 1993)- en todas las curvas analizadas no fueron significativamente diferentes de la unidad, sugiriendo que la población de sitios para cada NE no presenta subpoblaciones de distintas afinidades.

Resultados en la literatura pertinente han demostrado diversos modelos de heterogeneidad en los sitios moduladores de NE, entre los cuales se han descrito subpoblaciones para distintos esteroides (Majewska y col., 1990a; Prince y Simmonds, 1993) o varias subpoblaciones con diferente afinidad para un mismo NE (Morrow y col., 1989; Hawkinson y col., 1994; Goodnough y Hawkinson, 1995), coincidiendo esto último con lo observado para barbitúricos en el LO del pollo.

En el presente modelo la hipótesis más plausible indica que no se trata de sitios con distinta afinidad por los NE sino de sitios con distintos requerimientos estructurales, existiendo en animales adultos una población a la cual pueden unirse ambos NE y otra a la que sólo se une la $3\alpha,5\alpha$ -P produciendo el efecto “residual” no desplazable. A fin de definir de una forma más concluyente si ambos NE estaban compitiendo o no por un sitio común de acción se realizó un análisis de Schild de la competencia entre los dos moduladores.

En dicho análisis, las sucesivas curvas concentración-efecto para $3\alpha,5\alpha$ -P en presencia de concentraciones crecientes de $3\beta,5\beta$ -P mostraron en parte el desplazamiento esperado que presenta un agonista total en presencia de su agonista parcial (Figura 24). La $3\beta,5\beta$ -P aumentó los valores de estimulación en dichas curvas al actuar en presencia de bajas concentraciones de $3\alpha,5\alpha$ -P y disminuyó los mismos al actuar en presencia de altas concentraciones de dicho esteroide. El gráfico de Schild resultante del análisis de las curvas indicó un valor de K_i para $3\beta,5\beta$ -P (constante de afinidad para este NE) en el orden de magnitud de su EC_{50} , mostrando que el rango de concentraciones elegido para la $3\beta,5\beta$ -P había sido correcto. Por otro lado, la pendiente de la recta de regresión en este gráfico fue significativamente inferior a la unidad.

Una pendiente de valor similar a uno representa un mecanismo competitivo entre los ligandos ensayados por un único sitio de reconocimiento (Arunlakshana y Schild, 1949). La pendiente obtenida indica en cambio que la naturaleza de la interacción entre los NE es más compleja, pudiendo postularse varios mecanismos causales (Viapiano y Fiszler de Plazas, 1998). Entre ellos pueden sugerirse la existencia de constantes de asociación distintas para cada esteroide, de varios

mecanismos saturables de captación de los mismos, o bien heterogeneidad de sitios moduladores (Kenakin y col., 1992; Kenakin, 1993).

En conjunto, los datos obtenidos en las Figuras 23 y 24 sugieren una interacción compleja entre ambos esteroides con el receptor GABA_A o con la propia membrana, incompatible con un modelo competitivo. Por lo tanto los términos “agonista total” y “agonista parcial”, que son utilizados normalmente para referirse al efecto de NE en el receptor GABA_A (Im y col., 1989, Majewska, 1991) deben emplearse cuidadosamente ya que el comportamiento farmacológico de estas sustancias es más complejo que una simple competición por un sitio modulador.

Relevancia biológica de los neuroesteroides 5 β reducidos.

Más allá de la complejidad en la interacción de los dos NE analizados con sus sitios de reconocimiento, el hecho de que un esteroide con configuración 3 β ,5 β presente actividad sobre el receptor GABA_A es un hallazgo novedoso que permite preguntarse si las actividades diferenciales de este NE en mamíferos y aves pueden estar relacionadas con eventos fisiológicos diferentes en ambas clases de vertebrados.

En particular, el perfil de esteroidogénesis en aves y mamíferos presenta notorios contrastes durante el desarrollo. La biosíntesis de 3 α ,5 α -P a partir de progesterona ha sido demostrada en el SNC de mamíferos (Bitran y col., 1995), mientras que los metabolitos 5 β -reducidos de esta hormona no han sido detectados hasta el presente en cerebro en concentraciones significativas (Purdy y col., 1991), sugiriendo la ausencia de una actividad 5 β -reductasa relevante (Mellon, 1994).

Por el contrario, varias evidencias indican que en los tejidos esteroidogénicos de las aves la actividad 5 β -reductasa es mucho mayor que la 5 α -reductasa (Aragón y col., 1991) especialmente en estadios tempranos del desarrollo (Pedrera y Lantos, 1973; González y col., 1983), en los cuales los metabolitos 5 β -reducidos de la progesterona son los únicos que poseen actividad biológica (Aragón y col., 1985). En el desarrollo postnatal la actividad 5 α -reductasa se incrementa, si bien la 5 β -reductasa predomina (Aragón y col., 1985). La presencia de 3 α ,5 α -P en el SNC de

aves ha sido descripta solamente en animales adultos de más de 40 días de edad (Nakamura y Tanabe, 1975), y más recientemente se ha demostrado la biosíntesis de $3\beta,5\beta\text{-P}$ -pero no $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ - en el propio LO del pollo en estadios tempranos del desarrollo (Pignataro y col., 1998).

En conjunto, estos resultados sugieren que en dichos estadios tempranos del desarrollo la $3\alpha,5\alpha\text{-P}$ probablemente no existe en concentraciones suficientes para actuar como un modulador endógeno del receptor GABA_A , siendo entonces los esteroides 5β -reducidos los únicos efectores del mismo. Los NE 5α -reducidos ($3\alpha,5\alpha\text{-P}$) aparecerían en estadios postnatales del desarrollo, estando su aparición relacionada con el aumento de complejidad en la interacción con los sitios moduladores del receptor. De los dos posibles metabolitos 5β que pueden producirse a partir de progesterona ($3\beta,5\beta\text{-P}$ y $3\alpha,5\beta\text{-P}$), los resultados del presente estudio han demostrado que la $3\beta,5\beta\text{-P}$ presenta una importante actividad estimuladora sobre el receptor, mientras que la $3\alpha,5\beta\text{-P}$ es mucho menos activa, dando a la primera una mayor relevancia.

A fin de determinar el papel biológico de los distintos NE empleados se requieren mayores estudios a nivel de la esteroidogénesis en el LO del pollo durante el desarrollo, así como un trabajo detallado que pruebe el rol de los NE 5β -reducidos en sistemas funcionales. No obstante, los presentes resultados permiten postular que durante la ontogenia temprana del SNC de las aves es probablemente la $3\beta,5\beta\text{-P}$, en lugar de su potente isómero $3\alpha,5\alpha\text{-P}$, el modulador endógeno principal del complejo receptor GABA_A .

Barbitúricos y neuroesteroides: ¿sitio de acción común o sitios diferentes?

Desde el inicio de los estudios con NE surgió la posibilidad de que los mismos actuaran en el receptor GABA_A a través de sitios moduladores previamente descriptos para barbitúricos. Ambos tipos de compuestos producen similares respuestas a nivel bioquímico (Majewska y col., 1986; Harrison y col., 1987; Gee y col., 1988), electrofisiológico (Peters y col., 1988; Hill-Venning y col., 1994) y aún

anestesiológico (Richards y White, 1981; Mok y col., 1991), incluyendo una propiedad común, la apertura del canal de Cl^- en forma GABA-independiente a altas concentraciones, que no presentan otros moduladores del receptor.

Los primeros trabajos sobre NE postularon que estos moduladores y los barbitúricos podían tener un sitio o mecanismo común de acción (Harrison y col., 1987). Se demostró inclusive una posible competencia entre ellos utilizando un barbitúrico para desplazar un NE sulfatado radioactivo (Majewska, 1990a). Sin embargo, otros trabajos sugirieron que los sitios de acción de ambos compuestos debían ser diferentes. Las evidencias que llevaron a esta diferenciación se basaron fundamentalmente en dos tipos de resultados: la aditividad de efectos de barbitúricos y NE al ser aplicados conjuntamente (Peters y col., 1988; Turner y col., 1989) y la posibilidad de desplazar sus efectos en forma diferencial (Kirkness y Turner, 1988).

No obstante, la mayoría de estos resultados no contó con una base metodológica sólida que permitiera concluyentemente demostrar sitios o mecanismos de acción diferentes para ambos compuestos. Los trabajos basados en la adición de efectos generalmente utilizaron concentraciones subsaturantes de los dos moduladores -en su mayoría fueron trabajos electrofisiológicos en los cuales no podía aplicarse una concentración bioquímicamente saturante de las drogas-.

Por otro lado las evidencias del desplazamiento diferencial de ambos moduladores fueron incompletas y poco concordantes con la farmacología establecida del receptor GABA_A . Basta citar, por ejemplo, la observación del efecto de PTX antagonizando un NE sin afectar la acción de barbitúricos, así como el efecto de bajas concentraciones de dicho convulsivante disminuyendo la unión de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ a la vez que disminuía la estimulación producida por el esteroide (Kirkness y Turner, 1988).

En conclusión, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la demostración de existencia o ausencia de un sitio común para ambos moduladores del receptor era fuertemente dependiente de los ligandos ensayados y de la preparación experimental empleada. Asimismo, no tuvieron en cuenta la propia heterogeneidad de sitios de reconocimiento para cada sustancia, la cual en muchos casos podía explicar con otro modelo gran parte de los resultados descriptos.

Teniendo en cuenta la dificultad metodológica intrínseca en la determinación de un sitio común o sitios diferentes de acción para barbitúricos y NE, en el presente trabajo se evaluaron los dos enfoques previamente aplicados: aditividad de efectos y desplazamiento diferencial de los mismos. En ambos casos, el hecho de contar con una preparación *in vitro* otorgó la ventaja de permitir el uso de altas concentraciones de los moduladores, que no pueden utilizarse en preparaciones fisiológicas ya que las respuestas medibles en estos estudios se saturan a menores concentraciones.

Los resultados obtenidos mostraron que al aplicar los dos moduladores conjuntamente -el barbitúrico en concentración saturante- la potenciación obtenida en la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores varió significativamente con la preparación de membranas sinápticas elegida.

En la preparación de membranas sinápticas congeladas la aplicación conjunta de PB y 3 α ,5 α -P presentó un claro efecto aditivo, con un desplazamiento de las curvas concentración-efecto para el NE obtenidas en presencia de la concentración fija de PB, sin alteración de los valores EC₅₀ de las mismas, sugiriendo sitios diferentes e independientes (Figura 25, Tabla XIII). Por el contrario, en membranas sinápticas frescas, no sometidas al exhaustivo procedimiento de congelación-descongelación, la aditividad entre ambas drogas estuvo ausente, obteniéndose una estimulación aproximadamente constante que no se diferenció de la producida por el PB actuando por sí solo. Este efecto se repitió en todos los estadios del desarrollo ensayados, indicando un patrón ontogenético constante.

Para verificar que esta variación entre los dos tipos de membranas sinápticas obedecía exclusivamente a la metodología de preparación empleada se hizo necesario descartar la posibilidad de una “desensibilización” bioquímica del receptor causada en las membranas frescas por la alta concentración de PB -enmascaramiento-, si bien en membranas congeladas la presencia de una concentración saturante del barbitúrico no había impedido observar el efecto aditivo sobre la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores. Dicha desensibilización pudo haberse manifestado como una imposibilidad de aumentar la relación unión específica/unión inespecífica en presencia de uno de los moduladores dado que el otro en concentración saturante ya estimulaba el máximo aumento en dicho cociente. A fin de verificar esta posibilidad se repitieron ensayos similares a los anteriores utilizando una baja concentración fija

de PB (Figura 26), la cual producía por si sola una estimulación pequeña de los sitios receptores GABAérgicos.

Nuevamente se observó un efecto aditivo entre el barbitúrico y el NE solamente en la preparación de membranas sinápticas congeladas -desplazamiento de las curvas concentración-efecto para el NE-, mientras que en las membranas frescas dicho efecto aditivo no fue detectado. Este segundo resultado, que también se corroboró en todos los estadios del desarrollo ensayados, permite concluir que la diferenciación de los sitios de acción entre ambos moduladores es fuertemente dependiente de la preparación empleada.

Para verificar esta posibilidad mediante un enfoque metodológico diferente, se ensayó el desplazamiento diferencial del efecto de ambos moduladores en presencia de PTX. Este convulsivante ha sido descrito por su acción de desplazamiento solamente sobre barbitúricos sin afectar la unión basal de [³H]GABA a sus sitios receptores, resultados también confirmados en la presente tesis -Figura 14-.

El uso de PTX en membranas sinápticas congeladas mostró que esta droga desplazaba significativamente el efecto estimulador del PB sin afectar el de la 3 α ,5 α -P, produciendo además una caída en el efecto aditivo de los dos moduladores coincidente con la pérdida del efecto del barbitúrico. En contraste, al ensayar la PTX en membranas frescas a las cuales se habían aplicado PB y 3 α ,5 α -P se observó que el convulsivante desplazaba tanto el efecto estimulador del barbitúrico como del NE (Figura 27).

