



Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DE
LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR
GABA_A**

Tesis doctoral

Lic. María Celeste Ferreri

Instituto de Investigaciones Farmacológicas

CONICET-UBA

Director: Dra. María Clara Gravielle

Co-director: Dra. Susana Mosca

2015

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata, por la educación gratuita y de excelencia que permitió mi formación académica y profesional durante todos estos años.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme las becas doctorales que permitieron que me dedique exclusivamente a mi formación científica.

Al Instituto de Investigaciones Farmacológicas, dirigido por el Dr. Carlos Davio, por permitirme desarrollar el trabajo de investigación en sus instalaciones.

A mi Co-directora, la Dra. Susana Mosca, por aceptarme y sobre todo, ocuparse ante cualquier duda o consulta que le presentara.

A María Clara, principalmente por jugarse por una becaria mayor, con un hijo y sin experiencia. Porque más allá de las pequeñas o grandes diferencias siempre me ayudó, enseñó, comprendió, acompañó y facilitó los medios para realizar mi tesis.

A todos los compañeros del ININFA, por hacer que los días de trabajo sean tan llevaderos, por el compañerismo y por poder contar con todos cada vez que necesité una mano.

A los investigadores, por enriquecer mi formación: Silvia Wikinski, Stella Celuch, Gabriela Acosta, Irene Taravini, Roxana Peroni, Juan Ferrario, Verónica Bisagno, Carolina Ghanem y Graciela Balerio.

A los becarios, por los buenos momentos compartidos: Mercedes Odeón, Andrés Varani, Valeria Pedrón, Martín Cassanelli, María Laura Gutiérrez, Javier Muñiz, Juan Minoia, Betina González, Gimena Gómez y Sara Sanz-Blasco.

A los técnicos: Marina Galli y Fernanda De Fino, por los puchos compartidos, las orejas prestadas y las risas interminables. A Lidia Caballero por aguantar mis rabietas con las heladeras y freezers.

A Esther María, Miguel y Natalia, por mantener nuestras ratas y material del laboratorio limpio, cuidado y siempre a disposición.

A Cassa, por ayudarme siempre en forma incondicional con esa indispensable pero insoportable máquina llamada computadora.

A Merce, por tantos mates, cigarrillos, catarsis y risas.

A “La Guto”, mi compañera y nuera, por acompañarme, enseñarme, aguantarme y apoyarme siempre más allá de las diferencias.

A mis siete hermanas del alma: Ana, Vane, Mery, Lau, Marie, Maru y Andre por ser parte, durante más de 20 años, tanto de los momentos malos como los de los de diversión y disfrute.

A mis amigos biólogos: Yami, Sabi, Martín, Sil y Mari por tantos momentos hermosos compartidos en la facu.

A mi hermano, por acompañarme y compartir estos años.

A mis viejos, por enseñarme que en la vida hay que esforzarse para llegar a lo que se quiere, que nada es fácil pero que tampoco nada es imposible. Por apoyarme e incentivar me aunque no estuvieran de acuerdo con mis decisiones. A vos Ma que me acompañaste todo este tiempo desde algún lado, que estarías orgullosa de mi logro pero sobre todo te enorgullecerías por la persona que soy.

A mis suegros, por cuidar a mis hijos como si fueran los suyos.

A mi amor, Leo por acompañarme, bancarme, ayudarme, quererme, tranquilizarme y respetar mis decisiones sin objeciones.

A mis hijos, Stefi y Ren, a los cuales amo con el alma, por aguantar ausencias y nervios.

A todos y cada uno de Uds. infinitas gracias!!!!

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	12
1. Receptores GABAérgicos.....	13
2. Drogas que interactúan con el receptor GABA _A	19
2.1 Neuroesteroides.....	21
2.2 Barbitúricos.....	22
2.3 Benzodiazepinas.....	23
3. Tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas	27
4. Alteraciones del receptor GABA _A inducidas por la exposición prolongada a benzodiazepinas	30
4.1. Cambios en el número de receptores GABA _A	30
4.2. Desacoplamiento	31
4.3 Cambios en la composición de las subunidades del receptor.....	33
4.4 Modificaciones post-traduccionales del receptor.....	34
4.5. Rol de los canales de calcio activados por voltaje	36
5. Antecedentes de la línea de investigación	36
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
Objetivo general:.....	42
Hipótesis:	42
Objetivos específicos:	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Tratamientos crónicos <i>in vivo</i> con diacepam.....	46
2. Ensayos conductuales	46
2.1 Medición del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas.....	46

