

0308/  
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

"INCREMENTO EN LA EXCITABILIDAD DE LA  
CORTEZA CEREBRAL POR EFECTO DE LA PRIVACION  
DE GABA O BENZODIAZEPINAS. EFECTO  
COADYUVANTE DE LOS NEUROESTEROIDES"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA  
BASICA (UACPyP DEL CCH)**  
P R E S E N T A :  
**JAIME EDUARDO CALIXTO GONZALEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE BARGAS DIAZ

MEXICO, D. F.,

JULIO DEL 2000

279246



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“INCREMENTO EN LA EXCITABILIDAD DE LA CORTEZA CEREBRAL POR EFECTO DE LA  
PRIVACION DE GABA O BENZODIAZEPINAS.  
EFECTO COADYUVANTE DE LOS NEUROESTEROIDES”**

**RESUMEN**

1. La interrupción abrupta de la administración continua de GABA, el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC, induce una epilepsia parcial, además de alteraciones motoras e irritabilidad. A este fenómeno se le ha denominado “Síndrome de abstinencia al GABA” (SAG).
2. Los experimentos de esta Tesis fueron realizados en ratas macho cepa Wistar en dos modelos de hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA. En el primero, *in vivo*, se hicieron registros a nivel EEG. En el segundo, *in vitro*, se registraron potenciales de campo en rebanadas de cerebro. El objetivo principal de esta tesis fue producir y caracterizar la hiperexcitabilidad inducida por la interrupción brusca (privación) de la superfusión de GABA *in vitro*, así como estudiar el efecto de los neuroesteroides en la generación de esta hiperexcitabilidad.
3. Esta estrategia farmacológica permitió identificar algunos cambios celulares que podrían subyacer a los eventos relacionados con la abstinencia generada por diversas drogas que reconocen selectivamente al receptor GABA<sub>A</sub>. En particular, el efecto del GABA asociado con los neuroesteroides produce un incremento de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA; favoreciendo la aparición del SAG *in vivo* y disminuyendo el tiempo necesario para la inducción de la hiperexcitabilidad *in vitro*.
4. Durante la abstinencia al GABA, la alopregnanolona, el neuroesteroide con mayor actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, incrementó su efecto inhibitor. El flunitrazepam, también puede generar hiperexcitabilidad *in vitro*, por privación. Esta es muy similar a la producida por el GABA, lo cual sugiere que es el receptor GABA<sub>A</sub> el responsable de los cambios que desencadenan el aumento de la actividad eléctrica neuronal.
5. Se observó una disminución en la liberación de GABA-<sup>3</sup>H inducida por alto K<sup>+</sup> y además, durante la incubación con GABA, una posible modificación en los receptores GABA<sub>A</sub>.
6. La inhibición de la síntesis de proteínas con la anisomicina bloquea la génesis del SAG. La inducción de la LTP se facilita durante la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA.

## SUMMARY

1. The abrupt interruption of the continuous administration of GABA, the most important inhibitory neurotransmitter in the CNS, induces partial epilepsy, motor signs and irritability. This phenomenon has been denominated "GABA withdrawal syndrome" (GWS).
2. The experiments described in this Thesis were performed in male Wistar rats in two experimental models of hyperexcitability induced by sharp deprivation of GABA. In the first model, EEG was recorded *in vivo*. In the second, *in vitro*, field potentials were recorded in brain slices. The main objective of this Thesis was to produce and characterize hyperexcitability induced by the sharp interruption (deprivation) of GABA superfusion *in vitro*, as well as to study the effect of the neurosteroids on the generation of this hyperexcitability.
3. This pharmacological strategy applied, allowed the identification of cellular changes that may underlie events related to the withdrawal from diverse drugs which selectively recognize the GABA<sub>A</sub> receptor. In particular, the effect of GABA associated with neurosteroids produces an increase in the hyperexcitability induced by sharp deprivation of GABA. This interaction favors the appearance of GWS *in vivo*, and reduces the time necessary for the induction of hyperexcitability *in vitro*.
4. Allopregnanolone, a neurosteroid with a high affinity for the GABA<sub>A</sub> receptor, increased this inhibitory effect during GABA withdrawal. Deprivation of flunitrazepam can also generate hyperexcitability *in vitro*. This effect is similar to that of GABA, which suggests that it is the GABA<sub>A</sub> receptor that is responsible for the changes that provoke the increase in neuronal electrical activity.
5. A decreased was observed in the release of <sup>3</sup>H-GABA induced by high K<sup>+</sup> stimulation. In addition, GABA application also induced changes in the GABA<sub>A</sub> receptors.
6. The inhibition of protein synthesis by anisomycin blocked the generation of GWS. The induction of LTP was facilitated during hyperexcitability swayed by the sharp deprivation of GABA.

A Simón...

## INDICE

	página
I.I Resumen	5
I.II Summary	6
II. Introducción	7
II.I Neurotransmisión GABAérgica:	8
El GABA y sus receptores	
II.I.I Generalidades e historia	8
II.I.II Síntesis y metabolismo	9
II.I.III Recaptura	11
II.I.IV Fisiología	12
II.I.V El receptor GABA <sub>B</sub>	13
II.I.VI Estructura del receptor GABA <sub>A</sub>	13
II.I.VII Modulación alostérica del receptor GABA <sub>A</sub>	15
II.I.VIII Distribución del receptor GABA <sub>A</sub> en el SNC	17
II.II Los esteroides:	
características generales	20
II.III Esteroides Sistémicos y Esteroides Neuroactivos	22
II.IV Neuroesteroides	22
Anexo: " <i>Neuroesteroides, neuromoduladores de la excitabilidad cerebral</i> "	
II.V Síndromes de abstinencia relacionados con la neurotransmisión GABAérgica	26
II.VI El Síndrome de abstinencia al GABA (SAG)	31
III. Objetivos	38
IV. Hipótesis	39
IV. Material y métodos	40
V. Resultados	44
1ª sección: " <i>Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex</i> "	
2ª sección: " <i>Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro</i> "	
3ª sección: " <i>Long lasting effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat</i> "	
VI. Discusión	46
VII Conclusiones	55
VIII Referencias	57

### Lista de abreviaturas

ACCA	ácido cis-4 aminocrotonico
aloP	alopregnanolona, tetrahidroprogesterona, 3 $\alpha$ -OH dihidroprogesterona.
AMPA	ácido metil-3-hidroxi 5-metil 4-oxazole propiónico
ARNm	ácido ribonucléico tipo mensajero
Bic	bicuculina
BZ	benzodiazepina
Ca <sup>2+</sup>	calcio
Cd <sup>2+</sup>	cadmio
Cl <sup>-</sup>	cloro
DHEA	dehidroepiandrosterona
DHEAS	sulfato de dehidroepiandrosterona
DZ	diazepam
EEG	electroencefalograma, electroencefalográfico.
EN	esteroide neuroactivo
EP	espiga poblacional
Flun	flunitrazepam
HIPPAG	hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA
GABA	ácido gamma aminobutírico, 4 aminobutirato
GABA-T	enzima GABA transaminasa
GAD	enzima glutamato descaboxilasa, L-glutamato-carboxi-liasa
Glu	glutamato, ácido glutámico
IPSP	potencial post-sináptico inhibitorio
NE	neuroesteroide (s)
NMDA	N-metil D-aspartato
P	progesterona
PDS	despolarizaciones paroxísticas de gran amplitud
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLP	fosfato de piridoxal
PP	pulsos pareados
Preg	pregnenolona
RK	Ringer Krebs
SAG	Síndrome de abstinencia al GABA
SNC	sistema nervioso central
SP	sulfato de pregnenolona
TACA	ácido trans-4 aminocrotonico
THDOC	tetrahidro-deoxi-corticosterona
TM	dominio transmembranal
2-DG	2-deoxi-glucosa
Zn <sup>2+</sup>	Zinc

## ORGANIZACION DE LA TESIS

La presente Tesis esta organizada de la siguiente forma:

En la *Introducción* se presenta una revisión de conceptos básicos acerca de la neurotransmisión GABAérgica; la síntesis del GABA y sus receptores. Se dan detalles sobre algunos subtipos de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y la importancia que tienen en la plasticidad y el comportamiento farmacológico del receptor. Se hace una revisión breve acerca de los neuroesteroides además de que se identifican aspectos recientemente descritos acerca de estas moléculas en la neuromodulación de la transmisión GABAérgica (Calixto y Brailowsky "Neuroesteroides, neuromoduladores de la excitabilidad cerebral" Gaceta Médica de México. 1998 134: 69-84). En otro tópico, se revisa la farmacología y se provee de información relacionada a los síndromes de abstinencia y los mecanismos moleculares involucrados en la génesis de los mismos. Además, se ahonda en la descripción de la abstinencia al GABA (SAG), como un fenómeno que incluye el incremento de la excitabilidad neuronal.

Posteriormente se enumeran los *Objetivos e Hipótesis* de la tesis.

Los *Métodos* se describen brevemente, (ya que cada trabajo tiene los detalles de los procedimientos realizados: la cirugía estereotáxica, la obtención de rebanadas sagitales de cerebro y los experimentos en el ámbito neuroquímico).

Los *Resultados* fueron divididos en tres partes, en ellos se muestran los trabajos publicados en revistas internacionales arbitradas. El primero presenta evidencia de que el SAG, *in vivo*, se facilita por la alopregnanolona. El segundo artículo caracteriza la hiperexcitabilidad cortical por privación de GABA *in vitro*, los efectos de agonistas sobre el receptor, así como cambios neuroquímicos durante la hiperexcitabilidad. En la tercera sección, se presenta evidencia del efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas, la anisomicina; este fármaco es capaz de bloquear la génesis del SAG. Además, se demuestra la facilitación de la inducción de la LTP durante la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA.

En la *Discusión* se integra una reflexión de las diferencias y las similitudes de la privación de GABA *in vivo* e *in vitro*, además de analizarse los mecanismos que pudieran estar involucrados en el inicio y el mantenimiento de la abstinencia al GABA.

Finalmente, en las *Conclusiones* se enlistan los argumentos finales a los que conducen los resultados.



## I.I RESUMEN

1. La interrupción abrupta de la administración continua de GABA, el neurotransmisor inhibitorio más importante del SNC, induce una epilepsia parcial, además de alteraciones motoras e irritabilidad. A este fenómeno se le ha denominado "Síndrome de abstinencia al GABA" (SAG).

2. Los experimentos de esta Tesis fueron realizados en ratas macho cepa Wistar en dos modelos de hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA. En el primero, *in vivo*, se hicieron registros a nivel EEG. En el segundo, *in vitro*, se registraron potenciales de campo en rebanadas de cerebro. El objetivo principal de esta tesis fue producir y caracterizar la hiperexcitabilidad inducida por la interrupción brusca (privación) de la superfusión de GABA *in vitro*, así como estudiar el efecto de los neuroesteroides en la generación de esta hiperexcitabilidad.

3. Esta estrategia farmacológica permitió identificar algunos cambios celulares que podrían subyacer a los eventos relacionados con la abstinencia generada por diversas drogas que reconocen selectivamente al receptor GABA<sub>A</sub>. En particular, el efecto del GABA asociado con los neuroesteroides produce un incremento de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA; favoreciendo la aparición del SAG *in vivo* y disminuyendo el tiempo necesario para la inducción de la hiperexcitabilidad *in vitro*.

4. Durante la abstinencia al GABA, la alopregnanolona, el neuroesteroide con mayor actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, incrementó su efecto inhibitorio. El flunitrazepam, también puede generar hiperexcitabilidad *in vitro*, por privación. Esta es muy similar a la producida por el GABA, lo cual sugiere que es el receptor GABA<sub>A</sub> el responsable de los cambios que desencadenan el aumento de la actividad eléctrica neuronal.

5. Se observó una disminución en la liberación de GABA-<sup>3</sup>H inducida por alto K<sup>+</sup> y además, durante la incubación con GABA, una posible modificación en los receptores GABA<sub>A</sub>.

6. La inhibición de la síntesis de proteínas con la anisomicina bloquea la génesis del SAG. La inducción de la LTP se facilita durante la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA.

## I.II SUMMARY

1. The abrupt interruption of the continuous administration of GABA, the most important inhibitory neurotransmitter in the CNS, induces partial epilepsy, motor signs and irritability. This phenomenon has been denominated "GABA withdrawal syndrome" (GWS).
2. The experiments described in this Thesis were performed in male Wistar rats in two experimental models of hyperexcitability induced by sharp deprivation of GABA. In the first model, EEG was recorded *in vivo*. In the second, *in vitro*, field potentials were recorded in brain slices. The main objective of this Thesis was to produce and characterize hyperexcitability induced by the sharp interruption (deprivation) of GABA superfusion *in vitro*, as well as to study the effect of the neurosteroids on the generation of this hyperexcitability.
3. This pharmacological strategy applied, allowed the identification of cellular changes that may underlie events related to the withdrawal from diverse drugs which selectively recognize the GABA<sub>A</sub> receptor. In particular, the effect of GABA associated with neurosteroids produces an increase in the hyperexcitability induced by sharp deprivation of GABA. This interaction favors the appearance of GWS *in vivo*, and reduces the time necessary for the induction of hyperexcitability *in vitro*.
4. Allopregnanolone, a neurosteroid with a high affinity for the GABA<sub>A</sub> receptor, increased this inhibitory effect during GABA withdrawal. Deprivation of flunitrazepam can also generate hyperexcitability *in vitro*. This effect is similar to that of GABA, which suggests that it is the GABA<sub>A</sub> receptor that is responsible for the changes that provoke the increase in neuronal electrical activity.
5. A decreased was observed in the release of <sup>3</sup>H-GABA induced by high K<sup>+</sup> stimulation. In addition, GABA application also induced changes in the GABA<sub>A</sub> receptors.
6. The inhibition of protein synthesis by anisomycin blocked the generation of GWS. The induction of LTP was facilitated during hyperexcitability swayed by the sharp deprivation of GABA.

## II INTRODUCCIÓN

Los tratamientos prolongados con drogas que incrementan la actividad GABAérgica como las benzodiazepinas, los barbitúricos o el alcohol, generan estados de tolerancia y dependencia. Al suprimir bruscamente la administración de estas sustancias se manifiestan síndromes de abstinencia caracterizados por cambios en la actividad sensorial-perceptiva, alucinaciones, aparición de crisis convulsivas, etc. Es decir, el retiro de estas drogas favorece un incremento en la actividad neuronal. En los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la privación brusca del GABA, genera cambios electrofisiológicos tendientes al incremento de la excitabilidad neuronal. Como este fenómeno se acompaña de otros signos tales como irritabilidad, aumento de la conducta exploratoria, "sacudidas de perro mojado", movimiento continuo de las vibrisas, contracciones clónicas de la pata posterior contralateral al hemisferio infundido, etc., el fenómeno fue denominado "Síndrome de abstinencia al GABA" (SAG), señalando con esto una analogía heurística con el fenómeno desarrollado por los psicotrópicos que son agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>. Así, nuestra hipótesis más general postula que el sustrato de todas estas abstinencias es el mismo. En esta Tesis, se muestra que la supresión brusca de la administración de GABA *in vivo* genera un foco epiléptico cuando la infusión de GABA se localiza en un punto específico de la corteza cerebral. Este foco epiléptico dura varios días.

Una de las características importantes de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA es que presenta resistencia farmacológica a los antiepilépticos en los primeros estadios de evolución. Una primera hipótesis que se planteó para explicar este evento es que el número de receptores disminuyera debido a la privación de GABA (down regulation; Calkin y Barnes, 1988). Sin embargo, la re-administración de GABA es capaz de disminuir o bloquear completamente la hiperexcitabilidad. Es decir, este primer planteamiento es insuficiente para explicar la fenomenología de la privación de GABA. Por lo que planteamos una segunda hipótesis: ¿es posible que el receptor GABA<sub>A</sub> modifique su estructura debido a la administración y posterior privación de GABA? Muchos modelos de epilepsia y abstinencia tienen como común denominador la modificación en las subunidades que

conforman al receptor de GABA<sub>A</sub>. Así, la “abstinencia” al mismo GABA puede ser el sustrato de muchos tipos de epilepsia cuyo origen común es una modificación del receptor ionotrópico.

No obstante que conocíamos que la enzima de síntesis del GABA, la GAD, está disminuida en su actividad y que se presentan cambios por excitotoxicidad en el tejido nervioso durante la privación de GABA, esta Tesis estudia otros cambios en la sinapsis GABAérgica que podrían estar relacionados con los signos que acompañan la privación de GABA.

Con el fin de distinguir el efecto específico de la privación de GABA, de los cambios generados por las crisis misma y/o la hiperexcitabilidad fue necesario tener un correlato *in vitro* (rebanadas de cerebro). Además, la importancia de caracterizar un modelo *in vitro* en este tipo de fenómenos ayudará a identificar cambios neuroquímicos y biofísicos en diferentes etapas de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA.

Mediante una estrategia farmacológica, determinamos la sensibilidad del receptor GABA<sub>A</sub> durante la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA, para deducir si hay cambios en el receptor.

## **II. I Neurotransmisión GABAérgica: El GABA y sus receptores**

### **III.I GENERALIDADES E HISTORIA**

Un neurotransmisor clásico es una pequeña molécula derivada comúnmente de un aminoácido o de su metabolismo intermediario, se sintetiza por reacciones enzimáticas en secuencia y se almacena en vesículas de las terminales sinápticas. La liberación del neurotransmisor se incrementa durante la despolarización membranal que induce un aumento en la conductancia a calcio de la terminal. El efecto de un transmisor químico se inactiva ya sea por mecanismos de recaptura o por degradación enzimática en el espacio sináptico (Deutch y Roth, 1999).

Un neurotransmisor ejerce un efecto inhibitorio cuando deprime la excitabilidad neuronal. Durante la inhibición disminuye la probabilidad de que una neurona genere potenciales de acción. En el hipocampo y en la corteza cerebral la inhibición se produce mediante circuitos neuronales locales establecidos por interneuronas, de las cuales más del 90% son GABAérgicas (Nurse y Lacaille, 1997). Estas células inhiben a las neuronas de proyección (piramidales), lo cual establece una importante regulación en la

excitabilidad del cerebro (Luddens et al., 1995). No obstante, se ha demostrado que el GABA también genera respuestas despolarizantes (ver sección I.IV de esta Introducción).

El GABA fue descubierto en 1950 por Eugene Roberts (Krnjevic', 1991), y fue hasta 1957 cuando se publicó la primera evidencia que sugería que el GABA era un neurotransmisor. Bazemore y colaboradores identificaron una sustancia endógena o "factor I" como responsable de la acción inhibitoria de los extractos de tejido nervioso sobre neuronas de langostino (Krnjevic', 1997). Un año después se demostró que el GABA, aplicado en forma directa a la corteza cerebral, tenía efectos sobre la actividad eléctrica y se dieron evidencias de que involucraba el movimiento iónico en las neuronas (Krnjevic', 1984; Houser et al., 1984). Fue hasta 1966 cuando se obtuvieron pruebas convincentes del carácter inhibitorio del GABA, al estudiar la placa neuromuscular del crustáceo (Kuffler et al., 1984).

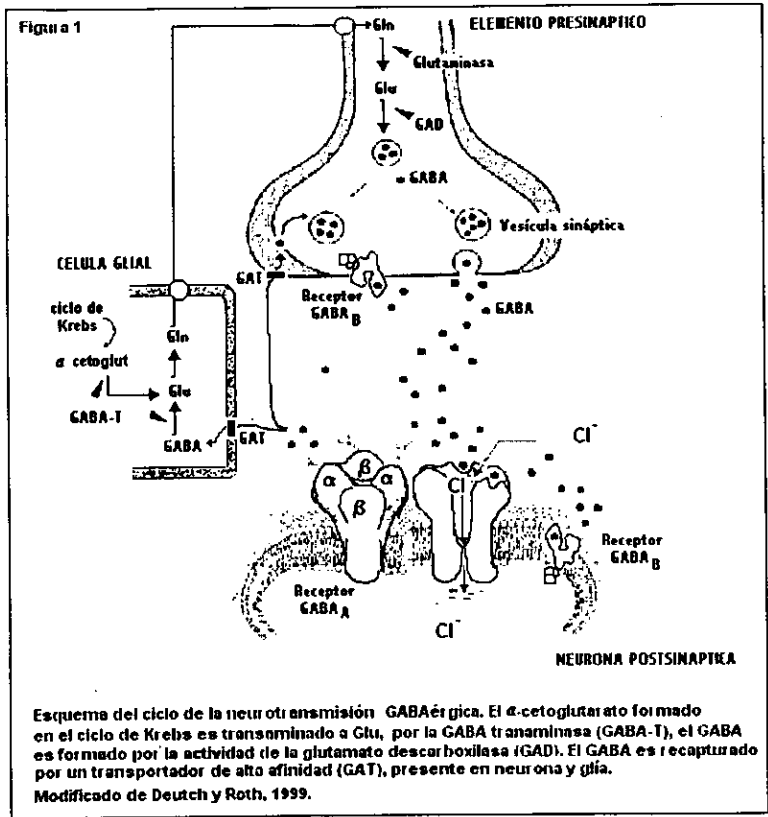
Este neurotransmisor es un aminoácido monocarboxílico (100 daltones), su nombre proviene de las siglas en inglés de su estructura molecular: ácido ( $\gamma$ ) gamma aminobutírico (4-aminobutirato). Es el neurotransmisor inhibitorio predominante en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (Olsen y Tobin, 1990; McKernan y Whithing, 1996; Avoli et al., 1997).

### **II.I.II SINTESIS Y METABOLISMO**

El GABA se sintetiza en las terminales nerviosas por descarboxilación del glutamato, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) también conocida como L-glutamato 1-carboxilasa-liasas. La mayor parte del ácido glutámico necesario para la formación del GABA no proviene del torrente sanguíneo, la neurona posee un mecanismo enzimático de síntesis a partir de una transaminación oxidativa debida a la  $\alpha$ -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), o por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa. Las fuentes del ácido glutámico son: 1) el  $\alpha$ -cetoglutarico, metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ó 2) la desaminación de la glutamina (DeLorcy y Olsen, 1994; Deutch y Roth, 1999).

Un aspecto interesante en la síntesis del GABA es el que la enzima que provee al sustrato (glutamato) también lo degrada. El GABA es transformado a semialdehído succínico por la GABA-T en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarico como co-sustrato para la

reacción. Así, la GABA-T es la clave de la síntesis y el catabolismo del GABA. Estos aspectos hacen diferente la síntesis del GABA a la de otros neurotransmisores, ya que el GABA es un derivado directo del metabolismo intermediario de la glucosa (Paul, 1995; figura 1).



La GAD es una enzima citosólica mientras que el glutamato es sintetizado en la mitocondria, por lo que es necesario un transporte (shunt) o derivación del precursor de un compartimento a otro para garantizar la producción de GABA. La GAD es crítica para el control de la excitabilidad neuronal, ya que una disminución en su actividad favorece la aparición de convulsiones (Tapia et al., 1975). Esta enzima tiene como cofactor a un derivado de la vitamina B6, el fosfato de piridoxal (PLP; por sus siglas en inglés). La GAD esta presente en las neuronas en dos isoformas que se encuentran codificadas por dos distintos genes. Las isoformas son distinguidas como GAD65 y GAD67 de acuerdo con su peso molecular. Estas exhiben algunas diferencias en su

distribución molecular, lo que sugiere que estas dos formas de GAD pueden regular diferentes vías de síntesis de GABA. Estas GADs difieren significativamente en su afinidad por el PLP: la GAD65 muestra una alta afinidad al cofactor en tanto que la GAD67 posee una muy débil interacción con el PLP. La GAD65 es una enzima cuya actividad es rápida y eficientemente regulada. La GAD67 se regula a nivel transcripcional y su expresión depende de la excitabilidad de la neurona (Tapia y Sandoval, 1971; Covarrubias y Tapia, 1980). La GAD no está presente en neuronas en las que el ácido glutámico se utiliza como neurotransmisor, es decir, las neuronas glutamatérgicas no tienen al GABA como neurotransmisor (Paul, 1995).

### II.I.III RECAPTURA

Estudios farmacológicos muestran que el GABA se recaptura por las neuronas y por la glía. La recaptura depende del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ , por lo que es dependiente de la actividad de la  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ . Además, la glía tiene capacidad de almacenar GABA. La recaptura de GABA es el mecanismo primario de la inactivación de su efecto. El transportador es una proteína de doce segmentos transmembranales, tiene sitios de glicosilación, y varios sitios para ser fosforilado: uno para proteína cinasa A (PKA) y siete para proteína cinasa C (PKC), por lo que este proceso se modula por la actividad de segundos mensajeros (Bowery, 1990; Nelson et al., 1990). Actualmente se distinguen tres distintos transportadores de GABA. Uno de ellos se expresa en forma específica en neuronas, otros lo presentan únicamente las células gliales y otro es común para ambos tipos de célula (Guastella et al., 1990; Liu, 1992).

Ante una estimulación eléctrica o química, el tejido neural inicia una respuesta. Entre los eventos que se suscitan, se puede identificar a las respuestas sinápticas excitadoras e inhibitoras. Las primeras favorecen la propagación de los impulsos eléctricos ya sea por la liberación de neurotransmisores o por modificaciones en el nivel de receptores postsinápticos. En tanto que los eventos sinápticos inhibitorios puede operar mediante dos mecanismos generales: por reducción en la liberación de aminoácidos excitadores a través de una acción presináptica o por reducción de la excitabilidad de la célula postsináptica (Kuriyama, 1993).

## II.1.IV FISIOLÓGIA

El GABA tiene efectos en ambas membranas: pre y postsináptica (Krnjević, 1997). El mecanismo de inhibición presináptico es a partir de una disminución en el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , catión involucrado en la maquinaria de liberación de neurotransmisores en la terminal nerviosa. A nivel postsináptico el mecanismo se debe a un rápido incremento en la conductancia al  $\text{Cl}^-$ , lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal. Además, en algunas neuronas se incrementa una conductancia lenta de  $\text{K}^+$ , fortaleciendo la hiperpolarización. A todo el evento postsináptico se le denomina potencial postsináptico inhibitorio (IPSP por sus siglas en inglés; Borman, 1988; Krnjević, 1991, 1997). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que durante la activación prolongada de los receptores de  $\text{GABA}_A$  en la dendrita, la respuesta de la membrana postsináptica cambia de hiperpolarización a despolarización (Staley y Proctor, 1999). Una explicación para el cambio del efecto del GABA es la siguiente: el incremento del flujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  a través del ionóforo  $\text{GABA}_A$  incrementa la concentración de estos aniones en el interior de la célula, por lo que disminuye la fuerza electroquímica de los aniones y en consecuencia su flujo al interior de la neurona también disminuye. Además, al cambiar su potencial de equilibrio, se favorece un egreso del  $\text{HCO}_3^-$ , produciendo un evento despolarizante (Grover et al., 1993). Esta despolarización disminuye el bloqueo dependiente de voltaje del receptor NMDA por parte del ion magnesio, por lo que esta actividad mediada por GABA es suficiente para la activación sináptica del receptor NMDA (Staley et al., 1995). Las respuestas postsinápticas  $\text{GABA}_A$ érgicas en neuronas corticales pueden consistir en una temprana "hiperpolarización somática" (también denominada respuesta h- $\text{GABA}_A$ ) y una respuesta "despolarizante dendrítica" (o respuesta d- $\text{GABA}_A$ ; Bonnet y Bingmann, 1995). En conclusión, los flujos de bicarbonato contribuyen a la respuesta d- $\text{GABA}_A$ , en tanto que la respuesta h- $\text{GABA}_A$  es principalmente debida al  $\text{Cl}^-$  (Perkins y Wong, 1997).

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción en la membrana a través de proteínas receptoras. El GABA se une a más de un sitio a nivel de la membrana neuronal. Los receptores para el GABA se dividen en dos grandes grupos, uno asociado a proteínas G y nucleótidos cíclicos, denominado tipo B o  $\text{GABA}_B$  o de tipo metabotrópico. El otro es el receptor tipo A,  $\text{GABA}_A$  o de tipo ionotrópico debido a que a través de él pasan aniones.



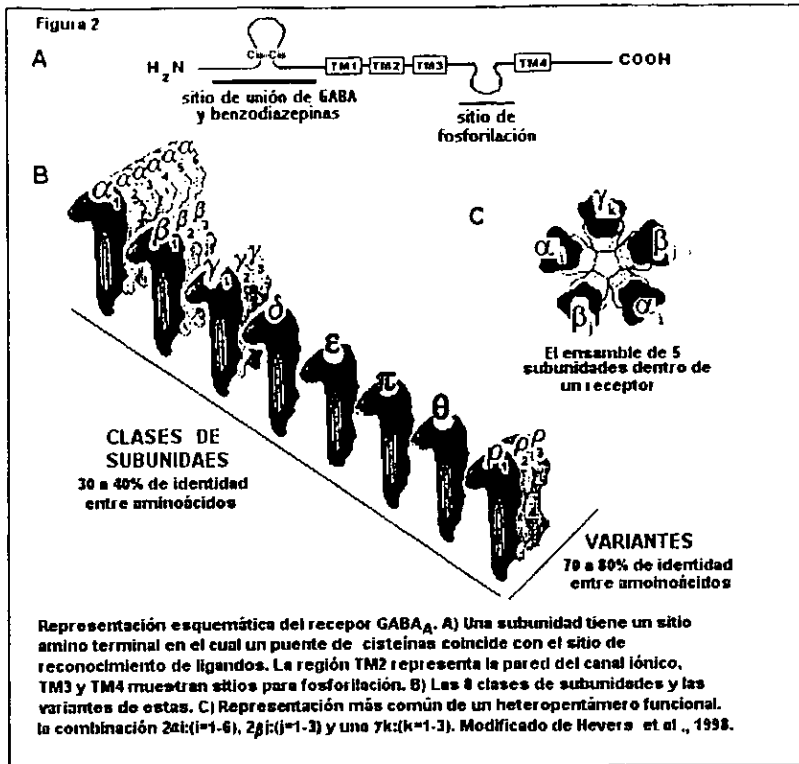
## II.I.V EL RECEPTOR GABA<sub>B</sub>

El receptor GABA<sub>B</sub> es una proteína de aproximadamente 80 kDa (Ohmori y Kuriyama, 1991) con siete segmentos transmembranales. Es miembro de la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Soltes et al., 1988; Kaupmann et al., 1997); es insensible a bicuculina (antagonista GABA<sub>A</sub>) pero reconoce al baclofén (agonista específico). Se ha demostrado que este fármaco actúa presinápticamente disminuyendo la liberación de neurotransmisores en el SNC (Thompson, 1992). Otro agonista selectivo de este receptor es el ácido 3-amino propil fosfonato (APPA, por sus siglas en inglés); en tanto que los antagonistas selectivos de este receptor son el saclofén y el faclofén (Kerr et al., 1987; Karlsson et al., 1988). El receptor GABA<sub>B</sub> se encuentra en ambas membranas sinápticas: a nivel presináptico es el receptor que permite la disminución en la liberación de neurotransmisores por un bloqueo en el ingreso de calcio a la terminal sináptica vía proteínas G, de tal forma que al ser activado inhibe la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. En la región postsináptica la activación de este receptor induce un incremento en la conductancia a potasio, lo que se identifica como la porción lenta del IPSP (Deutch, 1999).

## II.I.VI ESTRUCTURA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> tiene una composición semejante a los receptores ionotrópicos de acetilcolina (nicotínico) o de glicina y serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Estas proteínas están formadas por subunidades, y presumiblemente derivan de genes ancestrales. El receptor GABA<sub>A</sub> es un complejo molecular integrado como heteropentámero de peso aproximado entre 275 a 400 kDa (Hevers Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart et al., 1999).

El estudio de la estructura molecular del receptor GABA<sub>A</sub> ha permitido caracterizar a las subunidades que lo forman (figura 2). Estas proteínas se denominan con las letras griegas: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ε), pi (π), rho (ρ) y theta (θ); además, es posible distinguir diversos tipos: 6 diferentes subtipos de α; 4 distintas β, 4 tipos de γ, 1 forma de δ, 1 de tipo ε, 1 sola π, 3 formas de ρ y un solo tipo de θ (Kardos, 1999; Chebib y Johnston, 1999).



Basándose en esta heterogeneidad de isoformas, el ensamble variable de las subunidades otorga diversidad en las propiedades biofísicas del receptor. A partir de esta variedad de subunidades se puede calcular una combinación de más de 10 000 isoformas posibles del receptor  $GABA_A$ , aunque no todas serían funcionales (Wafford et al., 1994; Araki et al., 1992; Wang et al., 1992; Zhang et al., 1992; Bovolin et al., 1992; Araki y Tohyama, 1992). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular, el cual puede ser el sitio de ligado de varias moléculas. Todas las subunidades presentan 4 dominios transmembranales denominados TM1, TM2, TM3, y TM4; la región TM2 representa un especial interés: permite la formación de un canal iónico. Localizado en la región del citosol cada TM tienen 2 anillos de residuos de aminoácidos, el anillo que conecta a las regiones TM3 con TM4 contienen residuos de serina, un excelente blanco susceptible de ser fosforilado.

La secuencia de aminoácidos que componen a cada una de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> tiene una masa molecular en el rango de 48 a 64 kDa y además muestra entre un 30 a 40% de identidad entre los distintos grupos de subunidades y un 70 a 80% de identidad entre subunidades del mismo grupo (Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996; Hevers y Luddens, 1998.).

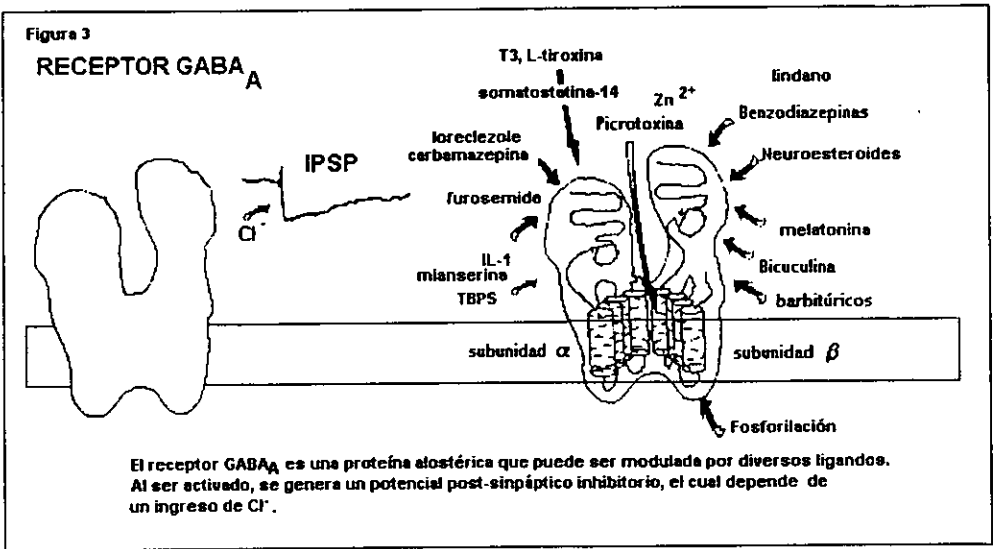
El sitio de pegado del GABA a su receptor es a nivel de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Específicamente, en la subunidad  $\alpha 1$  el residuo del aminoácido fenilalanina en la posición 64, es determinante para el pegado del neurotransmisor; en tanto que al nivel de la subunidad  $\beta$  los residuos de tirosina 157 y 205 así como las treoninas 160 y 302 son indispensables para el pegado del GABA. Cuando este neurotransmisor se une a su receptor ionotrópico los aniones pasan al interior de la neurona produciendo hiperpolarización o un cambio en el potencial de membrana que lo aleja del umbral de disparo del potencial de acción. Este fenómeno se debe a un cambio conformacional de la proteína receptora que la convierte en un canal, el cual es significativamente largo (5-8 Å). La formación de un canal selectivo en estas condiciones permite el flujo de Cl<sup>-</sup> y aniones al interior de la célula. Esta selectividad proviene de la carga positiva de los aminoácidos que estratégicamente se encuentran en la porción final del interior del canal.

El receptor-canal exhibe 3 diferentes conductancias las cuales se encuentran entre los 12, 17-20 y 27-30 pS; además se han revelado tres diferentes estados de apertura: 0.5, 2.6 y 7.6 ms (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996).

### III.VII. MODULACION ALOSTERICA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> es una proteína alostérica. Esto es, sus propiedades pueden ser moduladas por la unión de otros compuestos que no se unen al mismo sitio que reconoce al GABA. Ciertos fármacos hacen más eficiente la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del receptor/canal o cambiando el tiempo de apertura del canal. Ejemplos de estos moduladores son los barbitúricos y las benzodiazepinas, ya que ambos grupos de fármacos se unen al receptor y potencian la actividad del GABA, por ejemplo, desplazan la función concentración-respuesta de GABA hacia a la izquierda (Hadingham et al., 1992; McKernan y Whiting, 1996). Específicamente, las benzodiazepinas son moduladores de las corrientes de Cl<sup>-</sup> ya que

incrementan la frecuencia de apertura del canal pero no la duración de los estados abiertos, en tanto que los barbitúricos alteran las características de las corrientes GABAérgicas incrementando la duración de las aperturas del canal. De tal forma que el resultado neto de la presencia de barbitúricos o benzodiazepinas o ambos es el incremento de la inhibición neuronal (Macdonald y Olsen, 1994; Kardos, 1999). Las benzodiazepinas tienen su sitio de pegado en el receptor al nivel de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, quien confiere la afinidad por las mismas es la subunidad  $\gamma$ ; principalmente el subtipo tipo 2 ( $\gamma 2$ ). El efecto alostérico de las benzodiazepinas es uno de los más estudiados. El GABA debe estar presente para que el efecto de las benzodiazepinas se observe (Bureau y Olsen, 1990; Knapp et al., 1990).



El sitio de interacción de los barbitúricos se localiza en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor. Los barbitúricos tienen un modelo dual de acción: a concentraciones pequeñas su efecto depende de la presencia del GABA, sin embargo, a dosis grandes el efecto de incremento en el tiempo de la apertura del canal depende exclusivamente del barbitúrico.