Este resultado, junto a las variaciones observadas en la aditividad de efectos, permiten concluir que los barbitúricos y NE presentan sitios de acción que pueden ser diferenciados en membranas sinápticas congeladas, en las cuales ambos compuestos actúan independientemente. Por el contrario, en membranas sinápticas que no han sido sometidas a la congelación-descongelación, los sitios o mecanismos de acción de los dos moduladores no pueden diferenciarse, indicando que existe un sitio común para ambos (Viapiano y col., 1998b).

Un importante apoyo a este postulado proviene de resultados recientes obtenidos en ensayos de desacoplamiento del efecto de moduladores sobre los sitios receptores GABAérgicos (Friedman y col., 1996). En dichos ensayos se observó que la aplicación crónica de PB o pregnanolona a un cultivo de células neuronales

producía posteriormente la pérdida de efecto estimulador del barbitúrico o del NE respectivamente sobre los receptores GABA_A (desacoplamiento de sitios receptores y moduladores). Sorprendentemente, al desaparecer el efecto estimulador del barbitúrico también se perdía el del NE y viceversa, sugiriendo un acoplamiento funcional entre los sitios de acción de ambos moduladores en las células en cultivo.

Si bien la presente evaluación está limitada por tratarse de un enfoque indirecto sobre los sitios de reconocimiento del barbitúrico y el NE, la misma provee dos aproximaciones diferentes que permiten afirmar la posibilidad de un sitio común o sitios diferentes entre distintas preparaciones de membranas sinápticas. El uso de moduladores radioactivos, con los cuales se podría medir la unión directa de los mismos a sus sitios de reconocimiento, es la aproximación metodológica que permitiría demostrar más concluyentemente la naturaleza de la interacción entre barbitúricos y NE.

Durante el presente trabajo de tesis se intentaron realizar estudios de unión de [³H]3 α ,5 α -P en las preparaciones de membranas sinápticas, sin que se lograra obtener ningún éxito en dichos ensayos ya que la cantidad de unión inespecífica del NE tritado fue tan elevada que impidió su desplazamiento de la membrana aún con un exceso molar en tres órdenes de magnitud del mismo NE frío. Este resultado fue independiente del tiempo de incubación, temperatura o técnica de separación de las fracciones unida y libre, y se relaciona directamente con la elevada lipofilia de estos compuestos y su capacidad para introducirse en la membrana plasmática (Majewska, 1991). Este parece ser el principal obstáculo hasta el presente para obtener una demostración directa de la interacción molecular de estas sustancias con el receptor GABA_A, que no ha sido superado aparentemente por ningún grupo de trabajo. Las únicas evidencias sobre la unión de NE radioactivos se han obtenido con los NE sulfatados, que poseen una partición en membrana muy inferior a la de los metabolitos de la progesterona por presentar un importante grupo polar. Los problemas surgidos de la naturaleza lipofílica de los NE han sido considerados desde los primeros trabajos bioquímicos en los que se ensayaron estos compuestos (comentados por ejemplo en Harrison y col., 1987).

Es importante remarcar que las diferencias entre los resultados obtenidos fueron críticamente dependientes de la metodología de preparación de membranas

sinápticas empleada. Las evidencias en trabajos previos que habían demostrado una aditividad de efectos a nivel bioquímico para barbitúricos y NE fueron obtenidas en preparaciones de membranas sinápticas congeladas, coincidiendo con los resultados presentes en el mismo tipo de membranas. El hallazgo novedoso es la ausencia de dicha aditividad cuando la preparación de membranas sinápticas no es exhaustivamente tratada, lo cual sugiere que *in vivo* probablemente ambos moduladores actúen a través de un sitio de reconocimiento común.

Remoción de factores endógenos durante la congelación-descongelación de las membranas sinápticas.

El estudio del elevado número de subunidades que presenta el complejo receptor GABA_A -algunas de ellas descubiertas muy recientemente-, las posibles combinaciones funcionales de las mismas y su distribución en distintas áreas del SNC a lo largo del desarrollo demuestra que se ha realizado hasta el presente un gran avance en el conocimiento molecular de este complejo (Möhler y col., 1995; McKernan y Whiting, 1996). Los factores endógenos que pueden unirse al mismo son, sin embargo, mucho menos conocidos. Además de los propios ligandos naturales del complejo que se sintetizan en el SNC -GABA y NE- sólo se conocen algunas proteínas que pueden unir al mismo, tales como la GABAmodulina o el DBI -ya descriptos- cuyos roles en la neurotransmisión GABAérgica están incompletamente dilucidados.

En trabajos previos utilizando el mismo modelo experimental del presente estudio, se ha demostrado la existencia de un factor endógeno con actividad agonista sobre los sitios receptores de BZD (Fischer de Plazas y Gravielle, 1994), obtenido en los sobrenadantes de repetidos lavados de la preparación de membranas sinápticas. Este resultado indica que el receptor GABA_A no se encuentra aislado en la membrana en condiciones funcionales, sino asociado a factores que de cierta manera regulan su actividad, ya sea por interacción con los propios sitios receptores GABAérgicos o con los diversos sitios modulatorios presentes en el complejo.

El proceso de congelación-descongelación puede producir diversas alteraciones estructurales en la membrana (Toffano y col., 1981) o en los propios receptores (Strambini y Gabellieri, 1996), como se ha demostrado en otros modelos experimentales (Rodríguez Puertas y col., 1996). Asimismo, este proceso remueve posibles factores asociados al receptor -o la membrana-, que también están involucrados en su funcionalidad, resultando de la misma manera en un cambio en las respuestas observadas (Fischer de Plazas y col., 1993).

En el presente estudio las diferencias más importantes en las respuestas observadas entre membranas sinápticas frescas y congeladas consistieron en la aparición de dos poblaciones de sitios receptores GABAérgicos y la separación de los sitios moduladores de barbitúricos y NE. A fin de determinar la posible presencia de factores endógenos que estuvieran involucrados en estas diferencias, los sobrenadantes obtenidos de los lavados post-congelación -fuente principal de esos factores putativos- fueron concentrados, separados de GABA endógeno y probados nuevamente sobre las membranas congeladas.

Por supuesto, las alteraciones estructurales producidas por la congelación no pueden revertirse, por lo que dicha “reconstitución” no tuvo como objeto intentar devolver las membranas sinápticas a un estado pre-congelado, sino solamente verificar el posible rol de factores liberados de las mismas con la congelación-descongelación.

Posibles factores moduladores del receptor GABA_A .

Con la preparación de SN de lavados de las membranas sinápticas congeladas se trató de reestablecer en las mismas la fracción proteica que podía haber sido removida durante la congelación-descongelación. El seguimiento del perfil de elución cromatográfico de los SN mediante absorbancia UV a 280 nm (Figura 28), el alto PM de la fracción recuperada (mayor de 2500 Da) y la posibilidad de dosaje proteico en ausencia de contaminantes (aminoácidos, sales de Tris concentradas, detergentes) indican que las fracciones de SN ensayadas contenían efectivamente proteínas (Lagos

y col., 1983) sin contaminación de sustancias de bajo PM que pudieran provocar efectos inespecíficos en la unión de [³H]GABA o en su modulación.

Los resultados obtenidos en presencia de los SN ensayados mostraron un aumento significativo en la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores (Figura 29), siendo ésta una confirmación de que dichos SN carecían de GABA ya que, en caso contrario, se habría producido una inhibición competitiva de la unión del radioligando.

Este aumento en la unión específica de [³H]GABA en membranas sinápticas congeladas indica que se agregó algún componente con acción positiva sobre los receptores sin que este resultado pueda considerarse una reconstitución que devuelve las membranas sinápticas al estado de membranas frescas, ya que en las mismas la unión específica de [³H]GABA era comparativamente menor a la de las membranas congeladas (Figura 10). Esta diferencia con los resultados previos pudo haber sido causada por el agregado de una concentración proteica mayor que la que había sido removida por la congelación (las concentraciones proteicas removida y reconstituida fueron similares en porcentaje pero pueden haber diferido en la relación estequiométrica de sus componentes).

Las modificaciones observadas en la unión específica basal de [³H]GABA a sus sitios receptores, si bien no permiten concluir el mecanismo bioquímico que las produce (ya que no se contó con la suficiente masa de SN como para poder aplicarlos en ensayos de desplazamiento), están indudablemente relacionadas con una acción específica de dichos SN en el complejo receptor. Por consiguiente las alteraciones en la modulación de la unión de [³H]GABA en presencia de los SN son igualmente debidas a un efecto de los mismos estrictamente sobre el complejo.

Al aplicarse los moduladores ya conocidos -barbitúricos y NE- a las membranas sinápticas congeladas en presencia de SN se observó una marcada reducción en su efecto estimulador, la cual fue concentración-dependiente respecto de cualquiera de los SN ensayados. Se obtuvo hasta un 60 % de disminución en el efecto del PB y un 70 % en el efecto de la 3 α ,5 α -P en presencia de los SN, con respecto a sus efectos estimuladores sin agregados de sobrenadantes (Figura 30). Una disminución que hubiera sido porcentualmente igual al aumento en la unión basal de [³H]GABA (30 a 40%) podría haber indicado una acción de dichos SN solamente

sobre los sitios receptores GABAérgicos tal que aumentase la unión del radioligando pero no su potenciación. En cambio el resultado obtenido, con una disminución en la potenciación mucho mayor que el aumento en la unión basal de [³H]GABA, indica que la fracción proteica de los SN interfirió directamente con los sitios de reconocimiento de barbitúricos y NE, disminuyendo su efecto estimulador.

Por otro lado, el agregado de SN disminuyó en similar proporción el efecto aditivo de los dos moduladores, sin llegar a anularlo completamente. Este resultado coincide con los anteriores y demuestra una importante alteración en la respuesta de los receptores presentes en la membranas sinápticas congeladas -que presentaban sitios de acción diferentes para barbitúricos y NE- al restaurarles la fracción proteica removida con la congelación-descongelación. La disminución de aditividad observada sugiere que, si los sitios de acción de PB y 3 α ,5 α -P se superponen en membranas frescas -y, presumiblemente, *in vivo*-, puede existir un componente proteico que mantenga estable dicha asociación. Al ser removido el mismo durante la congelación-descongelación, no se produce pérdida del efecto de ninguno de los dos moduladores, pero sus sitios de acción se exponen por separado, dando el efecto aditivo observado en membranas congeladas.

El intento de subfraccionamiento en Sephadex G100 de la fracción proteica de SN obtenida no dio como consecuencia una separación en picos proteicos diferenciados, manteniéndose no obstante en el eluato recuperado la actividad inhibitoria sobre la potenciación de PB y 3 α ,5 α -P (Figura 32). Dado que la elección de las condiciones cromatográficas -longitud de corrida, velocidad de elución, controles proteicos ensayados- era apropiada para separar proteínas de diferente PM dentro de los límites del gel utilizado, es posible que el o los componentes proteicos contenidos en esta fracción sean de un peso molecular muy elevado y no hayan podido ser resueltos. Otra posibilidad es que se trate de un agregado soluble de proteínas (Lagos y col., 1983) obtenido después de la congelación, que retiene la actividad sobre los sitios receptores GABAérgicos y los sitios moduladores.

Más allá de la naturaleza molecular del factor o factores putativos hallados en los SN ensayados, cuya purificación escapa a los objetivos del presente estudio, el resultado más importante es la descripción de un efecto producido con la congelación de membranas sinápticas -aditividad de acción de drogas modulatorias-, parcialmente

revertido por el agregado de componentes removidos durante dicha congelación (Viapiano y col., 1998b). Esto sugiere la existencia de factores endógenos asociados al receptor, que podrían intervenir en el efecto de sustancias modulatorias, siendo por consiguiente posibles elementos reguladores en la funcionalidad del complejo receptor GABA_A.

Consideraciones metodológicas finales.

A lo largo del presente estudio se demostraron las variaciones que la metodología empleada introduce en las respuestas observadas del receptor GABA_A en el modelo estudiado, pudiendo llevar por lo tanto a conclusiones opuestas sobre el efecto de compuestos modulatorios en dicho receptor. Los resultados obtenidos mostraron como un simple tratamiento de congelación-descongelación en la preparación de membranas sinápticas, empleado como rutina en la mayoría de los estudios bioquímicos sobre receptores, genera importantes diferencias en el momento de definir el modelo de modulación de los sitios receptores por otros ligandos.

La elección de una preparación u otra al elegir un abordaje de estudio del receptor queda por lo tanto sometida al balance de ventajas y desventajas que presenta trabajar con cada tipo de muestra. Las membranas sinápticas congeladas poseen ventajas operativas de trabajo -el fraccionamiento subcelular y los ensayos de unión de radioligandos pueden realizarse en etapas separadas-, rinden una mejor relación entre unión específica e inespecífica, y no poseen pérdida de la modulación de los sitios receptores de baja afinidad por otros ligandos, a diferencia de otros procedimientos exhaustivos como puede ser el tratamiento de las membranas con detergentes.

Por otro lado, la población de sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad que se detecta es aparentemente una fracción de complejos receptores insensibilizados a moduladores como consecuencia de la congelación, y los mismos sitios de acción de dichos moduladores se separan, obteniéndose resultados al estudiar la acción conjunta de varias drogas modulatorias que probablemente no puedan ser extrapolados a la situación *in vivo*.

