

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, glutamatergic, 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, antidepressivos, 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 colinergic (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 anxiolytic, 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 de ADN y que se realizan a través de receptores a neurotransmisores.

Actualmente se sabe que muchos esteroides son moduladores de la excitabilidad cerebral^{1,43, 50,51} al interactuar con una superfamilia de receptores ionotrópicos que incluyen al: ácido gamma amino bórico tipo A (GABA_A), al glutamatergico 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@ifisiol.unam.mx

Trabajo apoyado parcialmente por DGAPA-UNAM y CONACyT.

cina. Estos esteroides se forman también en el cerebro² a partir de la glía⁴ 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,^{12, 25, 52} sobre la memoria, o en conductas como el apetito sexual, los cambios emocionales durante el periodo menstrual y el embarazo,^{10, 40} etc.

Esteroides

La palabra esteroide significa "semejante a un esteroil". Los esteroides son alcoholes sólidos que abundan en las plantas y animales; en el hombre el esteroil 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 ciclo-pentano-perihidrofenantreno (Figura 1)⁸⁷

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 estradioles, 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, rompiéndose en enlace. Esta vitamina interviene en la absorción de Ca^{2+} 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).^{53,54} 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 esterequímica 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).^{55,56}

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.⁵⁷
- 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 ~ ~ ~ .
- 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 tan sólo 10 segundos después de su aplicación i.v.⁵³

- d) Los glucocorticoides disminuyen la excitabilidad de neuronas del hipocampo, al inhibir la frecuencia de disparo en el área de CA1.⁵⁸
- e) Fuera del SNC, en el douden, tejido mamario y a nivel de osteoblastos, la vitamina 1,25 dihidroxid ó D₃ en segundos a minutos, estimula la actividad de una proteína cinasa, cambiando la actividad de canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, incrementando la corriente entrante de este catión.^{59, 60}

Estas evidencias indican que los estrógenos y los progestágenos tienen efectos rápidos sobre la excitabilidad neuronal y el metabolismo mediante un mecanismo 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 1)

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.^{20,22,34}

Los efectos mejor estudiados de los NE son sobre el receptor tipo GABA_A, el receptor para glicina, el glutamatergico de tipo NMDA, y el tipo nicotínico de acetilcolina, los 2 primeros inhibidores y los últimos excitadores de la actividad cerebral. Sobre canales de Ca²⁺ 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.¹³

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 α -5 α pregnano (Figura 1) El esteroide con mayor actividad farmacológica sobre el receptor GABA_A, 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 β 5 α ó el 3 α 5 β , tienen menor actividad GABAérgica, sin embargo, a este último isómero se le ha reportado actividad agonista/antagonista;^{9,14} otros trabajos muestran que la 3 α hidroxilación-5 α 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 α -5 α y el ceto del C20.⁶²

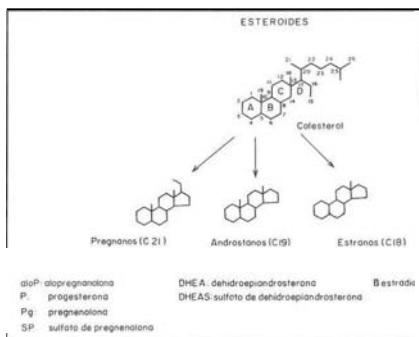


Figura 1. Química de los principales neuroesteroides (NE). Los NE son formados en la glia; a partir del colesterol se obtiene la familia de los pregnanos (C 21), de los cuales los más dinámicos en su actividad no genómica son: los 3 α -Hidroxilados-5 α -reducidos, así como los esteroides sulfatados o los La'am a ae os anorostanos (C 19) también son formados en el SNC, a DnFA y su sulfato son representativos de esta familia. Los estranos (C18), como el β 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 SO₂), tienen un efecto antagonista al receptor GABA_A y al de glicina, pero son agonistas del receptor NMDA.

Algunos isótopos β también tienen efectos en SNC, preferentemente anestésicos, y fuera del SNC, de vasodilatación, relajación intestinal y uterina.^{79, 80}

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 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 GABAérgicos como el flunitrazepam y barbitúricos, y disminuyen el pegado de antagonistas a este receptor como la picrotoxina o el t-butilbiciclofosforonato (TBPS)⁷ (Figura 4).