También interactúan con este receptor algunos tipos de esteroides, los cuales pueden modularlo en forma positiva y/o negativa (Majewska, 1992); el alcohol que reconoce un sitio diferente al de benzodiazepinas y barbitúricos (Aguayo, 1990) y la picrotoxina que

se une aparentemente al poro del canal previniendo el flujo de iones, debido a un bloqueo de apertura.

La bicuculina, un potente convulsivante, disminuye el pegado del GABA al receptor de manera competitiva. Agonistas selectivos de este receptor son la isoguvacina y el muscimol. Los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> mejor estudiados son el t-butilbiclofosforotionato (TBPS), y la penicilina, que bloquea el poro (Ruano et al., 1991; Costa, 1987; Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999).

Finalmente, algunos anestésicos generales como iso fluorano y el halotano; anticonvulsivantes como el loreclezole, la carbamazepina; la hormona tiroidea T3 así como la L-tiroxina; la somatostatina-14, la melatonina; los antihelmínticos como la ivermectina; pesticidas como el lindano, endrina, y dieldrina; algunas poliaminas como la espermina y la espermidina; antidepressivos como la mianserina y el amoxapina; diuréticos como el furosemide; citocinas como la interleucina-1 son moléculas que reconocen al receptor pero cuyo efecto o importancia en la modulación en la neurotransmisión GABAérgica aun no esta suficientemente estudiada (Mehta y Ticku, 1999). Se conoce que los cationes polivalentes como el Zn<sup>2+</sup> se comportan como un bloqueador no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> de una forma dependiente del voltaje. El efecto del Zinc disminuye o desaparece si el receptor GABA coexpresa la subunidad  $\gamma$  (Draguhn et al., 1990). Es decir, un receptor ionotrópico que es sensible a benzodiazepinas, es resistente al bloqueo por Zn<sup>2+</sup>. Tomando en cuenta que el zinc se localiza en vesículas sinápticas y es coliberado con varios neurotransmisores y hormonas, es posible que este catión module la actividad de ciertos subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> (Legendre y Westbrook, 1990; DeFazio y Hablitz, 1998).

Una misma neurona es capaz de expresar diferentes tipos de receptor GABA<sub>A</sub> y por lo tanto tener susceptibilidad farmacológica variable (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).

## II.I.VIII DISTRIBUCION DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> EN EL SNC

Con base en estudios farmacológicos se tienen evidencias de una segregación espacial de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> postsinápticos en células piramidales. La respuesta postsináptica del receptor GABA<sub>B</sub> se genera en dendritas, en tanto que la respuesta GABA<sub>A</sub> se produce en el soma y las dendritas.

Excepcionalmente a las subunidades  $\rho$  que se expresan únicamente en la retina y las  $\pi$  que se encuentran en timo, pulmón, próstata y útero, las otras subunidades se expresan ampliamente en el cerebro. El receptor GABA<sub>A</sub> de la retina es farmacológicamente insensible a bicuculina aunque es sensible a picrotoxina. No muestra modulación por barbitúricos, benzodiazepinas y/o baclofen por lo que se le denominó GABA<sub>C</sub> (Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). Los receptores GABA<sub>C</sub> se forman a partir de la unión de varias isoformas de la subunidad  $\rho$ , capaces de formar el canal de Cl<sup>-</sup>. Los agonistas descritos para este subtipo de receptor son el ácido cis-4-aminocrotónico o ACCA y el ácido trans-4-aminocrotónico (TACA). En cuanto a los antagonistas del receptor GABA<sub>C</sub>, el mejor estudiado es el ácido imidazol-4-acético y el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4il-metilfosfonico.

Estudios de biología molecular han permitido el mapeo de algunas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en el genoma humano. Así por ejemplo, los genes que codifican a las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$  se encuentran en el cromosoma 5 en las regiones q32-q33. En tanto que las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  se encuentran en el cromosoma 4 en las porciones p13-4q11, en el caso de la subunidad  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  y  $\gamma 3$  se encuentran en el cromosoma 15 en sus regiones q11-q13. La subunidad  $\alpha 3$  se encuentra codificada en un gen que reside en el cromosoma X (Thompson et al., 1992; Wilcox et al., 1992).

No obstante que los ARNm de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> se encuentran en casi todo el cerebro, pueden distinguirse distribuciones heterogéneas en algunas regiones del SNC. Por ejemplo, las células de Purkinje del cerebelo expresan casi exclusivamente la subunidad  $\alpha 6$ , en tanto que la subunidad  $\alpha 1$  se expresa principalmente en neocorteza y cerebelo. En corteza cerebral son muy comunes las subunidades  $\alpha 1-4$ , al igual que la isoforma  $\beta 2$ , en tanto que las subunidades  $\beta 1$  y  $3$  son más comunes en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el cerebelo. Por otra parte, las subunidades  $\beta 4$  y  $\gamma 4$  se han descrito solamente en el cerebro del pollo. Es interesante que la subunidad  $\gamma 1$  se expresa predominantemente en la amígdala y el septum; la variante  $\gamma 2$  se encuentra prácticamente en todo el cerebro, y su asociación con  $\beta 2$  y  $\alpha 1$  es frecuente (Essrich et al., 1998), la subunidad  $\gamma 3$  se localiza en la corteza cerebral y el estriado. La triple combinación  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  conforma la más frecuente población de receptor GABA<sub>A</sub> en la corteza cerebral, en comparación con el hipocampo, donde es común la expresión de las subunidades  $\alpha 2\beta 1\beta 3\gamma 2$  y  $\alpha 5\beta 1\beta 3\gamma 2$  (McKernan y Whiting, 1996). La subunidad  $\gamma 2$  tiene dos isoformas: larga ( $\gamma 2L$ ) y corta

( $\gamma 2S$ ; por sus siglas en inglés), la subunidad  $\gamma 2S$  es más abundante que la  $\gamma 2L$  en el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio, en contraste, en el colículo inferior, el bulbo y en el cerebelo se expresa más  $\gamma 2L$  que  $\gamma 2S$ . La mayor expresión de subunidad  $\delta$  se cuantifica en el cerebelo. En tanto que la subunidad  $\epsilon$  está en la amígdala, el tálamo y los núcleos subtalámicos (Hevers y Luddens, 1998; Mehta y Ticku, 1999).

La coexpresión de las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  asociadas con  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  o  $\beta 3$  con  $\gamma 2$  integran a los receptores  $GABA_A$  en los que se presenta una mayor sensibilidad a benzodiazepinas. Es posible subdividir a los receptores  $GABA_A$  con base en sus propiedades farmacológicas del efecto y pegado de las benzodiazepinas. El receptor tipo I (BZI), une con mayor afinidad a la trizolopiridazina (CI 218 872) en tanto que el receptor tipo II (BZII) une con gran afinidad al 1,4 benzodiazepina: 2 oxo-quazepam. El receptor BZI abunda en cerebelo, en tanto que el BZII se localiza en casi todo el cerebro. Para tipo de fármacos, como el TBPS el pegado al receptor  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  es considerable; en tanto que para algunos esteroides requieren de la presencia de  $\beta 2\gamma 2$  con cualquier isoforma de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$  para una modulación positiva potente (Fritschy et al., 1992; Puia et al., 1993).

Diversos estudios indican que la fosforilación del receptor  $GABA_A$  modifica las corrientes de  $Cl^-$  inducidas por GABA, benzodiazepinas y etanol. La fosforilación puede aumentar (Stelzer et al., 1988; Browning et al., 1990) o disminuir estas corrientes (Leidenheimer et al., 1992; Leidenheimer y Chapell, 1997), modificando la cinética de activación y el proceso de desensibilización del receptor. Esta modulación por fosforilación depende de distintas enzimas activadas por diversos segundos mensajeros, por ejemplo, la PKA, la PKC y por la cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  (CAMII). El blanco de estas fosforilaciones son los residuos de serina de las asas que comunican a M3 y M4 de las subunidades  $\beta$  (figura 2). De esta forma, la actividad de este receptor ionotrópico puede ser modulada por señales externas e internas (Figura 3; Lambert y Harrison, 1990; Bureau y Laschet, 1995; Krishek et al., 1994; Zahi et al., 1998; Churn y DeLorenzo, 1998).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica tienen un papel preponderante en la fisiopatogénesis de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, síndromes de abstinencia, etc., cuya característica principal es el aumento de la excitabilidad neuronal. Uno de los siguientes cambios puede ser suficiente para disminuir la eficacia de la transmisión GABAérgica: a) modificaciones en la síntesis del GABA b)

disminución en la liberación del GABA, c) cambios en la recaptura del GABA y d) modificaciones en la composición heteromérica.

En algunos tipos de epilepsia y en algunas enfermedades neurodegenerativas además de que la neurotransmisión inhibitoria está disminuida, hay un incremento en la transmisión excitadora. Diferentes evidencias experimentales apoyan lo anterior: a) existe una disminución de las terminales GABAérgicas corticales en diversos modelos de epilepsia experimental (Olsen y Avoli, 1996; Ribak y Bakay, 1999), b) las concentraciones de GABA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con diagnóstico de epilepsia y en modelos experimentales de epilepsia se encuentran por abajo de los niveles normales (Krnjevic', 1997), c) los fármacos que interfieren con el sistema GABAérgico provocan convulsiones tanto en el hombre como en animales, en tanto que aquellos fármacos que incrementan la función del GABA poseen propiedades anticonvulsivantes (LeGal La Salle et al., 1988; Brailowsky et al., 1988, 1989; Doble y Martin, 1996); d) en animales con epilepsia genética el común denominador son las anomalías en los receptores GABA<sub>A</sub> (Brailowsky et al., 1989; Olsen y Avoli, 1996) y e) muchos tipos de epilepsia inducen alteraciones en el receptor GABA<sub>A</sub> (Hu y Ticku, 1994. Speark et al., 1998; Smith et al., 1998).

## **II. II Los esteroides: características generales**

Las hormonas esteroides se clasifican con base en su estructura química y en su efecto biológico. Muchos tejidos del organismo participan en el metabolismo de estas hormonas, ya sea como fuente de origen o como órganos blanco. La IUPAC-IUB (que son las siglas en inglés de la Joint Commission of Biochemical Nomenclature) propuso en 1989 la estructura básica de los esteroides, la cual se muestra en la figura 4. El núcleo básico de los esteroides es el ciclopentano perihidrofenantreno, que varía dependiendo de las sustituciones en la posición del carbono número 17. (Hill et al., 1991).

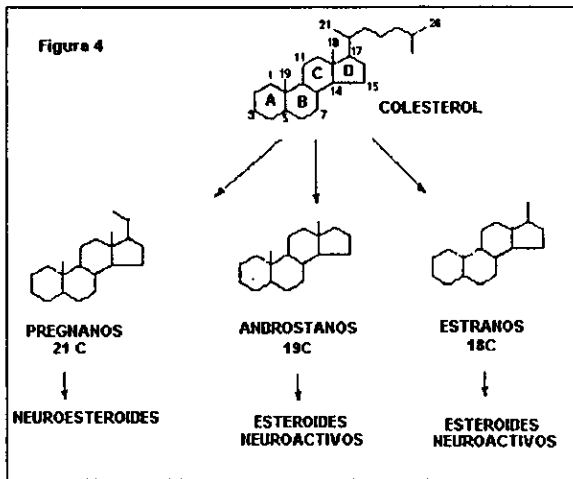
La célula que sintetiza esteroides puede obtener el colesterol, principal precursor, por tres diferentes vías:

- a) del torrente circulatorio a partir de lipoproteínas circulantes (de baja densidad o LDL) que al unirse a su receptor específico se internalizan y liberan en el citosol al colesterol.
- b) utilización de ésteres de colesterol en pozas de reserva citoplasmáticas (inclusiones citoplásmicas).



c) síntesis "de novo" a partir de acetil-coenzima A, cuyo paso limitante es al nivel de la enzima 3-OH-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG CoA reductasa; Jung-Testas, et al., 1999; Robel y Baulieu, 1995).

A partir del último tercio de los años setenta y durante la década de los ochenta, se comprobó que algunos efectos inducidos en el SNC por los esteroides tienen latencia corta (segundos/minutos), sugiriendo que no intervienen los receptores intracelulares (Roberts, 1995).



Los primeros estudios se realizaron con radioligandos; por medio de ellos se caracterizó la unión específica de los esteroides a la membrana neural. Towle publicó esto en membranas sinápticas (Towle et al., 1983). Posteriormente, Ke reportó que el C#11 de la progesterona se une por igual a la albúmina sérica que a un receptor membranal (Ke y Ramírez, 1990). Manipulaciones experimentales que descartan los mecanismos genéticos, por ejemplo, el bloqueo de la entrada del esteroide a la célula, la eliminación del núcleo celular, o la inhibición de los mecanismos de traducción genética (ARNs/síntesis proteica), brindaron evidencia de efectos rápidos e independientes del genoma (Lambert et al., 1999).

Actualmente se sabe que algunos esteroides se unen a receptores membranales de distintos neurotransmisores: GABA, glutamato, acetilcolina y glicina, interactuando con ellos en forma alostérica, modificando la concentración de algunos iones intracelulares, y en consecuencia, modificando la excitabilidad de la membrana neuronal. Esta "neuromodulación" de los esteroides se describe como efectos no

genómicos (Belelli et al., 1989; Carette et al., 1984; Harrison et al., 1984; Majewska et al., 1987, 1992; Gasior et al., 1999).

## II. III Esteroides Sistémicos y Esteroides Neuroactivos

Los órganos principales de síntesis de hormonas esteroides son las gónadas, la placenta (esteroides sexuales) y las glándulas suprarrenales (mineralocorticoides y glucocorticoides). En conjunto, a estos esteroides se les denomina esteroides sistémicos (ES). Los esteroides neuroactivos (EN) se refieren a los esteroides sistémicos con actividad en el tejido neural pero que el cerebro no sintetiza; estos son abundantes en el plasma y su concentración cambia en forma circádica (Majewska, 1992).

A principios de la década de los noventas se describió la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol marcado radioactivamente en homogenados de cerebro (Baulieu et al., 1992). Posteriormente se caracterizó su conversión a varios metabolitos, entre ellos a la  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona (pregnanolona o alopregnanolona o  $3\alpha$ -OH-DHP), así como al sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). Se identificó a las enzimas asociadas al citocromo p450sc: hidrolasas, desmolasas y oxidorreductasas en los oligodendrocitos, además de la enzima que reduce a la progesterona: la  $5-3\alpha$ -reductasa. Por lo anterior, se puede considerar al oligodendrocito como una célula neuroparácrina, productora de esteroides y neuromoduladora del SNC (Joels, 1997; Rupprecht et al., 1996). Etienne Baulieu y Paul Robel denominaron neuroesteroides a los esteroides sintetizados de novo en el cerebro (Baulieu y Robel, 1993). Las concentraciones de los neuroesteroides son independientes de la concentración de los esteroides sistémicos.

## II.IV Neuroesteroides

Los neuroesteroides endógenos y sintéticos con mayor actividad sobre el receptor  $GABA_A$  son los que tienen el anillo A reducido en su C#5 e hidroxilado en el C#3, ambos en posición  $\alpha$ , y un átomo electronegativo (comúnmente oxígeno) en el C#17 ó en el C#20 (Finn y Gee, 1993). Estas características las tienen la alopregnanolona y el esteroide neuroactivo tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC). La

alopregnanolona es el neuroesteroide con mayor actividad biológica y potencia farmacológica sobre el receptor GABA<sub>A</sub> (Farrb et al., 1992). Sus efectos descritos son: ansiolíticos, hipnóticos, antiepilépticos y anestésicos, (Majewska, 1992; Lan y Gee, 1994).

En los mamíferos, la concentración de pregnenolona es elevada en la etapa postnatal (40 ng/g) y posteriormente disminuye. La concentración incrementa en situaciones de estrés, gestación y periodo postparto (Wieland et al., 1981), lo que contribuye a la relajación, sedación y analgesia en estos estados (Wilson et al., 1992; Grobin et al., 1992; Kabbadj et al., 1993).

El cerebro de los mamíferos produce también neuroesteroides antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>; en esta categoría se encuentra los derivados sulfatados: sulfato de pregnenolona (PS) y el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). Estos neuroesteroides se han utilizado como agentes proconvulsivos en diversos modelos experimentales (Kokate et al., 1999).

De acuerdo a la heterogeneidad del receptor GABA<sub>A</sub>, las subunidades  $\alpha 1$ , 4 y 3 parecen proporcionar la mayor sensibilidad del receptor GABA<sub>A</sub> a los neuroesteroides, en tanto que es necesaria la presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\gamma 2$  como moduladoras de esta actividad. Sin embargo, aún no se ha identificado la posible función de otras subunidades (Maitra y Reynolds, 1998, 1999; Penschuck et al., 1999).

Se ha identificado al menos dos sitios diferentes del receptor GABA<sub>A</sub> con los que interactúan los neuroesteroides; caracterizados por su afinidad. Se ha postulado que el sitio de alta afinidad para el sulfato de pregnenolona, se refiere a una porción hidrofóbica dentro del receptor, ya que es insensible a digestión proteica. Sin embargo, para DHEAS los efectos de enzimas proteolíticas alteran notablemente la unión al receptor. Lo anterior hace pensar en distintos sitios de unión del receptor para estas moléculas y la participación de estructuras fuera del receptor (Majewska, 1992; Joels, 1997; Maitra y Reynolds, 1999).

Majewska propone que la interacción a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> es distinta entre los neuroesteroides agonistas y los neuroesteroides antagonistas (Majewska, 1992). Ambas moléculas muestran diferencias en su polaridad: los agonistas son altamente liposolubles en tanto que los antagonistas son muy hidrosolubles (grupo sulfato); esta propiedad hace que ambas estructuras se comporten en forma diferente en la membrana plasmática.

El átomo electronegativo del C#20 de los neuroesteroides agonistas es posible que sea la principal diferencia polar entre ambos grupos de neuroesteroides y a su vez el factor fundamental de unión a la proteína. La 3 $\alpha$  hidroxilación también puede ser responsable de una modificación del receptor. Tanto la 3 $\alpha$  hidroxilación como el grupo ceto del C#17 o del C#20 interactúan con las subunidades proteicas del receptor mediante puentes de hidrógeno, en tanto que la posición 3 $\beta$  es esencial para el efecto antagónico de los neuroesteroides sulfatados.

Orchinik, en 1993 propuso que los neuroesteroides pueden interactuar con proteínas G acopladas a sistemas efectores en la membrana neural. Un año después se identificó que algunos neuroesteroides eran capaces de modular corrientes de calcio por mecanismos de transducción acoplados a proteínas G sensibles a toxina pertusis (French-Mullen et al., 1994).

A fines de la década de los ochentas se propuso una probable relación entre la excitabilidad cerebral y los cambios cíclicos de las hormonales sexuales (estrógenos y progestágenos). La evidencia clínica y experimental apoya a los estrógenos y progestágenos como moduladores en la frecuencia de presentación de algunos tipos de epilepsia, en contraste con los pobres efectos de los andrógenos y otros esteroides (Gasior, 1999).

Los efectos de esteroides sexuales sobre algunos tipos de epilepsia han sido estudiados en modelos animales; por ejemplo, las crisis epilépticas inducidas por fármacos o electrochoque se incrementan por la administración de estrógenos, en tanto que las inyecciones IV de progesterona reducen estas crisis, así como aquellas que son inducidas por penicilina en gatas ovariectomizadas (Zahn, 1999).

En el ámbito clínico, la relación entre hormonas sexuales y epilepsia es cada vez más evidente: las crisis generalizadas son más frecuentes durante la fase del ciclo menstrual o fase premenstrual, en el que existe una disminución en la concentración de progesterona y se inicia un aumento en la concentración de estrógenos, en tanto que después de la fase lútea, existe una disminución significativa en la presentación de este tipo de crisis (Zahn, 1999).

Otro hecho que sugiere una relación íntima entre la hiperexcitabilidad neuronal y los esteroides es el cambio de frecuencia de aparición de la epilepsia generalizada y no generalizada en el embarazo. Algunos trabajos (Hallbreich et al., 1996; Morrel, 1998) mencionan una exacerbación de las crisis generalizadas, en el primer trimestre de la

gestación. En el postparto inmediato, las concentraciones de progesterona aumentan casi diez veces; en esta etapa la ocurrencia de las crisis epilépticas tiene una disminución significativa. A la epilepsia relacionada con los niveles de esteroides se le denominó "epilepsia catamenial" (Klein y Herzog, 1998; Morrel, 1998; Wooley y Schwartzkroin, 1998).

El efecto de los anticonceptivos orales en pacientes epilépticas, es otro punto a favor de la relación epilepsia-esteroides. La "Sociedad Americana contra la Epilepsia" y "la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de los E.U." advierten que el consumo de anticonceptivos de tipo estrogénico incrementa el riesgo de desencadenar crisis convulsivas en mujeres con diagnóstico previo de epilepsia. Se ha reportado que las crisis epilépticas son más frecuentes en mujeres con ciclos anovulatorios en comparación con mujeres que sí ovulan, por lo que ambas sociedades médicas proponen que manejos a base de anticonceptivos orales sean previamente sometidos a protocolos de estudio e individualizados. En contraste, la medroxiprogesterona, análogo de la progesterona, utilizado en la clínica como anovulatorio, se caracterizó también como un potente antiepiléptico ya que disminuyó las crisis en las mujeres que lo recibieron (Klein y Herzog, 1998).

En resumen, la relación entre la epilepsia y los esteroides está basada en evidencia experimental y clínica: a) el período menstrual define cambios cíclicos en los niveles tanto de progesterona como de estrógenos; la segunda parte del ciclo depende de progesterona; en ésta, la susceptibilidad a padecer una crisis epiléptica es menor que en cualquier parte del ciclo (Klein y Herzog, 1998); por lo que, b) los efectos de estrógenos y progesterona son de favorecer y disminuir respectivamente la actividad interictal (Morrel, 1998); c) estos cambios en las concentraciones de hormonas esteroides sexuales son evidentes en ciertas etapas biológicas, como en la pubertad y el embarazo, en los cuales cambia la frecuencia de aparición de episodios epilépticos (Wooley y Schwartzkroin, 1998); d) la administración de análogos y antagonistas de progesterona y estrógenos permiten facilitar o prevenir sus efectos sobre la excitabilidad cerebral (Zahn, 1999).

Se anexa el artículo de revisión "Neuroesteroides, neuromoduladores de la excitabilidad cerebral, Gac. Méd. Mex. 1998; 134 69-84, con el objetivo de mostrar la neuromodulación de los neuroesteroides en otras neurotransmisiones.

# Neuroesteroides. Neuromoduladores de la excitabilidad cerebral

Eduardo Calixto González,\* Simón Brailowsky\*\*

## Resumen

A los esteroides producidos por el cerebro se les denomina neuroesteroides (NE), los cuales pueden modular las neurotransmisiones: GABAérgica, glutamatérgica, glicinérgica y colinérgica (receptor nicotínico). Estos efectos son de latencia y duración corta, y no implican al genoma celular. La interacción de estos NE con receptores membranales contribuye a la regulación de la excitabilidad neuronal, y su estudio ha permitido un mejor entendimiento de fenómenos cognoscitivos, hormonales, de la epilepsia, así como el desarrollo de nuevos fármacos con efectos ansiolíticos, antidepresivos, anestésicos y anti-epilépticos.

**Palabras clave:** Neuroesteroides, epilepsia, efectos no-genómicos, GABA, glutamato, receptores ionotrópicos.

## Introducción

Los esteroides (gonadales, adrenales, placentarios y la vitamina D), tienen efectos fisiológicos gracias al reconocimiento de receptores solubles intracelulares, cuya consecuencia final es la expresión y/o inhibición de la síntesis de proteínas. Sus efectos son múltiples y polivalentes: son contrarreguladores en el metabolismo de carbohidratos, minerales, grasas y en el dimorfismo sexual; farmacológicamente pueden utilizarse como antiinflamatorios, anticonceptivos, etc, y sus efectos hemodinámicos, a través de la movilización de cateco-

## Summary

Steroids which are produced by the brain are called neurosteroids, and they are able to modulate neurotransmissions: GABAergic; glutamatergic; glycinergic, and cholinergic (nicotine receptor). These effects are of short latency and duration, and do not implicate the cellular genome. The interaction of these neurosteroids with membrane receptors contribute to the regulation of neuronal excitability, and their study has allowed a better understanding of cognitive, hormonal, and epileptic phenomena as well as the development of new drugs with ansiolytic, antidepressive, anesthetic and anti-epileptic effects.

**Key words:** Neurosteroids, epilepsy, non-genomic effects, GABA, glutamate, ionotropic receptors.

laminas, son bien conocidos. Sin embargo, los esteroides tienen también efectos neurológicos y cognoscitivos que pueden diferenciarse de sus acciones hormonales. La presente revisión pretende analizar los efectos de los esteroides a nivel de la membrana celular, independientes del ADN y que se realizan a través de receptores a neurotransmisores.

Actualmente se sabe que muchos esteroides son moduladores de la excitabilidad cerebral<sup>43, 50, 51</sup> al interactuar con una superfamilia de receptores ionotrópicos que incluyen al: ácido gamma amino bórico tipo A (GABA<sub>A</sub>), al glutamatérgico de tipo N metil-D-aspartato (NMDA), al de nicotina y al de gli-

\* Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular y Fisiología Humana, Facultad de Medicina, UNAM.

\*\* Académico numerario. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Solicitud de sobretiros: Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, CP 04510, México, D.F. UNAM, México. Tel. 622-5761 FAX. 622-5607, e-mail: sbrailow@i.fisiol.unam.mx

Trabajo apoyado parcialmente por DGAPA-UNAM y CONACYT.

cina. Estos esteroides se forman también en el cerebro<sup>2</sup> a partir de la glía<sup>4</sup> en forma independiente de la síntesis gonadal y la de las glándulas suprarrenales.

El estudio de estos esteroides neuromoduladores se encuentra en franca expansión dada la amplia gama de procesos por ellos regulados y de los eventos clínicos que se les relacionan: disforia, depresión, efectos ansiolíticos, de analgesia, anestésicos, anticonvulsivos o proconvulsivos,<sup>12, 25, 52</sup> sobre la memoria, o en conductas como el apetito sexual, los cambios emocionales durante el periodo menstrual y el embarazo,<sup>10, 40</sup> etc.

## Esteroides

La palabra esteroide significa "semejante a un estero". Los esteroides son alcoholes sólidos que abundan en las plantas y animales; en el hombre el esteroide más importante es el colesterol. Los esteroides tienen una estructura común: un esqueleto de 4 anillos (3 hexanos y 1 pentano) a los cuales se les puede agregar o eliminar cadenas; este esqueleto es conocido como ciclopentano-perihidrofenantreno (Figura 1).<sup>87</sup>

Por su estructura y función los esteroides son clasificados en familias:

- a) Los gonadales, y en su caso, también los placentarios, representados por los progestágenos, de 21 carbonos (C), de los cuales derivan los andrógenos, de 19 C y los estradiolos, de 18 C. De estos esteroides dependen los caracteres sexuales secundarios, la conducta sexual y el mantenimiento del embarazo.
- b) Los glucocorticoides y mineralocorticoides, formados en las glándulas suprarrenales, de 19 C, reguladores del metabolismo de iones y de glúcidos.
- c) Los tocoferoles, como la vitamina D, cuya estructura de 25 C es derivada directamente del colesterol, el cual sufre una modificación en su estructura por luz ultravioleta entre el C 9 y 10, rompiendo ese enlace. Esta vitamina interviene en la absorción de Ca<sup>2+</sup> en el tubo digestivo y no es sintetizada en el organismo.

## Efectos genómicos de los esteroides

Este es el mecanismo de acción de los esteroides tradicionalmente conocido. Debido a su alta liposolubilidad, pueden atravesar la membrana celular fácilmente e interactuar con una familia de proteínas solubles citosólicas (que a su vez pertenecen a un grupo de proteínas de choque térmico).<sup>53,54</sup> Este reconocimiento es altamente específico. El complejo esteroide/receptor se introduce en el núcleo y regula la expresión de genes y síntesis de proteínas, mediante la interacción estereoquímica directa con el ADN, en secuencias conocidas como elementos de respuesta a la hormona esteroide, mediante uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Se permite con esto la síntesis de ARNs y, posteriormente, en el citosol, de proteínas, las cuales pueden ser enzimas, receptores u hormonas que le brinden a la célula la adaptación al estímulo químico recibido (Figura 3).<sup>55,56</sup>

Los efectos mediados por este mecanismo tienen latencias largas (horas a días) y perduran por mucho tiempo, por lo que este proceso de transducción no puede explicar la fenomenología de sucesos de corta duración, reversibles y de semejanza con psicotrópicos que se observan a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). A continuación se enuncian las primeras evidencias de los mecanismos alternos de acción de los esteroides:

- a) La inyección i.v. de progesterona reduce rápidamente (con latencia de 3 a 10 minutos) la frecuencia de disparo neuronal en corteza cerebral de humanos, además de que su inyección intracarotídea reduce la frecuencia de disparo en neuronas de mesencéfalo de gato.<sup>57</sup>
- b) A nivel hipotalámico, los estrógenos incrementan la frecuencia de disparo de las neuronas del área preóptica, con una latencia de 15 minutos; a nivel del cerebelo, incrementan la excitabilidad de neuronas glutamatérgicas produciendo un mayor número de potenciales de acción, efecto que no bloquea el tamoxifén, potente antagonista del receptor citosólico de estrógenos<sup>44</sup>.
- c) Los andrógenos y derivados progestágenos disminuyen la ocurrencia de potenciales de ac-

ción en neuronas del hipotálamo, y a nivel electroencefalográfico (EEG), en gatos, producen ondas lentas de gran amplitud en tan sólo 10 segundos después de su aplicación i.v.<sup>63</sup>

- d) Los glucocorticoides disminuyen la excitabilidad de neuronas del hipocampo, al inhibir la frecuencia de disparo en el área de CA1<sup>58</sup>.
- e) Fuera del SNC, en el doudeno, tejido mamario y a nivel de osteoblastos, la vitamina 1,25 dihidroxiD ó D<sub>3</sub>, en segundos a minutos, estimula la actividad de una proteína cinasa, cambiando la actividad de canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje, incrementando la corriente entrante de este catión.<sup>59, 60</sup>

Estas evidencias indican que los estrógenos y los progestágenos tienen efectos rápidos sobre la excitabilidad neuronal y el metabolismo mediante un mecanismo no clásico, excitando o inhibiendo la actividad neuronal o afectando cinasas, respectivamente, en tanto que los corticoides tienen un efecto bimodal.

#### Actividad no genómica de los neuroesteroides (Cuadro I)

Como veremos con detalle más adelante, se define a todo esteroide sintetizado en el SNC como neuroesteroide (NE). Los NE pueden interactuar con proteínas membranales, sin necesidad de ingresar a la célula. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a canal, los cuales, al ser activados por sus ligandos a nivel extracelular, permiten corrientes iónicas a través de ellos y en consecuencia cambian la excitabilidad de la membrana neural.<sup>20,22,34</sup>

Los efectos mejor estudiados de los NE son sobre el receptor tipo GABA<sub>A</sub>, el receptor para glicina, el glutamatérgico de tipo NMDA, y el tipo nicotínico de acetilcolina, los 2 primeros inhibidores y los últimos excitadores de la actividad cerebral. Sobre canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje, además de la modulación a nivel del receptor, los NE pueden modificar la actividad de algunas proteínas G, y en particular las de tipo Gi.<sup>13</sup>

Se deben hacer algunas distinciones acerca del reconocimiento de receptores a neurotransmisores por parte de los NE.

#### 1) Existe una relación estructura-función de los esteroides

La actividad de un esteroide a nivel de receptor de membrana, depende de su estructura 3 $\alpha$ -5 $\alpha$  pregnano (Figura 1) El esteroide con mayor actividad farmacológica sobre el receptor GABA<sub>A</sub> es la Alopregnanolona (Alop), esteroide que se encuentra hidroxilado en su C3 y reducido en el C5; los isómeros de la Alop, como el 3 $\beta$ 5 $\alpha$  ó el 3 $\alpha$ 5 $\beta$ , tienen menor actividad GABAérgica, sin embargo, a este último isómero se le ha reportado actividad agonista/antagonista,<sup>9,14</sup> otros trabajos muestran que la 3 $\alpha$  hidroxilación-5 $\alpha$  reducción es indispensable para la actividad no genómica: si una de estas sustituciones no está presente, se pierde el efecto del esteroide a nivel de membrana. Otro factor importante es la presencia de un átomo altamente electronegativo en la molécula, comúnmente un grupo ceto en el C20 (de aquí la terminación "ona"); si se rompe o cambia, también se reducen los efectos no genómicos del esteroide. En resumen, la estructura del NE define su actividad; el efecto a nivel de la membrana se debe a una configuración pregnano asociada a la hidroxilación-reducción 3 $\alpha$ -5 $\alpha$  y el ceto del C20.<sup>62</sup>

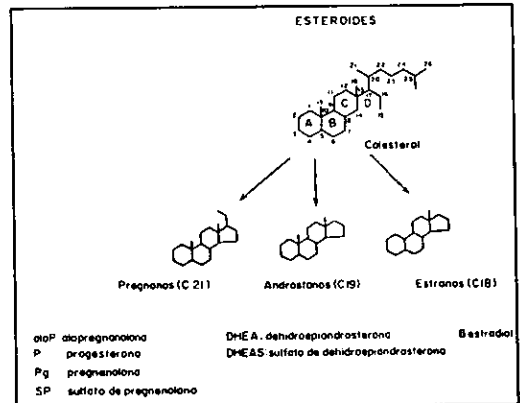


Figura 1. Química de los principales neuroesteroides (NE). Los NE son formados en la glia; a partir del colesterol se obtienen la familia de los pregnanos (C 21), de los cuales los más dinámicos en su actividad no genómica son: los 3 $\alpha$ -hidroxilados-5 $\alpha$ -reducidos, así como los derivados sulfatados de ellos. La familia de los androstanos (C 19) también son formados en el SNC, la DHEA y su sulfato son los representativos de esta familia. Los estranos (C 18), como el  $\beta$  estradiol, representan por excelencia al grupo de esteroides neuroactivos (actividad en el SNC, pero formados fuera de él).



Los derivados sulfatados (aquellos que sustituyen al grupo OH del C3 por un grupo  $\text{SO}_4^-$ ), tienen un efecto antagonista al receptor  $\text{GABA}_A$  y al de glicina, pero son agonistas del receptor NMDA.

Algunos isotipos  $\beta$  también tienen efectos en SNC, preferentemente anestésicos, y fuera del SNC, de vasodilatación, relajación intestinal y uterina.<sup>79, 80</sup>

## 2) El sitio de reconocimiento en el receptor no es el mismo para todos los NE

Sobre este aspecto, el receptor mejor estudiado al momento es el  $\text{GABA}_A$ . Este receptor tiene distintos sitios de reconocimiento para ligandos: barbitúricos, benzodiazepinas, alcohol, picrotoxina, bicuculina, etc. Los NE se unen en un sitio distinto a cualquiera de los antes mencionados. No obstante, algunos NE facilitan el pegado de agonistas  $\text{GABA}_A$  como el flunitrazepam y barbitúricos, y disminuyen el pegado de antagonistas a este receptor como la picrotoxina o el t-butilbiciclofosforotrioxonato (TBPS)<sup>7</sup> (Figura 4).

Mediante estudios con marcado radioactivo, se ha visto que los esteroides reconocen a la proteína membranal ( $\text{GABA}_A$ ), eliminando la posibilidad de que el esteroide se intercale con los lípidos y modifique así la permeabilidad de la membrana. Mediante la utilización de proteasas y fosfolipasas, se dedujo que el sitio de unión es netamente proteico y, en ocasiones, distinto para los mismos esteroides agonistas; existen además, 2 sitios de unión de acuerdo a la afinidad, uno de baja y otro de alta afinidad<sup>16</sup>. Los sitios de baja afinidad tienen comúnmente alta densidad (más abundantes), presentan una  $K_d$  en el rango  $\mu\text{M}$  con una  $B_{max}$  de 10 nM/mg de proteína, en tanto que para los de alta afinidad su  $K_d$  es del rango  $\mu\text{M}$  aunque con diferentes densidades. Por ejemplo: el sulfato de pregnenolona tiene una  $K_d$  de 300 a 500 nM y el sulfato de dehidroepiandrosterona de  $3\mu\text{M}$ .

La composición de las subunidades protéicas expresadas en el receptor definen la afinidad al NE. Se sabe que el receptor  $\text{GABA}_A$  tiene que incluir subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 2$  para que la familia de esteroides pregnanos tengan efecto en él.<sup>1, 21, 22</sup> Al cambiar estas subunidades, se modifica la interac-

ción receptor/NE y en consecuencia, los efectos farmacológicos. En la corteza cerebral de mamíferos coexisten diversos subtipos de receptores  $\text{GABA}_A$ , y se han localizado regiones con mayor sensibilidad a los NE; la Alop y algunos de sus derivados reconocen poderosamente a los receptores  $\text{GABA}_A$  de hipocampo, amígdala basolateral, y a nivel de la corteza cerebral, los situados específicamente en la lámina VI.<sup>24, 44</sup>

Mediante la secuenciación de los aminoácidos de la subunidad  $\alpha 1$ , se conoce que el residuo de la posición 64 y el de la 100, corresponden a una Fenilalanina (Phe); la interacción con una Histidina (His) en la posición 101, permite una conformación tridimensional de hoja plegada  $\beta$  para interactuar mediante puentes de  $\text{H}^+$  con el esqueleto hidrofóbico de los NE; además, la Arginina (Arg) 66 y la Tirosina (Tir) 98, pueden interactuar por cargas con el grupo  $\text{SO}_4^-$  del sulfato de pregnenolona y de la dehidroepiandrosterona. El carboxilo del Aspártico 62 y la carga de la Asparagina 66, por interacción iónica, pueden fijar al grupo ceto del C20 del esteroide, además de permitir la interacción con puentes de  $\text{H}^+$ . Otro modelo propuesto para explicar los efectos agonistas o antagonistas de los NE, aduce que los derivados sulfatados, por ser anfipáticos, tienen un reconocimiento distinto en el receptor; además de que la carga negativa del grupo  $\text{SO}_4^-$ , probablemente se introduce en el sitio del canal de  $\text{Cl}^-$  del receptor  $\text{GABA}_A$  bloqueándolo. Este modelo es atractivo para explicar el efecto antagonístico sobre el receptor  $\text{GABA}_A$  de los NE sulfatados.<sup>40</sup>

## 3) Los efectos de los NE ocurren sobre los receptores membranales y son reversibles

Diferentes estrategias experimentales como la eliminación del núcleo celular, el bloqueo de la síntesis de proteínas o la entrada del esteroide a la célula, permiten inferir que los NE actúan específicamente a nivel de la membrana plasmática.