Las membranas sinápticas frescas, por el contrario, presentan complejos receptores en una condición más cercana al estado nativo de los mismos en las sinapsis funcionales, resultando por lo tanto un modelo más valioso desde el punto de vista biológico. Como contraparte, son una elección ardua desde el punto de vista operativo y contienen mayores niveles de GABA endógeno, siendo más difícil por consiguiente detectar resultados representativos.

Las evidencias obtenidas en la presente tesis permiten afirmar que la elección metodológica final en el desarrollo de estudios de receptores -o, a un nivel más amplio, en cualquier estudio de un sistema biológico- es un factor que deberá tenerse en cuenta en base a qué preguntas se planteen, qué diversidad de herramientas pueda emplearse para responderlas y finalmente, qué influencia pueda tener la metodología empleada en las respuestas observadas.

Consideraciones ontogenéticas finales.

Los objetivos principales del presente estudio fueron cumplidos mediante el análisis de la presencia y modulación del complejo receptor GABA_A a lo largo del desarrollo ontogenético en un área representativa del SNC de las aves. El uso de diversas metodologías fue una estrategia destinada a revelar más detalladamente diferencias entre estadios del desarrollo que podrían haber pasado desapercibidas con un único abordaje metodológico.

Analizando ontogenéticamente las evidencias obtenidas de los sitios receptores GABAérgicos, el primer resultado de interés es la sobre-expresión en la densidad de los mismos en forma transitoria hacia el nacimiento, coincidiendo con la etapa de mayor plasticidad sináptica a lo largo del desarrollo. La aplicación de distintas metodologías demuestra que todos los estadios analizados poseen una subpoblación de receptores afectada por la congelación, con excepción del estadio prenatal más temprano (Ed 14) en el cual los receptores correspondientes aun no están presentes en la membrana sináptica.

Si se analiza a lo largo de la ontogenia la modulación de los sitios receptores, se observa que los mismos son estimulados por NE y barbitúricos durante todo el

desarrollo, con un perfil edad-dependiente, indicando que los sitios de reconocimiento para moduladores están acoplados a los sitios receptores GABAérgicos desde etapas prenatales tempranas. La mayor sensibilidad a los moduladores se manifiesta precisamente en los estadios tempranos del desarrollo -prenatal para barbitúricos y recién nacidos para NE-, siendo este el período en el cual el receptor presenta la mayor variabilidad en sus respuestas funcionales.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de tener en cuenta en todo estudio farmacológico del complejo receptor GABA_A las variaciones entre estadios del desarrollo, ya que concentraciones de sustancias que en un estadio son inefectivas, pueden poseer a su vez una acción significativa en otras etapas ontogénicas. Este considerando debe aplicarse ante la posible utilidad farmacológica de nuevas sustancias en evaluación -NE en este caso-.

Por otro lado, el hecho de que los NE presenten un perfil de acción edad-dependiente, incluyendo un aumento en la complejidad de sus sitios de reconocimiento a medida que transcurre el desarrollo, refuerza el posible rol de estos esteroides como factores reguladores de la neurotransmisión en las etapas de maduración del SNC (Viapiano y col., 1998a). Al respecto, se ha demostrado que estos compuestos endógenos están involucrados en procesos relacionados con el modelado sináptico y la citoarquitectura neuronal durante la ontogenia (Brinton, 1994; Schumacher y col., 1996).

La observación de una actividad moduladora común de los NE con los barbitúricos en membranas sinápticas frescas, la diferenciación de sus sitios de acción en membranas congeladas en todos los estadios del desarrollo y el agregado de SN que disminuyen la aditividad observada entre ambos compuestos, son resultados que, evaluados conjuntamente, permiten postular la existencia de factores endógenos asociados al complejo receptor. Los mismos serían mediadores de un efecto común de barbitúricos y NE, estando por lo tanto relacionados con la actividad moduladora en el receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia.

A nivel de aplicación clínica, dicha actividad equivalente para barbitúricos y NE sugiere acciones farmacológicas comunes, varias de las cuales -efectos anestésicos y anticonvulsivantes- han sido observadas, mientras que otras se encuentran ausentes en NE -efecto sedante-. El estudio de estos esteroides en la

ontogenia del SNC presenta por lo tanto gran importancia no solamente en la investigación básica sino también por sus posibles proyecciones terapéuticas..

La aplicación de diversas metodologías en el estudio ontogenético de los sitios receptores GABAérgicos, así como en el estudio de la modulación de dichos sitios, muestra que las mayores variaciones en los resultados obtenidos se producen siempre en estadios tempranos del desarrollo. Estas variaciones entre estadios reflejarían una modificación en la estructura molecular del complejo receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia. Inicialmente existiría un predominio en la membrana de combinaciones de subunidades más lábiles y sensibles a ligandos moduladores, en las etapas tempranas -más plásticas- del desarrollo, previas a la organización selectiva de sinapsis. Posteriormente, nuevas combinaciones producirían complejos menos lábiles y a su vez menos sensibles a dichos moduladores durante el desarrollo postnatal, en coincidencia con la estabilización de los circuitos neuronales en el modelo estudiado.

Un resumen del modelo de sitios receptores y moduladores que puede desprenderse de los resultados demostrados en el presente trabajo de tesis se encuentra en la Figura 33, en la cual se ha detallado el desarrollo ontogenético (a partir de Ed 16) de los diversos sitios en el complejo receptor y a la vez, las alteraciones observadas en cada estadio del desarrollo al cambiar la metodología utilizada para su estudio.

Puede observarse en dicho modelo cómo la congelación-descongelación es causante principalmente de una separación de componentes del complejo, revelada a través de múltiples sitios GABAérgicos y diferenciación entre los sitios moduladores. Por otro lado, el seguimiento ontogenético muestra la variación en la complejidad de esos sitios moduladores (disminuye para barbitúricos y aumenta para NE), probablemente relacionada con las distintas funciones que los moduladores del receptor -NE u otros ligandos endógenos- pueden tener a lo largo del desarrollo.

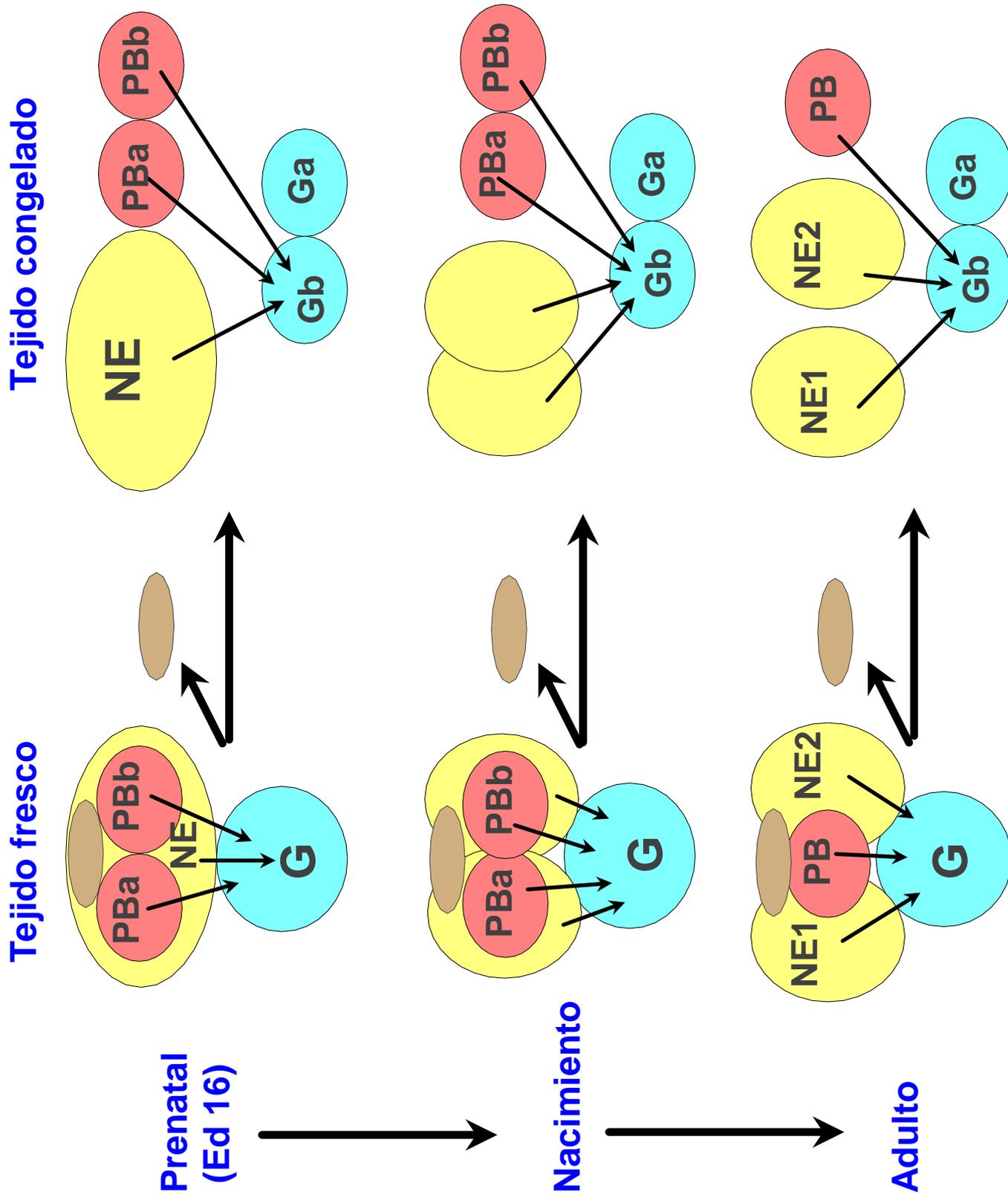


Figura 33: Modelo de interacción entre los sitios de unión de [3 H]GABA (G) y los sitios moduladores que unen barbitúricos (PB) o neuroesteroides (NE), basado en los resultados experimentales del presente estudio.

Ga, Gb: sitios receptores de alta y baja afinidad por GABA, respectivamente.

PBa, PBb: sitios moduladores que unen PB con alta y baja afinidad.

NE1, NE2: sitios moduladores que unen NE con distintas propiedades estructurales.

El óvalo que se desprende del complejo receptor con el proceso de congelación/descongelación representa el factor o factores asociados a los sitios moduladores. Las flechas indican sobre qué sitios GABAérgicos ejercen su acción los moduladores estudiados.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis permite realizar las siguientes conclusiones en relación a la ontogenia de los sitios receptores GABAérgicos y su modulación en el modelo estudiado:

- Existe una etapa de sobre-expresión transitoria de sitios receptores GABAérgicos en el período del nacimiento y postnatal inmediato, debida principalmente a un incremento en la densidad total de sitios receptores.
- Estos sitios receptores GABAérgicos se revelan como una única población de baja afinidad por GABA en membranas sinápticas no congeladas, mientras que la congelación-descongelación expone una segunda población de alta afinidad.
- Los sitios receptores de baja afinidad estudiados son modulables en todos los estadios del desarrollo por barbitúricos y NE, indicando que el acoplamiento entre sitios moduladores y receptores ocurre desde las más tempranas etapas de la ontogenia. Estas sustancias moduladoras presentan un perfil de acción edad-dependiente, siendo los estadios tempranos del desarrollo los más sensibles a su acción.
- Por el contrario, los sitios receptores de alta afinidad no presentan variaciones ontogénicas significativas, siendo además insensibles a la acción de los moduladores empleados. Esto sugiere que, si bien puede tratarse de una subpoblación real de receptores revelada por la congelación, los mismos carecerían de una funcionalidad biológica explicable.
- La presencia de una heterogeneidad de sitios de reconocimiento para barbitúricos y NE, con diversos perfiles edad-dependientes, indica que hay una variación en las respuestas del receptor a los ligandos moduladores durante el desarrollo. Dicha

variación puede estar relacionada con cambios en la aparición o en el papel biológico de los ligandos moduladores endógenos del receptor.

- En todos los estadios del desarrollo estudiados los barbitúricos y NE actúan a través de un único sitio de acción en la preparación de membranas sinápticas frescas, sugiriendo una posible acción común *in vivo*.

- La congelación-descongelación de las membranas sinápticas produce una separación entre los sitios moduladores de barbitúricos y NE, actuando los mismos en forma aditiva. La restitución de componentes removidos de las membranas congeladas reduce esta aditividad de efectos, sugiriendo la existencia de factores endógenos asociados al complejo receptor que intervienen en la acción común de diversos ligandos moduladores del complejo.

Los resultados obtenidos son de importancia para comprender las variaciones ontogénicas en la estructura del complejo receptor GABA_A y por lo tanto, en las respuestas funcionales del mismo. En forma similar, la existencia de factores endógenos asociados al complejo receptor es relevante en la determinación de sus mecanismos de modulación en la sinapsis.