Mediante estudios con marcado radioactivo, se ha visto que los esteroides reconocen a la proteína membranar (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 afinidad¹. Los sitios de baja afinidad tienen comúnmente alta densidad (más abundantes), presentan una K_d en el rango μM con una B_{max} de 10 nM/mg de proteína, en tanto que para los de alta afinidad su K_d es del rango μM 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 μM.

La composición de las subunidades proteicas expresadas en el receptor definen la afinidad al NE. Se sabe que el receptor GABA_A tiene que incluir subunidades α3, β1 y γ2 para que la familia de esteroides pregnanos tengan efecto en él.^{1, 21, 22} 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 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 GABA_A de hipocampo, amígdala basolateral, y anivel de la corteza cerebral, los situados específicamente en la lámina VI.^{24, 44}

Mediante la secuenciación de los aminoácidos de la subunidad α1, 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 β para interaccionar mediante puentes de H⁺ con el esqueleto hidrofóbico de los NE; además, la Arginina (Arg) 66 y la Tirosina (Tir) 98, pueden interaccionar por cargas con el grupo SO₄⁻ 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 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 SO₄⁻, probablemente se introduce en el sitio del canal de Cl⁻ del receptor GABA_A bloqueándolo. Este modelo es atractivo para explicar el efecto antagónico sobre el receptor GABA_A de los NE sulfatados.⁴⁰

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 Ca^{2+} al interior de la célula.^{26,63} 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 Cl^- y Ca^{2+} , inducidas o bloqueadas por los esteroides, y ver cómo éstas se recuperan en función del 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.^{19, 24, 49}

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 que la clasificación anterior parece ser clara, actualmente el grupo de Gee,⁶⁴ propone una nueva nomenclatura para estas clases de moléculas, EPALONES; un EPALON es un esteroide de estructura pregnano derivado de la **ewialowreananolona** (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 organoesteroidogénicos, pero con algunas particularidades²⁸ (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 P450scs mitocondrial (hemoproteína que hidroxila y corta uniones C-C); el colesterol es hidroxilado en posiciones 22 y 21 C, rompiendo a la molécula de 27 C en una de 20 C. Este primer paso es común a los tejidos esteroideogénicos; por medio de estudios con ADN complementario, se conoce que este complejo P450scs es el mismo en el oligodendrocito en adrenales y gónadas. Además, mediante la utilización de la inmunohistoquímica, la enzima también se descubrió en astrocitos tipo I⁴ a nivel de corteza cerebral, amígdala, hipocampo y mesencéfalo.⁴³

La Pg puede ser sustrato de otro citocromo, el P450c17, 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 proteína², 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 P450scs: la Pg, por medio de la 3 β hidroxisteroide reductasa/isomerasa (3P 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.⁴³

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 a la síntesis de un esteroide activo y ahorrar pasos en la vía. Por ejemplo, la P, mediante la 5 α -reductasa, forma a la 5 α -dihidroprogesterona, sustrato de una 3 α -hidroxilasa, culminando en la formación de un complejo cuya estructura es la más dinámica de los NE: la 3 α -OH-

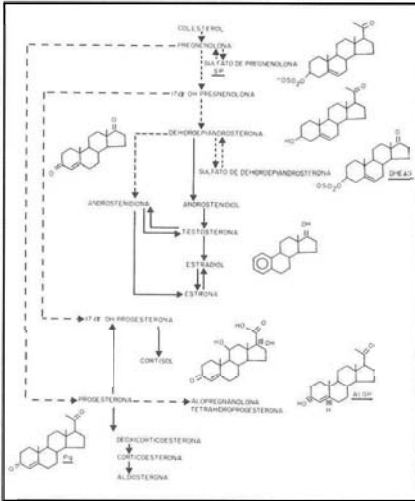


Figura 2. La síntesis de neuroesteroides en el SNC es semejante a la de otros órganos, o los pasos enzimáticos en algunas especies están demostrados en el hipodendrocito y el astrocitos.