Los efectos de los esteroides sobre los receptores es de tipo alostérico, es decir, modulan la actividad del neurotransmisor a partir de un sitio distinto al ocupado por su ligando; así, en el caso de un neurotransmisor excitador (ácido glutámico), el NE permite un incremento de su actividad y el

consecuente ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula.<sup>26,63</sup> Estos efectos tienen una latencia y duración corta (segundos a minutos), los cuales dependen también de la concentración y tiempo de exposición del NE al receptor. Estudios electrofisiológicos han permitido identificar las corrientes microscópicas de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , inducidas o bloqueadas por los esteroides, y ver cómo éstas se recuperan en función de tiempo, lo cual traduce que la apertura y cierre del receptor/canal es dinámica y depende de una interacción reversible con el NE.

#### 4) El efecto del NE en SNC depende de la presencia del neurotransmisor

Aunque existen discrepancias sobre si los esteroides por sí solos pueden inducir efectos, la mayoría de los grupos de investigación coinciden en la necesidad de la presencia del ligando natural para que el receptor, mediante la modificación estructural que sufre por la unión del neurotransmisor, exponga los sitios de unión al NE, y de tal forma el esteroide se una a él y desencadene su efecto. Esto apunta a que los NE necesitan del mismo neurotransmisor para potenciar o inhibir su actividad.<sup>19, 24, 49</sup>

### Neuroesteroides

Un neuroesteroide (NE) es un esteroide sintetizado en el SNC a partir de la glía y con efectos en el mismo tejido neural, en tanto que todos los esteroides con actividad en SNC pero sintetizados fuera de él, son denominados esteroides neuroactivos (EN). No obstante a que la clasificación anterior parece ser clara, actualmente el grupo de Gee,<sup>64</sup> propone una nueva nomenclatura para estas clases de moléculas, EPALONES; un EPALON es un esteroide de estructura pregnano derivado de la **epialopregnanolona** (de ahí el nombre), el cual puede ser natural o sintético, y capaz de modificar la actividad de un canal/receptor en la neurona; como se analizará más adelante, la epialopregnanolona, tiene una gran actividad GABAérgica y su estructura es fácilmente manipulable para desarrollar isómeros con actividad despolarizante o hiperpolarizante de la membrana neuronal.

### Farmacocinética de los neuroesteroides

El metabolismo de los neuroesteroides en el SNC ha sido demostrado en la glía y semeja la síntesis de los organos esteroideogénicos, pero con algunas particularidades <sup>29</sup>(Figura 2).

El primer paso de la síntesis de NE, es obtener pregnenolona (Pg) a partir del colesterol, por medio de una escisión enzimática llevada a cabo por el complejo citocromo P450<sub>sc</sub> mitocondrial (hemo-proteína que hidroxila y corta uniones C-C); el colesterol es hidroxilado en posiciones 22 y 20, rompiendo a la molécula de 27 C en una de 21 C. Este primer paso es común a los tejidos esteroideogénicos; por medio de estudios con ADN complementario, se conoce que este complejo P450<sub>sc</sub> es el mismo en el oligodendrocito que en adrenales y gónadas. Además, mediante la utilización de la inmunohistoquímica, la enzima también se descubrió en astrocitos tipo I<sup>a</sup> a nivel de corteza cerebral, amígdala, hipocampo y mesencéfalo.<sup>43</sup>

La Pg puede ser sustrato de otro citocromo, el P450<sub>c17</sub>, que hidroxila en el C17; mediante esta reacción se forman corticoesteroides, aldosterona y cortisol. No obstante, el cerebro adulto de la rata no presenta ARNm para esta proteína<sup>2</sup>, por lo que no puede convertir esteroides de 19 C, indicando diferencias en la vía de síntesis a este nivel con los otros órganos generadores de esteroides.

La siguiente reacción de la vía es independiente del citocromo P450<sub>sc</sub>: la Pg, por medio de la 3 $\beta$  hidroxisteroide reductasa/isomerasa (3 $\beta$  HSD), se convierte en progesterona (P). La P es el sustrato para la síntesis de todas las hormonas esteroides, sin embargo, su destino final depende de las enzimas presentes en la célula.<sup>43</sup>

Las evidencias experimentales apuntan a que el astrocito y el oligodendrocito también tienen una estrategia diferente para sintetizar sus esteroides: aparte de un esquema clásico, se infiere que tienen enzimas alternas para utilizar a esteroides "externos" (del torrente circulatorio), en pasos enzimáticos finales o casi al término de la síntesis de un esteroide activo y ahorrarse pasos en la vía. Por ejemplo, la P, mediante la 5 $\alpha$ -reductasa, forma a la 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona, sustrato de una 3 $\alpha$  hidroxilasa, culminando en la formación de un complejo cuya estructura es la más dinámica de los NE: la 3 $\alpha$ OH-

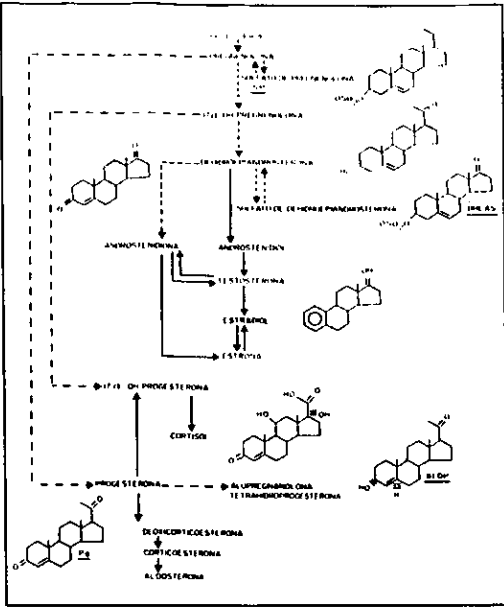


Figura 2. La síntesis de neuroesteroides en SNC es semejante a la de otros órganos, los pasos enzimáticos en flechas discontinuas están demostrados en el oligodendrocito y el astrocito.

5 $\alpha$ pregnan-20-ona, tetrahidroprogesterona o Alop. La inmunoreactividad para ambas  $\alpha$ -reductasas es grande en la corteza cerebral, hipófisis, tálamo, mesencéfalo y médula espinal.<sup>46</sup>

La Pg es sustrato, en el oligodendrocito, de un tercer citocromo, el P450sc7 $\alpha$ , el cual cataliza la formación de derivados sulfatados, como el sulfato de pregnenolona (SP). Las hidroxilaciones tipo  $\beta$  en el cerebro se llevan a cabo, pero en menor proporción, ya que las enzimas responsables representan apenas el 5% del total de las enzimas de la vía. Una vía alterna más de la Pg es una oxidoreducción por parte de la 20 $\alpha$  hidroxisteroide oxidoreductasa (20 $\alpha$  HOR) formando a la 20 $\alpha$  dihidroprogesterona, la cual mediante la interacción con la  $\alpha$ -hidroxilasa forma la 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -20 $\alpha$ -hexahidroprogesterona (HHP). Este producto complejo se convierte en Alop, por la enzima que inició esta vía alterna: la 20 $\alpha$  HOR; esto le otorga a la glía plurifuncionalidad en la síntesis de NE (Figura 2). El metabolismo de la deoxicorticosterona (DOC), derivado directo de la progesterona, aún no ha sido demostrado en la glía.

Los derivados sulfatados SP y DHEAS son elaborados en el SNC, pero hasta el momento, las

sulfatasas no han sido identificadas; no obstante, en animales castrados y adrenalectomizados, las concentraciones de DHEAS son semejantes a los animales control, lo que sugiere una síntesis independiente; además, se sabe que el colesterol en el SNC puede estar sulfatado, aunque no se conoce aún la importancia de este producto.<sup>44</sup>

Finalmente, la síntesis de NE puede estar contra-regulada por los mismos NE o EN, mediante la vía clásica de actividad intracelular de los esteroides: la genómica<sup>4</sup>. Se ha demostrado que al menos los estrógenos, disminuyen la transcripción y traducción de las  $\alpha$ -reductasas, cambiando la velocidad de la producción de NE. Esto revela un nuevo punto de regulación.

Es posible que la síntesis de NE en el SNC se regule también por 2 pequeños péptidos: el receptor periférico de benzodiazepinas (PBRs) y el inhibidor de unión de diazepam o DBI (ambos por sus siglas en inglés). El PBRs facilita el ingreso de colesterol a la glía, y del citosol a la mitocondria, organelo formador de esteroides por excelencia. El DBI es ligando endógeno del PBR y ambos se encuentran presentes en el SNC, gonadas, y páncreas. Mediante la actividad de la protein-quinasa, dependiente de AMPc, el DBI es activado y se une a PBR; a su vez este complejo facilita el ingreso de colesterol a la vía de síntesis de hormonas esteroideas en la mitocondria. Estas proteínas pequeñas, presentes dentro de la glía, incrementan sus niveles de expresión durante procesos de isquemia cerebral, epilepsia, síndromes de abstinencia a las benzodiazepinas o al alcohol, por lo que probablemente el cerebro mantenga sus niveles de NE, a expensas de la glía, que además de ser formadora también es sensora de la actividad metabólica neural.<sup>61,67</sup>

## Neuromodulación en distintas neurotransmisiones

### Neurotransmisión GABAérgica

#### Receptor GABA<sub>A</sub>

Los efectos sedantes, ansiolíticos y anestésicos de la inyección intravenosa de colesterol fueron las primeras evidencias de la acción de un esteroide en el cerebro (Cashin y Moravek, en 1927).<sup>51</sup> Des-

pués, se reportó el efecto relacionado a la conducta y anestésico de derivados progestágenos, en 1941 por Selye.<sup>66</sup> Tuvieron que pasar más de 30 años para saber que los NE tienen una asociación no covalente con el complejo molecular GABA<sub>A</sub>, afectando su conformación y en consecuencia su estado funcional.

El receptor GABA<sub>A</sub> reconoce al neurotransmisor inhibidor más importante del SNC: el GABA. Es un complejo de subunidades ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \rho$ ) que al interactuar con su ligando, activa un canal de Cl<sup>-</sup>, lo que favorece el ingreso de este anión al interior de la célula y generar un fenómeno de hiperpolarización de la membrana, disminuyendo la excitabilidad de la neurona. Existe otro receptor, el GABA<sub>B</sub>, el cual se encuentra asociado a proteínas G y activa a segundos mensajeros<sup>67</sup>; pertenece al grupo de los receptores metabotrópicos. Sobre el receptor GABA<sub>B</sub> no se ha reportado actividad de los NE hasta el momento. Existe también un receptor CABAC<sub>1</sub>, identificado solamente a nivel de la retina.<sup>68</sup>

Las benzodiazepinas (BZs), y los barbitúricos se unen con gran afinidad al receptor GABA<sub>A</sub> en sitios distintos (Figura 3). Esta unión incrementa la unión del GABA a su receptor, potenciando su efecto<sup>20</sup>; farmacológicamente estos efectos se clasifican como: ansiolíticos, anticonvulsivos, sedantes, hipnóticos y anestésicos. Por el contrario, los moduladores negativos de este receptor, como las  $\beta$  carbolinas y el TBPS, inhiben el pegado del GABA a su receptor, y al inhibir la inhibición tienen efectos proconvulsivos y ansiogénicos (hiperexcitadores).<sup>68</sup>

Por lo anterior, los NE pueden subclasificarse de acuerdo a sus efectos a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> en moduladores alostéricos positivos (agonistas) y alostéricos negativos (antagonistas).

**Agonistas GABAérgicos:** A este grupo pertenecen la Alop o tetrahidroprogesterona, que es el NE agonista GABA<sub>A</sub> más potente, la DHEA, y la THDOC.<sup>40,67</sup> La Alop se ha detectado en homogenados de cerebro de rata a concentraciones de 25 a 32 ng/g de peso de tejido cerebral, en corteza cerebral de 2.42 ng/g, y de THDOC de 0.15 ng/g. En corteza se sabe que las concentraciones se incrementan en situaciones de estrés hasta en un 100%.<sup>43</sup> Sus efectos electrofisiológicos han sido evidenciados: mediante registros de parche celular (incremento de la probabilidad de apertura de canales asociados al receptor GABA<sub>A</sub>, y el incremento de

la corriente microscópica de Cl<sup>-</sup>), registro de potenciales de campo (grupos de neuronas de hipocampo y corteza se inhiben ante la presencia de estos NE), y a nivel EEG (cambios en el patrón de frecuencia y potenciación de la actividad del GABA).<sup>40,43</sup>

Farmacológicamente, los NE favorecen el pegado del GABA y otros agonistas al receptor. Por estudios de desplazamiento y marcaje radioactivos se conoce la especificidad de unión, la afinidad y vida media de cada uno de los NE relacionados al receptor GABA<sub>A</sub>.<sup>14,37</sup> Conductualmente, estos NE favorecen la aparición del síndrome premenstrual, inducen sueño, disminuyen la ansiedad, son anestésicos y tienen efectos antiépilépticos.<sup>40</sup>

**Antagonistas GABAérgicos:** este grupo es representado por los pregnanos sulfatados: el SP y el DHEAS. Los estudios microfisiológicos han permitido observar que ambos NE bloquean totalmente y en forma reversible las corrientes de Cl<sup>-</sup>; su unión al receptor desplaza inclusive a los NE agonistas y a fármacos como benzodiazepinas y barbitúricos. Esta actividad depende del pH, temperatura y concentración de los NE<sup>16</sup>. Sin embargo, el SP tiene un comportamiento bimodal: es un agonista GABA<sub>A</sub>, como la Alop, a concentraciones pequeñas, pero a concentraciones fisiológicas ( $\mu$ M) es el más potente NE antagonista GABAérgico, además de que funciona como un potente agonista glutamatérgico de tipo NMDA;<sup>20</sup> no se conoce a ciencia cierta la importancia de este fenómeno a nivel de la excitabilidad neuronal, pero establece un interesante argumento de cómo el cerebro puede regular 2 neurotransmisiones antagónicas entre sí con una misma molécula. Los derivados sulfatados representan un nivel mayor de complejidad en el esquema de la actividad sináptica, por sus efectos antagonistas GABAérgicos y a su vez de agonistas glutamatérgicos.

## Neurotransmisión glutamatérgica

### Receptor NMDA

El glutámico es un aminoácido que funciona como neurotransmisor excitador en el SNC, con receptores que pueden clasificarse por los agonistas que los distinguen con mayor afinidad. Los agonistas permiten un incremento de la probabilidad de aper-

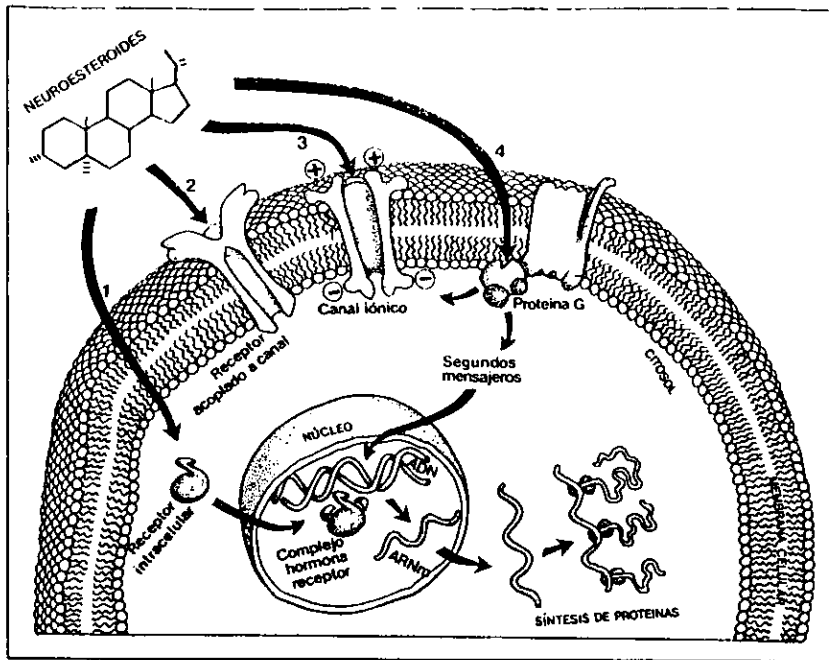


Figura 3. Efectos genómicos y no genómicos de los NE. La actividad de los NE depende del reconocimiento de proteínas en diferentes sitios. 1) RECEPTORES INTRACELULARES, mediante los cuales se permite la unión con el ADN celular y modificar la transcripción y traducción de la célula; este mecanismo de acción tiene latencias y duraciones largas (horas, días, meses, etc). 2) RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES ACOPLADOS A CANAL, cuyos efectos a corto plazo (segundos a minutos) se les denominó no genómicos. Actualmente se conoce que este mecanismo de los NE es el que modula la actividad de diversas neurotransmisiones (GABA, NMDA, nicotínico, glicina). 3) CANALES SENSIBLES A VOLTAJE: el efecto de los NE a este nivel modifica la permeabilidad de la membrana a iones y en consecuencia permite cambios en su potencial. 4) INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS G: este mecanismo es el menos estudiado hasta el momento; algunos NE pueden modificar la respuesta de proteínas Gi y cambiar la producción de segundos mensajeros como al AMPc.

tura de los canales iónicos. Se conocen 4 tipos distintos: el de mayor afinidad para el N-metil D-aspartato (NMDA), otro que reconoce mejor al ácido  $\alpha$ -amino 3-hidroxi 5 metil-4 isoxazole propiónico (AMPA), otro al ácido quisquálico y uno más, que reconoce mejor el ácido Kaínico (KA).<sup>72</sup> Existe otro tipo de receptores, asociados a proteínas G, clasificados como de tipo metabotrópico<sup>71</sup> (Figura 3).

El receptor NMDA es un receptor ampliamente regulado, ya que tiene al menos 5 sitios distintos de unión de ligandos; estos permiten que el receptor modifique su conformación y abra un canal de  $Ca^{2+}$  por el cual se permite el ingreso de este catión a la célula, despolarizándola. Estos sitios son: el sitio de unión para el glutámico (Glu), otro de unión para un coagonista, la glicina (Gly), un sitio regulador

que promueve la activación, el cual reconoce a las poliaminas (espermina y análogos), y otros 2 más que unen iones:  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  que funcionan como inhibidores del flujo de  $Ca^{2+}$  hasta que un cambio de voltaje (despolarizante), los desplaza de sus sitios de unión.

Este receptor es reconocido con gran afinidad por aminoácidos cortos dicarboxílicos, como aspartato, NMDA, quinolinato y el glutámico. Tiene varias particularidades: su función depende de la unión simultánea de 2 agonistas (Glu y Gly), pero también puede ser activado por el voltaje de la membrana, por lo que también es un receptor/canal sensible a voltaje.<sup>72</sup>

Los primeros estudios sobre la actividad excitadora de los NE emplearon inyecciones de Pg

(100 $\mu$ M), induciendo la facilitación de la actividad del receptor NMDA y antagonismo discreto de los receptores KA y AMPA. Se identificó que en células de Purkinje, la P inhibe entre un 40-50% la respuesta de tipo NMDA y de KA.<sup>15</sup> Los NE, SP y DHEAS tienen efectos semejantes a la picrotoxina, un agente epileptógeno muy potente. Se sabe que el receptor a NMDA está implicado en el daño neuronal asociado a la epilepsia o a la isquemia neuronal. Aparentemente, el SP no potencia estos efectos tóxicos en neuronas de hipocampo en cultivo, no obstante este NE incrementa la despolarización inducida por el receptor. Además, se ha identificado que el NE reconoce un sitio distinto al modulado por la poliaminas<sup>17</sup> y también independiente del sitio de unión de Glu y Gly.<sup>26</sup>

Durante el estrés crónico se sabe que se incrementan los niveles de algunos NE y EN; es posible que gracias a los efectos dependientes del NMDA, los NE sulfatados potencien el ingreso de Ca<sup>2+</sup> a la célula, promuevan la fosforilación-desfosforilación del citoesqueleto; *in vitro*, se ha demostrado que este fenómeno inhibe el crecimiento dendrítico en neuronas en cultivo.<sup>18</sup>

La potencia del SP sobre las corrientes inducidas por el NMDA en neuronas de médula espinal muestran una CE50 de 60 $\mu$ M. Fisiológicamente, el SP se encuentra a bajas concentraciones en el cerebro: 12 a 19  $\mu$ M,<sup>43</sup> lo cual sugiere que la neuro-modulación excitadora por SP es consecuencia de una desinhibición por vía GABAérgica más que por un incremento de la neurotransmisión glutamatergica.

### Otras neurotransmisiones moduladas por NE

Receptor de glicina (Gly) y de acetilcolina tipo nicotínico.

La Gly es también un neurotransmisor inhibidor en el SNC, especialmente a nivel de médula espinal; semejante al GABA, permite una corriente de Cl que hiperpolariza a la neurona. El receptor para Gly es un complejo de 250 KDa, compuesto por 2 polipéptidos homólogos  $\alpha$ (48 KDa) y otro de tipo  $\beta$ (58 KDa), además de un péptido asociado a los 2 anteriores, el cual une al aminoácido. Además de la Gly, otros agonistas sobre este receptor son la  $\beta$ -alanina, L-alanina, taurina, L-serina y prolina.<sup>73</sup> (Fi-

gura 4). Las moléculas que bloquean la actividad de este receptor son: la estricnina, la progesterona y el esteroide sintético RU 5235. En células de médula espinal en cultivo, el registro de parche de membrana celular ha identificado una disminución de la corriente de Cl<sup>-</sup> por parte de la progesterona, sin embargo, el NE Alop, permite un incremento de esta corriente, semejante a la que produce en el receptor GABA.<sup>31</sup>

El receptor de acetilcolina de tipo nicotínico en el SNC es un complejo de varias subunidades:  $\alpha$ 1,2 y 3,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  este receptor es miembro de la super-familia de receptores acoplados a canal. Al interactuar con 2 moléculas de acetilcolina, permite una corriente entrante de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> además de una saliente de K<sup>+</sup> (Figura 3), lo que origina una despolarización de la célula.<sup>74</sup> Al expresar las subunidades de este receptor en ovocitos de rana (*Xenopus*) la conductancia de este receptor es inhibida por progesterona y Alop. Los NE interactúan con la porción extracelular del receptor, y la interacción no depende de la presencia de acetilcolina, es voltaje independiente y no altera la desensibilización del receptor. Los NE preñanos pueden interactuar en forma no competitiva con el sitio de unión de la acetilcolina al receptor.<sup>32</sup>

Se sabe que los progestágenos y los estrógenos pueden interactuar con el sistema de opioides, pues pueden regular la expresión del receptor en hipófisis e hipotálamo, y modificar de esta forma la liberación de gonadotropinas; sin embargo, este mecanismo utiliza la vía clásica de transducción de los esteroides, pues tiene latencias largas, y el efecto depende del tiempo de exposición de los esteroides a la célula.<sup>47</sup>

### Interacción con segundos mensajeros

Aunque existen evidencias de efectos de los NE sobre proteínas G, aún no se han identificado los mecanismos específicos de interacción. La progesterona es capaz de inducir la maduración de ovocitos mediante mecanismos no genómicos, ya que inhibe a la adenilato ciclasa activada previamente por vía de la fosfolipasa C.<sup>33</sup> En rebanadas de cerebro, a concentraciones fisiológicas, la progesterona inhibe el incremento de AMP<sup>c</sup> estimulado por epinefrina.<sup>62,57</sup> El  $\beta$ -estradiol potencia la hidrólisis

de fosfatidil inositol por el receptor KA. Es conocido que el cortisol inhibe la liberación de prolactina, consecuencia de la inhibición de la adenilato ciclasa y del incremento de  $Ca^{2+}$  en el interior de la célula.<sup>35</sup> A nivel de hipocampo, en células de CA1, la Alop parece interferir con la actividad de una proteína Gi, sensible a la ADP-ribosilación favorecida por la actividad de la toxina pertussis.<sup>13</sup> Finalmente, los NE parecen interaccionar con canales  $Ca^{2+}$  y  $K^{+}$  sensibles a voltaje mediante la fosforilación de los mismos, por vía de proteínas G.

### Importancia clínica

Las 2 neurotransmisiones rápidas más importantes en el SNC, la GABAérgica y la glutamatérgica, son moduladas por los NE; esta regulación puede estar relacionada con variaciones de la conducta, con el estrés, funciones cognitivas, la epilepsia y otras entidades patológicas que a continuación se detallan.

### Variaciones en la conducta y NE

Los niveles plasmáticos y cerebrales de algunos esteroides adrenales y NE tienen un ciclo diurno. En el cerebro de rata, la PS y la DHEAS se incrementan en las primeras horas de la noche y disminuyen en las primeras horas del día.<sup>40</sup>

Los estados de ansiedad, depresión y situaciones de estrés tienen en común la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, lo cual se relaciona con el incremento sérico de esteroides, y en forma alterna con el incremento de esteroidogénesis glial. La PS y DHEAS se incrementan durante estos estados emocionales.

Por otra parte, se ha sugerido un papel del GABA en las emociones y en la etiología de algunos desórdenes efectivos. La depresión y la ansiedad están relacionadas con la actividad GABAérgica de acuerdo con los siguientes datos: a) los niveles de GABA en líquido cerebroespinal (LCE) se encuentran disminuidos en pacientes con diagnóstico de depresión; b) GABA-agonistas disminuyen la ansiedad; c) la inyección de bicuculina (GABA-antagonista) disminuye la conducta depresiva; d) los antidepresivos tricíclicos inhiben la recaptura de GABA y

estimulan su liberación; e) los efectos GABA<sub>A</sub> agonistas incrementan la actividad noradrenérgica.<sup>40,45</sup>

Es conocido que la conducta de agresión depende de la concentración de andrógenos. La actividad de los NE a nivel del receptor GABA<sub>A</sub> queda de manifiesto también en esta conducta; por ejemplo, la inyección i.v. de GABA-agonistas disminuye la conducta agresiva; la THDOC disminuye, en ratones, la agresividad por estrés.<sup>36</sup>

Ontogenéticamente, existen cambios en la producción de los NE a diferentes edades: la P y el SP disminuyen cerca de un 60% en sus niveles en el SNC a los 70 años, comparando con los niveles de la cuarta década de la vida;<sup>44</sup> algo semejante sucede con la DHEA, la cual gradualmente reduce sus niveles plasmáticos y en el SNC conforme avanza la edad, considerándose por algunos como un "elixir de la juventud";<sup>82</sup> pues en ancianos, la DHEA, mejora procesos mnésicos, físicos e inmunes; sin embargo, estos datos requieren ser confirmados.

### Conducta sexual y reproductiva

Las evidencias de efectos de los NE sobre la actividad sexual son extensas: a) en roedores, la receptividad sexual cambia por los NE; en esta especie, la P, THDOC y la Alop promueven la aparición de lordosis o actitud para el apareamiento; b) el intercambio heterosexual en algunos mamíferos depende de las feromonas o sustancias odoríferas para atraer a la pareja durante el ciclo estral de la hembra; los NE agonistas al GABA<sub>A</sub> se incrementan en esta fase en el bulbo olfatorio.<sup>75</sup> Si su síntesis se bloquea, no se da el apareamiento por falta de estimulación a este nivel;<sup>40</sup> c) en el humano, el GABA favorece la conducta maternal o afectiva en las primeras horas del posparto, y ésta se potencia con la Alop y la THDOC.<sup>76</sup>

### Excitabilidad cerebral en el embarazo y NE

Durante el embarazo, y especialmente en su último trimestre, las concentraciones sistémicas y en cerebro de Alop se incrementan casi 3 veces sobre sus concentraciones basales, lo cual podría relacionarse con estados depresivos de la mujer embarazada casi al término de la gestación.<sup>40</sup> Este

cuadro semejante a la etapa premenstrual ha sido considerado como un síndrome de abstinencia a la Alop y/o la P, cuyos niveles se mantienen elevados por varios días, para después caer bruscamente.<sup>39</sup> No conocemos aún la localización y características del receptor GABA<sub>A</sub> asociados a estos cambios; los NE agonistas al receptor GABA<sub>A</sub> son rápidos y potentes inductores del sueño (hipnóticos);<sup>38</sup> estos efectos pueden relacionarse a la somnolencia excesiva que algunas pacientes reportan durante el embarazo.

### Funciones cognitivas y NE

Se ha sugerido un papel importante de los NE en la memoria y el aprendizaje. Por ejemplo, a nivel del hipocampo, los NE GABA-antagonistas favorecen la aparición de un modelo de plasticidad denominado potenciación (facilitación sináptica) a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés); este modelo utiliza la neurotransmisión glutamatérgica vía receptor NMDA; el fenómeno se observa después de la aplicación de una serie de trenes de estímulos de alta frecuencia en corteza cerebral o en hipocampo: tiempo después se registra una respuesta de mayor amplitud ante estímulos menores que el tren original, que puede durar varios días. El PS facilita la inducción de LTP en tanto que la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (agonista GABAérgico) la impide.<sup>40</sup> Es posible que los NE-antagonistas GABAérgicos, que son potenciadores del NMDA, puedan ser "facilitadores" de la memoria (promnésicos); en roedores<sup>41</sup>, la DHEA y su derivado sulfatado DHEAS han mostrado ser los mejores candidatos.

### Epilepsia y NE

La epilepsia es un trastorno neurológico producido por la descarga sincrónica y de gran magnitud de grupos neuronales de la corteza cerebral o estructuras subcorticales; sus manifestaciones puede ir desde una sensación anormal hasta la convulsión tónico-clónica con pérdida de la conciencia. El origen de la epilepsia puede relacionarse con la pérdida de la inhibición del SNC o por incremento en su excitabilidad. Las neurotransmisiones por aminoácidos implicados en la epilep-

sia son principalmente la glutamatérgica y la GABAérgica, ambas moduladas por los NE.<sup>48</sup>

Las evidencias de la actividad de los NE sobre la epilepsia son: a) el cambio en la aparición de algunos tipos de epilepsia durante el ciclo menstrual: algunas crisis son más frecuentes durante la primera fase del ciclo (estrogénica). A partir de la fase lútea o fase progesteracional del ciclo, parece haber una protección contra la hiperexcitabilidad en los procesos epilépticos; un ejemplo de lo anterior es la denominada epilepsia catamenial:<sup>77</sup> este tipo de crisis se presenta en forma cíclica asociada al incremento de estrógenos y se reduce durante el período premenstrual; b) en el embarazo, el cual cursa con incremento de progesterona y sus NE derivados, se reduce la aparición de descargas y crisis epilépticas;<sup>44</sup> c) algunas crisis parciales infantiles son dependientes de la edad, por ejemplo, los cambios hormonales en la etapa puberal permiten disminución de las crisis.<sup>40,77</sup>

La Alop es un NE cuya capacidad antiepiléptica ha sido ampliamente estudiada.<sup>11,12</sup> puede inhibir las crisis epilépticas en modelos *in vivo* o *in vitro* (inducción con pentilentetrazol y kindling); en forma semejante a las benzodiazepinas o barbitúricos. Por el contrario, el PS es un potente proepiléptico por sus propiedades antagónicas GABAérgicas. Además, la Alop potencia la actividad del GABA en un modelo de epilepsia parcial, consecuencia del retiro de la infusión intracortical del GABA en corteza cerebral de mamíferos, conocido como Síndrome de Abstinencia al GABA(SAG).<sup>49</sup>

### Otras entidades patológicas/farmacológicas relacionadas con los NE

La sobreproducción de esteroides adrenales característica del síndrome de Cushing tiene repercusiones en el SNC: labilidad emocional, hipersomnia y agitación, lo que recuerda un estado depresivo, en tanto que en el síndrome de Adison, los disturbios psiquiátricos que se observan son irritabilidad, apatía, fatiga, ansiedad, somnolencia, defectos en la memoria, etc.<sup>25,40,43</sup>

Por otra parte, algunos neurofármacos pueden alterar la síntesis *de novo* de los NE: la fenitoina, los barbitúricos, las benzodiazepinas, y la carbama-



zepina incrementan la expresión de la 5 $\alpha$ -esteroide-reductasa (Figura 2), la cual es responsable de formar Alop a partir de P; este efecto también es posible por cafeína y metamfetamina. En contraste, una dieta deficiente en riboflavina reduce en el astrocito a la misma 5 $\alpha$ -reductasa. De tal forma que fármacos y la dieta intervienen en la síntesis de NE en SNC, lo cual influye en el control de la excitabilidad de las neuronas.<sup>44</sup>

NE al receptor y medibles por desplazamiento o uniones de otros ligandos (Figura 4).

3. La neurotransmisión GABAérgica es neuro-modulada por esteroides de estructura pregnano doblemente reducidos, siendo el más potente la Alop, y antagonizada por PS y DHEAS. La neurotransmisión excitadora glutamatérgica es modulada en forma positiva por los derivados sulfatados PS y DHEAS.

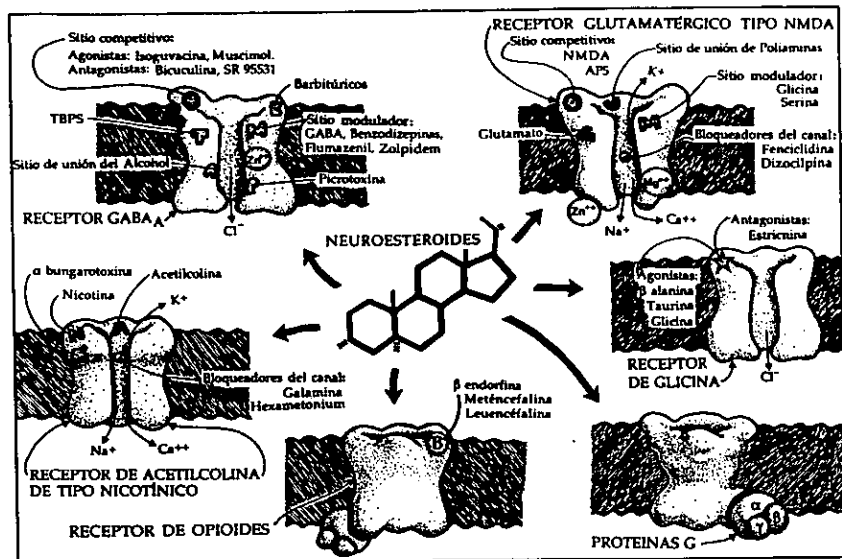


Figura 4. Los receptores de neurotransmisores acoplados a canal pueden ser reconocidos por los NE. El receptor GABA<sub>A</sub> es hasta ahora el mejor estudiado, con diversos sitios de unión a fármacos; este receptor es modulado en forma semejante por benzodiazepinas y aloP. La P es un modulador potente del receptor nicotínico, en tanto que los derivados sulfatados, SP y DHEAS, son agonistas del receptor de tipo NMDA. El receptor de glicina potencia su actividad por aloP. Las proteínas C y los receptores a opioides son modulados por la familia de NE, pregnanos principalmente. En la figura se muestran las corrientes iónicas moduladas por los NE: para GABA<sub>A</sub> y glicina corrientes de Cl<sup>-</sup>, para el receptor nicotínico y NMDA: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>, así como los diversos ligandos que pueden interactuar en sitios específicos en cada uno con ellos.

En resumen:

1. El cerebro produce *de novo* sus propios neuroesteroides-NE, los cuales pueden modular alostéricamente a varios receptores acoplados a canal (GABA<sub>A</sub>, NMDA, nicotínico, glicina) (Figura 3).

2. El efecto a nivel del complejo proteico de membrana es reversible, de latencias y duraciones cortas, observable por los cambios en las conductancias, corrientes iónicas, uniones específicas del

4. Esta modulación alostérica sobre el receptor y/o la interacción con proteínas G y sus mecanismos de transducción son conocidos como efectos no genómicos de los esteroides. Clínicamente, la neuromodulación por NE se expresa como conductas adaptativas al estrés, durante el ciclo menstrual o en el embarazo, además de influir en alteraciones psiquiátricas como la depresión y la ansiedad, y neurológicas, como la epilepsia (Cuadro 1).

**Cuadro I. Efectos no genómicos de los neuroesteroides y esteroides neuroactivos.**  
**Efectos rápidos (< 20 min) que excluye al ADN.**  
 No necesita el esteroide ingresar a la célula para desencadenar los efectos.  
 Efectos no son bloqueados por inhibidores de proteínas.

**Alopregnanolona**

**AloP**

Mayor actividad GABAérgica de toda la familia de NF  
 Potencia actividad GABA<sub>A</sub> como la inducida por Bz y barbitúricos  
 Regionalización de efectos (farmacológicamente más actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub> que expresa las subunidades:

$\alpha 3, \beta 1, \gamma 2$ )

~ frecuencia de apertura del receptor/canal GABA<sub>A</sub>

~ conductancia de Cl<sup>-</sup>

~ unión de muscimol, Bz, barbitúricos (GABA<sub>A</sub>)

~ AMPc inducido por adrenalina

Inducción de lordosis en roedores

Incremento de actividad en bulbo olfatorio por feromonas

Hipnótico, anticonvulsivo, ansiolítico, anestésico.

NE responsable del síndrome premenstrual (abstinencia a

Alop)

**THDOC**

~ Unión de flunitrazepam

ansiolítico, sedante.

~ Actividad electrofisiológica en roedores y gatos.

**Progesterona (P)**

Inducción de lordosis en roedores

Incremento de actividad en bulbo olfatorio por feromonas

Hipnótico, anticonvulsivo, ansiolítico, anestésico.