Por consiguiente, estos resultados proveen fundamentos bioquímicos que pueden utilizarse para comprender el rol fisiológico de los receptores GABA_A durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central.¹

Lic. Mariano S. Viapiano

Dra. Sara Fiszer de Plazas

¹Los resultados obtenidos en el presente estudio de tesis doctoral han sido dados a conocer a través de las publicaciones indicadas en las referencias bibliográficas N° 86, 287, 288, 289 y 290.

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se estudió el perfil de aparición y la modulación farmacológica del complejo receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia del lóbulo óptico de las aves. Dicha estructura mesencefálica presenta un tejido rico en sinapsis GABAérgicas involucradas en la funcionalidad de los circuitos de procesamiento visual y las variaciones bioquímicas de estos receptores se consideran representativas de eventos plásticos en las conexiones neuronales durante el desarrollo.

En este estudio se utilizaron diversas técnicas en la preparación de las membranas sinápticas (ciclos de lavado y congelación-descongelación) como estrategia para determinar variaciones entre estadios del desarrollo en los complejos receptores que no hubieran sido detectables utilizando una única metodología.

Los resultados obtenidos mostraron un período de sobre-expresión transitoria de los sitios receptores GABAérgicos correspondiente al nacimiento y período postnatal inmediato, coincidiendo con la etapa de mayor plasticidad sináptica a lo largo del desarrollo. Esta sobre-expresión se debió fundamentalmente a un incremento en la densidad máxima de sitios receptores. En la preparación de membranas sinápticas sometidas a congelación-descongelación se observaron dos poblaciones de sitios receptores, de alta y baja afinidad por GABA. Los mismos fueron detectados en todos los estadios del desarrollo estudiados con excepción de los más tempranos, en los cuales la fracción de receptores sensible a la congelación no se hallaría aun presente en el terminal sináptico. Por otro lado, en las membranas sinápticas no congeladas solamente fue detectable la población de baja afinidad.

Al evaluar a lo largo de la ontogenia la modulación de la unión de [³H]GABA a sus sitios receptores por barbitúricos y neuroesteroides, se observó que dichos moduladores producían una estimulación alostérica de los sitios receptores GABAérgicos de baja afinidad en todos los estadios del desarrollo ensayados, indicando que los sitios modulatorios están acoplados a los sitios receptores GABAérgicos desde etapas prenatales tempranas.

El perfil de acción fue diferente para cada modulador siendo en ambos casos edad-dependiente. Se observó una heterogeneidad de sitios modulatorios, tanto para

barbitúricos en estadios prenatal y de recién nacidos, como para neuroesteroides en animales adultos. La mayor sensibilidad a los moduladores se manifestó en los estadios tempranos del desarrollo -prenatal para barbitúricos y recién nacidos para neuroesteroides-, coincidiendo con etapas en las cuales el receptor presenta gran variabilidad en sus respuestas funcionales.

La heterogeneidad de sitios modulatorios para neuroesteroides, junto al hallazgo de una nueva relación estructura-actividad para estas sustancias, no coincidente con la previamente conocida en mamíferos, indican una compleja interacción de estos esteroides con el receptor GABA_A en aves y sugieren un probable rol regulatorio de los mismos en etapas ontogenéticas tempranas.

Por otro lado, los sitios receptores GABAérgicos de alta afinidad fueron insensibles a la acción de los moduladores empleados, y no presentaron además variaciones ontogenéticas significativas. Estos resultados permiten postular que, si bien dichos sitios pueden representar una subpoblación real de receptores revelada por la congelación, la misma carecería de una funcionalidad biológica explicable.

La aplicación de diversas metodologías en la observación del perfil de aparición de los sitios receptores GABAérgicos, así como en el estudio de la modulación de dichos sitios, demostró que en todos los casos los estadios tempranos del desarrollo presentaban las mayores variaciones entre distintas preparaciones de membranas sinápticas. Estas diferencias en sensibilidad a la metodología entre estadios reflejarían una modificación en la estructura molecular del complejo receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia.

Al analizar la acción estimuladora conjunta de barbitúricos y neuroesteroides se manifestaron notorias diferencias en todos los estadios del desarrollo estudiados entre las dos preparaciones de membranas sinápticas empleadas. Se observó que en membranas sinápticas no congeladas ambos moduladores actuaban a través de un sitio de reconocimiento común, mientras que en membranas congeladas presentaban efectos aditivos y eran diferencialmente desplazados por un antagonista GABAérgico, indicando una diferenciación de sus sitios de acción.

La fracción proteica extraída durante la congelación de membranas fue concentrada y aplicada a las mismas, produciendo una significativa disminución en la aditividad de efectos observada para ambos moduladores. Este resultado,

conjuntamente con los anteriores permite postular la existencia de factores endógenos asociados al complejo receptor, removidos durante la congelación-descongelación de las membranas sinápticas. Los mismos serían mediadores de un efecto común de barbitúricos y neuroesteroides *in vivo*, estando por lo tanto relacionados con la modulación del receptor GABA_A a lo largo de la ontogenia.

Los resultados obtenidos demuestran por lo tanto significativas variaciones ontogénicas en el complejo receptor GABA_A, tanto en sus sitios de reconocimiento de GABA como de ligandos moduladores. Estas variaciones son relevantes para comprender las modificaciones en las respuestas funcionales del complejo receptor a lo largo del desarrollo. En forma similar, la existencia de factores endógenos asociados al receptor es de importancia en la determinación de sus mecanismos naturales de modulación en la sinapsis.

El presente estudio provee entonces los fundamentos bioquímicos que pueden utilizarse para comprender la función de estos receptores durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central.

Título: “Ontogenia del complejo receptor GABA_A en el Sistema Nervioso Central de las aves: modulación por barbitúricos, neuroesteroides y factores endógenos.”

Palabras clave: receptor GABA_A, barbitúricos, neuroesteroides, desarrollo del SNC, moduladores endógenos, lóbulo óptico del pollo.

SUMMARY

The presence and pharmacological modulation of GABA_A receptor complex were studied in developing chick optic lobe. This mesencephalic structure presents a large amount of GABAergic synapses involved in visual processing so that biochemical modifications of GABA_A receptors are representative of plasticity in neural connections during development.

Synaptic membranes were prepared according to two different methodologies (washing cycles and freezing-thawing), as a strategy to detect variations among developmental stages not disclosed by a single procedure.

Our results show a transient over-expression of [³H]GABA binding at hatching, the stage of greatest synaptic plasticity during development, most likely due to an increase in density of GABA receptor sites. In frozen-thawed membranes two populations of GABA binding sites, with high and low affinity for the radioligand, were observed at all developmental stages studied with the exception of the earliest one (14-day embryos). This result suggests that the fraction of receptor complexes affected by the freezing-thawing procedure are not yet present in synaptic membranes at that prenatal stage. On the other hand, non-frozen (fresh) membranes only showed a population of low-affinity GABA binding sites.

On analyzing the modulation of [³H]GABA binding by barbiturates and neurosteroids, both modulators were found to be allosteric stimulators of low-affinity GABA binding sites at all developmental stages studied, indicating that modulatory and GABA binding sites are coupled since early prenatal development.

The observed stimulation was drug- and age-dependent. Modulatory sites presented heterogeneity for barbiturates at early developmental stages as well as for neurosteroids in adult animals. Maximal sensitivity to modulators was found at early development -prenatal stages and newly hatched chicks-, in agreement with the period of greatest variability in receptor functional responses.

Neurosteroids stimulatory effect presented a new structure-activity relationship, different from the one previously known for mammals. This finding, along with the heterogeneity of steroid recognition sites, indicates a complex interaction of these

endogenous substances with the receptor in avian Central Nervous System, suggesting a probable regulatory role during early stages of development.

At all stages studied, high-affinity GABA binding sites were unaffected by modulatory drugs and showed few variations during ontogeny. These findings allow us to conclude that, although these binding sites may well represent a fraction of total receptors exposed by freezing-thawing, they would lack a relevant biological function.

The use of diverse methodologies in the preparation of synaptic membranes to study GABA binding sites or modulatory sites showed the greatest variation at prenatal and hatching stages. This differential sensitivity to methodologies is indicative of molecular modifications in GABA_A receptor structure during development.

On comparing the stimulatory effect of barbiturates and neurosteroids acting jointly, we found significant differences at all developmental stages between the two membrane preparation procedures. In fresh membranes both modulators acted through a common recognition site, whereas in frozen membranes they showed additive effects and differential displacement with a GABAergic antagonist, indicating dissimilar modulatory sites.

Protein components extracted during the freezing-thawing procedure were concentrated and assayed on frozen membranes, decreasing the additive effect previously observed. Taken together, these results suggest the existence of endogenous factors associated to the receptor complex, removed during freezing-thawing cycles. They would produce a common effect for barbiturates and neurosteroids *in vivo*, related to GABA_A receptor modulation during ontogeny.

In conclusion, we have demonstrated ontogenetic variations in GABA_A receptor properties supporting functional modifications of this receptor complex during development. We also postulate the existence of endogenous factors associated to the receptor, useful to determine its natural regulatory mechanisms in the synapse. Consequently, our present study provides a tentative biochemical basis to understand the role of these receptors during Central Nervous System development.

Title: "Ontogeny of GABA_A receptor complex in avian Central Nervous System: modulation by barbiturates, neurosteroids and endogenous factors."

Keywords: GABA_A receptor, barbiturates, neurosteroids, CNS development, endogenous modulators,

chick optic lobe.

BIBLIOGRAFIA

1. 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. (1991) Neurosteroids: Biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **40**, 71-81.
2. Ali, S. F., Hong, J. S., Bondy, S. C. (1983) Response of neuropeptides and neurotransmitter binding sites in the retina and brain of the developing chick to reduced visual input. *Int. J. Devl. Neuroscience* **1**, 99-103.
3. Allan A. M., Harris R. A. (1986) Anesthetic and convulsant barbiturates alter γ -aminobutyric acid-stimulated chloride flux across brain membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**, 763-768.
4. Amin J., Weiss D. S. (1993) GABA_A receptor needs two homologous domains of the α subunits for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**, 565-569.
5. Anholt, R. R., Pedersen, P. L., De Souza, E. B., Snyder, S. H. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **261**, 576-583.
6. Aragonés, A., Gonzalez, C. B., Lantos, C. P., Sancovich, H. A. (1985) Progesterone, its A/B cis reduction and delta-aminolevulinic acid synthetase in the developing hen. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **35**, 379-397.
7. Aragonés, A., Gonzalez, C. B., Spinedi, N. C., Lantos, C. P. (1991) Regulatory effects of 5β reduced steroids. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **39**, 253-263.
8. Araki, T., Kiyama, H., Tohyama, M. (1992) GABA_A receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. *Neuroscience* **51**, 583-591.
9. Arunlakshana, O., Schild, H. O. (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **14**, 48-58.
10. Asakura, T., Ikeda, Y., Matsuda, M. (1983) 4-aminobutiraldehyde as a substance convertible in vivo to GABA. *J. Neurochem.* **40**, 294-296.

11. Asano, T., Spector, S. (1979) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous ligands for the brain benzodiazepine-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 977-981.
12. Asano T., Ogasawara N. (1981) Stimulation of GABA receptor binding by barbiturates. *Eur. J. Pharmacol.* **77**, 355-357.
13. Awapara, J., Landua, A., Fuerst, R., Seale, B. (1950) Free γ -aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* **187**, 33-39.
14. Backus, K. H., Arigoni, M., Drescher, U., Scheurer, L., Malherbe, P., Mohler, H., Benson, J. A. (1993) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification. *Neuroreport* **5**, 285-288.
15. Batuecas, A., Cubero, A., Barat, A., Ramírez, G. (1987a) The GABA_A receptor complex in the developing chick optic tectum: characterization of [³H]-muscimol binding sites. *Neurochem. Int.* **10**, 405-411.
16. Batuecas, A., Cubero, A., Barat, A., Ramírez, G. (1987b) The GABA_A receptor complex in the developing chick optic tectum: ontogeny of [³H]-muscimol, [³H]-flunitrazepam and [³⁵S]-TBPS binding sites. *Neurochem. Int.* **10**, 425-431.
17. Baulieu, E. E., Robel, P. (1990) Neurosteroids, a new brain function? *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37**, 395-403.
18. Belelli, D., Bolger, M. B., Gee, K. W. (1989) Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur. J. Pharmacol.* **166**, 325-329.
19. Belhage, B., Meier, E., Schousboe, A. (1986) GABA-agonists induce the formation of low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells via preexisting high-affinity GABA receptors. *Neurochem. Res.* **11**, 599-606.
20. Belhage, B., Damgaard, I., Saederup, E., Squires, R. F., Schousboe, A. (1991) High- and low-affinity GABA receptors in cultured cerebellar granule cells regulate transmitter release by different mechanisms. *Neurochem. Int.* **19**, 475-482.
21. Bitran, D., Hilvers, R. J., Kellog, C. K. (1991) Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [β]-pregnan-20-one; endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA_A receptor. *Brain Res.* **561**, 157-161.