5αpregnan-20-ona, tetrahidroprogesterona o Alop. La inmunoreactividad para ambas α-reductasas es grande en la corteza cerebral, hipófisis, tálamo, mesencéfalo y médula espinal.⁴⁶

La Pg es sustrato, en el oligodendrocito, de un tercer citocromo, el P450_{sc7α}, el cual cataliza la formación de derivados sulfatados, como el sulfato de pregnenolona (SP). Las hidroxilaciones tipo β 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 alternativa más de la Pg es una oxidoreducción por parte de la 20α-hidroxiesteroide oxidoreductasa (20α-HOR) formando a la 20α-dihidroprogesterona, la cual mediante la interacción con la α-hidroxilasa forma la 3α-5α-20α-hexahidroprogesterona (HHP). Este producto complejo se convierte en Alop, por la enzima que inició esta vía alterna: la 20α-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.⁴⁴

Finalmente, la síntesis de NE puede estar contrarregulada por los mismos NE o EN, mediante la vía clásica de actividad intracelular de los esteroides: la genómica⁴. Se ha demostrado que al menos los estrógenos, disminuyen la transcripción y traducción de las α-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 proteína-quinasa, dependiente de AMPc, el DBI es activado y se une a PBR; a su vez este complejo facilita el ingreso de esteroides 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 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 neuronal.^{81,87}

Neuromodulación en distintas neurotransmisiones

Neurotransmisión GABAérgica

Receptor GABA_A

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 Moravik, en 1927).⁵¹ Des-

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

El receptor GABA_A reconoce al neurotransmisor inhibitorio 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⁻, 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_B, el cual se encuentra asociado a proteínas G y activa a segundos mensajeros⁵⁷; pertenece al grupo de los receptores metabotrópicos. Sobre el receptor GABA_B no se ha reportado actividad de los NE hasta el momento. Existe también un receptor CABA, identificado solamente a nivel de la retina.⁶⁸

Las benzodiazepinas (BZs), y los barbitúricos se unen con gran afinidad al receptor GABA_A en sitios distintos (Figura 3). Esta unión incrementa la unión del GABA a su receptor, potenciando su efecto²⁰; farmacológicamente estos efectos se clasifican como: ansiolíticos, anticonvulsivos, sedantes, hipnóticos y anestésicos. Por el contrario, los moduladores negativos de este receptor, como las β carbolinas y el TBPS, inhiben el pegado del GABA a su receptor, y al inhibirla inhibición tienen efectos proconvulsivos y ansiogénicos (hiperexcitadores).⁶⁸

Por lo anterior, los NE pueden subclasificarse de acuerdo a sus efectos a nivel del receptor GABA_A, 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_A, más potente, la DHEA, y la THDOC.^{40,87} 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%.⁴³ Sus efectos electrofisiológicos han sido evidenciados: mediante registros de parche celular (incremento de la probabilidad de apertura de canales asociados al receptor GABA_A y el incremento de

la corriente microscópica de Cl⁻), 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).^{40,49}

Farmacológicamente, los NE favorecen el pegado del GABA y otros agonistas al receptor. Por estudios de desplazamiento y marcaje radioactivo se conoce la especificidad de unión, la afinidad y vida media de cada uno de los NE relacionados al receptor GABA_A.^{14,37} Conductualmente, estos NE favorecen la aparición del síndrome premenstrual, inducen sueño, disminuyen la ansiedad, son anestésicos y tienen efectos antiepilépticos.⁴⁰

Antagonistas GABAérgicos: este grupo es representado por los pregnanosulfatados: el SP y el DHEAS. Los estudios microfisiológicos han permitido observar que ambos NE bloquean totalmente en forma reversible las corrientes de Cl⁻; 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 NE¹⁶. Sin embargo, el SP tiene un comportamiento bimodal: es un agonista GABA_A, como la Alop, a concentraciones pequeñas, pero a concentraciones fisiológicas (μ M) es el más potente NE antagonista GABAérgico, además de que funciona como un potente agonista glutamatergico de tipo NMDA;²⁶ 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 antagonicas entre si 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 glutamatergicos.