~ inducción acrosomal en espermatozoides

~ la corriente de Ca<sup>2+</sup> en espermatozoide

~ contracción yeyuno e ileon

**Sulfato de Pregnenolona (SP)**

~ ó ~ conductancia de Cl<sup>-</sup> (agonista/antagonista GABA<sub>A</sub>)

Agonista glutamatérgico: ~ la corriente de Ca<sup>2+</sup> en neuronas

~ procesos mnésicos

**Estrógenos**

~ respuesta a glutámico en hipocampo

~ excitotoxicidad de neurotransmisores

~ la corriente de K<sup>+</sup>

~ liberación de prolactina

**Andrógenos**

~ Frecuencia de disparo en neuronas de hipotálamo

~ ó ~ excitabilidad de hipocampo

~ ó ~ corrientes neuronales de Ca<sup>2+</sup>

**Glucocorticoides**

~ descarga espontánea en hipocampo

~ ó ~ corrientes neuronales de Ca<sup>2+</sup>

\* incremento

~ disminución

**Conclusiones**

La demostración de la síntesis de esteroides por el sistema nervioso central y de su actividad sobre receptores ionotrópicos se integra dentro de la concepción moderna de la unidad neuro-psico-immuno-endocrina. El lugar que cada uno de estos

niveles ocupa dentro de la fisiología y la patología se empieza a vislumbrar, y con ello las posibilidades de desarrollar nuevos fármacos con acciones anestésicas, ansiolíticas y antiepilépticas.

**Referencias**

1. **Shingal R, Sutherland L, et al.** Effects of subunit types of the cloned GABA<sub>A</sub> receptor on the response to a neurosteroid. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.* 1991;206:77-80.
2. **Mellon S, Descheppe C.** Neurosteroid biosynthesis. Genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* 1993; 629: 283-292.
3. **Rupprecht R, Trapp J, et al.** Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroid. *Neuron.* 1993; 11:523-530.
4. **Akwa Y, Sananes N, et al.** Astrocytes and Neurosteroids: Metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J. Clin. Biol.* 1993; 121: 135-143.
5. **Woolley C, McEwen B.** Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1993; 336: 293-306.
6. **Al-Dahan M, Jallilian H, et al.** Regulation of aminobutyric acid B (GABA<sub>B</sub>) receptors in cerebral cortex during the estrous cycle. *Brain Res.* 1994;640: 33-39.
7. **Hawkinson JE, Kimbrough C, et al.** Correlation of neuroactive steroid modulation of [35S] t-Butylbicyclophosphorothionate and [3 H] Flunitrazepam binding and aminobutyric acid A receptor function. *Mol. Pharmacol.* 1994; 46:977-985.
8. **Jusoff A, Reinhardt V, et al.** GABA binding sites: their density, their affinity to muscimol and their behavior against neuroactive steroid in human gliomas of different degrees of malignancy. *J. Neural Transm. (Gen Sect)* 1994;96 233-241
9. **Hawkinson J, Kimbrough C, et al.** The neuroactive steroid 3 $\alpha$ -hidroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-one is a two component modulator of ligand binding to the GABA<sub>A</sub> receptor. *Eur. J. Pharm. Mol Pharmacol Sec.* 1994; 269: 157-163.
10. **Finn D, Gee K.** The influence of estrous cycle on neurosteroid potency at the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993;265: 1374-1379.
11. **Tauboll E, Gjerstad L.** Comparison of 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one and phentobarbital on cortical synaptic activation and inhibition studied in vitro. *Epilepsia.* 1993; 34 (2): 228-235.
12. **Tauboll E., Lindstrom S.** The effect of progesterone and its metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one on focal epileptic seizures in the cat's visual cortex in vivo. *Epilepsy Res.* 1993; 14: 17-30.
13. **Ffrench-Mullen J, Danks M, et al.** Neurosteroid modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein coupled mechanism. *J. Neurosci.* 1994; 14 (4): 1963-1977

14. Prince R, Simmonds M. Differential antagonism by epipregnanolone of alfaxalone and pregnanolone potentiation of <sup>3</sup>H Flunitrazepam binding suggest more than one class binding site for steroids at the GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuropharmacol.* 1993; 32 (1): 59-63
15. Smith SS. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience.* 1991; 42 (2): 309-320.
16. Demircoren S, Majewska M, et al. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Neuroscience.* 1991;45(1):127-135
17. Fahey J, Lindquist D, et al. Pregnenolone sulfate potentiation of NMDA-mediated increase in intracellular calcium in cultured chick cortical neurons. *Brain Res.* 1995;669:183-188.
18. McEwen B, Cameron H, et al. Adrenal Steroids and plasticity of hippocampal neurons: toward an understanding of underlying cellular and molecular mechanisms. *Clin. Mol. Neurobiol.* 1993;13(4):457-482.
19. Twyman R, Macdonald R. Neurosteroid regulation of GABA<sub>A</sub> receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J. Physiol.* 1992; 456 215-245.
20. Deutsch S, Mastropalo J, et al. GABA-active steroids: endogenous modulators of GABA-gated chloride ion conductances. *Clin. Neuropharmacol.* 1992;15(5):352-364.
21. Pula G, Ducic I, et al. Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA<sub>A</sub> receptor subunit composition? *Receptors and Channels,* 1993;1:135-142.
22. Lan N, Bolger M, et al. Identification and characterization of a pregnane steroid recognition site that is functionally coupled to an expressed GABA<sub>A</sub> receptor. *Neurochemical Res.* 1991;16(3):347-356.
23. Nguyen Q, Saap D, et al. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor binding in human brain by neuroactive steroids: species and brain regional differences. *Synapse.* 1994;19:77-87.
24. Canonaco M, Carelli A, et al. Steroid hormones and receptors of the GABA<sub>A</sub> supramolecular complex. *Neuroendocrinology.* 1993;57:965-973.
25. Freeman E., Purdy R, et al. Anxiolytic metabolites of progesterone: correlation with mood and performance measured following oral progesterone administration to healthy female volunteers. *Neuroendocrinology,* 1993; 58:478-484.
26. Majone S, Berrino L, et al. Pregnenolone sulfate increases the convulsant potency of N-methyl-D-aspartate in mice. *Eur. J. Pharmacology.* 1992;219(3): 477-479.
27. Ator N, Grant K, et al. Drug discrimination analysis of endogenous neuroactive steroids in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;241:237-243.
28. Akwa Y, Morfin R, et al. Neurosteroid metabolism. *Biochem J.* 1992;288:959-964
29. Zaman S, Shingal R, et al. Effects of subunit types of the recombinant GABA<sub>A</sub> receptor on the response to a neurosteroid. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.* 1992;225:321-330.
30. Frye C, Mermeistein P, et al. Evidence for a non-genomic action of progestins on sexual receptivity in hamster ventral tegmental area but not hypothalamus. *Brain Res.* 1992;578:87-93.
31. Wu F.-S, Gibbs T, et al. Dual activation of GABA<sub>A</sub> and glycine receptors by β-alanine: inverse modulation by progesterone and 5α-pregnan-3α-ol-20-one. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 1993;246:239-246.
32. Valera S, Ballivet M, et al. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:9949-9953.
33. Chen E, Marril G, et al. Progesterone induced second messengers at the onset of meiotic maturation in the amphibian oocyte: interrelationships between phospholipid N-methylation calcium and diacylglycerol release and inositol phosphoglycerid turnover. *Endocrinology,* 1991;81:53-57.
34. Sha Yin, Yi-Zhang C. Membrane receptor-mediated electro-physiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology.* 1989;124(2):687-697
35. Borsky R, Richman H, et al. Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991;88:2758-2762.
36. Kavaliers M. Inhibitory influences of adrenal steroids 3α-5α tetrahydrodeoxycorticosterone on aggression and defeat-induced analgesia in mice. *Psychopharmacology,* 1988;95:488-492.
37. Friedman L, Gibbs T, et al. Gamma aminobutyric acid A receptor regulation: chronic treatment with pregnenolone uncouples allosteric interaction between steroids and benzodiazepine recognition sites. *Mol. Pharmacol.* 1993;44:191-197
38. Bowers B, Wehner J. Biochemical and behavioral effects of steroids on GABA<sub>A</sub> receptor function in long and short-sleep mice. *Brain Res. Bull.* 1992;29:57-68.
39. Gallo M, Smith S. Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol. Biochem and Behav.* 1993;46:897-904.
40. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 1992; 38:379-385.
41. Mayo W, Dellu F, et al. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res.* 1992;607:324-328.
42. Grobin A, Roth R, et al. Regulation of the prefrontal cortical dopamine system by the neuroactive steroid 3α, 21-dihydroxy-5α-pregnan-20-one. *Brain Res.* 1992;578: 351-356.
43. Baulieu EE. Neurosteroids. An Overview. *Adv. Biochem. En:Psychopharmacology. GABAergic Synaptic Transmission; Molecular, Pharmacological and Clinical aspects.* Biggio G. Concas R. (Eds) Raven Press. 1992; PP1-13.
44. Roberts E. Pregnenolone: from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA<sub>A</sub> receptor. *Biochem. Pharmacol.* 1995;49(1):1-16.

45. **Lan N, Gee K.** Neuroactive steroid actions at the GABA<sub>A</sub> receptor. *Hormones and Behav.* 1994; 28: 537-544.
46. **Brann D, Hendry L, et al.** Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Molec. Biol.* 1995;52(2):113-133.
47. **Piva F, Limonta, P, et al.** Effects of steroids on the brain opioid system. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1995; 53(1-6):343-348.
48. **Olsen R, Sapp D.** Neuroactive steroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1995; 48:57-54
49. **Calixto E, Montiel M, et al.** Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 1995;195:73-76.
50. **Blanchard D, Sakai R, et al.** Subordination stress: behavioral, brain and neuroendocrine correlates. *Behav. Brain Res.* 1993;58:113-121
51. **Shumacher M.** Rapid membrane effects of steroid hormones. *Trends in Neurosci.* 1990;13:359-362.
52. **Steiger A, Trachsel L.** Neurosteroid pregnenolone induces sleep-EEG changes in man compatible with inverse agonistic GABA<sub>A</sub>-receptor modulation. *Brain Res.* 1993;615:267-274.
53. **Clocca D, Vargas-Roig L.** Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Reviews.* 1995;16 (1):36-62.
54. **Sarrel P, Lufkin E, et al.** Estrogen action in arteries, bone, and brain. *Science and Medicine*, 1994;1(3):44-53.
55. **Osborne C, Elledge R, et al.** Estrogen receptor in breast cancer therapy. *Science and Medicine*, 1996; 3(1): 32-41.
56. **O'Malley B.** Thirty years of steroid hormone actions: personal recollections of an investigator. *Steroids*, 1995; 60: 490-498.
57. **Kubli-Garfias C.** Physiological role of 5 $\alpha$  and 5 $\beta$  metabolites in CNS. *Trends in Pharmacol. Sci.* 1984; 5: 439-444.
58. **Teyler T, Vardanis R, et al.** Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science*, 1980; 209: 1017-1018.
59. **Lieberherr M, Grosse B, et al.** A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxvitamin D3 on the phosphoinositide metabolism in the rat enterocytes. *J. Biol. Chem.* 1989; 34 (20):403-420
60. **De Boland A, Norman A.** Evidence for involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent protein kinase in the 1,25-dihydroxvitamin D3 - mediated rapid stimulation of intestinal calcium transport (transcaltachia). *Endocrinology*, 1990; 127:39-45.
61. **Belletti D, Lan N, et al.** Anticonvulsant steroids and GABA/benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex. *Neuroscience & Behav. Rev.* 1990;14:315-322.
62. **McEwen B.** Non-genomic and genomic effects of steroid on neural activity. *Trends in Pharmacol. Sci.* 1991; 12: 4141-146.
63. **Bowlby M.** Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 1993;43: 813-819.
64. **McCauley L, Gee K.** Detection and characterization of epalton receptors: novel recognition sites for neuroactive steroids that modulate the GABA receptor complex: *Meth. Neurosci.* 1994;22:211-225.
65. **Melcagni R, Ballabio M, et al.** Metabolism of steroid in pure cultures of neurons and glial cells: role of intracellular signalling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995; 53 (1-6): 331-336.1
66. **Selye H.** Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1941;46:116-121.
67. **Kuriyama K, Hirouchi M, et al.** Structure and function of cerebral GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neurosci Res.* 1993; 17:91-99.
68. **Macdonald R, Olsen R.** GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann. Rcv. Neurosci.* 1994;17:569-602.
69. **Krogsgaard-Larsen P, Frolund B, et al.** GABA<sub>A</sub> receptor agonists, partial agonists, and antagonists, design and therapeutic prospects. *J. Med. Chcmistry*, 1994; 37 (16): 2489-2505.
70. **Walkins J, Collingridge G.** Phenytylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994;15:333-342.
71. **Shoepf D, Conn P.** Metabotropic glutamate receptor in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993;4:13-20.
72. **Nakanishi S, Masu M.** Molecular diversity and functions of glutamate receptor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994;23:319-348.
73. **Betz H.** Glycine receptors are heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci.* 1991;14:458-461
74. **Sargent P.** The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Annu. Rcv. Neuroscience.* 1993;16:403-443.
75. **Molina V, Ciesielsky L, et al.** Effects of potentiation of the GABAergic neurotransmission in the olfactory bulb on mouse-killing behaviour. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986;24:657-664.
76. **Milewich L, Kaimal V, et al.** Steroid 5 $\alpha$ -reductasa activity in endothelial cells from human umbilical cord vessels. *J. Steroid Biochem.* 1987;26:561-567.
77. **Rosciszewska D, Buntner B, et al.** Ovarian hormones, anticonvulsant drugs, and seizures during the menstrual cycles in women with epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1986; 49: 47-51
78. **Kawata M.** Roles of steroids and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res.* 1995;24:1-46.
79. **Kubli-Garfias C.** Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. *J. Steroid Biochem.*1987;27:631-634.
80. **Perusquia M, Garcia-Yañes E, et al.** Non genomic mechanism of action of D-4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractibility of the isolated rat myometrium. *Life Sciences*, 1990; 47:1547-1553.
81. **Papadopoulos V.** Peripheral-Type Benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocrine Reviews*, 1993; 14 (2): 222-240.
82. **Bilger B, Forever Young.** Can DHEA temper the ravage of time? Some investigators can't afford to wait for the answer. *The Sciences*, 1995; 35 (5):26-31.

83. **Landgren S, Aagly J, et al.** The effect of progesterone and its metabolites on the interictal epileptiform discharge in the cat's cerebral cortex. *Acta Physiol Scand.* 1987; 131:33-42.
84. **Morrow L, Pace J, et al.** Characterization of steroid with aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol Pharmacol.* 1989; 37, 263-270.
85. **Costa E, Guidotti A.** Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sciences.* 1991; 49: 325-344.
86. **Zivin J, Choi D.** Stroke therapy. *Scientific American,* 1991; 265: 56-63.
87. **Costa Erminio, Paul Steven.** Neurosteroid and brain function. *Fidia research fundation symposium series.* Ed. Thieme. USA, 1991.
88. **Braitowsky S., Silva-Barrat C, et al.** Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. 1989; *Salud Mental;* 12: 53-62.

## II. V Síndromes de Abstinencia relacionados con la neurotransmisión GABAérgica

A lo largo de la historia humana, las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo y el pensamiento: el alcohol, la nicotina, la marihuana, entre muchas otras drogas, son ejemplos de este grupo de sustancias. En algunos casos, el adelanto en el conocimiento farmacológico lleva al diseño de nuevas drogas que propician trastornos en el funcionamiento del SNC, como es el caso de los psicotrópicos. Diversos agentes utilizados con un fin terapéutico pueden alterar la conducta del paciente y generar dependencia física e intelectual.

Algunos de los cambios (en metabolismo y órgano blanco) que se generan en el organismo por el consumo de una sustancia en forma repetida se conocen como "tolerancia". La tolerancia puede definirse como la reducción en los efectos de una droga después de su administración repetida (Midel, 1981). Normalmente, conforme se aumenta la dosis de un fármaco, aumenta también su efecto; sin embargo, se requiere de dosis cada vez mayores para obtener el efecto logrado en la primera exposición (desviación a la derecha de la curva dosis-efecto). El diazepam, por ejemplo, produce sedación a dosis de 5 a 10 mg al administrarse por primera vez. Sin embargo, quien lo toma en forma repetida puede hacerse tolerante a dosis de hasta varios de cientos de gramo (Teuber, 1999).

Actualmente se distinguen diferentes tipos de tolerancia, que pueden subclasificarse en tres: tolerancia farmacocinética, tolerancia farmacodinámica y tolerancia aprendida. Está última incluye una forma de tolerancia conductual que también se llama tolerancia condicionada (Cox et al., 1983; Feldman et al., 1996).

El término de tolerancia farmacocinética o de eliminación, se refiere a los cambios de distribución o metabolismo del fármaco después de la administración repetida, de modo que hay concentraciones plasmáticas reducidas en la sangre y, de manera subsecuente, en los sitios de acción de dicho fármaco. El mecanismo más frecuente es el aumento en la tasa metabólica. Un ejemplo de este proceso es el de los barbitúricos, ya que estimulan la producción de enzimas microsomales en el hepatocito, con el consecuente retiro y catabolismo rápido de los barbitúricos de la circulación (McLellan et al., 1992).

La tolerancia farmacodinámica, funcional, o de tipo celular, es la expresión de un cambio en el número de receptores (up/down regulation) asociado o no a cambios en la afinidad del receptor por la droga (fosforilación-defosforilación). También puede deberse a un desacoplamiento de las cadenas de señalamiento asociado al receptor (fosforilación, defosforilación, cambios en el genoma, desensibilización) (Feldman et al., 1996).

La tolerancia aguda se refiere a aquella que se genera rápidamente tras el empleo de un fármaco en una sola ocasión. El ejemplo típico de este tipo de tolerancia es el producido por la administración de cocaína. Si se administra repetidamente, los efectos de dosis subsecuentes disminuyen en cuestión de horas y a lo largo de la misma sesión (Lader et al., 1987).

La tolerancia cruzada ocurre cuando el uso repetido de una sustancia confiere tolerancia no sólo a la sustancia que se está empleando, sino también a otras de la misma categoría estructural o mecánica, efecto que se observa entre las benzodiazepinas y los barbitúricos (Robinson et al., 1981).

En contraste con la tolerancia, la sensibilización es un incremento en la respuesta originado por la administración de la dosis repetida del fármaco. Este fenómeno se observa como una desviación hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta (O'Brien, 1996).

La dependencia es un término clínico que se refiere a un estado de adaptación (tolerancia) producido por el reajuste de los mecanismos homeostáticos ante la administración repetida de una sustancia. La droga puede afectar múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio. La persona en estado de dependencia física o adaptada, requiere de una administración sostenida del fármaco para desempeñar sus actividades normales. Si, en forma repentina, esta sustancia deja de administrarse, se presenta un desequilibrio brusco, y los sistemas afectados deberán someterse de nuevo a un proceso de reajuste hasta alcanzar un nuevo equilibrio sin la sustancia.

La prueba clínica de la dependencia física es la aparición del "síndrome de abstinencia" o síndrome de supresión cuando la droga ha dejado de administrarse. Las variables farmacocinéticas tienen importancia considerable en la amplitud y en la duración del síndrome de supresión. Cada categoría de sustancia conlleva síntomas característicos, que suelen ser contrarios a los efectos del fármaco (O'Brien, 1996).

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia, son fenómenos biológicos, son consecuencias naturales del consumo de fármacos o sustancias, que

pueden producirse en animales de experimentación. Estos modelos pueden ser un correlato del evento que se registra en el humano. A continuación se mencionan las principales abstinencias relacionadas con el sistema GABAérgico y el enfoque actual que se les da en el campo de las neurociencias.

Las benzodiazepinas están entre los fármacos con mayor frecuencia de prescripción en el mundo. Se utilizan especialmente para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio. La administración de benzodiazepinas por algunas semanas produce poca tolerancia, y la interrupción suele no causar muchos problemas. Sin embargo, después de varios meses, aparece una tolerancia importante y se presenta síndrome de abstinencia si las dosis son disminuidas o se interrumpen. Es difícil distinguir entre los síntomas de la abstinencia y la reaparición de la ansiedad que motivó la prescripción de las benzodiazepinas. Es común el incremento paulatino de la dosis por la disminución del efecto durante tratamientos prolongados con benzodiazepinas. Los signos y síntomas más comunes de la abstinencia a las benzodiazepinas son la ansiedad y la agitación. Se incrementa la sensibilidad a la luz y al ruido, aparecen parestesias y sacudidas mioclónicas, se presentan trastornos del sueño y pueden presentarse mareos, inquietud e irritabilidad, así como una serie de signos neurológicos bastante característicos entre los que se incluyen: temblor, disartria, nistagmo y ataxia cerebelosa. Después de dosis altas de benzodiazepinas, el síndrome de abstinencia aparece con convulsiones y delirio (Doble y Martín, 1996).

En el caso de las benzodiazepinas, la génesis de la dependencia física no es tan clara como con los barbitúricos u otros ansiolíticos como el meprobamato. Los efectos de los barbitúricos son similares a los observados con el etanol. Dosis únicas de 200 a 400 mg de amobarbital producen en pocas horas disminución de la atención, disforia, distorsión en la sensación del tiempo, disminución en la actividad intelectual, nistagmo y diplopía. Altas dosis generan depresión respiratoria e hipoxia (O'Brien, 1996).

La privación de barbitúricos después de dosis repetidas, induce cambios electroencefalográficos tales como un incremento en la actividad basal, predominantemente en la región frontal del cerebro (O'Brien, 1996).

La abstinencia alcohólica se desencadena por un descenso absoluto o relativo de los valores de alcohol en sangre. Habitualmente, aparece un temblor generalizado rápido, más perceptible en la lengua y las manos, que empeora con la actividad motora o situaciones estresantes. Los síntomas alcanzan la plenitud a las 48 horas del último consumo. El inicio puede ser brusco o gradual. Desde el punto de vista clínico, presenta



unos pródomos caracterizados por temblor, alucinaciones visuales y ansiedad. El período de estado constituye el llamado *delirium tremens*, caracterizado por un descenso del nivel de conciencia, actividad psicomotriz alterada, alucinaciones visuales y agitación psicomotriz. En el plano neurológico se muestra disartria, con temblores de grandes oscilaciones y síntomas de ataxia cerebelosa. Pueden presentarse crisis convulsivas acompañada de confusión, desorientación, conciencia fluctuante y obnubilación. El cuadro alcanza su cenit a los 2-3 días de su inicio y puede mantenerse durante varios días. El riesgo de muerte es relativo, pero en casos tratados, la tasa de mortalidad es inferior al 1 % (Brailowsky y Garcia, 1999).

El DSM-III-R plantea criterios comunes para el diagnóstico de la abstinencia de sedantes-hipnóticos y ansiolíticos. Son los siguientes: 1. Interrupción o reducción del uso abundante o moderado durante un período prolongado (varias semanas o más) de un sedante, hipnótico o ansiolítico seguida como mínimo, de tres de los siguientes síntomas: náuseas o vómitos, malestar general y/o debilidad, hiperactividad autónoma (p. ej. taquicardia, diáforesis, ansiedad o irritabilidad), hipotensión ortostática, temblor de manos, lengua y párpados, insomnio y crisis epilépticas. 2. Dichos síntomas no deben estar causados por ningún otro trastorno físico o mental (Doble y Martín, 1996).

Un denominador común de la abstinencia a drogas que involucran a la neurotransmisión GABAérgica es la hiperexcitabilidad del SNC. Pero, ¿cuáles son los posibles mecanismos responsables de la aparición de estos eventos clínicos.?

El receptor GABA<sub>A</sub> podría ser el origen de los cambios en los fenómenos de abstinencia, así como de algunos trastornos conductuales y de algunos tipos de epilepsia. La expresión del ARNm de las subunidades del receptor cambian, debido a la excitabilidad neuronal, ya que después de crisis epilépticas disminuye la expresión de algunas subunidades como  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$  y  $\gamma 1$  en las regiones donde se encuentra el foco epiléptico. Esto cambia la sensibilidad del receptor al GABA y a otros agonistas (Doble y Martín, 1996; Clark et al., 1994; Smith et al., 1998).

Existen trabajos que señalan cambios en la subunidad  $\alpha 4$  en algunas epilepsias y en abstinencia de benzodiazepinas y neuroesteroides. Por ejemplo: los niveles de ARNm de esta subunidad aumentan 4h después de la primer crisis epiléptica inducida por kindling en la amígdala (Clark et al., 1994). Crisis inducidas por ácido kainico, también presentan el fenómeno de "up-regulation" en la subunidad  $\alpha 4$  (Tzunashima et al., 1997). Electrochoques repetidos generan también un incremento en la expresión del

ARNm de esta subunidad (Clark, 1998). Además, durante la abstinencia a la alopregnanolona y a la progesterona, aparece un incremento en la expresión de la isoforma  $\alpha 4$ . La "terapia antisentido" contra el ARNm de esta subunidad previene de la abstinencia a los neuroesteroides (Smith et al., 1998). La abstinencia de diazepam, tiene en común, el incremento en la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  en la corteza cerebral (Doble y Martin, 1996), en tanto que un tratamiento crónico con etanol, induce una disminución en la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 6$  así como un incremento de la  $\gamma 3$  (Buck et al., 1991). Durante la abstinencia alcohólica se ha determinado también, que la expresión de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 5$  disminuyen en neuronas de la corteza cerebral, además de presentarse cambios en la fosforilación del receptor (Mhatre y Ticku, 1992). Diversos estudios indican que tratamientos largos con benzodiazepinas disminuyen significativamente la expresión de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$ . Cuando los tratamientos son prolongados (mayores de 1 mes), se reduce la expresión de la subunidad  $\alpha 5$ , y aumenta la de las isoformas  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  (Doble y Martin, 1996). En la abstinencia de diazepam se ha demostrado una disminución en la densidad de las subunidades  $\alpha 1$  y un incremento en la expresión de  $\alpha 5$ ,  $\gamma 2L$ ,  $\gamma 2S$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  en neuronas de la corteza cerebral, específicamente en la región frontoparietal (Impagnatiello et al., 1996; Pesold et al., 1997). Un tratamiento prolongado con muscimol, en cultivos de neuronas, reduce la expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha 1$  (Hirouchi et al., 1992); el tratamiento simultáneo con bicuculina, bloquea este fenómeno. Las  $\beta$ -carbolinas, antagonistas del receptor  $GABA_A$ , inducen un incremento en la expresión de la subunidad  $\delta$  del receptor  $GABA_A$  en cultivos de neuronas (Doble y Martin, 1996).

Un aspecto interesante que sustenta en parte la hipótesis de este trabajo es el siguiente: Hay una gran diversidad de drogas que reconocen al receptor  $GABA_A$ : el tratamiento prolongado con sus agonistas genera cambios en la expresión de las subunidades del mismo. También puede disminuir o aumentar el número de receptores, lo que puede traducirse en una modificación de la sensibilidad farmacológica, y determina cambios en la excitabilidad del tejido. Dado que el agonista por excelencia del receptor  $GABA_A$  es el mismo GABA, es lógico proponer que estos cambios debe producirlos el GABA.

El balance de las evidencias disponibles acerca de los cambios en las subunidades del receptor  $GABA_A$  después de tratamientos prolongados con agonistas.

provocaron una explicación molecular del desarrollo de tolerancia y abstinencia de las drogas GABAérgicas. El GABA mismo debería producir algunos de estos cambios.

Existen ajustes farmacológicos rápidos ante la exposición prolongada de un agonista al receptor GABA<sub>A</sub>; la desensibilización es la primera consecuencia. Ante una concentración elevada de un agonista, el receptor disminuye su actividad; a largo plazo, este fenómeno también depende de un cambio en la composición de las subunidades del receptor (Cash et al., 1997). La desensibilización depende del estado de fosforilación del receptor. Así, un incremento en los niveles de AMP<sub>C</sub> o en la actividad de la PKA disminuyen la actividad del receptor favoreciendo la desensibilización, es decir, la fosforilación cambia los estados de apertura, la duración de apertura del canal y/o la afinidad al pegado del ligando al receptor GABA<sub>A</sub> (Brown et al., 1998; Frosch et al., 1992; Laidenheimer y Chapell, 1997).

## II. VI El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

En el curso de una investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia (Silva-Barrat et al., 1988) en la década de los ochentas, se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical posterior al tratamiento con GABA en el mandril fotosensible (Brailowsky et al., 1987; 1988; Menini et al., 1991).

En estos primates, la estimulación luminosa intermitente induce la aparición de descargas epilépticas al nivel de la corteza cerebral, acompañadas de mioclonias generalizadas. La infusión crónica, localizada, de GABA mediante cánulas intracorticales, tiene un potente efecto anticonvulsivo, que perdura a lo largo del período de infusión (7 días).

En todos los mandriles, fotosensibles o no, a los que se administró el GABA, se constató la aparición de focos de actividad paroxística en el sitio de infusión al día siguiente de haber cesado el tratamiento. Independientemente del área infundida, se observó la presencia de poliespigas y de actividad en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora se correlacionó con la aparición de mioclonías de la pata posterior contralateral al hemisferio infundido. En algunos animales se presentaron, así mismo, sacudidas de "perro mojado" (Brailowsky et al., 1987; 1991).

Posteriormente se confirmó la presencia de este fenómeno de hiperexcitabilidad en ratas epilépticas (kindling amigdalino; Fukuda et al., 1987), y no epilépticas

(Brailowsky et al., 1987; 1989). El fenómeno se caracterizó conductual y electroencefalográficamente (Brailowsky et al., 1988).

Tanto en monos como en ratas, la interrupción abrupta de la infusión intracortical crónica de GABA fue seguida de la aparición de un foco epiléptico en la zona infundida, caracterizado por descargas en forma de espiga. Al correr el tiempo, las manifestaciones electroencefalográficas se circunscribieron más a la zona de la cánula de infusión, y en las etapas finales del fenómeno, las descargas desaparecieron gradualmente para sólo reaparecer en la fase de sueño de ondas lentas. A este fenómeno de hiperexcitabilidad se le llamó "Síndrome de Abstinencia al GABA" (SAG; LeGal La Salle et al., 1988; Silva-Barrat et al., 1992), ya que, además de las crisis convulsivas, los animales presentaban otras manifestaciones clínicas tales como: mioclonus de la pata inferior contralateral al hemisferio infundido, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad, y aumento de la conducta exploratoria. En las primeras horas de la evolución del SAG, el animal cursa con aletargamiento (Brailowsky et al., 1992). Existe dependencia física, ya que la re-infusión de GABA hace que desaparezcan las manifestaciones EEG (Brailowsky, 1994). Finalmente, también hay señales de tolerancia cruzada a benzodiazepinas (diazepam) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica (Brailowsky, 1992).

Se le ha descrito tres distintos patrones en el electroencefalograma (EEG) durante el SAG (Brailowsky et al., 1990):

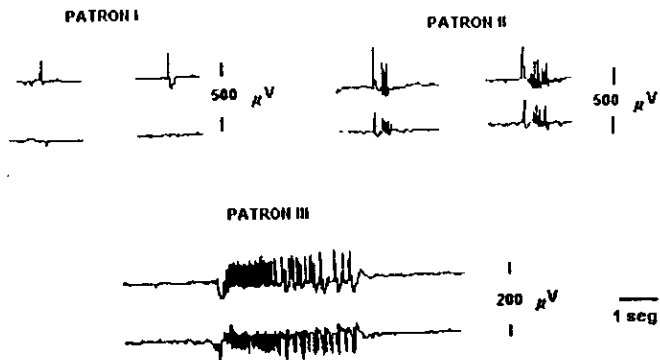
PATRON I: se presenta actividad espiga-onda única unilateral, de 200 a 700  $\mu$ V de amplitud y a una frecuencia de 0.5 a 3 ciclos por segundo (cps).

PATRON II: aparecen complejos espiga-onda seguido de poliespigas de alta frecuencia.

PATRON III: se observan espigas de propagación contralateral (bisincronía), generalmente con mayor amplitud en el lado de la infusión, de varios segundos de duración (ver figura 5).

Comúnmente el SAG se inicia con el patrón I, que predomina a partir del segundo día y hasta el final del síndrome. Los patrones II y III se observan en las primeras 4 a 6 horas y son poco frecuentes después de 12 horas de evolución. La aparición de las descargas paroxísticas tiene una latencia promedio de 90 minutos (Brailowsky et al., 1990).

Figure 5



Con la técnica de la 2-deoxiglucosa (2-DG) radioactiva se ha observado cambios metabólicos producidos por el SAG cortical (Menini et al., 1991), mediante esta técnica es posible estudiar el metabolismo glucídico cerebral ya que la 2-DG se acumula en el sitio de utilización. Las áreas cerebrales más activas acumularán más 2-DG, la cual puede visualizarse mediante autorradiografía. De esta manera, se observó un aumento significativo en el consumo local de glucosa (3 a 5 veces con relación al control), no sólo en el área cortical involucrada en la generación de la actividad paroxística, sino también en la zona talámica ipsilateral de proyección de dicha área cortical (núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central lateral, ventro-lateral y reticular), en animales sacrificados 60 minutos después de haberse iniciado el SAG. Estas regiones hipermetabólicas corresponden con las áreas de gliosis que se cuantifican en animales sacrificados 10 días después de haberse interrumpido la actividad paroxística (Brailowsky, 1991).

También se han estudiado los efectos de las infusiones crónicas intracorticales del GABA sobre la actividad de la enzima de síntesis del mismo, la GAD. Los resultados demostraron una reducción de aproximadamente 40% en la actividad de la GAD, tanto en presencia como en ausencia del cofactor PLP, a nivel del sitio de infusión del aminoácido (Salazar et al, 1994).

En rebanadas de corteza cerebral, obtenidas de ratas que presentaban convulsiones *in vivo* (mioclonias unilaterales) o cambios eléctricos (espigas en el sitio de infusión), se llevaron a cabo experimentos *in vitro*, con los que se registró a nivel intracelular a las neuronas situadas en la vecindad del sitio de infusión.

La estimulación eléctrica de la sustancia blanca situada en el mismo plano columnar del sitio de registro indujo en todas las células analizadas, despolarizaciones

paroxísticas acompañadas de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas actividades son las llamadas despolarizaciones paroxísticas de gran amplitud o PDS (del inglés: paroxysmal depolarization shift) y se han considerado como una característica de las células epilépticas. Se encontró una población de neuronas que presentaba, además de los PDS inducidos sinápticamente, trenes de potenciales de acción de alta frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente. Estas neuronas, con capacidad intrínseca de generar PDS se diferencian de las neuronas en las que los PDS sólo podían ser inducidos por estimulación sináptica en: a) presentar potenciales dependientes de voltaje (PPSE), que aumentaban por hiperpolarización y disminuían por despolarización; b) presentar PDS dependientes de calcio: la sustitución del calcio con cobalto produjo la desaparición de los trenes de potenciales de acción de alta frecuencia inducidos por corriente para dar paso a potenciales únicos, y c) tolerancia a los efectos hiperpolarizantes del GABA aplicado al baño en el que se mantenía a las rebanadas. Esta tolerancia se manifestó con una  $DE_{50}$  (concentración efectiva 50) de isoguvacina 50-100 veces mayor para estas células que para las neuronas con PDS sinápticos (Silva-Barrat et al., 1989; 1992; 2000).

Experimentos enfocados a determinar el papel de los dos principales subtipos de receptor al GABA, demostraron que el SAG es un fenómeno dependiente del receptor  $GABA_A$ . Las pruebas que apoyan esta afirmación son farmacológicas: por una parte, la demostración de que es posible inducir un foco epiléptico al interrumpir infusiones localizadas de isoguvacina, un agonista específico  $GABA_A$  y por la otra, la comprobación de que los agonistas específicos del receptor  $GABA_B$  (baclofen) inducen dicho foco cuando se aplican, pero no cuando se suprimen. Además, los antagonistas  $GABA_B$ , como el flaclofen, no tienen efecto sobre los focos epilépticos producidos por la privación de GABA (Brailowsky et al., 1990, 1991).

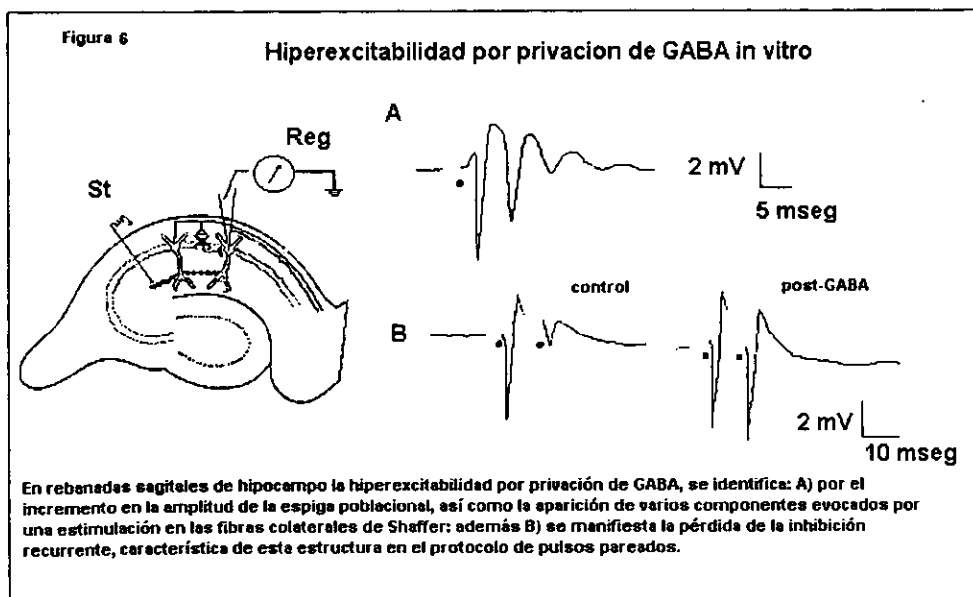
La respuesta de estas descargas epileptiformes a los diferentes fármacos anticonvulsivos, administrados por vía sistémica, varía de acuerdo al tiempo de evolución de la actividad paroxística, ya que el foco epiléptico es extraordinariamente resistente a los anticonvulsivos usados clínicamente (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepina, etc.), e incluso al fármaco de elección en casos de status epiléptico, el diazepam, lo que sugiere la existencia de tolerancia cruzada. Dosis hasta de 15 mg/kg. I.P. de esta benzodiazepina no afectan la frecuencia de la descarga del foco epiléptico, a pesar de que el animal esté profundamente sedado. El

pentobarbital, a dosis anestésicas (35 mg/kg.), no modifica significativamente la frecuencia del foco de descarga cortical. Lo anterior es prueba de que el SAG es un modelo de epilepsia intratable, en los primeros estadios de su evolución (Brailowsky, 1991)

A partir del segundo día del SAG su respuesta cambia, empieza a observarse un efecto anticonvulsivo por la administración de fármacos antagonistas del receptor al NMDA como la ketamina, el amino-fosfonoheptanoato (APH) y el MK-801, o por benzodiazepinas como el clonazepam (Brailowsky et al., 1988; 1990; 1991).