22. Bitran, D., Shiekh, M., McLeod, M. (1995) Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptors. *J. Neuroendocrinol.* **7**, 171-177.
23. Blair, L. A., Levitan, E. S., Marsahll, J., Dionne, V. E., Barnard, E. A. (1988) Single subunits of the GABA_A receptor form ion channels with properties of the native receptor. *Science* **242**, 577-579.
24. Bloom, F., Iversen, L. (1971) Localizing [³H]-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* **229**, 628-630.
25. Boemaker, J. (1980) Colour vision in birds and the role of oil droplets. *Trends Neurosci.* **3**, 196-199.
26. Bondy, S. C., Purdy, J. L. (1977) Development of neurotransmitter uptake in regions of the chick brain. *Brain Res.* **119**, 403-416.
27. Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A. L. (1983) Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br. J. Pharmacol.* **78**, 191-206.
28. Braestrup, C., Nielsen, M. (1983): Benzodiazepine Receptors. In: *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 17, (Iversen, L. L., Iversen, S. D., Snyder, S. H., eds.), pp 285-384. Plenum Press, New York.
29. Brinton, R. D. (1994) The neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **14**, 2763-2774.
30. Bureau, M., Olsen, R. W. (1988) γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor protein carries binding sites for both ligands on both two major peptide subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1006-1011.
31. Callachan, H., Cottrell, G. A., Hather, N. Y., Lambert, J. J., Nooney, J. M., Peters, J. A. (1987) Modulation of the GABA_A receptor by progesterone metabolites. *Proc. R. Soc. Lond.* **B231**, 359-369.
32. Carlson, B. X., Mans, A. M., Hawkins, R. A., Baghdoyan, H. A. (1992) Pentobarbital-enhanced [³H]-Flunitrazepam binding throughout the rat brain: an autoradiographic study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 1401-1414.

33. Casalotti, S. O., Stephenson, F. A., Barnard, E. A. (1986) Separate subunits for agonist and benzodiazepine binding in the γ -aminobutyric acid A receptor oligomer. *J. Biol. Chem.* **261**, 15013-15016.
34. Cashim, M. F., Moravsek, V. (1927) The physiological actions of cholesterol. *Am. J. Physiol.* **82**, 294-298.
35. Celloti, F., Melcagni, R. C., Martini, L. (1992) The 5α -reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front. Neuroendocr.* **13**, 163-215.
36. Changeux, J. P., Danchin, A. (1976) Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* **264**, 705-712.
37. Cherubini, E., Gaiarsa, J., Ben-Ari, Y. (1991) GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* **14**, 515-519.
38. Cherubini, E., Stratta, F. (1997) GABA_C receptors, a novel receptor family with unusual pharmacology. *News Physiol. Sci.* **12**, 136-141.
39. Chiu, T. H., Rosenberg, H. C. (1979) Differential effects of Triton X-100 on benzodiazepine and GABA binding in a frozen-thawed synaptosomal fraction of rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **58**, 335-338.
40. Corda, M. G., Guidotti, A. (1983) Modulation of GABA receptor binding by Ca^{++} . *J. Neurochem.* **41**, 277-280.
41. Corda, M. G., Giorgi, O., Biggio, G. (1986) Behavioural and biochemical evidence for a long-lasting decrease in GABAergic function elicited by chronic administration of FG 7142. *Brain Res.* **384**, 60-67.
42. Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjoval, J., Baulieu, E. E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4704-4707.
43. Corpéchet, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjoval, J., Vihko, R., Baulieu, E. E., Robel, P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.* **270**, 119-125.
44. Corpéchet, C., Leclerc, P., Baulieu, E. E., Brazeau, P. (1985) Neurosteroids: regulatory mechanism in male rat brain during heterosexual exposure. *Steroids* **45**, 229-234.
45. Costa, E., Guidotti, A. (1979) Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepine. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 531-545.

46. Costa, E., Barnard, E. (eds.) (1988) *The allosteric modulation of amino acid receptors and its therapeutics implications*. Raven Press, New York.
47. Costa, E., Cheney, D. L., Grayson, D. R., Korneyev, A., Longone, P., Pani, L., Romeo, E., Zivkovich, E., Guidotti, A. (1994) Pharmacology of neurosteroid biosynthesis. Role of the mitochondrial DBI receptor (MDR) complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **746**, 223-242
48. Cottrell, G. A., Lambert, J. J., Peters, J. A. (1987) Modulation of GABA_A receptor activity by alphaxalone. *Br. J. Pharmacol.* **90**, 491-500.
49. Crossland, W., Cowan, W., Rogers, L., Kelly, J. (1974) The specification of the retinotectal projections in the chick. *J. Comp. Neurol.* **155**, 127-164.
50. Cuenod, M., Streit, P (1980) Aminoacids transmitters and local circuitry in optic tectum. In *The Neurosciences* (Schmidt, F. O., Warden, F. G., eds.), pp 989-1004. MIT Press, Cambridge, USA.
51. Davis, L. G., Cohen, R. K. (1980) Identification of an endogenous peptide-ligand for the benzodiazepine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 141-148.
52. Davis, W., Ticku, M. K. (1981) Ethanol enhances [³H]-Diazepam binding at the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Mol. Pharmacol.* **20**, 287-294.
53. De Blas, A. L., Sangameswaran, L. (1986) Demonstration and purification of an endogenous benzodiazepine form the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Life Sci.* **39**, 1927-1936.
54. De Feudis, F., Ossola, L., Mandel, P. (1979) More muscimol binding sites than GABA binding sites in a particulate fraction of the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2687-2689.
55. De Feudis, F. (1981) Muscimol binding and GABA receptors. *Drug. Devl. Res.* **1**, 93-105.
56. DeFeudis, F. V. (1983) Psychoactive agents and GABA receptors. *Pharmac. Res. Commun.* **15**, 29-39.
57. De Long, C., Coulombre, A. (1965) Development of the retinotectal topographic projections in the chick embryo. *Exp. Neurol.* **13**, 350-363.

58. Demirgoren, S., Majewska, M. D., Spivak, C. E., London, E. D. (1991) Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA_A receptor. *Neuroscience* **45**, 127-135.
59. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L. (1962a) Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. *J. Neurochem.* **9**, 23-35.
60. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Pellegrino de Iraldi, A. (1962b) Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature* **194**, 794-795.
61. Desmond, M. M., Schwanecke, R. P., Wilson, G. S., Yasunaga, S., Burgdorff, R. N. (1972) Maternal barbiturate utilization and neonatal withdrawal symptomatology. *J. Pediatr.* **80**, 190-197.
62. Determan, H. (1968) *Gel Chromatography. A laboratory handbook*. Springer-Verlag (Ed), New York.
63. Deutsch, S. I., Park, C. H., Hitri, A (1994) Allosteric effects of a GABA receptor-active steroid are altered by stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**, 913-917.
64. Dietl, M. M., Cortés, R., Palacios, J. M. (1988) Neurotransmitter receptors in the avian brain III: GABA-benzodiazepine receptors. *Brain Res.* **439**, 366-371.
65. Djamgoz, M. B. (1995) Diversity of GABA receptors in the vertebrate outer retina. *Trends Neurosci.* **18**, 118-120.
66. Dluzen, D. E., Ramirez, V. D., (1989) Progesterone effect upon dopamine release from the corpus striatum of female rats. II: Evidence for a membrane site of action and the role of albumin. *Brain Res.* **476**, 338-344.
67. Drouva, S. V., Laplante, E., Kordon, C. (1985) Progesterone induced LHRH release in vitro is an estrogen- as well as Ca⁺⁺-Calmodulin-dependent secretory process. *Neuroendocrinology* **40**, 325-331.
68. Dudel, J., Kuffler, S. (1961) Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* **155**, 543-562.
69. Dunn, S. M., Thuynsma, R. P. (1994) Reconstitution of purified GABA_A receptors: Ligand binding and chloride transporting properties. *Biochemistry* **33**, 755-763.

70. Edgar, P. P., Schwartz, R. D. (1992) Functionally relevant γ -aminobutyric acid A receptors: Equivalence between receptor affinity (Kd) and potency (EC₅₀)? *Mol. Pharmacol.* **41**, 1124-1129.
71. Enna, S. J., Snyder, S. H. (1975) Properties of γ -aminobutyric acid GABA receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain. Res.* **100**, 81-97.
72. Enna, S. J., Bird, E. D., Bennett, J. P., Bylund, B. D., Yamamura, H. I., Iversen, L. L., Snyder, S. H. (1976) Huntington's chorea: Changes in neurotransmitter receptors in the brain. *New Engl. J. Med.* **294**, 1305-1309.
73. Enna, S. J., Snyder, S. H. (1976) Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. *Brain Res.* **115**, 174-179.
74. Enna, S. J., Snyder, S. H. (1977) Influences of ions, enzymes and detergents on γ -aminobutyric acid receptor binding in synaptic membranes of rat brain. *Mol. Pharmacol.* **13**, 442-453.
75. Erlander, M. G., Tobin, A. J. (1991) The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase. A review. *Neurochem. Res.* **16**, 215-226.
76. Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
77. Farrant, M., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1990) Molecular and cellular mechanisms of GABA/Benzodiazepine receptor regulation: electrophysiological and biochemical studies. *Neurochem. Res.* **15**, 175-191.
78. Feldman, H. A. (1972) Mathematical theory of complex ligand-binding system at equilibrium: some methods for parameter fitting. *Analyt. Biochem.*, **49**, 317-338.
79. Ferrero, P., Santi, M. R., Conti-Tronconi, B., Costa, E., Guidotti, A. (1986) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 827-831.
80. Fishman, R. H. B., Yanai, J. (1983) Long-lasting effects of early barbiturates on central nervous system and behavior. *Neurosci. Biobehav. Res.* **7**, 19-28.
81. Fiszer de Plazas (1982) Ontogeny of GABA receptor sites in chick embryo cerebellum. *Devl. Brain Res.* **3**, 263-275.

82. Fiszer de Plazas, S., Flores, V., Ríos, H. (1986) GABA receptors in the developing chick visual system: influence of light and darkness. In *GABA and Neuroendocrine Function* (Racagni, E., Donoso, A., eds.) pp 25-38. Raven Press, New York.
83. Fiszer de Plazas, S., Mitridate de Novara, A. M. (1990) Effect of diazepam on the low affinity GABA binding sites at different developmental stages of the chick optic lobe. *Neurochem. Int.* **17**, 381-387.
84. Fiszer de Plazas, S., Conterjnic, D., Flores, V. (1991). 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**, 195-201.
85. Fiszer de Plazas, S., Gravielle, M. C., Mitridate de Novara, A., Flores, V. (1993) Methods for removing endogenous factors from CNS membranes preparations: Differences in [³H]-GABA binding parameters and developmental-related effects. *Neurochem. Res.* **18**, 385-391.
86. Fiszer de Plazas, S., Gravielle, M. C. (1994) Presence of endogenous inhibitors of benzodiazepine binding in developing chick optic lobe. *NeuroReport* **5**, 1957-1960.
87. Fiszer de Plazas, S., Viapiano, M. S., Mitridate de Novara, A. M. (1995) Pentobarbital modulatory effect on GABA binding sites in developing chick optic lobe. *Int. J. Devl. Neuroscience* **13**, 783-789.
88. Flood, J. F., Smith, G. E., Roberts, E. (1988) Dehydroepiandrosterone and its sulfate enhance memory retention in mice. *Brain Res.* **447**, 269-278.
89. Flood, J. F., Morley, J. E., Roberts, E. (1992) Memory enhancing effect in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1567-1571.
90. Flores, V., Ríos, H., Fiszer de Plazas, S. (1986) Development of GABA binding sites in chick embryo optic lobe: Effect of Triton X-100. *Int. J. Devl. Neuroscience* **4**, 27-34.
91. Ffrench-Mullen, J. M., Spence, K. T. (1991) Neurosteroids block Ca⁺⁺ channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **202**, 269-272.
92. Friedman, L. K., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1996) 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**, 100-109.
93. Frye, C. A., Sturgis, J. D. (1995) Neurosteroids affect spatial/reference, working and long-term memory of female rats. *Neurobiology of Learning and Memory* **64**, 83-96.
94. Gardner, C. R., Klein, J., Grove, J. (1981) Endogenous GABA determines the characteristics of [³H]-GABA binding. *Eur. J. Pharmacol.* **75**, 83-92.
95. Gee, K. W., Chang, W. C., Brinton, R. E., McEwen, B. S. (1987) GABA-dependent modulation of the Cl⁻ ionophore by steroids in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **136**, 419-423.
96. Gee, K. W., Bolger, M. B., Brinton, R. E., Coirini, H., McEwen, B. S. (1988) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**, 803-812.
97. Giusti, L., Belfiore, M. S., Martini, C., Lucacchini, A. (1993) 3 α -hydroxy,5 α -pregnan-20-one modulation of solubilized GABA/Benzodiazepines receptor complex. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **45**, 309-314.
98. Gonzalez, C. B., Cozza, E. N., Bedners, M. E. O., Lantos, C. P., Aragonés, A. (1983) Progesterone and its reductive metabolism in steroidogenic tissues of the developing hen embryo. *Gen. Comp. Endocr.* **51**, 384-393.
99. González, N., Alfie, J., Fiszer de Plazas, S. (1990) Glutamic acid decarboxylase in different areas of the developing chick Central Nervous System. *Neurochem. Res.* **15**, 917-921.
100. Goodman Gilman, A., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (1995) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Edition*. Pergamon Press Inc., New York.
101. Goodnough D. B., Hawkinson J. E. (1995) Neuroactive steroid modulation of [³H]-Muscimol binding to the GABA_A receptor complex in rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **288**, 157-162.
102. Govadorsky, V., Zueva, L. (1977) Visual pigments of chicken and pigeons. *Vision Res.* **17**, 537-543.