Neurotransmisión glutamatergica

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-

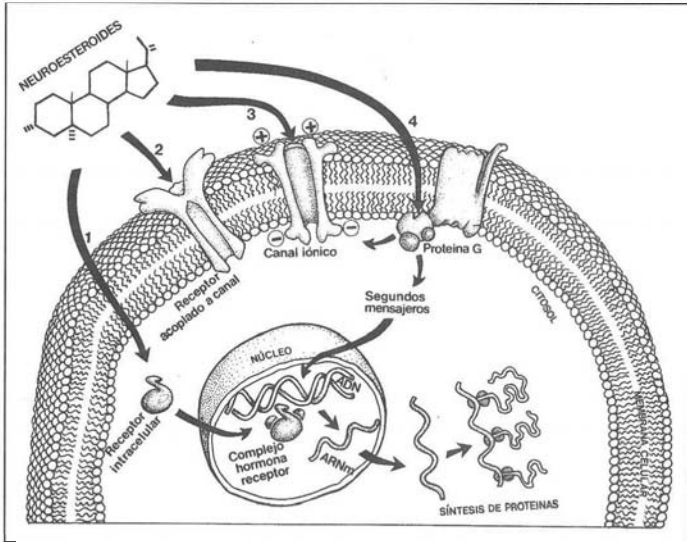


Figura 3 Efectos genómicos y no genómicos de los NE. La activación de los NE depende de reconocimiento de proteínas en diferentes sitios: 1) RECEPTORES TRANSCRIPCIÓN que reconocen el AON celular y modificar la transcripción y traducción de la célula; este mecanismo de acción tiene latencias y duraciones largas (horas, días, meses, etc). 2) RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES ACOPLADOS A CANAL, cuyos ciclos a corto plazo (segundos a minutos) se relacionan no genómicos. Actúa mediante un mecanismo que reconoce mejor el ácido quiscuálico y uno más, que reconoce mejor el ácido Kaínico (KA).⁷² Existe otro tipo de receptores, asociados a proteínas G, clasificados como de tipo metabotrópico⁷¹ (Figura 3).

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 α -amino 3-hidroxi 5 metil-4 isoxazolo propiónico (AMPA), otro al ácido quiscuálico y uno más, que reconoce mejor el ácido Kaínico (KA).⁷² Existe otro tipo de receptores, asociados a proteínas G, clasificados como de tipo metabotrópico⁷¹ (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 (esperminas 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.⁷²

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

(100 μ 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.¹⁵ 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 poliaminas¹⁷ y también independiente del sitio de unión de Glu y Gly.²⁶

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^{2+} 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.¹⁸

La potencia del SP sobre las corrientes inducidas por el NMDA en neuronas de médula espinal muestran una CE50 de 60 μ M. Fisiológicamente, el SP se encuentra a bajas concentraciones en el cerebro: 12 a 19 μ M.⁴³ Lo cual sugiere que la neuromodulación 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 inhibitorio 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 α (48 KDa) y otro de tipo β (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 β -alanina, L-alanina, taurina, L-serina y prolina.⁷³ (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⁻ 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_A.³¹

El receptor de acetilcolina de tipo nicotínico en el SNC es un complejo de varias subunidades: α 1, 2 y 3, β , γ , y δ este receptor es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a canal. Al interactuar con 2 moléculas de acetilcolina, permite una corriente entrante de Na^+ y de Ca^{2+} además de una saliente de K^+ (Figura 3), lo que origina una despolarización de la célula.⁷⁴ 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 prenanos pueden interactuar en forma no competitiva con el sitio de unión de la acetilcolina al receptor.³²

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.⁴⁷

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.³³ En rebanadas de cerebro, a concentraciones fisiológicas, la progesterona inhibe el incremento de AMP^c estimulado por epinefrina.^{62,57} El β -estradiol potencia la hidrólisis

defosfatidil 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.³⁵ 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.¹³ 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 DHEA se incrementan en las primeras horas de la noche y disminuyen en las primeras horas del día.⁴⁰

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 DHEA 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, agonistas incrementan la actividad noradrenérgica.^{40,45}

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

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;⁴⁴ 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";⁴⁸ 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, se incrementan en esta fase en el bulbo olfatorio.⁷⁵ Si su síntesis se bloquea, no se da el apareamiento por falta de estimulación a este nivel;⁴⁰ c) en el humano, el GABA favorece la conducta maternal o afectiva en las primeras horas del parto, y ésta se potencia con la Alop y la THDOC.⁷⁶

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.⁴⁰ 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.³⁹ No conocemos aún la localización y características del receptor GABA_A, asociados a estos cambios; los NE agonistas al receptor GABA_A son rápidos y potentes inductores del sueño (hipnóticos);³⁸ 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 denominada 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 α -dihidro corticosterona (agonista GABAérgico) la impide.⁴⁰ Es posible que los NE-antagonistas GABAérgicos, que son potenciadores del NMDA, puedan ser "facilitadores" de la memoria (promnésicos); en roedores^m, 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 pueden 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 epilepsia

son principalmente la glutamatérgica y la GABAérgica, ambas moduladas por los NE.⁸⁸