En este contexto, es necesario mencionar que la actividad paroxística focal característica del SAG puede inhibirse por la infusión local del GABA, aún en las fases iniciales del síndrome.

Con el fin de demostrar la especificidad del fenómeno de hiperexcitabilidad causado por el GABA, se probó el efecto de la taurina, así como de la glicina, con resultados negativos (Brailowsky, 1991).



Para reproducir *in vitro* el fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal inducido por la privación brusca del tratamiento crónico con GABA, se hicieron estudios en rebanadas de hipocampo de rata (García-Ugalde et al., 1992). Esta es una preparación

frecuentemente empleada en el estudio experimental de la epilepsia, por la facilidad con la que se pueden reconocer sus elementos anatómicos (neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 y sus vías de llegada y salida). Por otra parte, dada la gran incidencia de epilepsia del lóbulo temporal (psicomotora), su estudio es de importancia clínica y experimental.

En rebanadas de hipocampo incubadas con GABA (10 mM) por 60 o 120 minutos y luego privadas bruscamente del neurotransmisor, se constató la aparición de hiperexcitabilidad neuronal caracterizada por un aumento extraordinario de la respuesta de campo de las neuronas piramidales del área CA1 a la estimulación aferente (colaterales de Schaffer), así como por la abolición de la inhibición recurrente mediada por el GABA y evaluada mediante el paradigma de la estimulación pareada (figura 6).

Estos experimentos demostraron la posibilidad de inducir un fenómeno de hiperexcitabilidad *in vitro* como modelo del SAG *in vivo*. Las preparaciones *in vitro* pueden facilitar considerablemente el análisis neuroquímico y neurofarmacológico de la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA.

En resumen, desde el punto de vista clínico, el SAG reproduce varios cuadros observados en el humano:

1) un cuadro de estado epiléptico focal (actividad paroxística continua localizada en una zona específica).

2) un síndrome de epilepsia parcial continua (síndrome de Kojewnikow), caracterizado por descargas focales asociadas a mioclonus y a descargas epileptiformes lateralizadas periódicas.

3) desde el punto de vista fisiopatológico, el SAG se relaciona con todos los síndromes que se caracterizan por alteraciones de la transmisión inhibitoria y se asemeja a otros modelos de epileptogénesis inducida por antagonistas del GABA como la bicuculina o la picrotoxina. Ambos modelos se acompañan de hiperexcitabilidad neuronal, de hipermetabolismo glucídico y de cambios neuropatológicos compatibles con la excitotoxicidad.

4) desde el punto de vista neurofarmacológico, el SAG constituye un fenómeno dependiente de los receptores GABA<sub>A</sub>, que se acompaña de disminución en la actividad de síntesis de la GAD y de tolerancia a agonistas específicos de este receptor (la isoguvacina). Por otra parte, el perfil farmacológico del SAG varía con el tiempo de evolución: extremadamente resistente en las primeras 24 horas y, en etapas posteriores sensible a las benzodiazepinas.



5) el SAG podría relacionarse con síndromes de carencia o abstinencia semejantes a los que se observan al suspender bruscamente la administración prolongada de sustancias como los barbitúricos, las benzodiazepinas o el alcohol, sustancias que se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica.

6) el animal con SAG presenta dependencia al GABA y tiene alteraciones conductuales como hipersomnia, irritabilidad y aumento de la actividad exploratoria, además de movimientos mioclónicos de la pata trasera contralateral al hemisferio infundido así como, ocasionalmente, sacudidas de “perro mojado”.

### III OBJETIVOS

1. El objetivo central de esta tesis fue caracterizar en una preparación de corteza cerebral *in vitro* la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA.
2. Estudiar durante la hiperexcitabilidad inducida por la supresión brusca de GABA la sensibilidad del receptor GABA<sub>A</sub> a distintos agonistas selectivos para este receptor, como son el diazepam, el flunitrazepam y la alopregnanolona.
3. Comparar la hiperexcitabilidad inducida por privación de agonistas alostéricos (flunitrazepam) con aquella producida por el agonista endógeno (GABA).
4. Observar los cambios funcionales en la neurotransmisión GABAérgica por la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA. Es importante hacer notar que la preparación *in vitro* permite estudiar el curso temporal de estos cambios: antes y después de que se genere la hiperexcitabilidad. Mientras que, los estudios *in vivo* sólo permiten estudiar los cambios funcionales después de la aparición de la hiperexcitabilidad.
5. Estudiar el efecto de la inhibición en la síntesis de proteínas en la inducción del SAG, utilizando para este efecto la anisomicina.
6. Evaluar la susceptibilidad de inducción de la LTP por efecto de la abstinencia al GABA, debido a que éste puede ser un bioensayo equivalente al bloqueo selectivo de la neurotransmisión GABAérgica

#### IV HIPOTESIS

Una de las características más importantes de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA es que muestra una resistencia farmacológica a los antiepilépticos en los primeros estadios de evolución. (Down regulation). Sin embargo, la re-administración de GABA es capaz de disminuir o bloquear completamente la hiperexcitabilidad.

En la búsqueda de una explicación lógica de los mecanismos de inicio de la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA, se plantea la siguiente hipótesis: ¿es posible que el receptor GABA<sub>A</sub> modifique su estructura por acción de la administración y posterior privación de GABA? Muchos modelos de epilepsia y síndromes de abstinencia tienen en común denominador la modificación en las subunidades que conforman al receptor GABA<sub>A</sub>. Así, la abstinencia al mismo GABA, puede ser el sustrato de muchos tipos de epilepsia cuyo origen común es una modificación del receptor GABA<sub>A</sub>.

La hipótesis general de la presente Tesis postula que el sustrato común de todas las abstinencias de drogas GABAérgicas es el mismo.

## V MATERIAL Y METODOS

### EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### CIRUGIA ESTEREOTAXICA

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con peso de 250 a 300 g, a las cuales se les mantuvo en forma individual en cajas de acrílico, con libre acceso al alimento y en condiciones de temperatura controlada y ciclos luz/oscuridad 12/12 h.

A la rata anestesiada con una mezcla de halotano 2% y carbogéno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), se le implantaron en ambas cortezas somatomotoras (2 mm posterior de bregma; 2 mm lateral a la línea media y a 1.4 mm de profundidad), dos cánulas de infusión de 0.5 mm de diámetro externo y 10 mm de largo. Además, se colocaron electrodos epidurales, 2 mm posteriores a ambas cánulas de infusión.

La actividad electroencefalográfica basal (EEG) de ambas regiones somatomotoras se obtuvo mediante derivaciones bipolares amplificadas y registradas en un polígrafo Grass (Mod. 79) (filtros 0.3-300 Hz). Las instilaciones intracorticales de GABA o neuroesteroides se llevaron a cabo utilizando una bomba de microinfusión (Harvard Apparatus) a una velocidad de 3 µl/h. Todas las soluciones instiladas fueron marcadas con "azul verdadero" para delimitar el área de infusión en la corteza cerebral. Se realizaron infusiones unilaterales de GABA solo o asociado con neuroesteroides durante 120 minutos. Se midieron los cambios en el EEG después de las instilaciones (latencia a la primera espiga epileptiforme y duración del foco epiléptico).

Diez días después de concluir las manifestaciones EEG características del SAG, se sacrificó a los animales con pentobarbital sódico (200 mg/Kg.). Se llevaron a cabo perfusiones intracardíacas con solución PLP: paraformaldehído, lisina-metaperhidato: (metaperhidato de sodio 1.2g; lisina 6.8g; paraformaldehído 20g; Buffer fosfato 0.2 M). El cerebro se mantuvo en diferentes gradientes de solución fosfatos/sacarosa para finalmente ser seccionado en el microtomo y prepararlo para diferentes tinciones histológicas.

#### HISTOLOGIA

A los cortes de cerebro (50 micras) se les realizó tinción de Nissl e inmunohistoquímica para proteína fibrilar ácido glial (GFAP). Los cortes preparados en laminillas se analizaron por medio de un procesador de imágenes computarizado (Image, Macintosh) a través de microscopia fotónica (Nikon).

## ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizaron para estos resultados dos pruebas estadísticas no paramétricas: el análisis de varianza de Kruskal-Wallis.

## EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### PREPARACION DE REBANADAS DE CEREBRO:

Para estos experimentos se utilizaron ratas macho cepa Wistar (120 g); las cuales fueron decapitadas bajo anestesia con éter. Se les extrajo el cerebro y se seccionó en un vibratomo (pelco 101) en cortes sagitales de 400  $\mu\text{m}$  de grosor a temperatura de 4 °C. Las rebanadas se mantuvieron en solución salina con bicarbonato (en mM): NaCl 125, KCl 3.0, MgCl<sub>2</sub> 1.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucosa 11; saturado con burbujeo continuo con carbógeno ajustado a un pH=7.4 y a una osmolaridad de 300 mOsmol/l.

Los protocolos farmacológicos y los registros de las espigas poblacionales (EPs) se llevaron a cabo en una cámara de perfusión continua (5 ml), a temperatura de 31 °C; con una velocidad de superfusión de 1 a 2 ml/min. El registro de las EPs se obtuvo en capas superficiales corticales (I/II) por medio de micropipetas de vidrio llenas con solución 0.9% de NaCl (3-10 M $\Omega$ ) (amplificador Grass serie p5 estandar AC). Las EPs fueron observadas en un osciloscopio y digitalizadas simultáneamente para su almacenamiento (Axoclamp Instruments). Los estímulos para provocar las EPs se realizaron con un electrodo bipolar concéntrico en capas profundas de la corteza cerebral (V/VI) mediante pulsos cuadrados únicos (40-70  $\mu\text{s}$  a 0.2Hz) (estimulador Grass S-88), así como con pulsos pareados con diferentes intervalos de tiempo entre los estímulos: 20, 40, 80, 150 y 300 ms. La intensidad de estimulación para todos los experimentos fue la necesaria para obtener una espiga poblacional de amplitud del 40% de la amplitud máxima. Estos protocolos no indujeron depresión o espigas múltiples ni tampoco potenciaron la respuesta en las condiciones testigo.

Los experimentos para inducir hiperexcitabilidad por privación de GABA *in vitro* se realizaron de la siguiente manera: se incubaron las rebanadas con GABA (5 mM) durante 120 minutos. Después se eliminó bruscamente el GABA de la perfusión y se registró durante 4 horas. Se registraron las EPs cada 15 minutos, así como la respuesta a los pulsos pareados, antes, durante y después de la incubación con el

GABA. Durante el incremento de la excitabilidad inducida por privación de GABA se llevaron a cabo diferentes aplicaciones de fármacos o se efectuaron los experimentos neuroquímicos.

## EXPERIMENTOS NEUROQUIMICOS

### LIBERACION DE GABA-<sup>3</sup>H

En rebanadas corticales procesadas de manera idéntica a las de los experimentos de neurofisiología, se cuantificó la liberación de GABA-<sup>3</sup>H (actividad específica 50 Ci/mmol) ante un estímulo depolarizante (KCl, 50 mM), en tres distintas condiciones: control, al término de la incubación con GABA por 2 horas y 150 minutos después del término de la incubación con el aminoácido.

El tejido se incubó con GABA-<sup>3</sup>H (0.1 mM) durante 10 minutos a 37 °C. Después, las rebanadas fueron transferidas a 4 micro-cámaras de perfusión (0.5 ml/min) paralelas con capacidad de 0.25 ml cada una. Se colectaron fracciones cada minuto durante la perfusión. Después de 5 minutos de liberación espontánea, el medio de perfusión fue sustituido por Ringer-Krebs con alta concentración de KCl [50 mM]. Cada fracción de superfusión obtenida en periodos de un minuto y el tejido (solubilizado) se ajustó a 5 ml con tritosol y se procesó para su lectura en un contador de centelleo Beckman (Mod. LS 1701). La liberación de GABA-<sup>3</sup>H, se expresó en porcentajes de radioactividad total liberada por minuto (radioactividad total = total liberado + remanente en el tejido). Los valores de radioactividad, en cpm, fueron del orden de los 100 000; convertido para su análisis en porcentajes. Estudios previos, demostraron que, en estas condiciones experimentales, entre el 80 a 95% de la radioactividad liberada corresponde al neurotransmisor estudiado.

### ANALISIS ESTADISTICO

En los registros electrofisiológicos, los promedios ( $\pm$  errores estándar) del incremento de las EPs con respecto al control (en porcentaje) y la liberación de GABA-<sup>3</sup>H se validaron utilizando la prueba estadística de U de Mann-Whitney.

Sustancias utilizadas:

GABA (sigma, St Lois, MO)

Alopregnanolona, (aloP, sigma, St Lois, MO)

Progesterona (P, sigma, St Lois, MO)

Moleculsol (5 $\alpha$ -cyclo-dextrine, sigma, St Lois, MO)

Diazepam (Dz, sigma, St Lois, MO)

Bicuculina (Bic, sigma, St Lois, MO)

CdCl<sub>2</sub> (sigma, St Lois, MO)

MK801 (RBI, Natick, MA)

Flunitrazepam (Flun, sigma, St Lois, MO)

<sup>3</sup>H-GABA (sigma, St Lois, MO)

<sup>3</sup>H-Muscimol (sigma, St Lois, MO)

Exceptuando la alopregnanolona (que tiene que diluirse en moleculsol) y el flunitrazepam previamente disuelto en 0.1 N de HCl, todas las drogas utilizadas fueron disueltas desde una solución "stock" en el Ringer.

## VI RESULTADOS

Los resultados se presentan en tres secciones.

1ª. Sección: "Allopregnanolone potentiates a GABA-Withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex". *Neurosci. Lett.* 1995; 195: 73-76. Este primer trabajo muestra que la allopregnanolona es capaz de potenciar el efecto de la supresión aguda de GABA para producir hiperexcitabilidad, evaluado mediante registros EEG. Se demuestra que este neuroesteroide disminuye la latencia para producir el SAG e incrementa la duración del foco epiléptico. Esto sugiere que la hiperexcitabilidad o el síndrome de abstinencia producido por agonistas alostéricos o el agonista endógeno puede tener un sustrato común.

2ª. Sección: "Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal *in vitro*" *Epilepsy Res.* 2000; 39: 13-26. En este artículo se demuestra y caracteriza electrofisiológicamente la hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA *in vitro*. Se muestran evidencias de:

1. La hiperexcitabilidad neuronal inducida por la privación aguda de GABA puede producirse *in vitro*, en la neocorteza.
2. La hiperexcitabilidad neuronal también puede inducirse por privación aguda de flunitrazepam. Ambos fenómenos (1, 2) fueron muy semejantes.
3. La progesterona facilita la hiperexcitabilidad cortical provocada por la privación de GABA.
4. En condiciones de hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA el efecto inhibitorio de la allopregnanolona se incrementa.
5. Se demuestran cambios neuroquímicos en condiciones de hiperexcitabilidad por privación de GABA y durante la incubación con el neurotransmisor: en este orden, se presentan evidencias de una disminución en la liberación de GABA-<sup>3</sup>H.



provocada por el  $K^+$  después de la privación aguda de GABA y una disminución de la unión específica de muscimol- $^3H$  durante la incubación con GABA; el cual se recupera durante el período de hiperexcitabilidad inducido por la privación.

3ª. Sección "Long Lasting effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat" Neural plasticity, 2000 7;(1-2):1-8. Se presentan resultados *in vivo* e *in vitro*, los cuales demuestran que un inhibidor de la síntesis de proteínas como la anisomicina es capaz de bloquear la generación del SAG, además de que durante la hiperexcitabilidad inducida por la supresión de GABA *in vitro* se incrementa la sensibilidad para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP).

## Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex

Eduardo Calixto<sup>a</sup>, Teresa Montiel<sup>a</sup>, Cristina Lemini<sup>b</sup>, Simon Brailowsky<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-253, México, 04510 D.F., México

<sup>b</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., México

Received 27 March 1995; revised version received 8 June 1995; accepted 9 June 1995

### Abstract

We have studied the neuromodulatory effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (allopregnanolone-3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P-) in the GABA-withdrawal syndrome (GWS). This is a model of partial epilepsy consisting of an enduring paroxysmal activity recorded at the site of GABA infusion that depends, for its induction, on GABA receptor activation. Rats were chronically implanted for frontal and occipital EEG recording with infusion cannulae fixed on the somatomotor cortical region. When the neurosteroid was infused after or concurrently with GABA, a potentiation of the GWS (i.e. shorter latency and prolonged duration) was observed. No modifications in EEG activity were detected when allopregnanolone was administered alone or prior to GABA administration. These results indicate a neuromodulatory effect of allopregnanolone, dependent on the presence of GABA at the receptor site.

**Keywords:** Epilepsy; EEG; Plasticity; GABA receptor; Allosteric modulation

Epileptic activity can be elicited by the manipulation of either excitatory or inhibitory neurotransmitter concentration. As a rule, any procedure interfering with GABA neurotransmission provokes seizures.

Several forms of epilepsy involve cyclic variations; for example, in epileptic women, seizure occurrence decreases during the second half of the estrous cycle, during puberty, in the last trimester of pregnancy, and in the immediate postpartum period [6]. The neuroactive forms of the sex steroid progesterone, the pregnanolones, appear to be involved in these effects [11].

The GABA-withdrawal syndrome (GWS) is an experimental model of partial epilepsy induced by the cessation of exogenous infusions of GABA in the cerebral cortex, the amygdala or the hippocampus [2,4,8]. The GWS is easily identifiable in EEG recordings by the presence of high-amplitude spikes and spike-and-wave continuous activity [3]. These paroxysmal patterns gradually decrease in amplitude and frequency until they disappear

hours or days after, depending on the GABA infusion time [2].

Although we cannot rule out the participation of many other molecules in the GWS our data indicate that, at least for its induction, GABA is the main neurotransmitter involved. We have induced GWS with other GABA<sub>A</sub> receptor agonists such as isoguvacine [5] and THIP, while baclofen, the prototype GABA<sub>B</sub> agonist does not induce withdrawal signs. Moreover, in previous experiments we have found that discontinuation of intracortical chronic infusions of other substances with inhibitory properties (i.e. glycine or taurine) did not induce paroxysmal discharges [3].

In the mammal brain, glial cells appear responsible for the de novo synthesis of steroids [10]. These 'neurosteroids' have anesthetic, sedative-hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic actions [10]. Oligodendrocytes and astrocytes can synthesize in particular one of the most potent steroids allopregnanolone (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one) [10]. Allopregnanolone (3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P) has been proposed to exert a positive modulation of GABAergic neurotransmission by increasing the frequency of chloride channel openings and enhancing GABA binding [8,10].

\* Corresponding author. Tel.: +52 5 622 5761; Fax: +52 5 622 5607; E-mail: sbrailow@ifscun1.fisiol.unam.mx.

To determine the role of neurosteroids in the GWS allopregnanolone was infused into the cerebral cortex of the rat either alone, together with GABA, prior to, or following GABA administration. The behavioral and electrophysiological effects of the intracortical infusions were studied.

The experiments were performed on male Wistar rats (250-300 g), individually caged, with free access to food and water, on a 12/12 h cycle (lights on 0800 h).

Drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and RBI (Natick, MA). The solvents were saline for GABA, and molucsol® for allopregnanolone. All solutions contained direct blue (1 mg/5 ml), a dye that marks the injection site and indicates the extent of drug diffusion. The dose of allopregnanolone was determined on pilot experiments and based on studies of GABA receptor binding in the presence of neurosteroids [9,10].

Cortical electrodes were implanted in halothane anesthetized rats above the frontal and occipital cortices, using a frontal sinus site as reference. Infusion cannulae (0.5 mm diameter, 10 mm length) were stereotaxically placed on the somatomotor cortical region (AP = -2 mm from bregma; 2 mm lateral to the midline, and 1.5 mm depth, from the bone), as described in previous studies [2]. All injections were performed unilaterally, with a programmable pump (Harvard) at a rate of 3  $\mu$ l/h for a minimum of 120 min.

Recordings began 1 week after surgery when an initial control EEG (0.1-300 Hz) was performed. Rats showing abnormalities in the EEG (e.g. focal spiking or slowing) were discarded from the study. For the remaining animals, the EEG was analyzed before, during GABA infusion, and up to 15 days after induction of GWS.

At the end of the experiment, rats were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardially for future histological evaluation. Brain sections were stained with Cresyl Violet or prepared for glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunocytochemistry.

The statistical analysis employed non-parametric calculations (Mann-Whitney U- and Kruskal-Wallis tests). The significance levels were established at the  $P \leq 0.05$  level.

Groups of animals were divided according to the content of the infused solution as follows. Infusions lasted for 120 min unless otherwise specified. There was no discontinuity between successive infusions. (1) Vehicle: saline ( $n = 4$ ) or molucsol ( $n = 6$ ); (2) allopregnanolone (3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P) alone  $10^{-4}$  M ( $n = 6$ ); (3) GABA alone 0.5 M ( $n = 5$ ); (4) GABA and allopregnanolone together  $10^{-8}$  M ( $n = 12$ ); (5) GABA followed by allopregnanolone for 180 min ( $n = 7$ ); (6) allopregnanolone followed by GABA ( $n = 11$ ).

Intracortical infusion of vehicle or allopregnanolone alone showed no behavioral or EEG effects, either during or after infusion. The EEG characteristics of the GWS induced by infusion of GABA alone, or in combination

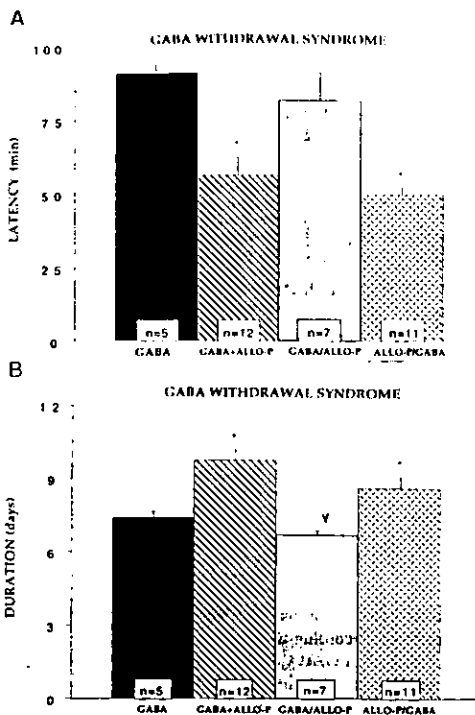


Fig. 1. Bars indicate the latency (min) and duration (days) of GWS induced in rats treated with GABA and with GABA and allopregnanolone (ALLO-P). Note the decrease in latency and the lengthening of the duration of the syndrome in those groups in which the steroid was delivered with GABA (GABA + ALLO-P) or following GABA (GABA/ALLO-P). \* $P \leq 0.05$ , Mann-Whitney U-test.

with allopregnanolone, were qualitatively similar to those previously reported [3]: high-amplitude spikes (200-700  $\mu$ V), with increasing frequency during the first hours, spontaneously fading after several days (Fig. 1).

The simultaneous infusion of GABA and allopregnanolone, or the infusion of GABA prior to allopregnanolone administration, significantly prolonged the duration of GWS. Moreover, the latency for initiation of the characteristic epileptogenic activity of GWS was shorter compared to the latency observed following the infusion of GABA alone (Fig. 2). No potentiation was observed when allopregnanolone was infused prior to GABA administration (Fig. 2). On average, latencies decreased by 30% and GWS duration increased by 40%.

Histological analyses revealed gliotic changes around the infusion site, with neuroglial depopulation in the vicinity of the location of the cannula. As previously reported [2,3] in rats presenting GWS, thalamic GFAP immunoreactivity was observed.

The experiments presented here indicate that, in the presence of GABA, allopregnanolone administration po-

tentiates the epileptogenic effects of GABA withdrawal. Thus, either when allopregnanolone was simultaneously infused with GABA, or following GABA infusion, an enhancement of the otherwise 'classic' GWS was recorded as a decrease in the latency at which paroxysmal activity first appeared and as a prolongation of the duration of the abnormal epileptic discharge.

The neurosteroid agonist, given alone, had no detectable behavioral or EEG consequences. However, the possibility of a withdrawal syndrome to steroids cannot be completely ruled out. There are reports of a progesterone withdrawal syndrome in rats [7] and it is possible that the premenstrual syndrome might be a form of neurosteroid/GABA withdrawal.

The neuronal hyperexcitability characteristic of the GWS may be related to a rapid and reversible GABA<sub>A</sub> receptor desensitization with decreased chloride conductance, as observed *in vitro* in the presence of GABA [16]. Accordingly, it has been shown that neurons located in the vicinity of the GABA infusion site become tolerant to the effects of isoguvacine, a pure GABA<sub>A</sub> agonist [15]. It is possible that 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P could facilitate processes leading to the desensitization of GABA<sub>A</sub> receptors.

The interaction between GABA and neurosteroids has been well demonstrated. The average time the GABA receptor channel remains open is increased in the presence of pregnanolone (3 $\alpha$ -5 $\beta$ -pregnan-20-one) and a positive allosteric modulation of GABA binding has been revealed with biochemical studies [9]. Consistent with our results, *in vitro* studies have shown that the sequence of exposure to neurosteroids is the determinant for the neurosteroid-dependent increase in GABA-induced chloride conductance [17]. Neurosteroids appear to modify GABA binding by allowing the ionic channel to open faster and remain opened for a longer time. This effect could be related to the 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P-induced decrease in GWS latency reported here. It could be proposed that the GABA<sub>A</sub> receptor desensitization observed following prolonged infusion of GABA is potentiated in the presence of 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ P (groups 4 and 6).

The enhanced duration of GWS observed in the presence of allopregnanolone (over 8 days) might be related to genomic events translated as changes in receptor protein stability (half-life) and/or assembly (changes in subunit composition), modifications in neuronal and glial transporters, or interactions with G-proteins [10,12].

The neuronal hyperexcitability characteristic of the GWS might also be modulated by the indirect influence of other neurotransmitters. For example, it has been shown that the non-competitive NMDA glutamate receptor antagonist phencyclidine [1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine] injected 30-60 min before the discontinuation of GABA infusion, prevented the development of GWS [14]. However, in our hands, the simultaneous infusion of GABA and allopregnanolone in the presence of a more selective antagonist of the NMDA receptor subtype, di-

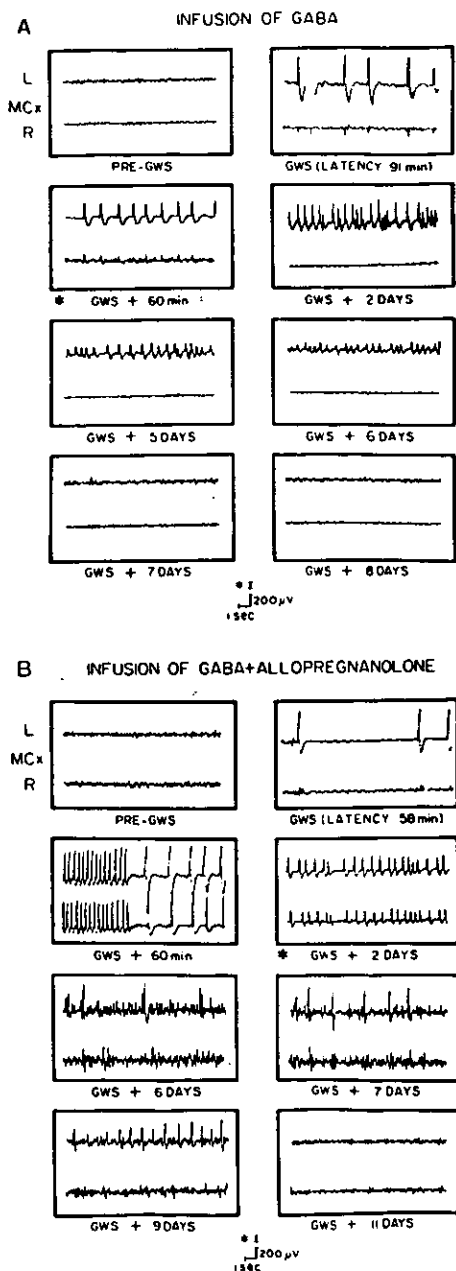


Fig. 2. Representative EEG recordings from rats in which a GWS was induced either with GABA alone (left-hand tracing) or combined with allopregnanolone. Note the decrease in latency and the lengthening of the syndrome in the rat in which the steroid was delivered combined with GABA. Mcx, motor cortex; L, left; R, right.

benzocycloheptenimine (MK801, 0.5 and 5 mg/kg, i.p.) produced a GWS with a latency and duration not significantly different to the GWS produced by the simultaneous infusion of GABA and allopregnanolone alone (unpublished observations). The possibility that other neurotransmitters besides glutamate might indirectly participate in the induction and/or maintenance of GWS cannot be eliminated, nor can the possibility that NMDA glutamate receptors might participate in the induction of the GWS following infusion of GABA alone. The magnitude of the potentiating effects of the neurosteroid might have been enough to overcome any indirect influence of increased NMDA receptor stimulation. Therefore, although the influence of glutamate on GWS remains a possibility, our results indicate a predominant GABAergic influence on the induction of GWS.

GABA receptor desensitization, interaction of neurosteroids with other neurotransmitters, and/or a modification of GABA synthesis such as the observed decrease in glutamate decarboxylase activity following chronic GABA infusion [13] may contribute to the apparent effect of  $3\alpha$ - $5\alpha$ P in decreasing GABAergic activity.

In conclusion, we identified a positive modulatory effect of a neurosteroid, allopregnanolone, in a GABA-dependent model of partial epilepsy. Steroids might participate in other withdrawal syndromes related to GABA (barbiturates, benzodiazepines, ethanol) or to cyclic excitability changes observed in epileptic and pregnant women.

We thank R.W. Olsen for critical reading of the manuscript. Supported in part by grants from DGAPA-UNAM and from CONACYT, Mexico.

- [1] Araneda, S., Silva-Barrat, C., Menini, C. and Naquet, R., High expression of noradrenaline, choline acetyltransferase and glial fibrillary acidic protein in the epileptic focus consecutive to GABA withdrawal. An immunocytochemical study, *Brain Res.*, 655 (1994) 135-146.
- [2] Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C. and Naquet, R., The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis, *Brain Res.*, 442 (1988) 175-179.
- [3] Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C. and Naquet, R., Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats, *Epilepsia*, 31 (1990) 369-377.
- [4] Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. and Naquet, R., Epileptogenic gamma-aminobutyric acid withdrawal syndrome after chronic, intracerebral infusion in baboons, *Neurosci. Lett.*, 74 (1987) 75-80.
- [5] Brailowsky, S. and Montiel, T., Isoguvacine suppression induces long-lasting epileptogenic changes in the rat, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17 (1991) 174.
- [6] Cramer, J.A. and Mattson, R.H., Hormones and epilepsy. In E. Wyllie (Ed.), *The Treatment of Epilepsy*, Lea & Febiger, New York, 1993, pp. 686-691.
- [7] Gallo, M.A. and Smith, S.S., Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 46 (1993) 897-904.
- [8] Le Gal la Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C. and Naquet, R., Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures, *Exp. Neurol.*, 101 (1988) 411-417.
- [9] Macdonald, R.L. and Olsen, R.W., GABA-A receptor channels, *Annu. Rev. Neurosci.*, 17 (1994) 569-602.
- [10] Majewska, M.D., Neurosteroids - endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor - mechanism of action and physiological significance, *Prog. Neurobiol.*, 38 (1992) 379-395.
- [11] Mellon, S.H., Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78 (1994) 1003-1008.
- [12] Paul, S.M. and Purdy, R.H., Neuroactive steroids, *FASEB J.*, 6 (1992) 2311-2322.
- [13] Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, R. and Tapia, R., Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-aminobutyric acid, *Neurochem. Int.*, 24 (1994) 363-368.
- [14] Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J. and Naquet, R., Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat, *J Neurophysiol*, 67 (1992) 715-727.
- [15] Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, C. and Naquet, R., Tolerance to GABA<sub>A</sub> agonist may explain bursting properties of neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome, *Brain Res.*, 498 (1989) 289-298.
- [16] Woodward, R.M., Polenzani, L. and Miledi, R., Effects of steroids on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by poly(A)<sup>+</sup> RNA from mammalian brain and retina, *Mol. Pharmacol.*, 41 (1992) 89-103.
- [17] Zaman, S.H., Shingai, R., Harvey, R.J., Darlison, M.G. and Barnard, E.A., Effects of subunit types of the recombinant GABA<sub>A</sub> receptor on the response to a neurosteroid, *Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sect.*, 225 (1992) 321-330.

## Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro

E. Calixto, A.M. López-Colomé, C. Casasola, T. Montiel, J. Bargas\*,  
S. Brailowsky<sup>1</sup>

*Instituto de Fisiología Celular, UNAM, P.O. Box 70-253, Mexico City DF 04510, Mexico*

Received 6 May 1999; received in revised form 2 August 1999; accepted 24 August 1999

### Abstract

The sharp interruption of the intracortical instillation of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), generates an epileptic focus in mammals. Seizures elicited by GABA withdrawal last several days or weeks. The present work reports that GABA withdrawal-induced hyperexcitability can be produced in vitro: a sudden withdrawal of GABA (5 mM; 120 min) or benzodiazepine (60  $\mu$ M flunitrazepam) from the superfusion, induced a gradual increase in the amplitude of the evoked population spike (PS) recorded on neocortical slices. PS enhancement reached 150% above the control value 2.5 h after GABA withdrawal. GABA withdrawal-induced hyperexcitability was facilitated by progesterone. PS enhancement induced by GABA withdrawal was associated with an impairment of GABA transmission occurring before epileptiform discharges were fully established. Paired pulse inhibition and evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release appear decreased; suggesting that cortical hyperexcitability as a result of GABA withdrawal involves pre-synaptic changes. Specific muscimol binding decreased during GABA superfusion but recovered after GABA withdrawal. However, the sensitivity of the post-synaptic response to 3 $\alpha$ -OH-5 $\alpha$ -pregnan-20-one or allopregnanolone (alloP) was enhanced after GABA withdrawal, suggesting a functional change in the GABA<sub>A</sub> receptors. The changes described may be the cellular correlates of the withdrawal syndromes appearing after interruption of the administration of GABA<sub>A</sub> receptor agonists. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** GABA; GABA<sub>A</sub> receptor; Epilepsy; Neurosteroids; Withdrawal; Hyperexcitability

### 1. Introduction

The prolonged use of drugs that increase GABAergic activity, such as benzodiazepines,

barbiturates, and alcohol, produces tolerance and dependence. Their suppression produces withdrawal syndromes characterized by changes in sensation and perception as well as hallucinations and seizures (Ryan and Boise, 1984; Frances et al., 1987, 1988; Doble and Martin, 1996).

Moreover, the sharp interruption of a continuous cortical infusion of Gamma-aminobutyric acid (GABA) itself, is able to produce an epileptic

\* Corresponding author. Tel.: + 52-5-6225670; fax: + 52-5-6225607.

E-mail address: jargas@ifisiol.unam.mx (J. Bargas)

<sup>1</sup> Deceased May 28, 1998.

focus in the infusion site. Partial epileptic crisis can be produced in the somatosensory cortex of baboons and rats after GABA withdrawal *in vivo* (Brailowsky et al., 1987, 1988, 1990; Le Gal La Salle et al., 1988). The seizures induced in this way last several weeks after GABA withdrawal. In contrast to other epileptic models, these crises develop pharmacological resistance to antiepileptic agents, such as diazepam, valproate, phenytoin, and progabide, during the first hours of evolution (Brailowsky et al., 1987, 1988). There is evidence that the continuous presence of an elevated GABA concentration may produce down-regulation of the GABA<sub>A</sub> receptor in neurons (Tehrani and Barnes, 1988; Calkin and Barnes, 1994). However, the seizures produced by GABA withdrawal can only be stopped by intracortical reinfusion of GABA (Brailowsky et al., 1988), suggesting that some GABA<sub>A</sub> receptors remain functional or reappear after being down regulated. However, their operation might remain altered to explain hyperexcitability (Brailowsky et al., 1987). An altered GABA<sub>A</sub> receptor function is secondary to several epileptic models (Le Gal La Salle et al., 1988; Hu and Ticku, 1994a,b; Krnjevic', 1997; Olsen and Avoli, 1997; Speark et al., 1998). In addition, a tolerance to GABA (Silva-Barrat et al., 1989), a reduction in glutamic acid decarboxylase (GAD; the GABA synthesizing enzyme) activity (Salazar et al., 1994), and increased numbers of bursting neurons (Silva-Barrat et al., 1992) accompany the excitability changes induced by GABA withdrawal. There are also neurochemical and histological alterations such as increases in 2-deoxy-glucose uptake and production of glial fibrillar acidic protein (GFAP) (Brailowsky et al., 1987, 1988). However, since all these changes have been described after producing GABA withdrawal *in vivo*, they necessarily occur after the seizures are fully established. Thus, it is necessary to discriminate between the changes induced by GABA withdrawal, and those produced by seizures themselves (e.g. Hu and Ticku, 1994a,b; Olsen and Avoli, 1997; Speark et al., 1998). Therefore, it is necessary to describe, *in vitro*, the first changes produced by GABA withdrawal because, first, these changes occur before, but ultimately lead to seizures. Second, they may underlie the changes in

GABA transmission produced by the withdrawal of several other types of GABA<sub>A</sub> receptor agonists (Frances et al., 1987, 1988; Brailowsky and Montiel, 1991; Calixto et al., 1995; Doble and Martin, 1996; Pesold et al., 1997). Finally, if these changes were identified, they could be controlled before they lead to the epileptic crisis.