2.2 Medición del efecto sedativo de las benzodiazepinas.....	47
3. Cuantificación de diazepam en corteza cerebral.....	48
4. Ensayo de unión de [³ H] flunitrazepam.....	48
5. PCR cuantitativa en tiempo real.....	49
7. Inmunoprecipitación del receptor GABA _A y ensayo de <i>western blot</i>	53
8. Ensayo de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA _A	54
10. Tratamientos crónicos <i>ex vivo</i> con diazepam:.....	56
11. Análisis de datos.....	56
11.1. <i>Western blotting</i>	56
11.2 Análisis estadístico.....	56
RESULTADOS.....	57
1. Desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos y sedativos del diazepam.....	58
2. Concentraciones de diazepam en la corteza cerebral de ratas.....	63
3. Efecto de la administración crónica de diazepam sobre la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas del receptor GABA _A	64
6. Efecto de la administración crónica de diazepam sobre el estado de fosforilación del receptor GABA _A	74
7. Efecto de la exposición crónica a diazepam de neuronas de corteza cerebral en cultivo sobre la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas.....	76
7.1 La exposición crónica de neuronas de corteza cerebral a diazepam induce el desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas.....	76
7.2 Rol de la activación de CCDV-L sobre el desacoplamiento inducido por la exposición crónica a diazepam.....	78
DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	90

RESUMEN

Las benzodiazepinas se usan en la clínica como anticonvulsivantes, sedativos/hipnóticos, ansiolíticos y relajantes musculares; también producen amnesia anterógrada y son empleadas para facilitar la anestesia. El efecto terapéutico de las benzodiazepinas está mediado por la unión a un sitio específico en el receptor GABA_A. Dado que en lugar de activar directamente al receptor las benzodiazepinas actúan estimulando las acciones del GABA endógeno, exhiben un gran índice terapéutico y baja toxicidad. Sin embargo, el consumo prolongado de benzodiazepinas induce tolerancia a la mayoría de sus efectos farmacológicos.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el mecanismo molecular de tolerancia a las benzodiazepinas, realizando estudios conductuales en combinación con análisis bioquímicos. Se estudió el efecto de administraciones diarias (1 inyección subcutánea por día) con vehículo o diazepam (15 mg/kg) en ratas durante 1 (tratamiento agudo), 7 o 14 días. Los estudios conductuales se llevaron a cabo 2 horas luego de la última inyección pues es el momento donde se alcanza la máxima concentración de diazepam en el plasma y el cerebro. El efecto ansiolítico de la benzodiazepina se determinó en el test del laberinto en cruz elevado, estimándolo como un aumento en el número de entradas y en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en relación al grupo de ratas administradas con vehículo. El efecto ansiolítico persistió luego del tratamiento con diazepam por 7 días pero fue abolido luego de la administración de 14 días. De este modo, la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam se detectó solamente luego del tratamiento más prolongado. El efecto sedativo del diazepam, estimado como una reducción en la actividad locomotora en el test del campo abierto comparado con animales tratados con vehículo, se observó luego del tratamiento agudo pero no se detectó luego de los tratamientos crónicos de 7 o 14 días. Por consiguiente, la tolerancia a los efectos sedativos se detectó luego de los dos tratamientos crónicos con diazepam. Estos resultados están de acuerdo con las evidencias previas que indican que la tolerancia a las benzodiazepinas se desarrolla con diferentes cursos temporales dependiendo del efecto farmacológico.

Nuestros resultados mostraron que la concentración de diazepam en la corteza cerebral de las ratas no disminuyó luego de los dos tratamientos crónicos con la

benzodiazepina con respecto al grupo de animales que recibió el tratamiento agudo, indicando que el proceso de tolerancia no está mediado por cambios en factores farmacocinéticos.

Diversos estudios indican que la administración crónica con benzodiazepinas produce una reducción en la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, llamada desacoplamiento. A fin de investigar si la tolerancia a los efectos sedativos y/o ansiolíticos del diazepam inducida por nuestros protocolos de tratamiento está acompañada por el desarrollo de desacoplamiento, medimos la potenciación de la unión de flunitrazepam por GABA en homogenatos de membrana de la corteza cerebral de ratas tratadas con diazepam. Los dos tratamientos crónicos con diazepam de 7 y 14 días indujeron un desacoplamiento significativo, en cambio, el tratamiento agudo con diazepam no modificó el grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, indicando que el desacoplamiento es el resultado de un tratamiento crónico con benzodiazepinas. Estos resultados sugieren que la tolerancia a los efectos sedativos del diazepam está asociada al desacoplamiento. Dado que la ocurrencia de desacoplamiento precedió al desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam, el mecanismo de tolerancia a este efecto farmacológico estaría mediado por un mecanismo diferente.