- 103.Gravielle, M. C., Fiszer de Plazas, S. (1991) Benzodiazepine receptor sites in the chick optic lobe: development and pharmacological characterization. *Neurochem. Res.* **16**, 57-62.
- 104.Gravielle, M. C., Fiszer de Plazas, S. (1995) Ontogeny of two different benzodiazepine binding sites in the chick optic lobe. *NeuroReport* **6**, 2510-2512.
- 105.Greenlee, D., Van Ness, P. C., Olsen, R. W. (1978a) Gamma-aminobutyric acid binding in mammalian brain: Receptor-like specificity of sodium independent sites. *J. Neurochem.* **31**, 933-938.
- 106.Greenlee, D., Van Ness, P. C., Olsen, R. W. (1978b) Endogenous inhibitor of GABA binding in mammalian brain. *Life Sci.* **22**, 1653-1662.
- 107.Grüsser, O., Karten, H., Prosser, C., Szekely, J. (1978) Afferent input and integrative mechanism within the nonmammalian tectum. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* **13**, 186-195.
- 108.Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Meidel, M. C., Davidson, N., Lester, H. A., Kanner, B. I. (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* **249**, 1303-1306.
- 109.Guidotti, A., Gale, K., Suria, A., Toffano, G. (1979) Biochemical evidence for two classes of GABA receptors in rat brain. *Brain Res.* **172**, 566-571.
- 110.Guidotti, A., Konkol, D. R., Ebstein, B., Corda, M. G., Wise, B. C., Krutzsch, H., Meek, J. L., Costa, E. (1982) Isolation, characterization and purification to homogeneity of a rat brain protein (GABA-modulin). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 6084-6088.
- 111.Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkol, D., Bennet, C. D., Costa, E. (1983) Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3531-3535.
- 112.Güntürkün, O. (1991) The functional organization of the avian visual system. In *Neural and behavioural plasticity* (Andrew, R., ed.), pp 92-105. Oxford Univ. Press, United Kingdom.
- 113.Haefely, W. E. (1988) Endogenous ligands of the benzodiazepine receptor. *Pharmacopsychiatr.* **21**, 43-46.

- 114.Harris, B. D., Wong, G., Skolnick, P. (1993) Neurochemical actions of inhalational anesthetics at the GABA_A receptor complex. *J. Pharm. Exp. Ther.* **265**, 1392-1398.
- 115.Harris, B. D., Wong, G., Moody, E.J., Skolnick, P. (1995) Different subunit requirements for volatile and nonvolatile anesthetics at gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol. Pharmacol.* **47**, 363-367.
- 116.Harrison, N. L., Simmonds, M. A. (1984) Modulation of GABA receptor complex by a steroid anesthetic. *Brain Res.* **323**, 284-293.
- 117.Harrison, N. L., Majewska, M. D., Harrington, J. W., Barker, J. L. (1987) Structure-activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid A receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**, 346-353.
- 118.Hawkinson J. E., Kimbrough C. L., Mc Cauley L. D., Bolger M. B., Lan N. C., Gee K. (1994) The neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20 one is a two-component modulator of ligand binding to the GABA_A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **269**, 157-162.
- 119.Hill, R. M. (1973a) Drugs ingested by pregnant women. *Clin. Pharmacol. Ther.* **14**, 654-659.
- 120.Hill, R. M. (1973b) Teratogenics and antiepileptic drugs. *N. Eng. J. Med.* **289**, 1089-1090.
- 121.Hill, D. R., Bowery, N. G. (1981) [³H]Baclofen and [³H]GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* **290**, 149-152.
- 122.Hill-Venning, C., Belelli, D., Peters, J. A., Lambert, J. J. (1994) Electrophysiological studies of neurosteroid modulation of γ -aminobutyric acid type A receptor. *Methods Neurosci.* **22**, 446-467.
- 123.Hoehn-Saric, R. (1982) Neurotransmitters and anxiety. *Arch. Gen. Psychiatry* **39**, 735-742.
- 124.Horne A. L., Harkness P. C., Hadingham K. L., Whiting P., Kemp J. A. (1993) The influence of the γ 2L subunit on the modulation of responses to GABA_A receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 711-716.
- 125.Horng, J. S., Wong, D. T. (1979) γ -aminobutyric acid receptors in cerebellar membranes of rat brain after a treatment with Triton X-100. *J. Neurochem.* **32**, 1379-1386.

- 126.Hosokawa, Y., Sciancalepore, M., Stratta, F., Martina, M., Cherubini, E. (1994) Developmental changes in spontaneous GABA_A - mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 805-813.
- 127.Hu, Z. Y., Bourreau, E., Jung-Testas, I., Robel, P., Baulieu, E. E. (1987) Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8215-8219.
- 128.Huang, J., Casida, J. E. (1997) Avermectin B1a binds to high- and low-affinity sites with dual effects on the γ -aminobutyric acid-gated chloride channel of cultured cerebellar granule neurons. *J. Pharm. Exp. Ther.* **281**, 261-266.
- 129.Hughes, W. F., La Velle, A. (1974) On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.* **179**, 297-302.
- 130.Huidobro-Toro, P., Bleck, V., Allan, A. N., Harris, R. A. (1987) Neurochemical actions of anesthetic drugs on the γ -aminobutyric acid receptor-chloride channel complex. *J. Pharm. Exp. Ther.* **242**, 963-969.
- 131.Im, W. B., Blakeman, D. P., Davis, J. P., Ayer, D. E. (1989) Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and γ -aminobutyric acid A receptors. *Mol. Pharmacol.* **37**, 429-434.
- 132.Ingle, D., Sprague, J. M. (1975) Sensoriomotor function of the midbrain tectum. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* **13**, 2.
- 133.Ito Y., Lim D. K., Nabeshima T., Ho I. K. (1989) Effects of picrotoxin treatment on GABA_A receptor supramolecular complexes in rat brain. *J. Neurochem.* **52**, 1064-1070.
- 134.Iversen, L. L., Kelly, J. S. (1975) Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 933-938.
- 135.Jo, D. H., Abdallah, M. A., Young, J., Baulieu, E. E., Robel, P. (1989) Pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate and fatty esters in the rat brain. *Steroids* **54**, 287-297.
- 136.Johnston, G. A. (1978) Pharmacology of aminoacid inhibitory transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **18**, 269-289.
- 137.Johnston G. A., Willow M. (1982) GABA and barbiturate receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**, 328-330.

138. Johnston, G. A. (1986) Multiplicity of GABA Receptors. In *Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties*. pp 57-71, Alan Liss Inc., New York.
139. Johnston, G. A. (1996) GABA_C receptors: Relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 319-323.
140. Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B. (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 239-246.
141. Kavaliers, M. (1988) Inhibitory influences of the adrenal steroid 3 α ,5 α -tetrahydrocorticosterone on aggression and defeat-induced analgesia in mice. *Psychopharmacology* **95**, 488-492.
142. Kelly, J. P., Cowan, W. M. (1972) Studies on the development of the chick optic tectum. III. Effects of early eye removal. *Brain Res.* **42**, 263-288.
143. Kenakin, T. P., Bond, R., Bonner, T. I. (1992) Definition of Pharmacological Receptors. *Pharm. Rev.* **44**, 351-361.
144. Kenakin, T. P. (1993) *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. 2nd. Ed. Raven Press, New York.
145. Kerr, D. I., Ong, J. (1995) GABA_B receptors. *Pharmacol. Ther.* **67**, 187-246.
146. Kirkness, E. F., Turner, A. J. (1988) The stimulatory effects of secobarbital and pregnanolone can be blocked selectively. *Eur. J. Pharmacol.* **150**, 385-388.
147. Knapp, R. J., Malatynska, E., Yamaura, H. I. (1990) From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. *Neurochem. Res.* **15**, 105-112.
148. Koenig, J. A., Martin, I. L. (1992) Effect of free fatty acids on GABA_A receptor ligand binding. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 11-15.
149. Kokate, T. G., Svennson, B. E., Rogawski, M. A. (1994) Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with γ -aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J. Pharm. Exp. Ther.* **270**, 1223-1229.
150. Krause, J. E., Karavolas, H. J. (1980) Pituitary 5 α -dihydroprogesterone 3 α -hydroxysteroid-oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **255**, 11807-11814.

151. Kuffler, S., Edwards, C. (1958) Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* **21**, 589-610.
152. Kurioka, S., Hayata, H., Matsuda, M. (1981) Characterization of γ -aminobutyric acid binding sites on crude synaptic membranes. *J. Neurochem.* **37**, 283-288.
153. Laduron, P. (1984) Criteria for receptor sites in binding studies. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 833-839.
154. Lagos, N., Valdés, F., Orrego, F. (1983) A search for endogenous modulators of the GABA receptor in different regions of the rat CNS. *Neurochem. Int.* **5**, 325-331.
155. Lan, N. C., Gee, K. W., Bolger, M. B., Chen, J. S. (1991) Differential responses of expressed recombinant human γ -aminobutyric acid A receptors to neurosteroids. *J. Neurochem.* **57**, 1818-1821.
156. Lancel, M., Cronlein, T., A., Müller-Preuß, P., Holsboer, F. (1994) Pregnenolone enhances EEG delta activity during non-rapid eye movement sleep in the rat in contrast to midazolam. *Brain Res.* **646**, 85-94.
157. Laurie, D. J., Wisden, W., Seeburg, P. H. (1992) The distribution of thirteen GABA_A receptor subunits mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* **12**, 4151-4172.
158. La Vail, J. H., Cowan, W. M. (1971) The development of the chick optic tectum I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res.* **28**, 391-419.
159. Leeb-Lundberg, F., Snowman, A. M., Olsen, R. W. (1980) Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7468-7472.
160. Leeb-Lundberg, F., Snowman, A. M., Olsen, R. W. (1981) Interaction of anticonvulsants with the barbiturate-benzodiazepine-GABA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.* **72**, 125-129.
161. Lester, B. R., Peck, E. J. (1979) Kinetic and pharmacological characterization of gamma-aminobutyric acid receptive sites from mammalian brain. *Brain. Res.* **161**, 79-97.

162. Lester, B. R., Miller, A. L., Peck Jr., E. J. (1981) Differential solubilization of γ -aminobutyric acid receptive sites from membranes of mammalian brain. *J. Neurochem.* **36**, 154-164.
163. Liu, Q. R., Lopez Corcuera, B., Madiyan, S., Nelson, H., Nelson, N. (1993) Molecular characterization of four pharmacologically distinct γ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 2106-2112.
164. Lloyd, K. G., Shemin, L., Hornykiewicz, O. (1977) Distribution of high affinity sodium independent [³H]-GABA binding in the human brain: Alterations in Parkinson's disease. *Brain. Res.* **127**, 269-278.
165. Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1955). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
166. Luddens, H., Wisden, W. (1991) Functions and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 49-51.
167. MacDonald, R., Barker, J. L. (1978) Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature* **271**, 563-564.
168. MacDonald, R. L., Rogers, C. L., Twynman, R. E. (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA_A receptor channel of mouse spinal neurons in culture. *J. Physiol.* **417**, 483-500.
169. MacDonald, R. L., Olsen, R. W. (1994) GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* **17**, 569-602.
170. Madtes Jr, P. (1984) Chloride ions preferentially mask high-affinity GABA binding sites. *J. Neurochem.* **43**, 1434-1437.
171. Majbeesh, N. J., Frese, M., Ranen, T., Jeserich, G., Kanner, B. I. (1992) Neuronal and glial γ -aminobutyric acid transporters are distinct proteins. *FEBS Lett.* **299**, 99-102.
172. Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D. Barker, J. L., Paul, S. M. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptors. *Science* **232**, 1004-1007.
173. Majewska, M. D., Schwartz, R. D. (1987) Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the γ -aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res.* **404**, 355-360.