For these reasons, this work attempts to produce an *in vitro* correlate of the GABA withdrawal phenomenon. The effect of GABA withdrawal has been studied in the hippocampal slice. In this preparation, the sudden interruption of GABA superfusion generated population spikes (PS) potentiation, loss of GABAergic inhibitory activity, and polyspikes in the CA1 region (Garcia-Ugalde et al., 1992). As a logical continuation, the present experiments demonstrate that the hyperexcitability induced by GABA withdrawal *in vitro* can also be generated in the neocortex. Thus, the present report describes the time course of the GABA withdrawal-induced hyperexcitability in the cortical slice. In addition, pre- and post-synaptic changes associated with the initiation of GABA withdrawal-induced hyperexcitability are described. The time course of PS enhancement induced by GABA and flunitrazepam withdrawal were compared. It is shown that the withdrawal of both agonists is very similar. Since such enhancement of excitability precedes a fully established epileptiform discharge, its associated changes are probably the initial conditions leading to the seizures which accompany several withdrawal syndromes.

## 2. Methods

### 2.1. Recordings

The present experiments were performed on rat neocortical slices maintained *in vitro*. Briefly, Wistar rats (120–150 g) were deeply anaesthetized and decapitated. The brain was rapidly removed and placed in cold saline which contained (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-glucose (saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>; 300 mOsm/L, pH 7.4). Sagittal slices (350 μm thick) of the somatosensory cortex

were obtained in a vibratome and incubated in saline for 30 min at 25°C before recording. The slices were transferred to a submerged recording chamber and superfused with saline of the same composition (32–34°C; 1–2 ml/min).

PS were recorded from the superficial cortical layers (I/II) with glass micropipettes filled with a 0.9% NaCl solution and amplified with a standard AC amplifier (P5-Grass, Guiney, MA). The PS was displayed on an oscilloscope and digitized for storage and later analysis. A concentric bipolar electrode was used to stimulate the deep layers

of the cerebral cortex (V/VI) with single square pulses (40–70  $\mu$ s; 1–6 V) given at a frequency of 0.2 Hz. A stimulus strength which evoked PS amplitudes, about 40% of the maximum amplitude, was kept constant during the whole experiment (before, during GABA superfusion, and after GABA withdrawal). When GABA was not superfused, these stimulus conditions did not induce depression, potentiation, multiple spikes, or epileptiform discharges. In these control conditions, PS amplitude does not change significantly during a 4 h period (see Fig. 1). Both the presence

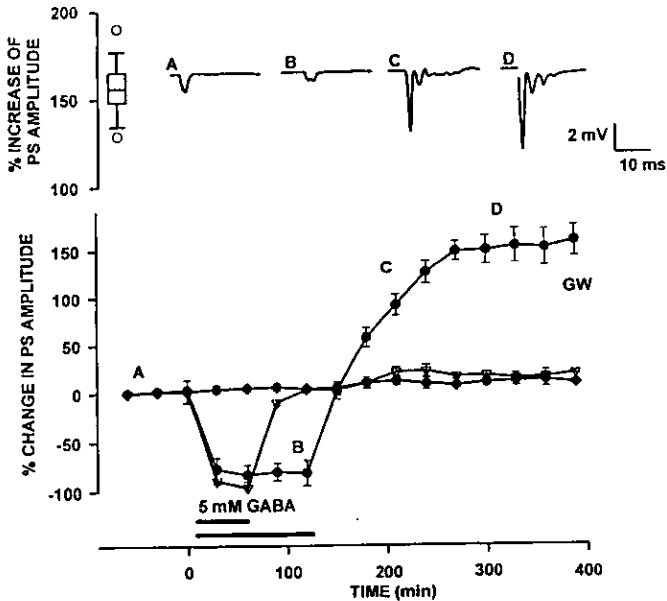


Fig. 1. Hyperexcitability induced by GABA withdrawal. Time course of several representative experiments was averaged. Stimulus strength was not changed during the experiments. In this and similar graphs, symbols represent the average % change in PS amplitude. Bars represent SEM. Horizontal bars at bottom indicate the time of GABA exposure in two sets of experiments: 60 and 120 min. Slices not exposed to GABA (filled diamonds;  $n = 7$ ) preserved the amplitude of the recorded PS for several hours ( $> 6$  h). Slices exposed to 5 mM GABA for 60 or 120 min showed a decrease in the amplitude of the recorded PS during GABA superfusion. A small transient PS enhancement, as compared to control slices (empty triangles;  $n = 7$ ), was detected after GABA withdrawal in slices superfused for 60 min. When GABA was withdrawn after 120 min of GABA superfusion (filled circles;  $n = 12$ ) the PS exhibited a gradual increase until a new stable value was reached 150 min after GABA withdrawal (GW). Representative traces recorded from one slice are shown on top; letters indicate the approximated times at which records were taken, corresponding to those in the time course plot. Box plot at top left summarizes the distribution from 12 experiments with GABA withdrawal-induced hyperexcitability (% change in PS amplitude 150 min after GABA withdrawal).



of  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  blocked the response; assessing the synaptic origin of the PS. Paired pulses at different time intervals, 20–300 ms, were used to test for recurrent inhibition. The ratio of the second over the first response ( $S_2/S_1$ ) was used to determine the degree of inhibition.

### 2.2. GABA withdrawal

After recording a stable PS amplitude for a control period of 30–60 min, brain slices were superfused (or incubated) for 60–120 min with saline containing 5 mM GABA (see Fig. 1). Superfusion with GABA severely reduced, but not abolished, PS amplitude. Thereafter, GABA was washed off from the bathing saline. Traces shown in the time course plots are representative of those sampled at 15 min periods.

### 2.3. GABA release

Brain slices processed as in Section 2.1 were used to measure evoked GABA release. Briefly, cortical slices were incubated in bathing saline containing [ $^3\text{H}$ ]-GABA (0.1 mM) for 10 min at 37°C. The slices were then washed several times with fresh saline, transferred to parallel 0.25 ml chambers and superfused at 0.5 ml/min. The release of [ $^3\text{H}$ ]-GABA (spec. act. 50 Ci/mmol) induced by a depolarizing stimulus (50 mM KCl) was quantified. Fractions were collected every minute. The parallel arrangement of the chambers allowed to simultaneously study the slices in the control conditions and after GABA withdrawal. Radioactivity in each fraction and in the solubilized tissue was measured in a liquid scintillation counter (Beckman) after the addition of 5 ml trititol (Fricke, 1975). [ $^3\text{H}$ ]-GABA release was expressed as percentage of total radioactivity incorporated by the tissue, released per min. Previous studies have shown that under these experimental conditions 80–95% of the released radioactivity is  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and identical to GABA (López-Colomé et al., 1978; Arias et al., 1990).

### 2.4. Membrane preparation

Brain slices were homogenized in Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7.4 and placed on ice for 15 min in order to allow complete osmotic disruption. The homogenate was centrifuged for 20 min at 45000  $\times g$  at 4°C. The resulting membrane pellet was washed three times with the same buffer, and kept at  $-70^\circ\text{C}$  until used for assays. All membranes were used between 48 h and 1 week after freezing. Previous to the assay, membranes were resuspended in the same buffer, incubated at 37°C for 30 min, and pelleted.

### 2.5. Binding assay

$^3\text{H}$ -Muscimol binding was performed as previously described (López-Colomé et al., 1990). The membrane pellet was resuspended in Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 to a protein concentration of 100  $\mu\text{g}$  per assay in a final volume of 175  $\mu\text{l}$ . Ten nanomoles of [ $^3\text{H}$ ]-muscimol was used, and incubation was carried out at 4°C for 60 min. Non-specific binding was defined in the presence of 5  $\mu\text{M}$  unlabeled muscimol or 1 mM GABA. All experiments were performed in triplicate. Reaction was stopped by centrifugation in a Beckman airfuge at 90000 rpm for 1 min; pellets were superficially rinsed twice with cold buffer and digested in 2% SDS overnight. Radioactivity was measured in a liquid scintillation counter, after the addition of 5 ml tritol (Fricke, 1975), corrections were made for quenching and counting efficiency. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951).

### 2.6. Drugs

GABA, [ $^3\text{H}$ ]-muscimol, muscimol, diazepam, 3 $\alpha$ -OH-5 $\alpha$ -pregnan-20-one or allopregnanolone (alloP), molecusol,  $\text{Cd}^{2+}\text{Cl}_2$ , and bicuculline were purchased from Sigma (St Louis, MO). AlloP was diluted in molecusol (10 mM  $\alpha$ -cyclodextrine) which was also present in the bathing media during the whole electrophysiological experiment.

## 2.7. Statistical analysis

Sample statistics are given as means  $\pm$  standard errors of PS enhancement, with respect to the control (%). Comparisons of PS amplitudes and [ $^3$ H]-GABA release were done with a non parametric test: Mann-Whitney's *U*-test. Box plots were used to show the whole distribution of PS enhancement after withdrawal (Tukey, 1977). Briefly, the box plot represents the distribution as a box with the median as a central line and the hinges as the edges of the box (the hinges divide the upper and lower halves of the distribution in half). The inner fences (shown as lines originating from the edges of the box) run to the limits of the distribution excluding outliers (defined as points that are more than 1.5 times the interquartile range beyond the inner fence); outliers are shown as circles.

## 3. Results

### 3.1. Effect of GABA withdrawal on cortical PS

Fig. 1 illustrates the time course of several representative experiments in which GABA withdrawal-induced hyperexcitability was produced. Suppression of GABA from the superfusion induced a gradual increase in the amplitude of the cortical PS (GW in Fig. 1; filled circles;  $n = 12$ ; GABA exposure time is indicated by longer horizontal bar at bottom). Multiple spikes may appear during PS enhancement (see sample records at Fig. 1 top; letters indicate the approximated sampling time on the time course plot). Such enhancement of excitability follows the inhibition produced by a 120 min exposure to GABA. One hundred and fifty minutes after GABA withdrawal, PS amplitude was significantly larger in those slices exposed to 5 mM GABA for 120 min, than in control slices (Fig. 1; filled diamonds;  $n = 7$ ), or those slices exposed to GABA for a briefer period (60 min; empty triangles;  $n = 7$ ; GABA exposure time is indicated by shorter horizontal bar at bottom). Mean percentage increase in PS amplitude was (mean  $\pm$  SEM.)  $157 \pm 16\%$  ( $n = 12$ ; box plot in Fig. 1 top left;  $P < 0.0001$ ;

Mann-Whitney's *U* test). This set of experiments demonstrates that neocortical hyperexcitability can be induced *in vitro* by GABA withdrawal in conditions of full receptor recovery from desensitization (Cash et al., 1997). Hyperexcitability was not observed following a 60 min exposure to 5 mM GABA (Fig. 1; empty triangles). Although 60 min of GABA exposure is enough time to attain receptor desensitization (Frosch et al., 1992). These data suggest that in order to produce a significant increase in excitability upon GABA withdrawal, high concentrations of GABA should be maintained for a prolonged period of time.

### 3.2. Benzodiazepine withdrawal also induces hyperexcitability *in vitro*

Time course plot in Fig. 2 shows that exposure to the benzodiazepine flunitrazepam (60  $\mu$ M FLUN; horizontal bar at bottom indicates exposure time) induced an enhancement of PS amplitude upon drug withdrawal (FW in Fig. 2; filled circles;  $n = 7$ ). PS amplitude decreases during flunitrazepam exposure. The hyperexcitability induced by flunitrazepam withdrawal is comparable to the effect seen after GABA withdrawal. An increase in PS amplitude of  $110 \pm 7\%$  above the control value (Fig. 2; filled triangles) was observed after 150 min of flunitrazepam withdrawal ( $P < 0.002$ ; Mann Whitney's *U* test;  $n = 7$ ). These experiments demonstrate that, upon their withdrawal *in vitro*, allosteric agonists of the GABA<sub>A</sub> receptor induce hyperexcitability similar to that induced by GABA withdrawal. However, note that pharmacological concentrations may be enough for some agonists to produce withdrawal-induced hyperexcitability.

### 3.3. Steroids facilitate withdrawal-induced hyperexcitability

At the concentrations tested, not all allosteric GABA<sub>A</sub> receptor agonists increased excitability upon their suppression. Neither 100  $\mu$ M midazolam for 120 min (not shown) nor 100  $\mu$ M progesterone for 120 min, induced a significant PS enhancement upon withdrawal (Fig. 3; empty squares). It is noteworthy, however, that superfu-

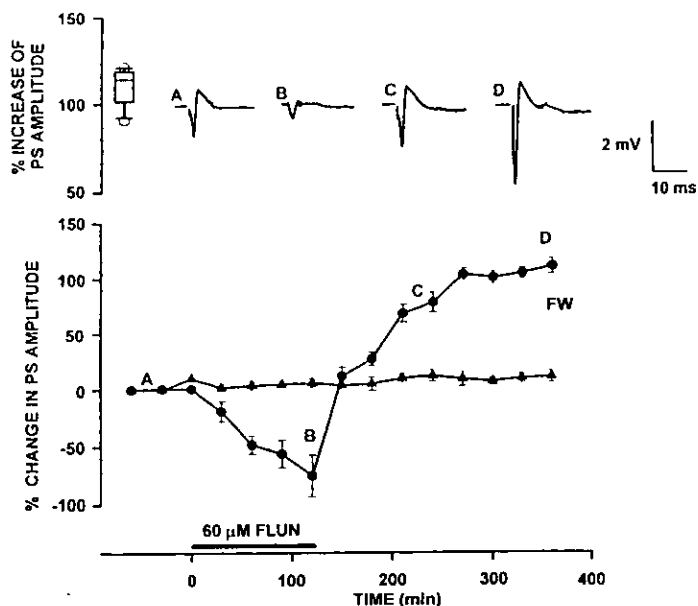


Fig. 2. Hyperexcitability induced by flunitrazepam withdrawal. Time course of several representative experiments with the benzodiazepine flunitrazepam ( $60 \mu\text{M}$ ) was averaged. Horizontal bar at bottom indicates time of flunitrazepam exposure (FLUN). Slices not exposed to flunitrazepam (filled triangles;  $n = 7$ ) preserved the amplitude of the recorded PS for several hours ( $> 6 \text{ h}$ ). Slices exposed to flunitrazepam (FW: filled circles;  $n = 7$ ) exhibited a gradual depression of PS amplitude during drug superfusion but drug withdrawal induced a PS enhancement. Traces from a representative experiment are depicted on top. Box plot summarizes distribution of PS enhancement from seven experiments.

sion with progesterone produced a marked reduction in PS amplitude ( $100 \mu\text{M}$  PROG: longer horizontal bar at bottom indicates exposure time). Since, as shown in Fig. 1, a 60 min exposure to 5 mM GABA is not enough to produce withdrawal-induced PS enhancement, we wanted to see if progesterone facilitates GABA withdrawal-induced hyperexcitability. Fig. 3 illustrates that a 60 min GABA exposure time becomes able to induce withdrawal-induced hyperexcitability when GABA is co-administered with  $100 \mu\text{M}$  progesterone (GW-P in Fig. 3; filled triangles; exposure time is indicated by the shorter horizontal bar at bottom). Mean PS enhancement after 150 min of GABA plus progesterone withdrawal was:  $149 \pm 8.6\%$  ( $P < 0.002$ ; Mann-Whitney's U test;  $n = 7$ ). Therefore, the enhancement of GABA binding

and function induced by progesterone, and described by several investigators (López-Colomé et al., 1990; Landren, 1991; Nguyen et al., 1995; Hauser et al., 1996; Lambert et al., 1996; Baulieu, 1997; Zhu and Vicini, 1997), seems equivalent to an increase in GABA exposure time.

#### 3.4. Impairment of inhibitory transmission during withdrawal-induced hyperexcitability

Impairment of recurrent inhibition is a common correlate of seizures. Since withdrawal-induced hyperexcitability is not yet a fully established epileptiform discharge (Traub and Jefferys, 1994), we wanted to see if an impairment of recurrent inhibition can be detected after GABA withdrawal. Recurrent inhibition was assessed

with a paired pulse protocol. Control records from a slice not exposed to GABA (Fig. 4A) show that the second PS is reduced, as compared to the first, at various time intervals. The inhibition of the second PS is larger with briefer interstimulus intervals (Fig. 4C; filled circles). This inhibition is as a result of GABAergic interneurons, is blocked by bicuculline and has been well characterized (e.g. Creager et al., 1980; Davies et al., 1990; Steffensen and Henriksen, 1991). One hundred and fifty minutes after GABA withdrawal, a paired pulse protocol no longer produces inhibition of the second response (Fig. 4B;  $n = 12$ ). Paired pulse facilitation replaces inhibition at brief interstimulus intervals (Fig. 4C; filled squares); as it happens after GABA<sub>A</sub> blockade (e.g. Higgins and Stone, 1993). It is then concluded that, as in the hippocampus (Garcia-

Ugalde et al., 1992), GABA withdrawal induces an early failure of GABA transmission in the neocortex. These *in vitro* experiments suggest that this transmission failure may precede the establishment of the epileptic focus *in vivo*. Future experiments will indicate the time course for the development of this transmission failure and the participation of GABA<sub>A</sub> receptor desensitization or down regulation.

In order to establish a biochemical correlate of this transmission failure, evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release was measured in slices showing withdrawal-induced hyperexcitability. Fig. 5 shows that [<sup>3</sup>H]-GABA release evoked by high K<sup>+</sup> (50 mM) depolarization was significantly decreased after GABA withdrawal, as compared to controls. Evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release was decreased by  $68 \pm 18\%$  ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ; Mann-Whitney's U

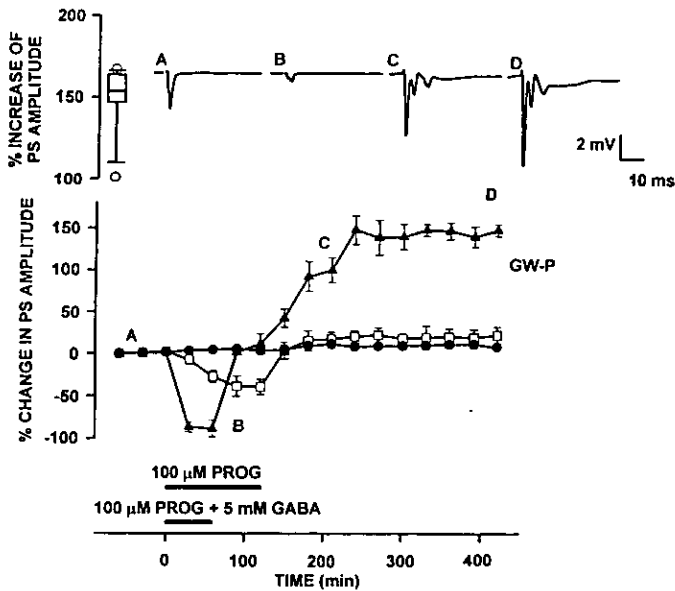


Fig. 3. Progesterone facilitates GABA withdrawal-induced hyperexcitability. One hundred and twenty minutes superfusion with 100  $\mu$ M progesterone depresses PS amplitude (empty squares), but hyperexcitability is not induced upon progesterone withdrawal. However, 100  $\mu$ M progesterone co-administered with 5 mM GABA, induce withdrawal hyperexcitability (GW-P: filled triangles) even if superfusion time is 60 min. Records on top are from a representative experiment. Box plot summarizes PS enhancement from seven experiments as compared with the control (filled circles).

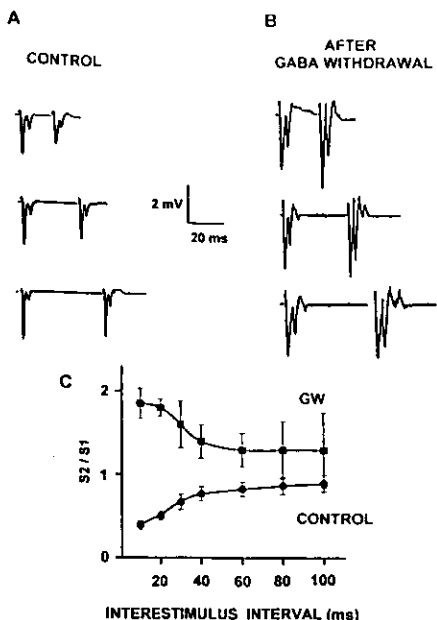


Fig. 4. Impairment of recurrent inhibition after GABA withdrawal. Recurrent inhibition was assessed with a paired pulse protocol. A. In control conditions, the second PS is reduced as compared to the first as time interval between the two stimuli is shortened. B. After GABA withdrawal, the second PS is no longer inhibited at brief interstimulus intervals and facilitation is obtained. C. Graph shows mean amplitude ratio between the second and first response (S2/S1) at different time intervals between stimuli. Control slice: filled circles. Slices after GABA withdrawal: filled squares.

test) in slices exposed to 5 mM GABA for 120 min. Results suggest the participation of presynaptic mechanisms in the observed failure in GABA transmission. These data are in agreement with a previous report showing a decrease in GAD activity during GABA withdrawal (Salazar et al., 1994).

Finally, GABA transmission may also fail because of modifications in the heteromeric composition of GABA<sub>A</sub> receptor caused by changes in gene expression induced by repeated seizures (Le Gal La Salle et al., 1988; Hu and Ticku, 1994a,b; Krnjević, 1997; Olsen and Avoli, 1997;

Speark et al., 1998). However, receptor changes may precede, and not be a consequence of the full induction of epileptiform discharges in the case of GABA withdrawal. To obtain evidence of a possible change of receptor composition induced by GABA withdrawal, specific binding on GABA<sub>A</sub> receptors was assessed in cortical slices with muscimol. Total specific muscimol binding is reduced in membranes obtained from slices exposed to 5 mM GABA, as compared to the control (Fig. 6). These results support previous evidence of down regulation of the GABA<sub>A</sub> receptor after prolonged GABA exposure (Tehrani and Barnes, 1988; Calkin and Barnes, 1994). However, at a time when GABA withdrawal-induced hyperexcitability is attained (150 min after GABA withdrawal), total specific muscimol binding has been recovered (Fig. 6) and is not significantly different to the control value. Therefore, number of GABA<sub>A</sub> receptors does not explain GABA withdrawal-induced hyperexcitability. Nevertheless, since GABA<sub>A</sub> receptors first decline and then recover (Fig. 6), it may be possible that the receptors measured after GABA withdrawal are not the same as those present before GABA exposure; even if their numbers are similar.

Modifications in the heteromeric structure of GABA<sub>A</sub> receptors may induce changes in the sensitivity of the GABA<sub>A</sub> receptors to allosteric ligands such as the neurosteroids (Puia et al., 1992; Lambert et al., 1996). Accordingly, inhibition of PS amplitude induced by alloP was tested before and after GABA withdrawal. Fig. 7 shows that 100 μM alloP reversibly induced a greater PS inhibition in those slices subject to GABA withdrawal (96 ± 3%) than in those subject to the control conditions (58 ± 14%) ( $P < 0.05$ ; Mann-Whitney's U test;  $n = 5$ ). The increased effect of alloP after GABA withdrawal reflects changes in the GABA<sub>A</sub> receptor, which precede the full induction of epileptiform discharges.

Nonetheless, the structural changes are subtle, since the effects of diazepam and GABA on the enhanced PS did not differ from the controls (Fig. 7).

## 4. Discussion

### 4.1. Withdrawal-induced hyperexcitability *in vitro*

The present results describe an experimental paradigm to produce GABA withdrawal-induced hyperexcitability in the cortical tissue *in vitro*. It is also shown that the hyperexcitability induced by GABA withdrawal is similar to that induced by the benzodiazepine flunitrazepam. Hence, the experiments described in this work open the possibility of studying, *in vitro*, some physiological features of the withdrawal phenomenon induced by several ligands of the GABA<sub>A</sub> receptor. Clinically, withdrawal syndromes may involve the induction of seizures. Therefore, the study of the development of the synaptic changes induced by GABA withdrawal could be relevant to the understanding and possible control of recurrent seizures during withdrawal syndromes.

The present experiments show that an enhanced PS response can be obtained for the same stimu-

lus in cortical slices when GABA<sub>A</sub> receptor agonists are withdrawn. A stable amplitude for the PS, 150% over control amplitude, is achieved 150 min after GABA withdrawal; the enhanced response is maintained during the rest of the experiment in control saline. This duration is particularly long and compares with cortical LTP (e.g. Wang et al., 1997; Monimoto et al., 1998). Therefore, this enhanced excitability may be the initial step leading to focal seizures observed after GABA withdrawal *in vivo*, where seizures may last 7–10 days after withdrawal (Brailowsky et al., 1987, 1988). This constitutes an epilepsy model on its own right. Nevertheless, several minutes of GABA superfusion at high concentrations are needed to generate withdrawal-induced hyperexcitability *in vitro*. The GABA concentration used (5 mM) can only be reached for brief periods of time in the reduced volume of the synaptic cleft (e.g., Meldrum, 1995; Krnjevic, 1997). Quickly after release, active uptake and metabolism reduce extracellular GABA concentration in physiologi-

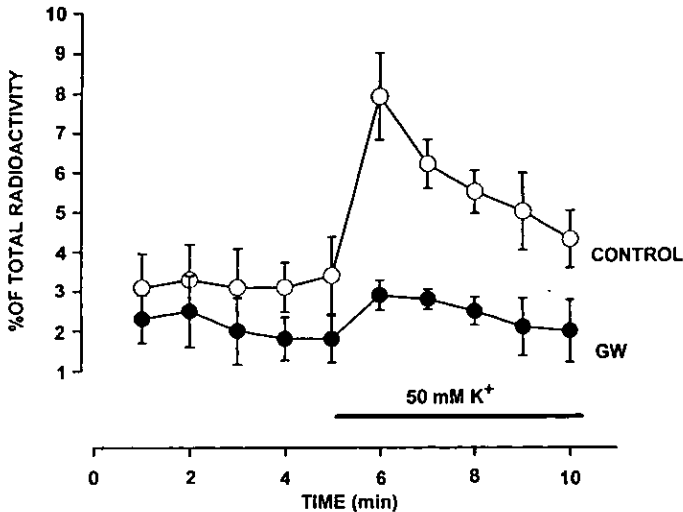


Fig. 5. Evoked GABA release is decreased after GABA withdrawal. The release of [<sup>3</sup>H]-GABA was evoked with a high K<sup>+</sup> saline in neocortical slices similar to those used for electrophysiology. Cortical slices were depolarized with saline containing 50 mM K<sup>+</sup>. Slices in the control condition: empty circles. Slices after GABA withdrawal: filled circles. Symbols are mean and bars are SEM of five experiments.

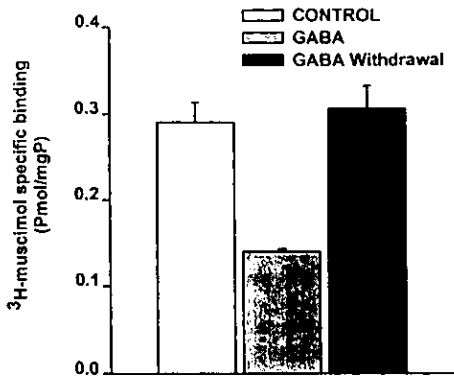


Fig. 6. Specific binding to GABA receptors during GABA exposure and GABA withdrawal. Specific <sup>3</sup>H-muscimol binding to membranes obtained from neocortical slices. Membranes were obtained before (control), during (GABA) and after 150 min exposure to 5 mM GABA (GABA Withdrawal). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three to five experiments performed in triplicate. Specific binding decreases during GABA superfusion and increases again during GABA withdrawal (150 min). Saturating doses of muscimol (10  $\mu$ M) were used in the three samples.

cal conditions (e.g. Olsen and Avoli, 1997). For this reason GABA withdrawal-induced hyperexcitability is not observed in normal GABA transmission. However, drugs designed to enhance GABAergic transmission are widely used in clinics, e.g. benzodiazepines and barbiturates. Therapeutically administered, GABA<sub>A</sub> receptor agonists reach receptors together with endogenous GABA. Chronic administration of these agonists might induce withdrawal syndromes upon drug suppression (Ryan and Boise, 1984; Frances et al., 1987, 1988; Doble and Martin, 1996). Accordingly, the present *in vitro* experiments show that excitability rebound can be produced following withdrawal of micromolar concentrations of flunitrazepam and also that progesterone facilitates GABA withdrawal-induced hyperexcitability even if GABA exposure time is briefer. In other words, the action of allosteric GABA<sub>A</sub> receptor agonists appears to mimic long exposures to high GABA concentrations. Therefore, GABA withdrawal-induced hyperexcitability as described here underlies

a general mechanism dependant on the complex function of the GABA<sub>A</sub> receptor molecule. If this was the case, the present experiments are a contribution towards the design of experimental *in vitro* paradigms to study withdrawal-induced hyperexcitability by any ligand.

Withdrawal phenomena have been described *in vivo* for various benzodiazepines (Frances et al., 1987, 1988; Hu and Ticku, 1994b; Nguyen et al., 1995; Wheling, 1997) and GABA<sub>A</sub> receptor agonists (Brailowsky and Montiel, 1991; Landren, 1991; Yu and Ticku, 1995a,b). It is known that crossed tolerance for the GABA<sub>A</sub> receptor is shared by many benzodiazepines (Doble and Martin, 1996). Furthermore, withdrawal-induced hyperexcitability is commonly associated with tolerance (Hu and Ticku, 1994b; Cash et al., 1997; Pesold, et al., 1997). The present findings thus open the possibility to more detailed molecular and pharmacological analyses to study the precise generation and maintenance mechanisms responsible for the withdrawal phenomena, such as: phosphorylation (Krishek, et al., 1994), modification in sub-unit composition with functional uncoupling and changes in mRNA expression (Tehrani and Barnes, 1988; Hu and Ticku, 1994a,b; Pesold et al., 1997), and down regulation of the GABA<sub>A</sub> receptor (Ryan and Boise, 1984; Calkin and Barnes, 1994). This knowledge may lead to the manipulation of the withdrawal phenomena and the design of new molecules.

#### 4.2. Changes associated with withdrawal induced hyperexcitability

If GABA withdrawal-induced hyperexcitability leads to focal seizures *in vivo*, the search for some signs of GABA transmission failure associated with PS enhancement is a logical pursuit. This work shows that, in fact, alterations in GABA transmission are found during and after withdrawal. However, changes associated with GABA withdrawal are not simple or unique. A decrease in paired pulse inhibition and evoked [<sup>3</sup>H]-GABA release suggest an impairment of transmission. In addition, a decrease in specific binding followed by a recovery in the number of sites, after withdrawal, suggest that the receptors may have

changed during the course of the experiment. In support of this last assumption, an increased sensitivity of the population spike to alloP suggests subtle alterations of the GABA<sub>A</sub> receptor composition. Surprisingly, the actions of GABA and diazepam on the enhanced PS did not differ from those present in the control condition. Therefore, hyperexcitability is not a result of a complete loss of function of the GABA<sub>A</sub> receptors as in bicuculline block. Consequently, a more detailed pharmacological analysis is needed in order to identify changes in affinity, and molecular composition, which might be masked by the concentrations used in the present work. However, it is worth noticing that all changes screened above were found before the appearance of fully developed epileptiform discharges (Traub and Jefferys, 1994) and thus, they cannot be attributed to seizures themselves. On the contrary, they can be seen as leading to seizure development. After withdrawal-induced seizures are fully developed, they become resistant to several antiepileptic

drugs (Brailowsky et al., 1987, 1988). Thus, withdrawal phenomena may involve complex mechanisms that deserve further analysis.

#### 4.3. Functional implication of the facilitation produced by the neurosteroids

The neurosteroids (NS) allosterically modulate the GABA<sub>A</sub> receptor (Nguyen et al., 1995; Baulieu 1997; Spindler, 1997; Wheling, 1997) by acting at a site different from that recognized by GABA. NS are known to potentiate the GABA-induced Cl<sup>-</sup> currents by increasing the binding of GABA and other agonists to the receptor (Kubli-Garfias, 1984; López-Colomé et al., 1990; Landren, 1991). NS exert anti-epileptic, anxiolytic, anesthetic, and hypnotic effects (Baulieu, 1997; Wheling, 1997) possibly by activating per se the GABA<sub>A</sub> receptor and/or modifying its modulation by G proteins (Schwartz et al., 1989; Ffrench-Mullen et al., 1994; Finn et al., 1995; Yu and Ticku, 1995a,b). NS have a high anticonvul-

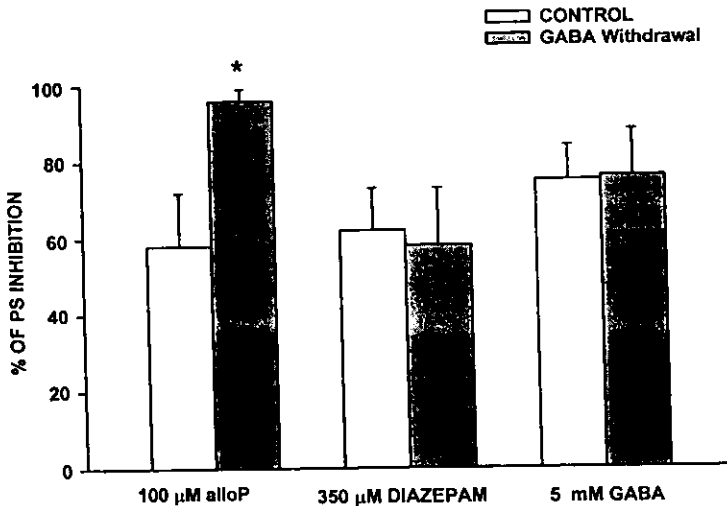


Fig. 7. Increased sensitivity to allopregnanolone after GABA withdrawal. Bars show percent inhibition of PS amplitude recorded on both control slices (empty bars) and in slices subject to GABA withdrawal (grey bars). GABA<sub>A</sub> receptor ligands tested were: alloP (100 μM), diazepam (350 μM) and GABA (5 mM). The response to alloP was significantly different to that of the control. Error bars represent SEM.



sant activity (Frye, 1995). Many physiological conditions, such as delivery and pregnancy, are characterized by sudden changes in steroid concentrations. Thus, the premenstrual syndrome is characterized by a chronic and gradual increase in intracerebral NS concentrations followed by their subsequent and sudden drop (Herkes et al., 1993; Baulieu, 1997; Spindler, 1997) that may lead to catamenial epilepsy (Bauer et al., 1998; Newmark and Penry, 1980; Herzog, 1991). Since it is shown here that NS facilitate GABA withdrawal-induced hyperexcitability after a sustained exposure exhibiting its usual inhibitory activity due to its positive modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor (Landren, 1991), a question arises about catamenial epilepsy being related to a 'withdrawal hyperexcitability' induced by progesterone, i.e. hyperexcitability related to a sharp withdrawal after sustained exposure (Moran and Smith, 1998). In fact, alloP administered *in vivo* has been shown to potentiate GABA withdrawal-induced seizures (Calixto et al., 1995). In relation to this, the present work also shows that NS inhibitory effects are increased after GABA withdrawal and changes in affinity for steroid binding have been reported under similar paradigms (Hauser et al., 1996; Lambert et al., 1996; Reddy and Kulkarni, 1997). This finding suggests that some NS derived molecules could be particularly helpful on the treatment of catamenial epilepsy and withdrawal syndromes.

## 5. Conclusions

Long lasting hyperexcitability in rat cerebral cortex slices can be induced by the exposure and subsequent withdrawal of GABA and flunitrazepam. The time course of this withdrawal-induced hyperexcitability is described. Steroids facilitate withdrawal induced hyperexcitability. The phenomenon involves pre- and post-synaptic alterations in GABA neurotransmission in the cerebral cortex. The experiments described may be important to design *in vitro* experimental paradigms to study physiological changes during withdrawal phenomena and syndromes.

## Acknowledgements

This work was partially supported by grants from DGAPA-UNAM (IN 203295 to EC and IN 201597 to JB and CONACyT-Mexico (40346-5-3297 to SB, 3286P-N to AMLC and 01158-N to JB). The authors would like to thank Edith Lopez for technical assistance.

## References

- Arias, C., Montiel, T., Tapia, R., 1990. Transmitter release in hippocampal slices from rats with limbic seizures produced by systemic administration of kainic acid. *Neurochem. Res.* 15, 641–645.
- Bauer, J., Burr, W., Elger, C.E., 1998. Seizure occurrence during ovulatory and anovulatory cycles in patients with temporal lobe epilepsy: a prospective study. *Eur. J. Neurol.* 5, 83–88.
- Baulieu, E., 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog. Horm. Res.* 52, 1–32.
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C., Naquet, R., 1987. Epileptogenic gamma-aminobutyric acid withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci. Lett.* 74, 75–80.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Naquet, R., 1988. The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.* 442, 175–179.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C., Naquet, R., 1990. Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 31, 369–377.
- Brailowsky, S., Montiel, T., 1991. Isoguvacine suppression induces long-lasting epileptogenic changes in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17, 174.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemini, C., Brailowsky, S., 1995. Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 195, 73–76.
- Calkin, P., Barnes, E., 1994.  $\gamma$ -Aminobutyric acid A (GABA<sub>A</sub>) agonist down-regulate GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 269, 1548–1553.
- Cash, D., Serfozo, P., Allan, A., 1997. Desensitization of a  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor in rat is increased by chronic treatment with chlordiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 704–711.
- Creager, R., Dunwiddie, T., Lynch, G., 1980. Paired pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the *in vitro* rat hippocampus. *J. Physiol.* 299, 409–424 London.