Teniendo en cuenta que la acción de las benzodiazepinas está influenciada por el subtipo de subunidad α del receptor GABA_A, es posible que el mecanismo de tolerancia involucre una alteración en la composición de subunidades del receptor. Con el objeto de investigar dicha hipótesis, estudiamos el efecto de los tratamientos crónicos con diazepam sobre la expresión de las subunidades α del receptor sensibles a benzodiazepinas. Experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real indicaron que el tratamiento crónico de 14 días con diazepam pero no el de 7 días produjo un aumento en los niveles de ARN mensajero de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A. Este incremento se correlacionó con un aumento en los niveles del péptido $\alpha 1$ medido mediante ensayos de *western blot*. Ensayos de inmunoprecipitación del receptor GABA_A seguidos por análisis de *western blot* demostraron que este aumento en los niveles de la subunidad $\alpha 1$ del receptor resulta en un incremento en el porcentaje de receptores conteniendo dicha subunidad. Por lo tanto, el

desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam estaría acompañado por un cambio en la combinación de subunidades del receptor GABA_A.

En estudios previos demostramos que el desacoplamiento inducido por la exposición continua de neuronas de corteza cerebral de rata a GABA está acompañado por un aumento en la fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A en residuos serina. En este trabajo investigamos si el desacoplamiento producido por los tratamientos crónicos con diazepam está acompañado por cambios en el estado de fosforilación del receptor GABA_A. Mediante ensayos de *western blot* demostramos que los dos tratamientos crónicos de 7 y 14 días con diazepam resultaron en un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A en el residuo serina 327. Por consiguiente, estos resultados sugieren que la tolerancia a los efectos sedativos del diazepam estaría mediada por un proceso de desacoplamiento que sería el resultado de un aumento en el grado de fosforilación del receptor GABA_A.

Resultados a partir de experimentos *ex vivo* en cultivos primarios neuronales de corteza cerebral de rata demostraron que la exposición crónica (48 horas) a diazepam indujeron desacoplamiento, sugiriendo que estos cultivos representan un buen modelo para estudiar las bases moleculares de la tolerancia. El desacoplamiento fue inhibido en presencia de flumazenil, demostrando que este proceso está mediado por la unión del diazepam a su sitio de unión específico. Además, el desarrollo de desacoplamiento requiere la activación del canal de cloruro del receptor GABA_A y depende de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L. El flujo de calcio a través de dichos canales podría activar la proteína quinasa C que a su vez mediaría la fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A.

ABSTRACT

Benzodiazepines are used in the clinic as anticonvulsants, sedative/hypnotic, anxiolytic and muscle relaxant; they also produce anterograde amnesia and are used to facilitate anesthesia. The therapeutic effect of benzodiazepines is mediated by specific binding to the GABA_A receptor. Because benzodiazepines stimulate GABA actions instead of directly activate the GABA_A receptor, they exhibit a high therapeutic index and low toxicity. However, the prolonged consumption of benzodiazepines induces tolerance to most of their pharmacological effects.

The aim of the present work was to analyze the molecular mechanism of tolerance to benzodiazepines, by performing behavioral studies in combination with biochemical analyses. We studied the effect of daily administrations (1 subcutaneous injection per day) with vehicle or diazepam (15 mg/kg) to rats for 1 (acute treatment), 7 or 14 days. The behavioral studies were carried out 2 h after the last injection, at the time of peak concentration of diazepam in the plasma and brain. The anxiolytic effect of the benzodiazepine was determined in the elevated plus-maze by estimating the increase in the number of entries onto and the time spent on the open arms relative to the control group treated with vehicle. The anxiolytic effect persisted after the 7-day treatment with diazepam but was abolished after the 14-day administration. Thus, the tolerance to the anxiolytic effects of diazepam was only detected after the longer treatment. The sedative effect of diazepam, estimated as a reduction in the locomotor activity in an open field compared to animals administered with vehicle, was observed after the acute treatment but was undetectable after the 7- and 14-days treatments. Therefore, the tolerance to the sedative effects was detected after both chronic treatments. These results are in agreement with previous evidences that indicate that tolerance to benzodiazepines develops at different rates depending on the pharmacological effect.