174. Majewska, M. D., Demirgoren, S., London, E. D. (1990a) Binding of pregnenolone sulfate to rat brain membranes suggests multiple sites of steroid action at the GABA_A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **189**, 307-315.
175. Majewska, M. D., Demirgoren, S., Spivak, C. E., London, E. D. (1990b) The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA_A receptor. *Brain Res.* **526**, 143-146.
176. Majewska, M. D. (1991) Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* **38**, 379-395.
177. Mamalaki, C., Stephenson, F. A., Barnard, E. A. (1987) The GABA_A/Benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous and heterologous subunits. *EMBO J.* **6**, 561-565.
178. Martin, D. L., Rimvall, K. (1993) Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* **60**, 395-407.
179. Massotti, M., Guidotti, A., Costa, E. (1981a) Characterization of benzodiazepine and γ -aminobutyric recognition sites and their endogenous modulators. *J. Neurosci.* **1**, 409-418.
180. Massotti, M., Mazzari, S., Schmid, R., Guidotti, A., Costa, E. (1981b) Endogenous inhibitors of Na⁺ independent [³H]GABA binding to crude synaptic membranes. *Neurochem. Res.* **6**, 551-565.
181. Matsumoto, K., Ojima, K., Watanabe, H. (1996) Neurosteroidal modulation of social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Brain Res.* **708**, 1-6.
182. McCabe, R. T., Olsen, R. W., Yezuita, J. P., Wamsley, J. K. (1987) Osmotic shock: A method to eliminate endogenous γ -aminobutyric acid and account for the influence on benzodiazepine binding affinity in autoradiographic studies. *J. Pharm. Exp. Ther.* **245**, 342-349.
183. McEwen, B. S. (1988) Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **121**, 141-147.
184. McGraw, C. F., McLaughlin, B. J. (1980) Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of the chick optic tectum. *J. Neurocytol.* **9**, 79-93.

185. McKernan, R. M., Whiting, P. J. (1996) Which GABA_A receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* **19**, 139-143.
186. Meier, E., Drejer, J., Schousboe, A. (1984) GABA induces functionally active low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **43**, 1737-1744.
187. Mellon, S. H. (1994) Neurosteroids: Biochemistry, modes of action and clinical relevance *J. Clin. Endoc. Metabol.* **78**, 1003-1008.
188. Mertens, S., Benke, D., Möhler, H. (1993) GABA_A receptor populations with novel subunit composition and drug binding profiles identified in brain by α 5- and δ - subunit specific immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* **268**, 5965-5976.
189. Mihic, S. J., Wu, P. H., Kalant, H. (1992) Potentiation of γ -aminobutyric acid-mediated chloride flux by pentobarbital and diazepam but not ethanol. *J. Neurochem.* **58**, 745-751.
190. Möhler, H., Okada, T. (1977). GABA receptor binding with $^3\text{H}(+)\text{bicuculline-methiodide}$ in rat CNS. *Nature* **267**, 65-67.
191. Möhler, H., Polc, P., Cumin, R., Pieri, L., Kettler, R. (1979) Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepine-like actions. *Nature* **278**, 563-565.
192. Möhler, H., Knofflach, F., Paysan, J., Motejlek, K., Benke, D., Luscher, B., Fritschy, J. M. (1995) Heterogeneity of GABA_A receptors: Cell-specific expression, pharmacology and regulation. *Neurochem. Res.* **20**, 631-636.
193. Mok, W. M., Krieger, N. R. (1990) Evidence that 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one is the metabolite responsible for progesterone anesthesia. *Brain Res.* **533**, 42-45.
194. Mok, W. M., Herschkowitz, S., Krieger, N. R. (1991) In vivo studies identify 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one as an active anesthetic agent. *J. Neurochem.* **57**, 1296-1301
195. Morrow, A. L., Suzdak, P. D., Paul, S. M. (1988). Benzodiazepine, barbiturate, ethanol and hypnotic steroid hormone modulation of GABA-mediated chloride ion transport in rat brain synaptoneuroosomes. In *Chloride Channels and Their Modulation by Neurotransmitters and Drugs* (Biggio, G., Costa, E., eds.), pp 247-261. Raven Press, New York.

196. Morrow, A. L., Pace, J. H., Purdy, R. H., Paul, S. M (1989) Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol. Pharmacol.* **37**, 263-270..
197. Nabekura, J., Oomura, Y., Minami, T., Mizuno, Y., Fukuda, A. (1986) Mechanism of the rapid effect of 17β -estradiol on medial amygdala neurons. *Science* **233**, 226-228 .
198. Nakamura, T., Tanabe, Y. (1975). In vitro metabolism of steroid hormones by chicken brain. *Acta Endocr. Copenh.* **75**, 410-416.
199. Napias, C., Bergman, M. O, Van Ness, P. C., Greenlee, D. V., Olsen, R. W. (1980) GABA binding in mammalian brain: Inhibition by endogenous GABA *Life Sci* **27**, 1001-1011.
200. Ojima, K., Matsumoto, K., Watanabe, H. (1997) Flumazenil reverses the decrease in the hypnotic activity of pentobarbital by social isolation stress: Are endogenous benzodiazepine receptor ligands involved? *Brain Res.* **745**, 127-133.
201. Olsen, R. W. (1981a) GABA-Benzodiazepine-Barbiturate Receptor Interactions. *J. Neurochem.* **37**, 1-13.
202. Olsen, R. W. (1981b) The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. *Mol. Cell. Biochem.* **39**, 261-279.
203. Olsen, R. W., Bergman, M. O., Van Ness, P. C., Lummis, S. C., Watkins, A. E. Napias, C., Greenlee, D. V. (1981) γ -aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites. *Mol. Pharmacol.* **19**, 217-227
204. Olsen R. W., Stauber G. B., King R. G., Yang J., Dilber A. (1986) Structure and function of the barbiturate-modulated Benzodiazepine/GABA receptor protein complex. In *GABAergic Transmission and Anxiety* (Biggio, G., Costa, E., eds.) pp 21-31. Raven Press, New York.
205. Olsen, R. W., Tobin, A. J. (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* **4**, 1469-1480.
206. Palacios, J. M., Niehoff, D. L., Kuhar, M. J. (1979) Ontogeny of GABA and benzodiazepine receptors: Effects of Triton X-100, bromide and muscimol. *Brain Res.* **179**, 390-395.
207. Paredes, R. G., Agmo, A. (1992) GABA and behavior: The role of receptor subtypes. *Neuroscience and Behavioral Reviews* **16**, 145-170.

208. Pedernera, E., Lantos, C. P. (1973) The biosynthesis of adrenal steroids by the 15-day-old chick embryo. *Gen. Comp. Endocr.* **20**, 331-341.
209. Peña, C., Medina, J. H., Novas, M. L., Paladini, A. C., De Robertis, E. (1986) Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl β -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4952-4956.
210. Peters, J. A., Kirkness, E. F., Callachan, H., Lambert, J. J., Turner, A. J. (1988) Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br. J. Pharmacol.* **94**, 1257-1269.
211. Petitti, N., Etgen, A. M. (1992) Progesterone promotes rapid desensitization of α 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* **55**, 1-8.
212. Pignataro, L. A., Colman Lerner, A., Barañao, L. Fiszer de Plazas, S. (1998) Biosynthesis of progesterone derived neurosteroids by developing avian CNS: *in vitro* effects on the GABA_A receptor complex. *Int. J. Devl. Neuroscience*, en prensa.
213. Pin, J. P., Duvoisin, R. (1995) Neurotransmitter receptors I: The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacol.* **34**, 1-26.
214. Por, S. B., Bondy, S. C. (1982) Effects of enucleation on high-affinity binding sites in chick optic tectum. *J. Neurochem.* **38**, 545-550.
215. Prasad, V. V. K., Vegesna, S. R., Welch, M., Lieberman, S. (1994) Precursors of neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3220-3223.
216. Prince, R. J., Simmonds, M. A. (1992a). Propofol potentiates the binding of [³H]FNZ to the GABA_A receptor complex. *Brain. Res.* **596**, 238-242.
217. Prince, R. J., Simmonds, M. A. (1992b) Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology* **31**, 201-205.
218. Prince, R. J., Simmonds, M. A. (1993) Differential antagonism by epipregnanolone of alphaxalone and pregnanolone potentiation of [³H]-Flunitrazepam binding suggests more than one class of binding site for steroids at GABA_A receptors. *Neuropharmacol.* **32**, 59-63.
219. Pritchett, D. B., Luddens, H., Seeburg, P. H. (1989a) Type I and type II GABA_A - Benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* **245**, 1389-1392.

- 220.Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R., Seeburg, P. H. (1989b) Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* **338**, 582-585.
- 221.Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P. H., Costa, E. (1991) Influence of recombinant γ -aminobutyric acid A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of γ -aminobutyric acid gated Cl⁻ currents. *Mol. Pharmacol.* **39**, 691-696.
- 222.Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P. H., Costa, E. (1992) Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABA_A receptors. In *GABAergic synaptic transmission* (Biggio, G., Concas, A., Costa, E., eds.) pp 103-110. Raven Press, New York.
- 223.Puka, M., Lazarewicz, J. W. (1993) Strychnine antagonizes GABA-evoked ³⁶Cl⁻ uptake in membrane vesicles from rat and rabbit cerebral cortex. *Acta Neurobiol. Exp. Warsz.* **53**, 511-516.
- 224.Purdy, R. H., Morrow, A. L., Moore, P. H., Paul, S. M. (1991) Stress-induced elevations of γ -aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4553-4557.
- 225.Rager, G., Von Oeynhausen, B. (1979) Ingrowth and ramification of retinal fibers in the developing optic tectum of the chick embryo. *Exp. Brain Res.* **35**, 213-227.
- 226.Regan, J. W., Roeske, W. R., Malick, J. B., Yamamura, S. H., Yamamura, H. I. (1981) γ -aminobutyric acid enhancement of CL-218872 affinity and evidence of benzodiazepine receptor heterogeneity. *Mol. Pharmacol.* **20**, 477-483.
- 227.Reggiani, A.; Barbaccia, M. L.; Spano, P. F.; Trabuchi, M. (1980) Acute and chronic ethanol administration on specific [³H]-GABA binding in different rat brain areas. *Psychopharmacology* **67**, 261-264.
- 228.Reynolds, J. N., Prasad, A., MacDonald, J. F. (1992) Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse Central Nervous System. *Eur. J. Pharmacol.* **224**, 173-181.
- 229.Rho, J. M., Donevan, S. D., Rogawski, M. A. (1996) Direct activation of GABA_A receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* **497**, 509-522.

230. Richards, C. D., White, A. E. (1981) Additive and non-additive effects of mixtures of short-acting intravenous anaesthetic agents and their significance for theories of anesthesia. *Br. J. Pharmacol.* **74**, 161-170.
231. Rios, H., Flores, V., Fiszler de Plazas, S. (1987). Effect of light- and dark-rearing on the postnatal development of GABA receptor sites in the chick optic lobe. *Int. J. Devl. Neuroscience* **5**, 319-325.
232. Roberts, E., Frankel, S. (1950) γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **187**, 55-63.
233. Roberts, E., Sherman, M. (1993) GABA-The quintessential neurotransmitter: Electroneutrality, fidelity, specificity and a model for the ligand binding site of GABA_A receptors. *Neurochem. Res.* **18**, 365-376.
234. Robertson, B. (1989) Actions of anesthetics and avermectin on GABA_A chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurons. *Br. J. Pharmacol.* **98**, 167-176.
235. Rodriguez Puertas, R., Pascual, J., Pazos, A. (1996) Effects of freezing storage time on the density of muscarinic receptors in the human postmortem brain: An autoradiographic study in control and Alzheimer's disease brain tissues. *Brain Res.* **728**, 65-71.
236. Rodriguez Sierra, J. F., Howard, J. L., Pollard, G. T., Hendricks, S. E. (1984) Effect of ovarian hormones on conflict behavior. *Psychoneuroendocrinology* **9**, 293-300.
237. Rogers, C. J., Twynman, R. E., MacDonald, R. L. (1994) Benzodiazepine and β -carboline regulation of single GABA_A receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* **475**, 69-82.
238. Rohde, B. H., Harris, R. A. (1982) GABA and flunitrazepam binding to neuroblastoma cell membranes. Effect of growth conditions, ethanol and pentobarbital. *Brain. Res.* **253**, 133-141.
239. Roodbard, D., Munson, P. J., Thakur, A. K. (1980). Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* **46**, 2907-2918.
240. Rupprecht, R., Reul, J. M., Trapp, T., Van Steensel, B., Wetzel, C., Damm, K., Ziegglänsberger, W., Holsboer, F. (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* **11**, 523-530.

241. Rupperecht, R., Hauser, C. A., Trapp, T., Holsboer, F. (1996) Neurosteroids: Molecular mechanisms of action and psychopharmacological significance. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **56**, 163-168.
242. Sábato, U. C., Aguilar, J. S., De Robertis, E. (1981) Benzodiazepine receptors in rat brain: Action of Triton X-100 and localization in relation to the synaptic region. *J. Receptor Res.* **2**, 119-133.
243. Samochocki, M., Strosznajder, J. (1993) Modulatory action of arachidonic acid on GABA_A/Chloride channel receptor function in adult and aged brain cortex membranes. *Neurochem. Int.* **23**, 261-267.
244. San Martín, S., Andrés-Trelles, F., Menéndez, L., Meana, A., Hidalgo, A., Baamonde, A. (1996) Interaction among alfaxalone, pregnenolone sulfate and two GABA_A agonists on hippocampal slices. *Cell. Mol. Neurobiol.* **16**, 427-431.
245. Sanna, E., Garau, F., Harris, R. A. (1995) Novel properties of homomeric $\beta 1$ γ -aminobutyric acid type A receptors: Actions of the anesthetics propofol and pentobarbital. *Mol. Pharmacol.* **47**, 213-217.
246. Scatchard, B. (1949) The attraction of proteins for small molecular ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 670-672.
247. Schliebs, R., Kullman, E., Bigl, V. (1986) Development of glutamate binding sites in the visual structures of the rat brain. Effect of visual pattern deprivation. *Biomed. Biochem. Acta.* **45**, 495-506.
248. 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. (1987) Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**, 221-227.
249. Scholes, N., Roberts, E. (1964) Pharmacological studies of the optic system of the chick: effect of γ -aminobutyric acid and pentobarbital. *Biochem. Pharmacol.* **13**, 1319-1329.
250. Schumacher, M., Coirini, H., Pfaff, D. W., McEwen, B. S. (1990) Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* **250**, 691-694.