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 prostacional del ciclo, parece haber una protección contra la hiperexcitabilidad en los procesos epilépticos; un ejemplo de lo anterior es la denominada epilepsia catamenial;⁷⁷ 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;⁴⁴ c) algunas crisis parciales infantiles son dependientes de la edad, por ejemplo, los cambios hormonales en la etapa puberal permiten disminución de las crisis.^{40,77}

La Alop es un NE cuya capacidad antiepiléptica ha sido ampliamente estudiada.^{11,12} 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 antagonicas 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).⁴⁹

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 Addison, los disturbios psiquiátricos que se observan son irritabilidad, apatía, fatiga, ansiedad, somnolencia, defectos en la memoria, etc.^{25,40,43}

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

zepin incrementaría la expresión de la 5 α -esteroide-reductasa (Figura 2), la cual es responsable de formar Alop a partir de P; este efecto también es posible por cafeína y metamphetamine. En contraste, una dieta deficiente en riboflavina reduce en el astrocito a la misma 5 α -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.⁴⁴

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.

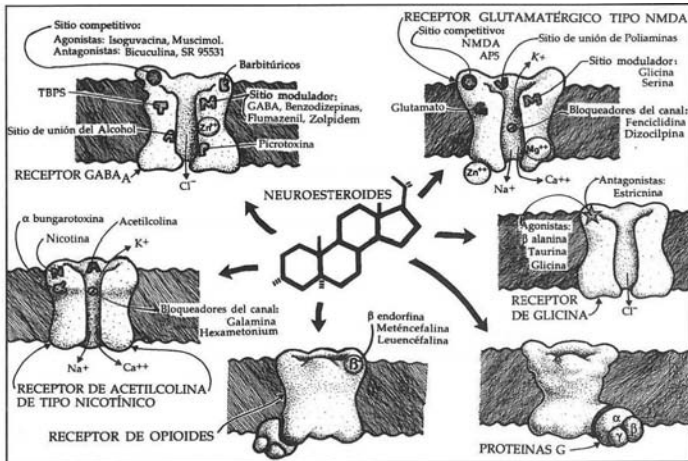


Figura 4. Los receptores de neurotransmisores acoplados a canal pueden ser reconocidos por los NE. El receptor GABA_A es hasta ahora el mejor estudiado, con diversos sitios de unión a fármacos: este receptor es modulado en forma semejante por benzodiazepinas y alop. La α es un modulador alostérico, en tanto que los otros son ligandos, SP y DHEAS, son agonistas de receptor de tipo NMDA. El receptor α naptotenc a su actividad por alop. Las proteínas G y los receptores opioides son modulados por la familia de NE, pregnanos principalmente. En la figura se muestran las corrientes iónicas moduladas por los NE: para GABA_A y glicina corrientes de Cl⁻, para el receptor nicotínico y NMDA Na⁺, K⁺ y Ca⁺⁺, así como otros derivados 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_A, 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 AON.
 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, como la inducida por Bz y barbitúrico
 Regionalización de efectos (farmacológicamente más actividad sobre el receptor GABA, que expresa las subunidades: $\alpha 3, \beta 1, \gamma 2$)

- " frecuencia de apertura del receptor/canal GABA,
- " conductancia de Cl⁻
-) unión de muscimol, Bz, barbitúricos (GABA)
-) 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 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 feromona; Hipnótico, anticonvulsivo, ansiolítico, anestésico.
- " inducción acrosomal en espermatozoides
- " la corriente de Ca²⁺ en espermatozoide
-) contracción yeyuno e ileon

Sulfato de Pregnenolona (SP)

- δ) conductancia Cl⁻ (agonista/antagonista GABA,)
- Agonista glutamatergico: " la corriente de Ca²⁺ en neurona,
- " procesos mnésicos

Istrógenos

- " respuesta a glutámico en hipocampo
- " exocitosis de neurotransmisores
- " la corriente de K⁺
- " liberación de prolactina

Andrógenos

- Frecuencia de disparo en neuronas de hipotálamo
- δ) excitabilidad de hipocampo
- " δ) corrientes neuronales de Ca²⁺

Glucocorticoides

-) descarga espontánea en hipocampo
- " δ) corrientes neuronales de Ca²⁺

" incremento
) disminución

Conclusiones

Lademostración de lasíntesis deesteroidespor 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 ocupadentro de la fisiología y lapatología se empieza a vislumbrar, y con ello las posibilidades de desarrollar nuevos fármacos con acciones anes-tésicas, ansiolíticas y antiepilépticas.