Our results showed that the diazepam concentration in the rat cerebral cortex did not decline after the chronic treatments with the benzodiazepine relative to the group of animals that received an acute treatment, indicating that the process of tolerance is not mediated by changes in pharmacokinetic factors.

Different studies indicate that the chronic administration with benzodiazepines produces a reduction in the interaction between GABA and benzodiazepine binding sites, named uncoupling. To investigate whether the tolerance to the sedative and/or anxiolytic effects of diazepam induced by our treatment protocols is accompanied by the development of uncoupling, we measured the potentiation of flunitrazepam binding by GABA in membrane homogenates from the cerebral cortices of rats treated with diazepam. The two chronic treatments with diazepam for 7 and 14 days induced a significant uncoupling, whereas the acute treatment did not modify the degree of coupling between the GABA and benzodiazepine sites. These results suggest that the tolerance to the sedative effects of diazepam is associated with the uncoupling. Since the occurrence of uncoupling preceded the development of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam, the mechanism of tolerance to this pharmacological effect could be mediated by a different mechanism.

Because the action of benzodiazepines is influenced by the subtype of GABA_A receptor α subunit, it is possible that the mechanism of tolerance involves an alteration in the subunit composition of the receptor. To investigate this hypothesis, we studied the effect of the chronic treatments with diazepam on the expression of benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor α subunits. Quantitative real-time PCR experiments indicated that the chronic treatment with diazepam for 14 days but not 7 days produced an increase in the mRNA levels of the $\alpha 1$ GABA_A receptor subunit. This increment was correlated with an increase in the $\alpha 1$ peptide levels measured by western blotting. Receptor immunoprecipitation assays followed by western blot experiments demonstrated that this increment in the $\alpha 1$ subunit levels results in an increase in the percentage of receptors containing this subunit. Thus, the development of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam is accompanied by a change in the subunit combination of the GABA_A receptor.

In previous studies we demonstrated that the uncoupling induced by the continuous exposure of rat cerebral cortical neurons to GABA is accompanied by an increase in the phosphorylation of the GABA_A receptor $\gamma 2$ subunit at serine residues. In this work we investigated whether the uncoupling induced by the chronic treatments with diazepam is accompanied by changes in the phosphorylation state of the GABA_A receptor. We demonstrated by means of western blot assays that both chronic treatments with diazepam

resulted in an increase in the degree of phosphorylation of GABA_A receptor γ 2 subunit at serine 327. Therefore, these results suggest that tolerance to the sedative effects of diazepam is mediated by an uncoupling process that could be the result of an increase in the phosphorylation degree of the GABA_A receptor.

Results from *ex vivo* experiments performed in primary neuronal cultures from rat cerebral cortices demonstrated that the chronic exposure (48 h) to diazepam induced uncoupling, suggesting that these cultures represent a good model to study the molecular bases of tolerance. The uncoupling was inhibited in the presence of flumazenil, demonstrating that this process is mediated by binding of diazepam to its specific site. Besides, the development of uncoupling requires the activation of the GABA_A receptor chloride channel and depends on the activation of L-type voltage gated calcium channels. The calcium influx through these channels may activate the protein kinase C that could mediate the phosphorylation of the GABA_A receptor γ 2 subunit.

INTRODUCCIÓN

1. Receptores GABAérgicos

El ácido γ aminobutírico (GABA) es el transmisor inhibitorio primario en el sistema nervioso central adulto y puede activar tres clases de receptores: receptores ionotrópicos tipo A ($GABA_A$) y tipo C ($GABA_C$) y receptores metabotrópicos tipo B ($GABA_B$). Los receptores ionotrópicos pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando que incluye a los receptores de acetilcolina nicotínicos, de glicina y de serotonina 5-HT₃ (Unwin 1989); este tipo de receptores median las acciones rápidas del GABA en el cerebro (receptores $GABA_A$), y en la retina (receptores $GABA_C$). Los receptores $GABA_B$ metabotrópicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y median las acciones lentas y prolongadas del GABA en el cerebro (Mehta and Ticku 1999; Bormann 2000).