251. Schumacher, M., Robel, P., Baulieu, E. E. (1996) Development and regeneration of the Nervous System: A role for neurosteroids. *Dev. Neurosci.* **18**, 6-21.
252. Schwartz, R. D., Skolnick, P., Seale, T. W., Paul, S. M. (1986) Demonstration of GABA/Barbiturate-Receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes: A functional assay of GABA receptor-effector coupling. In *GABAergic Transmission and Anxiety* (Biggio, G., Costa, E., eds.) pp 33-49, Raven Press, New York.
253. Scicolone, G., Pereyra Alfonso, S., Brusco, A., Pecci Saavedra, J., Flores, V. (1995) Development of the laminated pattern of the chick optic tectum. *Int. J. Devl. Neuroscience* **13**, 845-858.
254. Selye, H. (1942) Correlations between the chemical structure and the pharmacological action of the steroids. *Endocrinology* **30**, 437-452.
255. Shingai, R., Shuterland, M. L., Barnard, E. A. (1991). Effects of subunit types of the cloned GABA_A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur. J. Pharmacol.* **206**, 77-80.
256. Shivers, B. D., Kilish, I., Sprengel, R., Sontheimer, H., Mohler, P. R., Schofield, P. R., Seeburg, P. H. (1989) Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal sub-populations. *Neuron* **3**, 327-337.
257. Sigel, E., Stephenson, F. A., Mamalaki, C., Barnard, E. A. (1983) A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 6965-6971.
258. Sigel, E., Barnard, E. A. (1984) A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Improved purification with preservation of regulatory sites and their interactions. *J. Biol. Chem.* **259**, 7219-7223.
259. Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Möhler, H., Malherbe, P. (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron* **5**, 703-711.
260. Siskin, B., Sano, K., Roberts, E. (1961) γ -aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase and γ -aminobutyrate transaminase activities in the optic lobe of the developing chick. *J. Biol. Chem.* **236**, 503-507.
261. Skerit, J. H., Chow, S. C., Johnston, G. A. (1982) Differences in the interaction between GABA and benzodiazepine binding sites. *Neurosci. Lett.* **33**, 173-178.

262. Skerrit, J. H., Johnston, G. A. R. (1983) Enhancement of GABA_A binding by benzodiazepines and related anxiolytics. *Eur. J. Pharmacol.* **89**, 193-198.
263. Snodgrass, R. (1992) GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. *J. Ch. Neurol.* **7**, 77-82.
264. Speidel, B. D., Meadow, S. R. (1972) Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. *Lancet* **2**, 839-843.
265. Squires, R. F. (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol.* **22**, 1443-1450.
266. Squires, R. F., Casida, J. E., Richardson, M., Saederup, E. (1983) [³⁵S]-butylbicyclophosphorotriate binds with high affinity to brain specific sites coupled to a gamma-aminobutyric acid A and ion recognition site. *Mol. Pharmacol.* **23**, 326-330.
267. Steiger, A., Trachsel, L., Guldner, J., Hemmeter, U., Rothe, B., Rupprecht, R., Vedder, H., Holsboer, F. (1993) Neurosteroid pregnenolone induces sleep-EEG changes in man compatible with inverse-agonistic GABA_A receptor modulation. *Brain Res.* **615**, 267-274.
268. Strambini, G. B., Gabellieri, E. (1996) Proteins in frozen solutions: Evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophys. J.* **70**, 971-976.
269. Study, R. E., Barker, J. L. (1981) 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**, 7180-7184.
270. Supavilai, P., Karobath, M. (1981) In vitro modulation by avermectin B1a of the GABA/Benzodiazepine receptor complex of rat cerebellum. *J. Neurochem.* **36**, 798-803.
271. Tang, X. W., Yarom, M., Carlson, R. G., Velde, D. V., Huang, P. Y., Lee, Y. H., Seah, E. C., Deupree, D., Wu, J. Y. (1993) Isolation of Endogenous Modulators for the GABA_A and Taurine Receptors. *Neurochem. Int.* **23**: 485-493.
272. Tazawa, H. (1980) Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. *Respir. Physiol.* **41**, 137-142.
273. Tehrani, M. H. J., Barnes, E. M. (1986) Ontogeny of the GABA receptor complex in chick brain: studies in vivo and in vitro. *Devl. Brain Res.* **25**: 91-98.

274. Thomas, C. R. (1976) Routine phenobarbital for prevention of neonatal hyperbilirubinemia. *Obstet. Gynecol.* **47**, 304-308.
275. Thompson, S. A., Whiting, P. J., Wafford, K. A. (1996) Barbiturate interactions at the human GABA_A receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 521-527.
276. Ticku, M. K., Olsen, R. W. (1978) Interaction of barbiturates with dihydropicrotoxin binding sites related to the GABA receptor-ionophore complex. *Life Sci.* **22**, 1643-1652.
277. Toffano, G., Guidotti, A., Costa, E. (1978) Purification of an endogenous protein inhibitor of the high affinity binding of γ -aminobutyric acid to synaptic membranes of the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4024-4028.
278. Toffano, G., Aldinio, C., Balzano, M., Leon, A., Kirchner, G. (1981) Role of membrane lipids on the regulation of GABA recognition sites. In *GABA and benzodiazepine receptors* (Costa, E., Guidotti, A., eds.), pp 169-179. Raven Press, New York.
279. Trifiletti, R. R., Snowman, C. J., Syder, S. H. (1984) Barbiturate recognition site on the GABA/benzodiazepine receptor complex is distinct from the picrotoxin/TBPS recognition site. *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 441-447.
280. Trolle, D. (1968) Phenobarbitone and neonatal icterus. *Lancet* **1**, 251-252.
281. Tsuda, A., Ito, M., Kishi, K., Shiraishi, H., Tsuda, H., Mori, C. (1994) Effect of penicillin on GABA-gated chloride ion influx. *Neurochem. Res.* **19**, 1-4.
282. Tunncliff, G., Firneisz, G., Ngo, T., Martin, R. (1975) Developmental changes in the kinetics of gamma-aminobutyric acid transport by chick retina. *J. Neurochem.* **25**: 649-652.
283. Turner, D. M., Ransom, R. W., Jane, S., Yang, J., Olsen, R. (1989) Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the γ -aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 960-966.
284. Twyman, R. E., Rogers, C. J., Mac Donald, R. L. (1989) Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABA_A receptor channels. *Neurosci. Lett.* **96**, 89-95.

285. Underfriend, S. (1950) Identification of γ -aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method. *J. Biol. Chem.* **187**, 65-69.
286. Vaccarino, F., Conti Tronconi, B. M., Panula, P., Guidotti, A., Costa, E. (1985) GABA-modulin: A synaptosomal basic protein that differs from small myelin basic protein of rat brain. *J. Neurochem.* **44**, 278-290.
287. Van Ness, P. C., Olsen, R. W. (1979) Gamma-aminobutyric acid receptor binding in human brain regions. *J. Neurochem.* **33**: 593-596.
288. Viapiano, M. S., Fiszer de Plazas, S. (1997) 3β -hydroxy- 5β pregnan-20-one enhances [3 H]GABA binding in developing chick optic lobe. *J. Rec. Signal Trans. Res.* **17**, 585-597.
289. Viapiano, M. S., Fiszer de Plazas, S. (1998) Comparative modulation by $3\alpha,5\alpha$ and $3\beta,5\beta$ neurosteroids of GABA binding sites during avian Central Nervous System development. *Neurochem. Res.* **23**, 155-161.
290. Viapiano, M. S., Mitridate de Novara, A. M., Fiszer de Plazas, S. (1998a) Neurosteroid modulation of GABA binding sites in developing avian Central Nervous System. *Neurochem. Int.* , en prensa.
291. Viapiano, M. S., Rodríguez Gil, D. J., Mitridate de Novara, A. M., Fiszer de Plazas, S. (1998b) Synaptic membrane freezing affects barbiturate and neurosteroid modulation of GABA_A receptors in avian CNS. *Eur. J. Pharmacol.*, enviado para su publicación.
292. Villinger, J. W. (1985) Characterization of perypheral-type benzodiazepine recognition sites in the rat spinal cord. *Neuropharmacol.* **24**, 95-98.
293. Vischer, A., Cuenod, M., Henke, H. (1982) Neurotransmitter receptor ligand binding and enzyme regional distribution in the pigeon visual system. *J. Neurochem.* **38**, 1372-1382.
294. Wallace, S. J., Smith, J. A. (1980) Successful prophylaxis against febrile convulsions with valproic acid or phenobarbitone. *Br. Med. J.* **280**, 353-354.
295. White, W. F., Snodgrass, S. R. (1983) Isoguvacine binding, uptake and release: Relation to the GABA system. *J. Neurochem.* **40**: 1701-1708.
296. Whiting, P. J., McAllister, G., Vassilatis, D., Bonnert, T. P., Heavens, R. P., Smith, D. W., Hewson, L., O'Donnel, R., Rigby, M. R., Sirinasinghji, D. J., Marsahll, G., Thompson, S. A., Wafford, K. A. (1997) Neuronally restricted RNA

- splicing regulates the expression of a novel GABA_A receptor subunit conferring atypical functional properties. *J. Neurosci.* **17**, 5027-5037.
297. Wieland, S., Lan, N. C., Mirasedegi, S., Gee, K. W. (1991) Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Brain Res.* **565**, 263-268.
298. Wieland, S., Belluzi, J. D., Stein, L., Lan, N. C (1995) Comparative behavioral characterization of the neuroactive steroids 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one and 3 α -OH-5 β -pregnan-20-one in rodents. *Psychopharmacology* **118**, 65-71.
299. Willow, M., Johnston, G.A. (1981) Dual actions of pentobarbitone on GABA binding: Role of binding site integrity. *J. Neurochem.* **37**, 1291-1294.
300. Wolff, J. R., Böttcher, H., Zetzsche, T., Oertel, W. H., Chronwall, B. M. (1984) Development of GABAergic neurons in rat visual cortex as identified by glutamate decarboxylase-like immunoreactivity. *Neurosci. Lett.* **47**, 207-212.
301. Woolf, J. H., Nixon, J. C. (1981) Endogenous effector of the benzodiazepine binding site: Purification and characterization. *Biochem.* **20**, 4263-4269.
302. Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1990) Inverse modulation of GABA and glycine induced currents by progesterone. *Mol. Pharmacol.* **37**, 597-602.
303. Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1991) Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the NMDA receptor. *Mol. Pharmacol.* **41**, 333-336
304. Wu, F. S., Gibbs, T. T., Farb, D. H. (1993) Dual activation of GABA_A and glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur. J. Pharmacol.* **246**, 239-246.
305. Yanai, J., Rosselli-Austin, L., Tabakoff, B. (1979) Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* **64**, 237-244.
306. Yanai, J. (1984) An animal model for the effect of barbiturate on the development of the Central Nervous System. In *Neurobehavioral Teratology* (Yanai, J., ed.), pp 111-132. Elsevier Press, Amsterdam.
307. Yang, J. S. J., Olsen, R. W. (1987) γ -aminobutyric acid receptor binding in fresh mouse brain membranes at 22 $^{\circ}$ C: Ligand-induced changes in affinity. *Mol. Pharmacol.* **32**, 266-277.

308. Yarom, M., Bao, J., Tang, X. W., Wu, E., Lee, Y. H., Tsai, W. H., Wu, J. Y. (1992) Isolation and characterization of endogenous modulators for GABA system. *Neurochem. Res.* **17**, 107-114.
309. Yoneda, Y., Kuriyama, K. (1980) Presence of a low molecular weight endogenous inhibitor on [³H]-muscimol binding in synaptic membranes. *Nature* **285**, 670-673.
310. Yoneda, Y., Roberts, E., Dietz, G. W. (1982) A new synaptosomal biosynthetic pathway of glutamate and GABA from ornithine and its negative feedback inhibition by GABA. *J. Neurochem.* **38**, 1686-1694.
311. Zemp J., Middaugh L. D. (1975) Some effects of prenatal exposure to α -amphetamine sulfate and phenobarbital on developmental neurochemistry and on behavior. *Addict. Dis.* **2**, 307-331.
312. Zhu, W. J., Wang, J. F., Krueger, K. E., Vicini, S. (1996) Delta subunit inhibits neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *J. Neurosci.* **16**, 6648-6656.

---000---