- Davies, C., Davies, S., Collinridge, G., 1990. Paired pulse depression on monosynaptic GABA mediated inhibitory postsynaptic response in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 424, 513–531 London.
- Doble, A., Martin, I., 1996. The GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: *Neuroscience Intelligence Unit*. Chapman and Hall, New York.
- French-Mullen, J., Danks, P., Spence, K., 1994. Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via pertussis toxin G-protein-coupled mechanism. *J. Neurosci.* 14, 1963–1977.
- Finn, D., Roberts, A., Crabbe, J., 1995. Neuroactive steroid sensitivity in withdrawal seizure-prone and resistant mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19, 410–415.
- Frances, D., Sasaki, S., Carlen, P., 1987. Benzodiazepine-induced epileptiform activity in vitro. *Brain Res.* 437, 237–244.
- Frances, D., Sasaki, S., Carlen, P., 1988. Hyperexcitability of hippocampal CA1 neurons in brain slices of rats chronically administered clonazepam. *J. Exp. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 737–744.
- Fricke, V., 1975. A new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal. Biochem.* 63, 555–558.
- Frosch, M., Lipton, S., Dichter, M., 1992. Desensitization of GABA-activated currents and channel in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 12, 3042–3053.
- Frye, C., 1995. The neurosteroid 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP has antiseizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy. *Brain Res.* 696, 113–120.
- García-Ugalde, G., Galarraga, E., Bargas, J., Brailowsky, S., 1992. Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci. Lett.* 147, 229–232.
- Hausser, C., Weizel, C., Rupprecht, R., Holsboer, F., 1996. Allopregnanolone acts as an inhibitory modulator on  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 6 containing GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 219, 531–536.
- Herkes, G.K., Eadie, M.J., Sharbrough, F., Moyer, T., 1993. Patterns of seizure occurrence in catamenial epilepsy. *Epilepsy Res.* 15, 47–52.
- Herzog, A.G., 1991. Reproductive endocrine considerations and hormonal therapy for women with epilepsy. *Epilepsia* 32, S27–S33.
- Higgins, M., Stone, T., 1993. Bicuculline-resistant paired pulse inhibition in the rat hippocampal slice. *Br. J. Pharmacol.* 109, 1164–1168.
- Hu, X., Ticku, M., 1994a. Chronic benzodiazepine agonist treatment produces functional uncoupling of the GABA/benzodiazepine receptor ionophore complex in cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 45, 618–625.
- Hu, X., Ticku, M., 1994b. Chronic flurazepam treatment produces decreased efficacy of the benzodiazepine ligands and pentobarbital with  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 385–391.
- Krishek, B., Xie, X., Blackstore, E., 1994. Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by protein Kinase C phosphorylation. *Neuron* 12, 1081–1095.
- Krnjević, K., 1997. Role of GABA in the cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 439–451.
- Kubli-Garfias, C., 1984. Physiological role of 5 $\alpha$  and 5 $\beta$ -progesterone metabolites on the CNS. *THS* 5, 439–444.
- Lambert, J., Belelli, D., Hill-Vermin, C., Callaghan, H., Peters, A., 1996. Neurosteroid modulation of native and recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 155–174.
- Landren, S.O., 1991. Pregnenolone (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one), a progesterone metabolite, facilitates inhibition of synaptic transmission in the Schaffer collateral pathway of the guinea pig hippocampus in vitro. *Epilepsy Res.* 10, 156–165.
- Le Gal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R., 1988. Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp. Neurol.* 101, 411–417.
- López-Colomé, A., McCarthy, M., Beyer, C., 1990. Enhancement of [<sup>3</sup>H]muscimol binding to brain synaptic membranes by progesterone and related pregnanes. *Eur. J. Pharmacol.* 176, 297–303.
- López-Colomé, A., Tapia, R., Salceda, R., Pasantes-Morales, H., 1978. K<sup>+</sup>-stimulated release of labeled  $\gamma$ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat cerebral nervous system. *Neuroscience* 3, 1069–1074.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Meldrum, B., 1995. Neurotransmission in Epilepsy. *Epilepsia Suppl.* 36, S30–S35.
- Monimoto, K., Sato, K., Sato, S., Yamada, N., Hayabara, T., 1998. Time dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long term potentiation in rats. *Brain Res. Bull.* 45, 599–605.
- Moran, M.H., Smith, S.S., 1998. Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res.* 807, 84–90.
- Newmark, M.E., Penry, J.K., 1980. Catamenial epilepsy: a review. *Epilepsia* 21, 281–300.
- Nguyen, Q., Sapp, D., Van Ness, P., Olsen, R., 1995. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor binding in human brain by neuroactive steroids: species and brain regional differences. *Synapse* 19, 77–87.
- Olsen, R., Avoli, M., 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38, 399–407.
- Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P., Costa, E., 1992. Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 47, 103–110.
- Pesold, C., Caruncho, H., Impagnatiello, F., Berg, M., Fritschy, J., Guidotti, A., Costa, E., 1997. Tolerance to diazepam and changes in GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci.* 79, 477–487.
- Reddy, D., Kulkarni, S., 1997. Neurosteroid coadministration prevents development of tolerance and augments recovery from benzodiazepine withdrawal anxiety and hyperactivity. *Exp. Clin. Pharmacol.* 19, 395–405.

- Ryan, G., Boise, N., 1984. Benzodiazepine tolerance, physical dependence and withdrawal: electrophysiological study of spinal reflex function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231, 464–471.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., Tapia, R., 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Neurochem. Int.* 24, 363–368.
- Schwartz, J., Elikplimi, A., Mealing, G., Tsang, B., Rousseau, E., Whitfield, J., Payet, M., 1989. T- and L-calcium channels in steroid-producing chicken granulosa cell in primary culture. *Endocrinology* 125, 1973–1982.
- Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J., Naquet, R., 1992. Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat. *J. Neurophysiol.* 67, 715–727.
- Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R., 1989. Tolerance to GABA<sub>A</sub> agonist may explain bursting properties of neocortical neurons during GABA withdrawal syndrome. *Brain Res.* 498, 289–298.
- Spindler, K., 1997. Interaction between steroid hormones and the nervous system. *Neurotoxicology* 18, 745–754.
- Speak, G., Scharzer, C., Tsunashian, R., Kandlofer, S., 1998. Expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the hippocampus of the rat after kanine acid-induced seizures. *Epilepsy Res.* 32, 129–139.
- Steffensen, S., Henriksen, S., 1991. Effects of baclofen and bicuculline on inhibition in the fascia dentata and hippocampus region superior. *Brain Res.* 538, 46–53.
- Tehrani, J.M.H., Barnes, E., 1988. GABA down-regulation the GABA/benzodiazepine receptor complex in developing cerebral neurons. *Neurosci. Lett.* 87, 288–292.
- Traub, R.D., Jefferys, J.G.R., 1994. Are there unifying principles underlying the generation of epileptic after discharges in vitro? *Prog. Brain Res.* 102, 383–394.
- Tukey, J.W., 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, Menlo Park, CA.
- Wang, J., Ko, G., Kelly, P., 1997. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J. Clin. Neurophysiol.* 14, 264–293.
- Wheling, M., 1997. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Ann. Rev. Physiology.* 59, 365–393.
- Yu, R., Ticku, M., 1995a. Chronic neurosteroid treatment decrease the efficacy of benzodiazepine ligands and neurosteroids at the gamma aminobutyric acid A receptor complex in mammalian cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 784–789.
- Yu, R., Ticku, M., 1995b. Effects of chronic pentobarbital treatment on the GABA<sub>A</sub> receptor complex in mammalian cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1442–1446.
- Zhu, W., Vicini, S., 1997. Neurosteroids prolongs GABA<sub>A</sub> channel deactivation by altering kinetics of desensitized states. *J. Neurosci.* 17, 4022–4031.

## Long-Lasting Effects of GABA Infusion into the Cerebral Cortex of the Rat

Teresa Montiel,<sup>†</sup> Daniel Almeida, Iván Arango, Eduardo Calixto, César Casasola and Simón Brailowsky

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), México*

### SUMMARY

In electrophysiological terms, experimental models of durable information storage in the brain include long-term potentiation (LTP), long-term depression, and kindling. Protein synthesis correlates with these enduring processes. We propose a fourth example of long-lasting information storage in the brain, which we call the GABA-withdrawal syndrome (GWS). In rats, withdrawal of a chronic intracortical infusion of GABA, a ubiquitous inhibitory neurotransmitter, induced epileptogenesis at the infusion site. This overt GWS lasted for days. Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, prevented the appearance of GWS *in vivo*. Hippocampal and neocortical slices showed a similar post-GABA hyperexcitability *in vitro* and an enhanced susceptibility to LTP induction. One to four months after the epileptic behavior disappeared, systemic administration of a subconvulsant dose of pentylenetetrazol produced the reappearance of paroxysmal activity. The long-lasting effects of tonic GABA<sub>A</sub> receptor stimulation may be involved in long-term information storage processes at the cortical level, whereas the cessation of GABA<sub>A</sub> receptor stimulation may be involved

in chronic pathological conditions, such as epilepsy. Furthermore, we propose that GWS may represent a common key factor in the addiction to GABAergic agents (for example, barbiturates, benzodiazepines, and ethanol). GWS represents a novel form of neuro-glial plasticity. The mechanisms of this phenomenon remain to be understood.

### KEYWORDS

Focal epilepsy, GABA-withdrawal syndrome, GWS, memory, motor cortex, GFAP, plasticity

### INTRODUCTION

Over the past few years, we have been involved in studies addressing GABA-mediated inhibition in several different models of epilepsy. In photo-sensitive baboons and in kindled rats, we have demonstrated that intracortically applied GABA has powerful anticonvulsant effects (Fukuda, 1987; Brailowsky, 1989). In all cases, we observed that cessation of GABA infusion was associated with the appearance of epileptogenic activity at the site of the GABA infusion (Brailowsky, 1987). Phenomenologically, we named this event the "GABA-withdrawal syndrome (GWS)".

Although originally described in the baboon, GWS was also induced in the rat somatomotor cortex (Brailowsky, 1988), hippocampus, and amygdala (Le Gal la Salle, 1988). We also showed, using a 100

<sup>†</sup>Corresponding author:

Apdo. Postal 70-253, México 04510 D.F., MEXICO  
tel: +(525) 622-5761; fax: +(525) 622-5607  
e-mail: tmontiel@fisiol.unam.mx

$\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{h}$  dose, an inverse relation between GABA infusion time (from 6 h to 2 wk) and the latency and duration of epileptogenic activity (Brailowsky, 1988). With this procedure, a 3-h infusion of GABA was not effective in inducing GWS. We later found that hippocampal slices, perfused with GABA for 120 min, show an enhanced response to electrical stimulation and decreased paired-pulse during the washing period, GABA-mediated inhibition (Garcia-Ugalde, 1992).

Searching for neurotransmitter receptor specificity and for the minimum time of continuous GABA infusion that is required for inducing GWS, we produced a long-lasting GWS after a relatively short intracortical infusion of either GABA or GABA<sub>A</sub> agonist. The absence of an effect using antagonists of the excitatory neurotransmitter glutamate further suggests that the GWS phenomenon is mainly dependent, at least in the first stages, on changes in inhibitory mechanisms.

TABLE I

Occurrence of epileptogenic EEG activity<sup>1</sup> consecutive to intracortical microinfusion of various agents.

Drug	Dose	Infusion time (min) <sup>2</sup>	% GWS (n)	Latency (min)	Duration (days)
GABA	50 mM	120	76.9 (13)	35.2±3.4	2.2±0.4
	100 mM	120	100 (11)	39.9±6.5	3.3±0.5
	500 mM	120	100 (9)	95.4±10.2	7.0±0.4
	"	60	84.6 (13)	115.0±7.1	3.27±0.9
	"	30	58.3 (12)	99.7±11.8	7.0±2.0
	"	15	0 (8)	—	—
Aniso → GABA+Aniso.	75 mM →+ 0.5 M	60 → 120	0 (4)	—	—
Aniso + GABA	75 mM+ 0.5 M	120	0 (4)	—	—
Isoguvacine	61 mM	120*	100 (7)	127.8±39.9	11.42±0.6
	"	15*	100 (2)	158.5±	6.5±
	"	2*	100 (7)	232.5±13.3	5.0±0.6
THIP	10 mM	120*	100 (8)	98.6±7.7	1.5±0.5
	1 mM	120*	0 (5)	—	—
	100 $\mu\text{M}$	120	0 (2)	—	—
	10 mM	2*	0 (4)	—	—
	1 mM	2*	0 (4)	—	—
	100 $\mu\text{M}$	2	0 (2)	—	—
GABA → APH	0.5 M → 444 mM	120, 180	(5)	100±22.7	6.0±1.8
GABA → CNQX	0.5 M → 100 $\mu\text{M}$	120, 180	(8)	98.8±11.3	2.8±0.9
Glycine	0.5 M	7 days	0 (4)	—	—
		120	0 (4)	—	—

<sup>1</sup> percent of subjects

<sup>2</sup>All infusions, except the acute (0.4  $\mu\text{L}$  in 2 min) infusion, were performed at a rate of 3  $\mu\text{L}/\text{h}$ . Latency (in min) and duration (in days) of GWS are indicated (mean±s.e.m.). Aniso = anisomycin; The antibiotic was given either before and/or with GABA. \* = doses that induced EEG slowing during drug infusion. Other abbreviations are given in the text.

## EXPERIMENTAL METHODS

Experiments were performed in male Wistar rats (200 to 250g), prepared for chronic recording and intracortical infusion (Brailowsky, 1988). One week after surgery, saline or pharmacological agents (listed in Table 1) were unilaterally applied into the cortex for various periods of time. In separate groups of animals, immediately after GABA or saline disconnection, the respective NMDA and AMPA/quisqualate receptor antagonists, 444 mM APH (aminophosphonoheptanoate) and 100  $\mu$ M CNQX (6-cyano-7-nitrovinoxaline-2,3-dione), were administered locally at 1  $\mu$ L/h for 180 min. All drug and saline solutions contained 0.2 mg/mL of direct blue to

mark the infusion site and the diffusion area. The rats were sacrificed either 10 d after the electrical signs of GWS had disappeared or 30 to 120 d after overt GWS had disappeared, but with the administration of PTZ or its vehicle (saline) before the sacrifice (see below). The brains were processed for Nissl staining and for glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry (Hsu, 1981).

## RESULTS

In all animals in which GABA was successfully infused, except those of the 15-min infusion group, GWS was observed (Table 1). The GABA<sub>A</sub> agonists

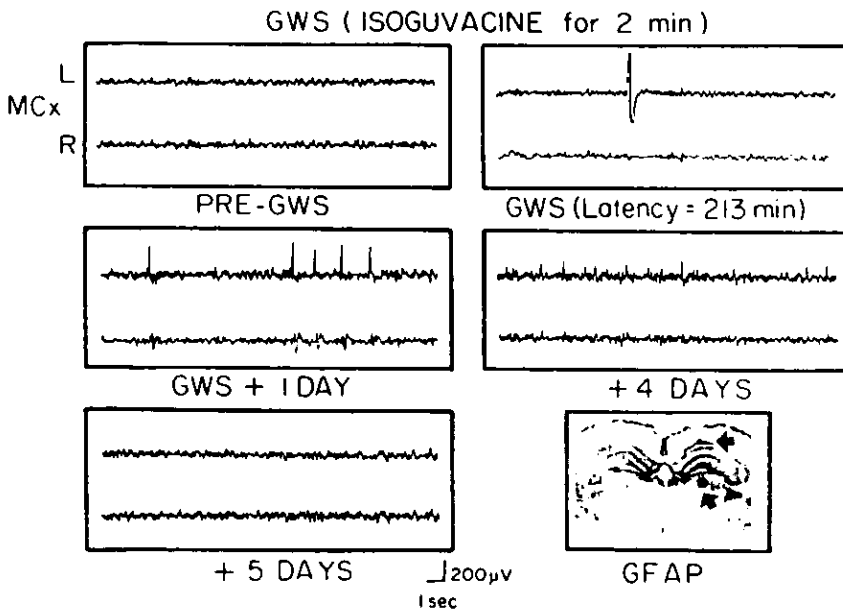


Fig. 1: An example of a GWS-like syndrome induced by acute, intracortically administered isoguvacine, a specific GABA<sub>A</sub> agonist, into the left somatomotor cortex. The latency for the appearance of the first epileptic spike was 213 min after injection. Insert: Micrograph of a coronal section of the rat brain processed for glial-fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity. Note the astrocytic reaction in the GABA-infused side, both at the cortical site and in ipsilateral thalamic structures (arrows).

used, isoguvacine and THIP, induced GWS with electrographic features similar to those induced by GABA (Table 1). It is noteworthy that acute micro-injections of isoguvacine (2 min) were effective in inducing paroxysmal activity for 5 d or more (see Table 1 and Fig. 1).

Histological analysis showed an area of gliosis at the cortical infusion site and in the thalamic projection site, in particular on the upper portion of the ventrolateral (VL) and posterior groups, and in the reticular nucleus (Fig. 1). GWS induction was not prevented by either APH or CNQX, which when given alone, had no effect.

Intracortical administration of glycine produced neither a behavioral nor an EEG

abnormality in the 200-min follow-up period after drug infusion. Sixty to 120 days after the electrical signs of GWS disappeared, rats were injected systemically with a subconvulsant dose (20 to 25 mg/kg i.p.) of PTZ, a widely used epileptogenic agent (Dedeyn, 1992), or with the PTZ vehicle (saline). In 12 of 14 rats, PTZ induced the reappearance of localized, high-voltage paroxysmal activity at the GABA-infused site, similar to the previous GWS and lasting from 60 to 90 min (Fig. 2).

In search of a possible relation between the in vitro analog of GWS and in vitro long-term potentiation (LTP) (Bliss, 1993), we treated cortical slices with GABA, applying the same methods as

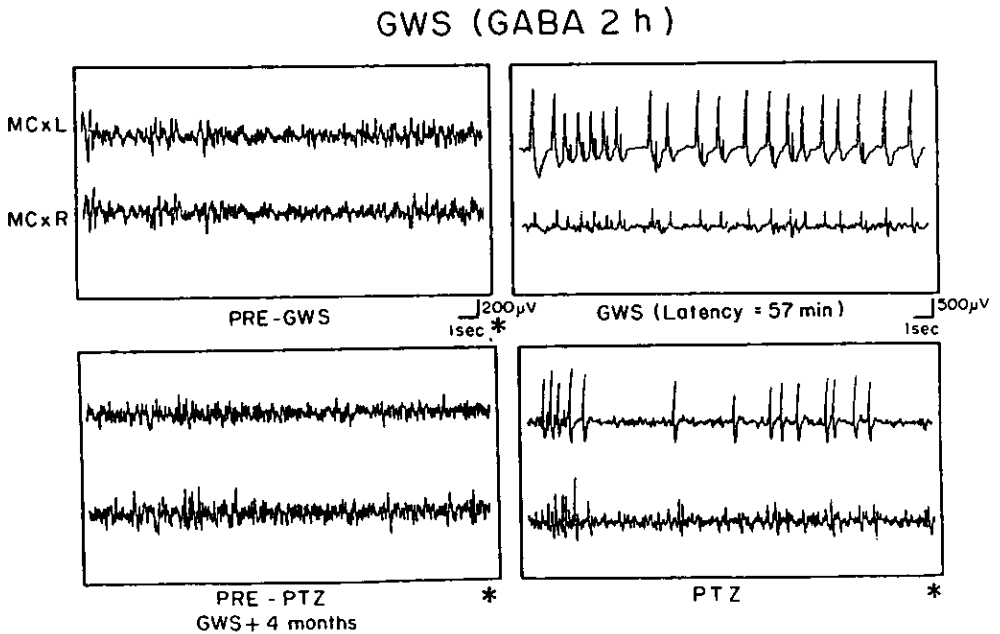


Fig. 2: An example of the electrographic changes typical of a GWS induced after 120 min of continuous intracortical GABA infusion. GABA was applied into the left somatomotor cortex (MCx). The effects of i.p. injection of pentylenetetrazol (20 mg/kg) 4 months after the disappearance of electrographic signs of GWS epileptogenesis are also shown. Note the reactivation at the cortical focus, with characteristics similar to those observed originally.

those used with hippocampal slices. We found that (a) cortical slices also show hyperexcitability after GABA incubation (Fig. 3), and (b) electrical stimulation that failed to produce LTP (40 Hz, 200

ms  $\times$  10, at 0.2 Hz) in control slices (n=3) elicited a further enhancement of the already facilitated response in GWS slices (n=4) and most notably, the appearance of additional components.

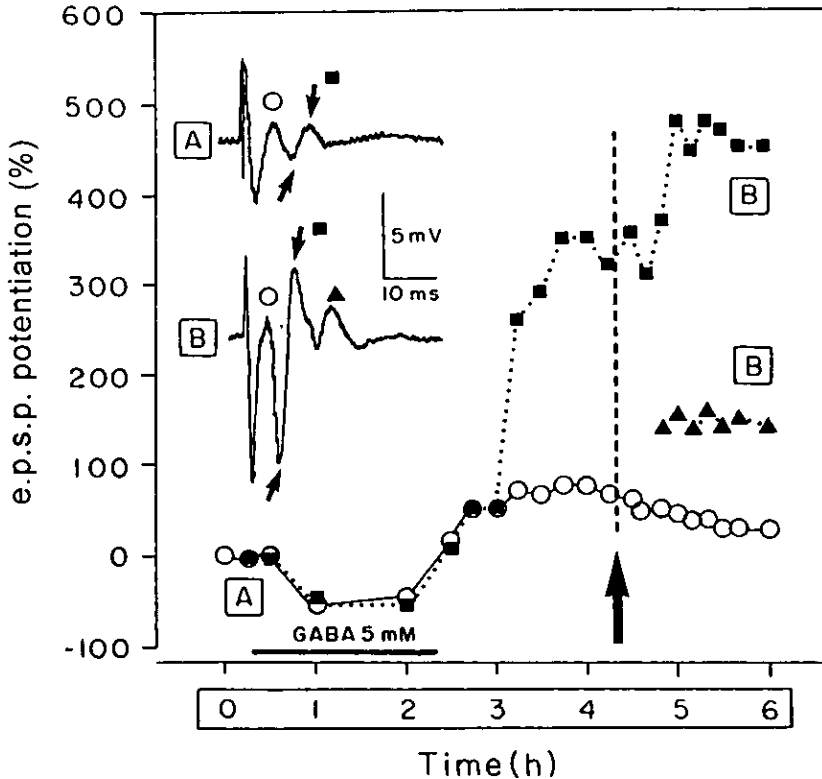


Fig. 3: *In vitro* induction of cortical GWS and the effects of electrical stimulation. Longitudinal brain slices (400  $\mu$ m), obtained from anesthetized young adult (150 g) Wistar rats, were incubated for 60 min in Ringer-Krebs solution and then for 120 min in 5 mM GABA, followed by a wash. The graph plots the slope of the rising phase of the various components (indicated by symbols) of the population evoked response (e.p.s.p.), recorded from the superficial layers (I-II) of the cortex in response to test stimuli applied to the deep (V-VI) cortical layers. Each point represents the average of 10 responses. The first response is shown in empty circles, the second component, indicated by arrows, is illustrated with filled squares, and in triangles, a late component that appeared after GWS induction and electrical stimulation (40 Hz for 200 ms  $\times$  10, at 0.2 Hz). (A) control response; (B) response after GWS induction and electrical stimulation. Note that GABA incubation produced an inhibition of the e.p.s.p. response, followed by a facilitation of about 350%. Electrical stimulation, applied at the arrow, produced a further enhancement of the response of about 100% and the appearance of an additional component (filled triangle) in the response. Calibration: 5 mV, 10 ms.



## DISCUSSION

Both the qualitative and quantitative features of the GWS found in this study are comparable to those previously observed (Brailowsky, 1988) in rats, in which a 6-h GABA infusion time was  $\mu\text{L/h}$ . It is thus possible that by increasing the infusion rate, we obtained a larger GABA diffusion and, therefore, a larger population of affected cells; alternatively, a saturation of GABA transport or turnover processes, or both may have occurred.

Among the GABA<sub>A</sub> agonists, the quantitative differences in GWS may be related to their pharmacokinetic profiles: isoguvacine remains longer in the extracellular space because it is not taken up, whereas THIP is known for its short duration of action (Krogsgaard-Larsen, 1994). This distinction may explain why an acute micro-injection of isoguvacine was as effective as a 30 min GABA infusion.

The specificity of the effects of GABA is supported by

- a) the lack of abnormalities observed after the cessation of glycine infusion;
- b) the effects of specific GABA<sub>A</sub> agonists (this study), and
- c) the potentiation of GWS produced by the neurosteroid allopregnanolone, an allosteric modulator of the GABA<sub>A</sub> receptor (Calixto, 1995).

The participation of GABA<sub>B</sub> receptors in the induction of GWS can be excluded because baclofen does not produce withdrawal signs (on the contrary, the drug itself induces paroxysmal activity). In addition, the specific GABA<sub>B</sub> antagonists, phaclofen and CGP 35348, do not modify GWS features (Brailowsky, 1995). In addition, GWS was not prevented by the glutamate receptor antagonists APH or CNQX.

In the current study, we also confirmed the histological changes previously reported by Brailowsky (1988), both at the infusion site and in ipsilateral thalamic areas, adding immunohistochemical evidence (GFAP staining) of

astrocytic participation in this reaction. The thalamic changes are similar to those reported with cortical epileptogenic foci that were induced with convulsant agents, such as bicuculline or penicillin, and shown to be excitotoxic in nature because they can be prevented by NMDA antagonists (Clifford, 1989). We propose that this event, gliosis, is but one manifestation of many important changes that are occurring in glial function. An explanation of these events will be critical to understanding the mechanisms involved in GWS.

Chronic GABA exposure may induce the creation of some form of "epileptic" GABA<sub>A</sub> receptor or an enhanced vulnerability to seizures, or both. For example, in Angelman syndrome, a clinical condition in which epileptic seizures are frequent, a deletion of genes encoding the GABA<sub>A</sub> receptor subunits, alpha-5, beta-3, and gamma-3, in chromosome 15q11-13, has been reported (McLean, 1995).

The GABA<sub>A</sub> receptor is a member of the superfamily of ionotropic receptors comprising several subunits, whose combination determines the particular pharmacology reported for diverse brain regions (Olsen, 1990; Macdonald, 1994). This property of allosteric modulation is relevant to widely used and clinically important drugs, such as the benzodiazepines, barbiturates, neurosteroids, and ethanol. After chronic administration, all these drugs, except the neurosteroids, can induce physical dependence and withdrawal signs. A common neurochemical mechanism involving GABA function has been suggested for such abstinence symptoms (Cowen, 1982). The premenstrual syndrome has been proposed to be a possible withdrawal syndrome to progesterone, a positive modulator of the GABA<sub>A</sub> receptor (Gallo, 1993). A progesterone metabolite, allopregnanolone, significantly potentiates GWS (Calixto, 1995). Despite the clinical differences in these withdrawal syndromes, an understanding of the pathophysiology of GWS may enable us to decipher the mechanisms responsible for sedative, anxiolytic, and hypnotic drug addiction, a

significant epidemiological problem in many countries. In fact, GWS may represent a common key factor in all such addictions.

A fascinating result of this study was the long-lasting (months) consequence of a relatively short exposure to GABA or to GABA<sub>A</sub> agonists (but not to glycine), protracted effects that could be unmasked by the systemic administration of PTZ (but not saline), even 4 months after the apparent disappearance of epileptogenic activity. If we consider such enduring epileptogenic activity as a synaptic expression that is analogous to memory (an "epileptogenic" experience), then a role for GABA in memory processes (conceived as cellular information storage) can be postulated.

A further suggestion for a relation between GWS and information storage derives from our results with anisomycin, an inhibitor of protein synthesis. A wide variety of experimental models, from snails to humans, have demonstrated that when administered from 1 h before and up to 7 h after a training or sensitization procedure, antibiotics like anisomycin induce amnesia to the task (Barzilai, 1989; O'Leary, 1995). Anisomycin blocks GWS induction and, interestingly, also interferes with drug dependence (Williams, 1994).

The GWS is a remarkable example of synaptic plasticity; its basic mechanism, neuronal and glial, may be analyzed from the rich perspectives offered by studies in epilepsy, drug dependence, and information storage.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the valuable comments of R. Galambos, T. Bullock, L.R. Squire, J.L. McGaugh, S.P.R. Rose, A. Tobin, R. Olsen, S. Young, M. Garcia-Munoz, R. Prado-Alcalá, G. Barrionuevo, M. Segal, and G.R. Siggins. This study was partially supported by grants from DGAPA-UNAM and CONACYT (México).

#### REFERENCES

- Barzilai A., Kennedy TE, Sweatt JD, Kandel ER. 5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 1989; 2: 1577-1586.
- Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
- Brailowsky S, Kunimoto M, Menini C, Silva-Barrat C, Riche D, Naquet R. The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res* 1988; 442: 175-179.
- Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Naquet R. Epileptogenic  $\gamma$ -aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic intracortical infusions in baboons. *Neurosci Lett* 1987; 74: 75-80.
- Brailowsky S, Montiel T, Meneses S, Discala G. Effects of GABA(B) receptor antagonists on two models of focal epileptogenesis. *Brain Res* 1995; 702: 126-132.
- Brailowsky S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D, Naquet R. Effects of localized chronic GABA infusions into different cortical areas of the photo-sensitive baboon *Papio papio*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1989; 72: 147-56.
- Calixto E, Montiel T, Lemini C, Brailowsky S. Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1995; 195: 73-76.
- Clifford DB, Zorumski CF, Olney JW. Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures. *Exp Neurol* 1989; 105: 272-279.
- Cowen PJ, Nutt DJ. Abstinence symptoms after withdrawal of tranquilizing drugs: is there a common neurochemical mechanism? *Lancet* 1982; 360-362.
- Dedeyn PP, Dhooze R, Marescau B, Pei YQ. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res* 1992; 12: 87-110.
- Fukuda H, Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Riche D, Naquet R. Anticonvulsant effect of intra-cortical chronic infusions of GABA in kindled rats; focal seizures upon withdrawal. *Exp Neurol* 1987; 98: 120-129.

- Gallo MA, Smith SS. Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 46: 897-904.
- Garcia-Ugalde G, Galarraga E, Bargas J, Brailowsky S. Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci Lett* 1992; 147: 229-232.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- Krogsgaard-Larsen P, Frølund B, Jørgensen FS, Schousboe A. GABA-A receptor agonists partial agonists and antagonists. Design and therapeutic prospects. *J Med Chem* 1994; 37: 2489-2505.
- Le Gal La Salle G, Brailowsky S, Menini C, Naquet R. Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp Neurol* 1988; 101: 411-417.
- Macdonald RL, Olsen RW. GABA(A) receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17: 569-602.
- McLean PJ, Farb DH, Russek SJ. Mapping of the alpha(4) subunit gene (GABRA4) to human chromosome 4 defines an (alpha2)-(alpha4)-(beta1)-(gamma1) gene cluster: Further evidence that modern GABA(A) receptor gene clusters are derived from an ancestral cluster. *Genomics* 1995; 26: 580-586.
- Olcary FA, Byrne JH, Cleary LJ. Long-term structural remodeling in *Aplysia* sensory neurons requires *de novo* protein synthesis during a critical time period. *J Neurosci* 1995; 15: 3519-3525.
- Olsen RW, Tobin AJ. Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB J* 1990; 4: 1469-1480.
- Williams MB, Jope RS. Protein synthesis inhibitors attenuate seizures induced in rats by lithium plus pilocarpine. *Exp Neurol* 1994; 12: 169-173.

## VII DISCUSION

En este último apartado de la Tesis se describirán las semejanzas del SAG *in vivo* y de la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA *in vitro*, además de resumir los posibles cambios que se suscitan en la neurotransmisión GABAérgica durante el fenómeno, finalmente argumentar las implicaciones fisiológicas de este trabajo.

### Comentarios generales a las publicaciones

El primer artículo del capítulo de resultados: "*Allopregnanolone potentiates a GABA-withdrawal syndrome in the rat cerebral cortex*", fue una de las primeras evidencias de la actividad de un neuroesteroide sobre un modelo de epilepsia. En este trabajo se identificó que una hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA se genera más rápido en presencia del neuroesteroide. Se disminuyó la latencia de aparición del foco epiléptico, aunado a un incremento en la duración de la hiperexcitabilidad. El efecto neuromodulador del neuroesteroide depende de la administración del neurotransmisor, ya que sin GABA no se observan descargas epilépticas. Esta facilitación sugiere que la hiperexcitabilidad producida por agonistas alostéricos puede facilitar el incremento de la excitabilidad cortical producida por el agonista endógeno. Por lo que ambos tipos de hiperexcitabilidad podrían compartir un sustrato común.

En el artículo "*Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro*", se demuestra que se puede producir hiperexcitabilidad cortical por privación de GABA *in vitro* y se caracteriza la preparación como un correlato de la hiperexcitabilidad producida *in vivo*. Las rebanadas de tejido cortical se incubaron en GABA (5 mM) a diferentes tiempos. La interrupción brusca de la superfusión con GABA o flunitrazepam y/o la asociación del GABA con un neuroesteroide, indujo la hiperexcitabilidad neuronal. Esta cursó con un incremento gradual en la amplitud de la espiga poblacional y la pérdida de la inhibición recurrente. Además, se corroboró en estas rebanadas una disminución del pegado específico de muscimol radioactivo durante la infusión con GABA, y una disminución en la liberación de GABA en las rebanadas hiperexcitables. Es posible que se modifique la expresión de algunos tipos de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> por la exposición del neurotransmisor, evento semejante a lo cuantificado por

benzodiazepinas y neuroesteroides, con ello, la sensibilidad farmacológica del receptor cambia, lo cual explica también, el incremento del efecto inhibitorio de la alopregnanolona. Estos datos sugieren componentes presinápticos (síntesis y captura) y postsinápticos (receptor GABA<sub>A</sub>) en la génesis y mantenimiento de la hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA.

Además de proporcionar una herramienta farmacológica para estudiar *in vitro* la hiperexcitabilidad producida por la privación aguda de GABA, se corroboró que los agonistas alostéricos como las benzodiazepinas o los neuroesteroides también son capaces de inducir o facilitar la hiperexcitabilidad por privación; subrayando, de nuevo, que el sustrato celular de estos fenómenos puede ser el mismo.

En el tercer artículo "*Long-lasting effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat*" se muestra que la privación aguda de GABA *in vitro*, incrementa la susceptibilidad del tejido para inducir la potenciación de largo plazo (LTP). Se brindan evidencias de que la inhibición en la síntesis de proteínas por la anisomicina previene la aparición de SAG. Se corroboró que el receptor GABA<sub>B</sub> no participa en la inducción del fenómeno de hiperexcitabilidad, y se descarta la participación de la neurotransmisión glutamatérgica en la inducción de la abstinencia por privación de GABA. Sin embargo, esta neurotransmisión excitadora puede estar involucrada en el mantenimiento de la hiperexcitabilidad.

### **Dos modelos de hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA**

El trabajo experimental de esta Tesis mostró que el SAG, un modelo de hiperactividad cortical (epilepsia parcial, *in vivo*) puede tener un correlato *in vitro* de hiperexcitabilidad neuronal. Debido a que el concepto síndrome, como conjunto de signos y síntomas (término netamente clínico), sólo puede aplicarse al animal íntegro, el fenómeno *in vitro* se denomina "hiperexcitabilidad neuronal producida por la privación aguda de GABA". Un síndrome de abstinencia, muestra tolerancia y dependencia física además de dependencia psicológica. Aspectos que han sido demostrados *in vivo* para muchos agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>. Pero *in vitro*, sólo puede obtenerse la hiperexcitabilidad del tejido al privar a éste de la superfusión con GABA o flunitrazepam.

Así, previamente al SAG se le ha descrito tolerancia al GABA (Silva-Barrat et al., 2000) y tolerancia cruzada a la isoguvacina (Silva-Barrat et al., 1989). La

dependencia física es manifiesta desde que sólo el GABA reduce las manifestaciones del SAG (Brailowsky et al., 1992; 1994). Además, hay semejanzas obvias con la inducción de hiperexcitabilidad debido a la privación de benzodiazepinas, barbitúricos y alcohol. Por lo que, no es incorrecto denominar a este modelo de epilepsia parcial en el animal íntegro como "síndrome". Por lo contrario, esta denominación tiene un valor heurístico pues señala las similitudes que el fenómeno presenta con cualquiera de los agonistas alostéricos del receptor GABA<sub>A</sub>. ¿Acaso, todas las drogas que selectivamente reconocen al receptor GABA<sub>A</sub> y que además inducen abstinencia, son capaces de producir hiperexcitabilidad cuando se interrumpe su administración?

El fenómeno de la hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA es una consecuencia del retiro del neurotransmisor de la superfusión. El modelo *in vivo* guarda diferencias y semejanzas con la preparación *in vitro* (cuadro 1).

**SEMEJANZAS DE LAS MANIFESTACIONES  
ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA HIPEREXCITABILIDAD  
INDUCIDA POR LA PRIVACION AGUDA DE GABA (cuadro 1)**

IN VIVO	IN VITRO
Latencia de aparición del foco epiléptico a los 90 minutos posterior a la interrupción de la infusión de GABA.	Incremento gradual en la amplitud de la espiga poblacional hasta alcanzar su máximo valor a los 150 minutos después de eliminar al GABA de la superfusión.
Disminución de la actividad EEG basal durante la instilación intracortical de GABA.	Reducción de un 90% en la amplitud del potencial de campo provocado durante la superfusión del neurotransmisor.
El foco epiléptico no se induce si la instilación del GABA dura menos de 120 minutos.	El retiro abrupto de la perfusión de GABA cuya duración fue menor de 120 min., no generó incremento de la excitabilidad cortical.
La latencia del SAG disminuye si el GABA se instila asociado con alopregnanolona.	La progesterona favorece la aparición de las "descargas epileptiformes" con tiempos de incubación menores de 120 min.

En el animal íntegro, la hiperexcitabilidad cortical tiene una latencia de aparición de la primer espiga promedio de 90 minutos y una duración del foco

epiléptico de 7 días. Estos dos parámetros son inversamente proporcionales al tiempo de instilación de GABA. Las instilaciones de dos horas y a velocidad de inyección realizadas en esta tesis son semejantes a los tiempos de latencia y duración previamente reportados (Brailowsky et al., 1989; 1990; 1991). *In vitro*, y semejante a lo publicado en el hipocampo (García-Ugalde et al., 1992), el incremento de la espiga poblacional es gradual y llega a su máxima amplitud a los 150 minutos posterior a la interrupción de la superfusión con GABA. Se deduce que se va generando un reclutamiento en el disparo de poblaciones neuronales corticales y con esto se va alcanzando la máxima amplitud en el potencial de campo.