Referencias

1. Shingai R, Sutherland L, et al. Effects of subunit types of the cloned GABA_A receptor on the response to a neurosteroid. Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec. 1991;206:77-80.
2. Mellon S, Deschepper 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. Cii. Biol. 1993; 121: 135-143.
5. Wooleley 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, Jalilian H, et al. Regulation of aminobutyric acid B (GABA_A) 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. Jussofie 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 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one is a two component modulator of ligand binding to the GABA_A 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 γ -aminobutyric acid A receptor complex. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993;265: 1374-1379.
11. Tauboil E, Gjerstad L. Comparison of 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one and phenobarbitai on cortical synaptic activation and inhibition studied in vitro. Epilepsia. 1993; 34 (2): 228-235.
12. Tauboil E, Lindstrom S. The effect of progesterone and its metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one on focal epileptic seizures in the cat's visual cortex in vivo. Epilepsy Res. 1993; 14: 17-30.
13. French-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 ^3H Flunitrazepam binding suggest more than one class binding site for steroids at the GABA_A 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. Demireoren S, Majewska M, et al. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA_A 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_A 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-activestereoids: 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_A 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_A receptor. *Neurochemical Res.* 1991;16(3):347-356.
23. Nguyen Q, Saap D, et al. Modulation of GABA_A 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_A 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, Shingai R, et al. Effects of subunit types of the recombinant GABA_A 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_A and glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.* 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 X, 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 phosphoglyceride 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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in the chick fish pituitary in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991;88:2758-2762.
36. Kavaliers M. Inhibitory influences of adrenal steroids 3 α -5 α tetrahydrodeoxiocorticosterone on aggression and defeat-induced analgesia in mice. *Psychopharmacology.* 1988;95:488-492.
37. Friedman L, Gibbs T, et al. Gammaaminobutyric acid A receptor regulation: chronic treatment with pregnanolone 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_A 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 produral: 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_A 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 3 α , 21-dihydroxy-5 α -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; PP:1-13.
44. Roberts E. Pregnenolone: from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA_A receptor. *Biochem. Pharmacol.* 1995;49(1):1-16.

45. Lan N, Gee K. Neuroactive steroid actions at the GABA_A 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_A 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_A-receptor modulation. *Brain Res.* 1993;615:267-274.
53. Ciocca 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): 32-44.
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 α and 5 β 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-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D₃ - mediated rapid stimulation of intestinal calcium transport (transcaltachia). *Endocrinology*, 1990; 127:39-45.
61. Belelli D, Lan N, et al. Anticonvulsant steroids and GABA/benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex. *Neuroscience & Biobehav. Rev.* 1990.14:315-322
62. McEwen B. Non-genomic and genomic effects of steroid on neural activity. *Trends in Pharmacol. Sci.* 1991; 12: 414-146.
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. Deletion and characterization of 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 glia cells: role of intracellular signaling. *Steroid Biochem Mo Biol* 1995 5311-61.331-336
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_A and GABA_B receptors. *Neurosci Res.* 1993; 17:91-99.
68. Macdonald R, Olsen R. GABA_A receptor channels. *Ann. Rcv. Neurosci.* 1994;17:569-602.
69. Krogsgaard-Larsen P, Frolund B, et al. GABA_A receptor agonists, partial agonists, and antagonists, design and therapeutic prospects. *J. Med. Chemistry*, 1994; 37 (16): 2489-2505.
70. Walkins J, Collingridge G. Phenylglycine 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 α -reductase activity in endothelial cells from human umbilical cord vessels. *J. Steroid Biochem.* 1987;26:561-567.
77. Rosciszweska D, Buntner B, et al. Ovarian hormones, anticonvulsant drugs, and seizures during the menstrual cycles in women with epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 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 progesterins 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 progesterins on the contractility 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 rage 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 foundation symposium series. Ed. Thieme. USA, 1991.
88. **Brailowsky S, Silva-Barrat C, et al.** Elementos fisiopatológicos de las epilepsias: aportaciones recientes de la investigación experimental. 1989; *Salud Mental*; 12: 53-62.