En el SAG *in vivo* se presentan tres patrones EEG de descarga epiléptica (ver Introducción). *In vitro*, la hiperexcitabilidad neuronal cursa con crecimiento de la espiga poblacional para producir “descargas epileptiformes” en sus etapas más avanzadas. La correlación entre ambos modelos es obvia y las diferencias pueden explicarse por que *in vivo* sólo se detecta la hiperexcitabilidad cuando ya está muy avanzada, aparte de que la integración tálamo-cortical cambia la naturaleza de la respuesta.

En las primeras horas de evolución del SAG, se presenta una resistencia farmacológica a drogas GABAérgicas exceptuando al GABA. No obstante, en la preparación *in vitro*, durante la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA, persiste la susceptibilidad al diazepam y al GABA; y se manifiesta un incremento en el efecto inhibitorio del neuroesteroide alopregnanolona.

*In vivo*, la infusión de GABA durante 60 minutos induce disminución en la actividad EEG e *in vitro* se reduce la amplitud del potencial de campo. La interrupción de la superfusión a los 60 minutos no genera hiperexcitabilidad neuronal *in vitro*. Sin embargo, la asociación GABA-progesterona es capaz de inducir un incremento significativo en la amplitud de la espiga poblacional después de los 60 minutos. *In vivo*, la alopregnanolona redujo la latencia y aumentó la duración de las crisis paroxísticas.

*In vivo* e *in vitro* los neuroesteroides producen un efecto facilitador de la inducción de la hiperexcitabilidad por privación de GABA. Esto muestra que los neuroesteroides, agonistas alostéricos del receptor, incrementan el efecto del GABA. Sugiriendo con esto que la curva dosis efecto del GABA se recorre hacia la izquierda; es decir, la dosis efectiva del GABA disminuye por la presencia del neuroesteroide. Lo mismo puede decirse del flunitrazepam, con el añadido de que en este caso basto la concentración endógena de GABA, presente en la rebanada para producir

hiperexcitabilidad. En otras palabras, el agonista alostérico hace que el receptor "vea" más GABA del que hay. Esto explica por que se necesitan concentraciones milimolares del agonista endógeno (GABA) para producir el fenómeno.

En esta Tesis se presentan datos que permiten hipotetizar sobre la inducción de cambios en el receptor GABA<sub>A</sub> por la supresión del aminoácido o de flunitrazepam. Estos cambios se suscitan antes de la aparición de las "descargas epileptiformes". Con esto, se sugiere que las modificaciones en el número de receptores o en la composición del mismo llevan a la hiperexcitabilidad neuronal, y no es el evento epileptiforme el que provoca los cambios en el receptor. Este fenómeno de incremento en la excitabilidad cortical por la supresión del GABA, podría ser el sustrato de todas las abstinencias generadas por diversas drogas que incrementan la actividad GABAérgica (benzodiazepinas, barbitúricos, alcohol, etc). Por lo que, esta preparación es un bioensayo para el estudio farmacológico de las abstinencias que involucran a la neurotransmisión GABAérgica. Futuros estudios han de determinar los eventos moleculares que se llevan a cabo por la supresión brusca de drogas que reconocen al receptor GABA<sub>A</sub>.

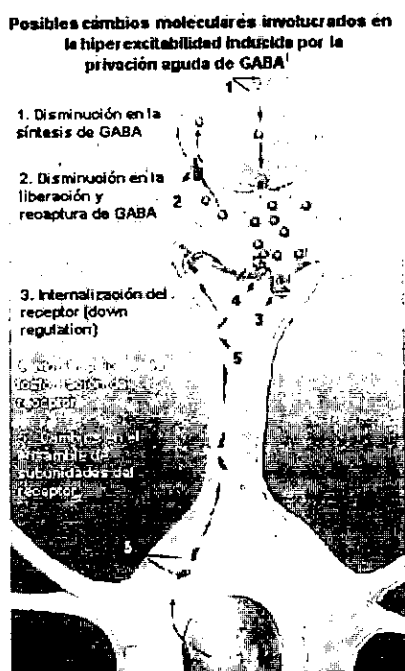
### **Aspectos moleculares posiblemente involucrados en la fenomenología de la abstinencia al GABA**

Con las evidencias publicadas en la literatura y los resultados de Tesis se puede hipotetizar que el incremento de la excitabilidad neuronal por la interrupción de la superfusión de GABA depende principalmente de un mecanismo general: modificaciones en el receptor GABA<sub>A</sub>. Los datos que se aportan en esta Tesis para esta afirmación son diversos. En los experimentos *in vivo* los agonistas alostéricos del receptor GABA<sub>A</sub> facilitan el SAG. *In vitro* queda de manifiesto que: a) hay una pérdida de la inhibición recurrente en el protocolo de estimulación pareada. b) hay disminución transitoria en el pegado específico de muscimol. c) hay un incremento en la sensibilidad al neuroesteroide, alopregnanolona en la preparación hiperexcitable. Se hace énfasis en que estos cambios pueden detectarse antes de que haya descarga epileptiforme, y se deduce que los cambios en el receptor GABA<sub>A</sub> y la consecuente modificación en su sensibilidad van empeorando a lo largo del tiempo, posterior al retiro de la superfusión con GABA.



¿Cuáles podrían ser los posibles mecanismos moleculares, sinápticos y neuronales involucrados en la generación de la hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA cuantificada en rebanadas de corteza cerebral?

Se conoce que en las abstinencias a benzodiazepinas y al alcohol, un común denominador es la desensibilización del receptor que depende de los niveles de fosforilación. Es posible hipotetizar que durante la hiperexcitabilidad generada por la supresión de GABA, los niveles de fosforilación del receptor GABA<sub>A</sub> cambien y el receptor tenga una menor actividad (Avoli y Olsen, 1997; Frosch et al., 1992; Krnjevic, 1991).



En la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA el "switch" inicial puede ser la disminución en el control GABAérgico debido a cambios en el receptor. Pueden presentarse cambios en la fosforilación; cambios en el número de receptores o en la expresión de isoformas de las subunidades.

**CAMBIOS EN LA NEUROTRANSMISION GABAERGICA  
POR ABSTINENCIA DE DIVERSAS DROGAS SELECTIVAS  
DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> (cuadro 2)**

1. Disminución en la síntesis de GABA	Salazar, et al. 1990.
2. Disminución en la recaptura y liberación de GABA	Guastella et al., 1990; Arias et al., 1990.
3. Internalización del receptor GABA <sub>A</sub> (down regulation).	Calkin y Barnes, 1994; Doble y Martin, 1996; Ryan y Boise, 1984; Krnjevic, 1997.
4. Modificaciones en la fosforilación del receptor y desensibilización	Browing, 1990; Bureau y Laschet, 1995; Cash et al., 1997; Frosch et al., 1992; Hu y Ticku, 1994; Krishek et al., 1994; Impagnatiello et al., 1996; Krishek et al., 1994; Lambert y Harrison, 1990; Leidenheimer et al., 1992, 1997; Zhai et al., 1998.
5. Cambio en el ensamble de subunidades del receptor GABA <sub>A</sub>	Buck, 1991; Clark, 1998; Olsen y Avoli, 1996; Hu y Ticku, 1994; Pesold et al., 1997; Smith et al., 1998; Speark et al., 1998; Tzunashima et al., 1997.

También existen evidencias acerca de la disminución en el número de receptores funcionales a nivel de la membrana (down regulation) por incubaciones con GABA o sus agonistas, lo cual explica la tolerancia a estas drogas. Este evento puede deberse a una internalización de los receptores (Calkin y Barnes, 1994).

En los últimos 10 años se han documentado cambios en la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> con desacoples del receptor-canal debido a incubaciones con agonistas alostéricos del receptor. Los cambios en las subunidades que ensamblan al receptor pueden generar modificaciones en su sensibilidad y en su modulación (Buck et al., 1991; Doble y Martin, 1996; Impagnatiello et al., 1996; Smith et al., 1998). Diversos tipos de epilepsia pueden inducir estos cambios (Clark et al., 1994; 1998; Tzunashima et al., 1997).

Se ha discutido en la Introducción de esta Tesis diversos cambios cuantificados en los ARNm de las diversas subunidades del receptor en el inicio y durante las abstinencias a drogas GABAérgicas así como en algunos modelos de epilepsia (Avoli y Olsen, 19997; Buck et al., 1991; Clark et al., 1994; 1998; Hiouchi et al., 1992; Pesold et al., 1997).

A nivel presináptico se conocía que la actividad de la GAD se encuentra disminuida durante el SAG (Salazar et al., 1994). *In vitro*, determinamos una disminución en la liberación del GABA por despolarización con  $K^+$ . Estos eventos podrían favorecer el mantenimiento de la hiperexcitabilidad.

Registros a nivel intracelular de rebanadas de cerebro de animales con SAG han mostrado que células adyacentes al foco epiléptico muestran un incremento en las conductancias a  $Ca^{2+}$ , haciendo que estas neuronas se comporten electrofisiológicamente como “rafagueadoras” (neuronas que generan despolarizaciones prolongadas con trenes de potenciales de acción). El ingreso de  $Ca^{2+}$  es semejante al cuantificado en otros modelos de epilepsia como el “kindling” (Brailowsky, 1991; Silva-Barrat et al., 1989; 1992).

El incremento en la excitabilidad posterior a la incubación con GABA también puede ocurrir con superfusiones cortas en cultivos neuronales (Golan et al., 2000).

### **Implicaciones funcionales**

Diversos modelos experimentales que cursan con cambios en la excitabilidad neuronal comparten algunas semejanzas con este fenómeno de hiperexcitabilidad inducida por la privación aguda de GABA (Olsen y Avoli, 1996).

Es posible que durante la evolución de algunos tipos de epilepsia y/o síndromes de abstinencia, los cambios en el receptor  $GABA_A$  mantengan los episodios de las crisis epilépticas. Presentándose con esto, receptores con diferente sensibilidad y en consecuencia, generándose una disminución en la sensibilidad farmacológica al tratamiento (resistencia a fármacos).

Los neuroesteroides pregnanos que incrementan la actividad del receptor  $GABA_A$  tienen un potente efecto anticonvulsivo (Joels, 1997). Fisiológicamente (durante la segunda fase del ciclo menstrual y el embarazo) estos neuroesteroides cambian su concentración. Lo anterior, clínicamente se identifica como hipersomnia y adinamia, que en algunos casos puede evolucionar al incremento de trastornos psicológicos tales como la depresión (Majewska, 1992). Es interesante que la privación también “fisiológica” de estos neuroesteroides (fase menstrual del ciclo y/o en el postparto inmediato) genera cambios conductuales como ansiedad, irritabilidad y labilidad emocional conocidos como “síndromes de abstinencia a progestágenos”. El síndrome premenstrual tiene este sustrato biológico, ya que para que se presente debe haber un incremento gradual en las concentraciones séricas y cerebrales de progesterona

y alopregnanolona, para seguirse de una caída abrupta en las concentraciones de estos neuroesteroides (Baulieu, 1997). Además, ciertos tipos de crisis epilépticas pueden presentarse durante el síndrome premenstrual ("epilepsia catamenial"), las cuales además presentan otra característica: durante la fase de mayor concentración de progesterona y alopregnanolona, las crisis epilépticas no aparecen. Es decir, la reducción en la concentración de la progesterona y su metabolito activo, la alopregnanolona, favorece la aparición de los eventos epilépticos. Debido a que ambos neuroesteroides facilitan la hiperexcitabilidad inducida por privación aguda de GABA *in vivo* e *in vitro*, los datos de esta Tesis sugieren que la epilepsia catamenial en su inicio, puede tener como sustrato a la hiperexcitabilidad inducida por supresión de GABA.

## VIII CONCLUSIONES

1. Se presenta un modelo *in vitro* de hiperexcitabilidad cortical inducida por privación de GABA o el agonista alostérico del receptor GABA<sub>A</sub>. flunitrazepam.
2. Las semejanzas entre las respuestas provocadas por el agonista endógeno GABA y la benzodiazepina, el agonista alostérico, sugieren que el sustrato molecular de ambas respuestas es el mismo.
3. Tanto *in vivo* como *in vitro* los neuroesteroides facilitan la inducción de la hiperexcitabilidad por privación de GABA, lo que vuelve a recalcar que todos los fenómenos de hiperexcitabilidad inducidos por drogas alostéricas o el agonista endógeno, se deben a cambios en blanco común, i.e. el receptor GABA<sub>A</sub>.
4. La preparación caracterizada en este trabajo permite identificar y seguir el curso temporal de la aparición de la hiperexcitabilidad inducida por privación de GABA. Esto facilitará estudios farmacológicos futuros acerca de la génesis de este fenómeno.
5. Durante la superfusión con GABA disminuye transitoriamente el número de receptores para después recuperarse durante la privación del aminoácido. Sin embargo, los receptores GABA<sub>A</sub> durante la privación aguda de GABA han cambiado su sensibilidad a los neuroesteroides, lo que sugiere modificaciones en la estructura del receptor.
6. Numerosos modelos experimentales de epilepsia señalan que como resultado de las crisis convulsivas se desarrollan cambios de largo plazo en la estructura del receptor GABA<sub>A</sub>. Estos llevan a deficiencias severas de la neurotransmisión inhibitora. En el presente estudio se observan deficiencias en la neurotransmisión GABAérgica antes de que las descargas epileptiformes se expresen en toda su magnitud. Por lo tanto, las deficiencias de la neurotransmisión, aquí descritas, producen a la descarga epileptiforme y no son el resultado de la misma. Por ejemplo, la disminución de la inhibición recurrente y la disminución en la liberación de GABA-<sup>3</sup>H provocada por

alto  $K^+$ . Ambas deficiencias se incrementan a lo largo de los 150 minutos posteriores a la superfusión con GABA hasta desarrollar hiperexcitabilidad y descargas epileptiformes.

7. El presente trabajo aporta una preparación *in vitro* que es un correlato del SAG descrito *in vivo*.

## IX REFERENCIAS

- Arias, C., Montiel, T., Tapia R. 1990. Transmitter release in hippocampal slice from rats with limbic seizures produced by systemic administration of kainic acid. *Neurochem. Res.*, 15 (6): 641-645.
- Aguayo, L., 1990. Ethanol potentiates the GABA<sub>A</sub> -activated- Cl<sup>-</sup> current in mouse hippocampal and cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 187: 127-130.
- Araki, T., Kiyama, H., Tohyama, M. 1992. The GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol. Brain Res.* 15: 121-132.
- Araki, T., Kiyama, H., Tohyama, M. 1992. Region specific expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 subunits mRNAs in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 12: 293-314.
- Avoli, M., Hwa G., Louvel I., Kurcewicz, R., Pumain R., Lacaille, JC. 1997. Functional and pharmacological properties of GABA mediated inhibition in the human neocortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 526-534.
- Baulieu, EE. 1992. Neurosteroids: an overview. GABAergic synaptic transmission. Ed. Biggio, G., Concas, A., Costa, E. Raven Press. New York, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* (47), 469 pp.
- Baulieu, EE., Robel, P. 1993. Neurosteroids: a new brain function? *Serono Symposia Publications from Raven press*, (74), in: *The New biology of steroids hormones*. Ed. Hochberg, R., Niftolin F. Raven Press, New York. 251-263.
- Belleli, D., Bolger, M., Gee, K. 1989. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one. *Eur. J. Pharmacol.* 166: 325-329.
- Bonnet, U., Bingmann, D. 1995. GABA<sub>A</sub>-responses of CA3 neurones: contribution of bicarbonate and of Cl<sup>-</sup>-extrusion mechanisms. *Neuroreport*, 6(4):700-704.
- Borman, J., 1988. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *TINS* 11(3): 112-116.
- Bovolin, P., Santi, M., Memo, M., Costa, E., Grayson, D., 1992. Distinct developmental patterns of expression of rat  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 5,  $\gamma$ 2s and  $\gamma$ 2l  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* 59:62-72.
- Bowery, N., 1990. GABA transporter protein cloned from rat brain. *TIPS*, 11:435-437.
- Browning, M., Bureau, M., Dudek, E., Olsen, R. 1990. Protein kinase C and cAMP dependent protein kinase phosphorylate the  $\beta$  subunit of the purified  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. *PNAS*, 87 1315-1318.
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C., Naquet, R. 1987. Epileptogenic  $\gamma$ -aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci. Lett*; 74: 75-80.

- Brailowsky, S., Garcia, O. 1999. Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch. Med. Res.* 30: 3-9.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Richie, D., Naquet, R. 1988. The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.* 442: 175-179.
- Brailowsky, S., Silva-Barrat, C., Ménini, C., Richie, D., Naquet, R. 1989. Effects of localized, chronic GABA infusion into different cortical areas of photosensitive baboons, *Papio, papio*. *Electroencephalography and Clin. Neurophysiol.* 72: 147-156.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C., Naquet, R. 1990. Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia.* 31(4): 369-377.
- Brailowsky, S., 1991. The GABA withdrawal syndrome. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 227-228.
- Brailowsky, S., García, O. 1999. Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch. Med. Research.* 30:3-9
- Brown, J., Wood, M., Coldwell, M., Briston, D. 1998.  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor function is desensitised in rat cultured cerebellar granule cells following chronic flunitrazepam treatment. *J. Neurochem.* 71:1232-1240.
- Buck, K., Hahner, L., Sikela, J., Harris, A. 1991. Chronic ethanol treatment alters brain levels of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs: relationship to genetic differences in ethanol withdrawal seizures severity. *J. Neurochem.* 57:1452-1455.
- Bureau, M., Olsen R., 1990. Multiple distinct subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol. Pharm.* 37: 497-502.
- Bureau, M., Laschet, J. 1995. Endogenous phosphorylation of distinct gamma-aminobutyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr kinase activities associated with the purified receptor. *J. Biol. Chem.* 270(44): 26482-26487.
- Calkin, P., Barnes, E. 1994. GABA<sub>A</sub> agonist down regulate GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 269:1548-1553.
- Carette, B., Polain, P. 1984. Excitatory effect of dehydroepiandrosterone, its sulphate ester and pregnenolone sulphate, applied by iontophoresis and pressure, on single neurones in the septo-preoptic area of the guinea pig. *Neurosci. Lett.* 45: 205-210.
- Cash, D., Serfozo, P., Allan, A. 1997. Desensitization of a  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor in rat is increased by chronic treatment with chlorodiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 704-711.



Chebib, M., Johnston, G. 1999. The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 937-940.

Churn, S., DeLorenzo, R. 1998. Modulation of GABAergic receptor binding by activation of calcium and calmodulin-dependent kinase II membrane phosphorylation *Brain Res.* 809 (1): 68-76.

Clark, M. 1998. Sensitivity of the rat hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 4$  subunit to electroshock seizures. *Neurosci. Lett.* 250:17-20.

Clark, M., Massenburg, G., Weiss, R. 1994. Post analysis of the hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Mol. Brain Res.* 26: 309-319.

Cox, Lebalnc, Marshan. 1983. *Drugs and drugs abuse; Addiction Research Fundation, Canada, 432pp.*

Costa, E., 1987. Polytypic signaling at GABAergic synapses. *Life sciences* 42:1407-1417.

Covarrubias, M., Tapia, R. 1980. Brain glutamate descarboxylase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme. *J. Neurochem.*, 34: 1682-1688.

DeFazio, T., Hablitz, J. 1998. Zinc and zolpidem modulate mIPSCs in rat neocortical pyramidal neurons *J. Neurophysiol.* 80 (4): 1670-1677.

DeLorcy, T., Olsen R. 1994. GABA and glycine. En: *Basic neurochemistry* (Siegel, G., Agranoff, B., Molinoff, B., 5<sup>o</sup> ed., Reven press, New York, USA.

Deutch A., Roth R. Neurotransmitters. 1999. En: *Fundamental Neuroscience*, Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J., Squire, L. Cap 8. (Academic press. California USA).

Doble, A., Martin, I. 1996. The GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. En: *Neuroscience Intelligent Unit. Champan and Hill. USA, 274 pp.*

Draguhn A., Verdorn, T., Ewert, M., Seeburg, P., Sakmann B. 1990. Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA<sub>A</sub> receptor subtypes by Zn<sup>2+</sup>. *Neuron*, 5: 781-788.

Essrich, C., Lorez, M; Benson, J., Fritschy, J., Luscher, N. 1998. Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin *Nature-Neurosci.*, 1 (7): 563-571.

Farb, D., Gibbs, T., Wu, FG., Gyenes, M., Friedman, L., Russek, S. 1992. Steroid modulation of amino acid neurotransmitter receptor. GABAergic synaptic transmission. Ed. Biggio, G., Concas, A., Costa, E. Reven Press. New York, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* (47):121-127.

Feldman, A., Meyer, C., Quesner, C., 1996. Principles of Neuropsychopharmacology. Academic Press, 1969 pp.

Finn, D., Gee, K. 1993. The influence of estrus cycle on neurosteroid potency at the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265(3): 1374-1379.

Ffrench-Mullen, JM., Danks, P., Spence, K. 1994. Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled mechanism. *J. Neurosci.* 14(4):1963-1977

Fritschy, J., Benke, D., Mertens, S., Oertel, H., Bachi, T., Mohler, H., 1992. Five subtypes of type A  $\alpha$ -aminobutyric acid receptor identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *PNAS*, 89:6726-6730.

Frosch, M., Lipton, S., Dichter, M. 1992. Desensitization of GABA-activated current and channels in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 12(6): 3042-3053.

Fukuda, H., Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D., Naquet, R. 1987. Anticonvulsant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp. Neurol.* 98:120-129.

García-Ugalde, G., Brailowsky, S. 1993. Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. *Ciencia*, 44: 279-289.

García-Ugalde, G., Galarraga, E., Bargas, J., Brailowsky, S. 1992. Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci. Lett.* 147: 229-232.

Gasior, M., Certer, R., Witkin, J. 1999. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *TIPS*, 20: 107-112.

Golan, H., Mikenberg, K., Greenberger, V., Segal, M. 2000. GABA withdrawal modifies network activity in cultured hippocampal neurons. *Neural plasticity*, 7(1-2): 31-42.

Grover, L., Lambert, N., Schwartzkroin, P., Teyler, T. 1993. Role of  $\text{HCO}_3^-$  ions in depolarizing GABA<sub>A</sub> receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *Neurophysiol.* 69(5):1541-1555

Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czysyk L., Keynan, S., Miedel, M., Davidson, N., Lester, H., Kanner, B. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*. 249: 1303-1306.

Grobin, C., Roth, R., Deutch, A. 1992. Regulation of the prefrontal cortical dopamine system by the neuroactive steroids  $3\alpha$ , 21-dihydroxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-one. *Brain res.* 578: 351-356.

- Hallbreich, U., Petty, F., Yonkers, K., Kramer, G., Rush, J., Bibi K. 1996. Low plasma  $\gamma$ -aminobutyric acid levels during the late luteal phase of women with premenstrual dysphoric disorder. *Am. J. Psychiatry*, 153; 718-720.
- Harrison, N., Simmonds, M. 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* 323: 287-292.
- Hadingham, K., Harkness, P., McKernan, R., Quirk, K., Bourdelles, B., Horne, A., Kemp, J., Barnard, A., Ragan, I., Whiting, P. 1992. Stable expression of mammalian type A  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in mouse cells: demonstration of functional assembly of benzodiazepine-responsive sites. *PNAS*, 89:6378-6392.
- Hevers, W., Luddens, H. 1998. The diversity of GABA<sub>A</sub> receptors. *Mol. Neurobiol.* 18(1): 35-86.
- Hill, R., Makin, H., Kirk, D., Murphy, G. 1991. Dictionary of steroids: chemical data, structures and bibliographies. Champam and Hall. New York, 956 pp.
- Hirouchi, M., Ohkuma, S., Kuriyama, K. 1992. Muscimol-induced reduction of GABA<sub>A</sub> receptor alpha 1-subunit mRNA in primary cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 15(3-4):327-331.
- Houser, C. Vaughn, J., Hendry, S., Jones, E., Peters, A., 1984. GABA neurons in the cerebral cortex. En: *Functional properties of cortical cells*, vol. 2. (Plenum press, New York USA.)
- Hu, X., Ticku, M. 1994. Chronic benzodiazepine agonist treatment produces functional uncoupling of the GABA/benzodiazepine receptor ionophore complex in cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 45, 618-625.
- Impagnatiello, F., Pesold, C., Longone, P., Caruncho, H., Fritschy, J., Costa, E., Guidotti, A. 1996. Modifications of  $\gamma$ -aminobutyric acid <sub>A</sub> receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. *Mol. Pharmacol.* 49:822-831.
- Joels, M. 1997. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 18: 2-48.
- Jung-Testas, I., Do Thi, A., Koenig, H., Desarnaud, F., Shazand, K., Schumacher, M., Baulieu EE. 1999. Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6): 97-107
- Kardos, J. 1999. Recent advances in GABA research. *Neurochem. Int.* 34:353-358.
- Kabbadj, K., Eletr, M., Baulieu, EE., Robel, P. 1993. Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia*, 7: 170-175.
- Karlsson, G., Pozza, M., Olpe, H. 1988. Phaclofen: a GABA<sub>B</sub> blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 485-486.

- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, J., Bishof, S., Mickel, S., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froesti, W., Bettler, B. 1997. Expression cloning of GABA<sub>A</sub> receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386: 239-246.
- Kc, FC., Ramírez, V. 1990. Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat brain using progesterone conjugated to <sup>125</sup>I-bovine serum albumin as a ligand. *J. Neurochem.* 54: 467-472.
- Kerr, D., Ong, J., Prager, R., Gynther, B., Curtis, D., 1987. Baclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain res.*, 405: 150-154.
- Klein, P., Herzog, A. 1998. Hormonal effects on epilepsy in women. *Epilepsia*, 39, supp 8: s9-s16.
- Knapp, R., Malatynska, E., Yamamura, H. 1990. From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. *Neurochem. Res.*, 15(2): 103-112.
- Kokate, TG., Juhng, N., Kirkby D., Llamas, J., Yamaguchi, S., Rogawski, M. 1999. Convulsant actions of the neurosteroid pregnenolone sulfate in mice. *Brain Res.* 831(1-2):119-124.
- Krishek, B., Xie, X., Blackstone, C., Haganir, R., Moss, S., Smart, G. 1994. Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron.* 12(5): 1081-1095
- Krnjevic', K. 1984. Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. En: *Functional properties of cortical cells, vol. 2.* (Plenum press, New York USA.)
- Krnjevic', K. 1991. Significance of GABA in brain function. En: *GABA mechanism in epilepsy.* Cap. 3. (wiley-Liss, Inc. USA.)
- Krnjevic', K. 1997. Role of GABA in cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 439-451.
- Kuffler, S., Nichols, J., Martin, A. 1984. *From the neuron of the brain.* 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts. (Sinauer Associates Inc. USA., 298-309)
- Kuriyama, K., Hirouchi, M., Nakayasu, H. 1993. Structure and function of cerebral GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neurosci. Res.*, 17: 91-99
- Lader, M., File, S. 1987. The biological basis of benzodiazepine dependence. *Psychol. Med.* 17: 539-547,
- Lambert, J., Belelli, D., Hill-Venning C., Peters, J. 1999. Neurosteroids and GABA<sub>A</sub> receptor function. *TIPS*, 16: 295-303.
- Lambert, N., Harrison, N. 1990. Analogs of cyclic AMP decrease  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor mediated chloride current in cultured rat hippocampal neurons via an extracellular site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255(1): 90-94.

- Lan, N., Gee, K. 1994. Neuroactive steroid action at the GABA<sub>A</sub> receptor. *Hormones and behavior*. 28: 537-544.
- Leidenheimer, N., McQuilkin, S., Hahner, L., Whiting, P., Harris, A. 1992. Activation of protein kinase C selectively inhibits the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor: role of desensitization. *Mol. Pharmacol.* 41: 1116-1123.
- Leidenheimer, N., Chapell, R. 1997. Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Mol. Brain Res.* 52: 173-181.
- LeGal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R. 1988. Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp. Neurol.* 101: 411-417.
- Legendre, P., Westbrook, G. 1990. Noncompetitive inhibition of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> channels by Zn. *Mol. Pharmacol.* 39: 267-274.
- Liu, Q., Mandiyan, S., Nelson, H., Nelson, N. 1992. A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *PNAS*, 89: 6639-6643.
- Luddens, H., Korpi, R., Seeburg H. 1995. GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiological implications. *Neuropharmacol.* 34(3): 245-254.
- Maitra, R., Reynolds, J. 1998. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by neuroactive steroids: evidence for heterogeneity of steroid sensitivity of recombinant GABA<sub>A</sub> receptor isoforms. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(9): 909-920
- Maitra, R., Reynolds, J. 1999. Subunit dependent modulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by neuroactive steroids. *Brain Res.* 819(1-2): 75-82
- Majewska, M., Schwartz, R. 1987. Pregnenolone sulfate: an endogenous antagonist of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res.* 404: 355-360.
- Majewska, M. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA<sub>A</sub> receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38: 379-385.
- McLellan, A., O'Brien, C., Metzger, D., Alterman, A., Cornish, J., Urshel, H. 1992. How effective is substance abuse treatment –compared to what? Addictive states. (Ed, O'Brien, C., Jaffe, J.) Raven press, New York: 231-252.
- Macdonald, R., Olsen, R. 1994. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 47-87
- McKernan, R., Whiting, P. 1996. Wich GABA<sub>A</sub> receptors subtypes really occur in the brain? *Trends. Neurosci.*, 19: 139-143.
- Mhatre, M., Ticku, M. 1992. Chronic ethanol administration alters  $\gamma$ -aminobutyric acid a receptor gene expression. *Mol. Pharmacol.* 42: 415-422.

Menini, C., Mraovitch S., Calando, Y., De la Sayette, V., Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., Seylaz, J. 1991. Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusion in the rat. *Neuroscience* 41(5): 607-615.

Mehta, A., Ticku, M. 1999. An update on GABA<sub>A</sub> receptors. *Brain Res. Rev.* 29:196-217.

Midel, G. 1981, *Pharmacology*; 2 ed; Englewood Cliffs, USA. 686 pp.

Morrel, M. 1998. Effects of epilepsy on women's reproductive health. *Epilepsia*, 39 suppl 8:s32-s37.

Nelson, H., Mandiyan S., Nelson, N. 1990. Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS* 269(1): 181-184.

Nurse, S., Lacaille, J. 1997. Do GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 520-525.

O'Brien, C. 1996. Addiction and abuse of substance. Cap. 24. En *The Pharmacological basis of therapeutics*. 8a ed; Ed: Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P., Ruddon, R., Goodman, A., Vol.1. 595-617.

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

Olsen, R., Avoli, M. 1996. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia*, 38(4): 399-407.

Ohmori, Y., Kuriyama, K., 1991. Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA<sub>B</sub> receptor. *Neurochem. Res.*, 16(3): 357-362.

Paul, S. 1995. GABA and glycine. En: *Neuropharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom, F., Kupfer, J., Raven press, New York, USA).

Penschuck, S., Paysan, J., Giorgetta, O., Fritschy, J.M. 1999 Activity-dependent regulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 868:654-666

Perkins, K., Wong, R. 1997. The depolarizing GABA response *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75(5):516-519.

Pesold, C., Caruncho, J., Impagnatiello, F., Berg, M., Fritschy, J., Guidotti, A., Costa, E. 1997. Tolerance to diazepam and changes in GABA receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci*, 79(2): 477-487.

Puia, G. Ducic, I. 1993. Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA<sub>A</sub> receptors subunit composition? *Receptors and Channels*, 1:135-142.

Ribak, C., Bayak, R. 1999. Neurocytology of a primate model of human temporal lobe epilepsy. *Adv. Neurol.* 79: 737-741.

Robel, P., Baulieu EE. 1995. Neurosteroids: Biosynthesis and function. Crit. Rev. In Neurol. 9(4): 383-394.

Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simón, H., Baulieu EE. 1995. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 53(1): 1-6.

Roberts, R. 1995. Pregnenolone –from Selye to Alzheimer- and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA<sub>A</sub> receptor. Biochem. Pharmacol. 49(1): 1-16.

Robinson, G., Setters, E., Janecek, E., 1981. Barbiturate and hypnosedative withdrawal by a multiple oral phenobarbital loading dose technique. Clin. Pharmacol. Ther. 30: 71-76.

Ruano, D., Cano, J., Machado, A., Vitorica, V. 1991. Pharmacologic characterization of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor in rat hippocampus during aging. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256(3): 902-908.

Rupprecht, R., Hauser, C., Trapp, T., Holsboer, F. 1996. Neurosteroids: molecular mechanisms of action and psychopharmacological significance. J. Steroid Biochem. Biol. 56 (1-6): 163-168.

Ryan, G., Boise, N. 1984. Benzodiazepine tolerance, physical dependence and withdrawal electrophysiological study of spinal reflex functional. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231: 464-471.

Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S., Tapia, R. 1994. Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid. Neurochem. Int. 24(4): 363-368.

Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoyer, H., Adamiker, D. 1999. Structure and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors. Neurochem. Int. 34: 379-385.

Silva-Barrat, C., Brailowsky, S., Richie, D., Menini, C. 1988. Anticonvulsant effects of localized chronic infusions of GABA in cortical and reticular structures of Baboons. Exp. Neurol, 101: 418-427.

Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini C., Naquet, R. 1989. Relationship between tolerance to GABA<sub>A</sub> agonist bursting properties in neocortical neurons during GABA withdrawal syndrome. Brain Res. 498: 289-298.

Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C, Champagnat, J., Naquet, R. 1992. Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat. J. Neurophysiol. 67(3): 715-727.

Silva-Barrat, C., Champagnat, J., Menini, C. 2000. The GABA withdrawal syndrome: a model of local status epilepticus. Neural plasticity, 7(1-2): 9-18.

Smith, S., Gong, Q., Hsu, F., Markowitz, R., Ffrench-Mullen, J., Li, X. 1998. GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 4$  suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature*, 392: 926-930.

Smith, S., Gong, Q., Li, X., Moran, M., Bitran, D., Fryc, C., Hsu, F. 1998. Withdrawal from 3 $\alpha$ -OH-5 $\alpha$ -pregnan 20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA<sub>A</sub> -gated current and increases the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 4$  subunit it association with increased anxiety. *J. Neurosci.* 18(14): 5275-5284.

Soltesz, I., Haby, M., Leresche, N., Crunelli, V., 1988. The GABA<sub>B</sub> antagonist phaclofen inhibits the late K<sup>+</sup> dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res.* , 448: 351-354.

Speark, G., Scharzer, C., Tsunashiap, R., Kandlofer, S. 1998. Expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. *Epilpesy. Res.*, 32, 129-139.

Staley, K., Proctor, W. 1999. Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *J Physiol (Lond)*, 519 Pt 3:693-712

Staley, K., Soldo, B., Proctor, W. 1995. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. *Science*, 269(5226): 977-981

Stelzer, A., Kay, A., Wong, S. 1988. GABA<sub>A</sub> receptor functional in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 241: 339-341.

Tapia, R., Sandoval, M., 1971. Study of inhibition of brain of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphatexime -O-acetic acid. *J. Neurochem.* 18: 2051-2059.

Tapia, R., Sandoval, M., Contreras P. 1975. Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J. Neurochem.* 12: 1283-1285.

Teuber, L., Watjens, F., Jensen, L. 1999. Ligands for the benzodiazepine binding site-a survey. *Curr Pharm Des*; 5(5): 317-43

Thompson, C., Bodewits, G., Stephenson, A., Turner, J. 1992. Mapping of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  subunit like immunoreactivity in rat brain. *Neurosci. Letters.* 144: 53-56.

Thompson, S., Gahwiler, B. 1992. Comparison of the actions of baclofen at pre and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.* , 451: 329-345.

Towle, A., Sze, P. 1983. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoid and gonadal steroids. *J. Steroid biochem.* 18(2): 135-143.

Tsuda, M., Chiba, Y., Suzuki T., Misawa, M. 1998. Up regulation of NMDA receptor subunit proteins in the cerebral cortex during diazepam withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 341; R1-R2.



Tzunashima, K., Schwarzer, C., Kiehmair, E., Sieghart, W., Sperk, G. 1997. GABA<sub>A</sub> receptor subunit in the rat hippocampus III. Altered messenger RNA expression in kainic acid -induced epilepsy. *Neurosci.* 80:1019-1032.

Wafford, K., Bain, K., Quirk, R., Mckernan, P., Wingrove, P., Whiting, J., Kemp, J. 1994. A novel allosteric modulatory site on the GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$  subunit. *Neuron.* 12: 775-782.

Wang, J., Kofuji, P., Burt, D. 1992. Strain comparisons and developmental profile of the delta subunit of the murine GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Res. Bull.* 29: 119-123.

Wilcox, A., Warrington, J., Gardiner, K., Berger, R., Whiting, P., Altherr, M., Wasmuth, J., Patterson, D., Sikela, J. 1992. Human chromosomal localization of genes encoding the  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  subunits of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *PNAS*, 89: 5857-5861.

Wieland, S., Lan, N., Mirasedeghi, S., Gee, K. 1981. Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one. *Brain Res.* 565: 263-268.

Wilson, M., Biscardi, R. 1992. Effects of gender and gonadectomy on responses to chronic benzodiazepine receptor agonist exposure in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 215: 99-107.

Woolley, C., Schartzkroin, P. 1998. Hormonal effects on the brain. *Epilepsia*, 39, supp 8:s2-s8.

Zhai, J., Stewart, R., Friedberg M., Li, C. 1998. Phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2L subunit in rat sensory neurons may not be necessary for ethanol sensitivity. *Brain Res.* 805 (1-2): 116-122

Zhan, C. 1999. Catamenial epilepsy: clinical aspects. *Neurology*, 52 (supp.1): s34-s37.

Zhang, J., Sato, M., Tohyama, M. 1992. Co expression of the  $\alpha 1$  and  $\beta 2$  subunit genes of the GABA<sub>A</sub> receptor in the magnocellular preoptic nucleus. *Mol. Brain Res.* 15:171-173.