Los receptores de la familia de canales iónicos activados por ligando son heteropentámericos y están formados por subunidades homólogas que comparten la siguiente estructura común (Fig. 1): un largo dominio amino terminal extracelular y cuatro dominios transmembrana (TM), con un largo dominio intracelular entre TM3 y TM4. Los dominios TM2 de todas las subunidades forman el poro del canal (Jacob, Moss et al. 2008). Los receptores $GABA_A$ son canales iónicos permeables a los iones cloruro (Cl^-) principalmente. La unión de un agonista al receptor induce la apertura del canal permitiendo el flujo de estos iones de acuerdo a sus gradientes electroquímicos. La corriente mediada por Cl^- puede ser despolarizante o hiperpolarizante dependiendo de la actividad de los cotransportadores NKCCI (transporta iones Cl^- hacia el interior celular) y KCC2 (transporta iones Cl^- hacia el exterior celular). En el sistema nervioso inmaduro las concentraciones intracelulares de Cl^- son elevadas debidas a la actividad de NKCCI y por lo tanto las acciones del GABA son despolarizantes. En el sistema nervioso maduro la activación del receptor $GABA_A$ induce principalmente el influjo de Cl^- debido a la actividad de KCC2 que se expresa más tarde durante el desarrollo, mientras que la actividad de NKCCI es reducida (Fig. 2) (Rivera, Voipio et al. 2005). En esta última situación se produce una disminución en la probabilidad de generación de un potencial de acción debido a la hiperpolarización y a un aumento en la conductancia (*shunting inhibition*). Sin embargo, el receptor $GABA_A$ puede mediar también respuestas despolarizantes en el adulto

en ciertas condiciones fisiológicas y patológicas donde ocurre una activación intensa del receptor (Sun, Zhao et al. 2001; Timofeev, Grenier et al. 2002).

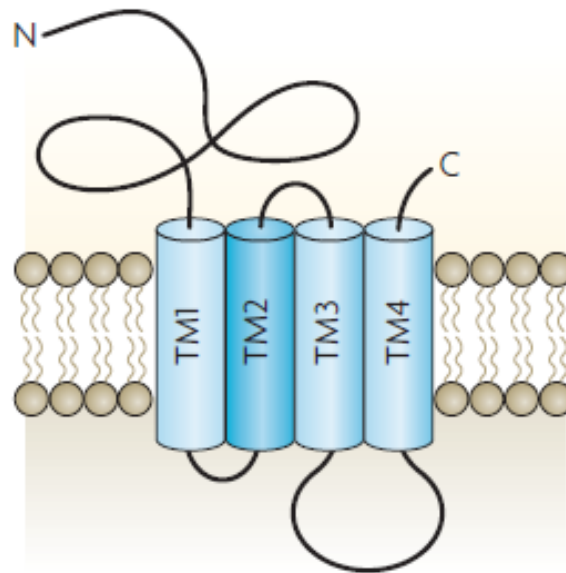
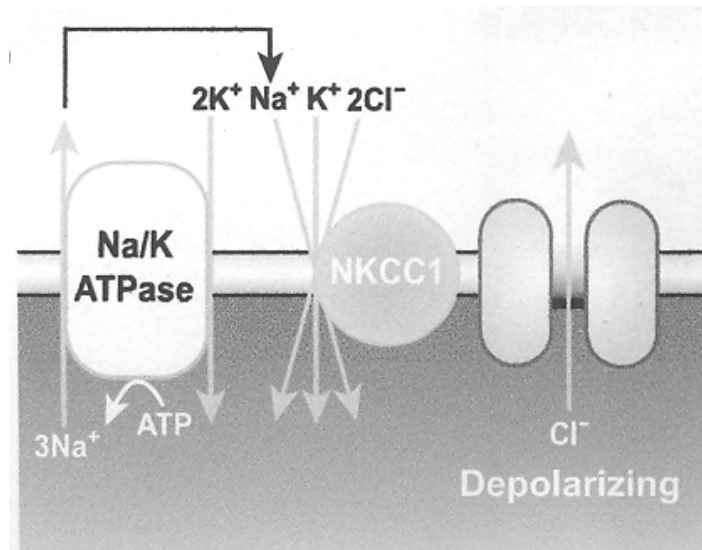


Figura 1: Estructura las subunidades del receptor GABA_A. Las subunidades del receptor GABA_A poseen cuatro pasos de transmembrana (TM1-4). El dominio TM2 de cada subunidad forma el poro del canal. El dominio intracelular ubicado entre TM3 y TM4 interacciona con proteínas que modulan la actividad de receptor.

A



B

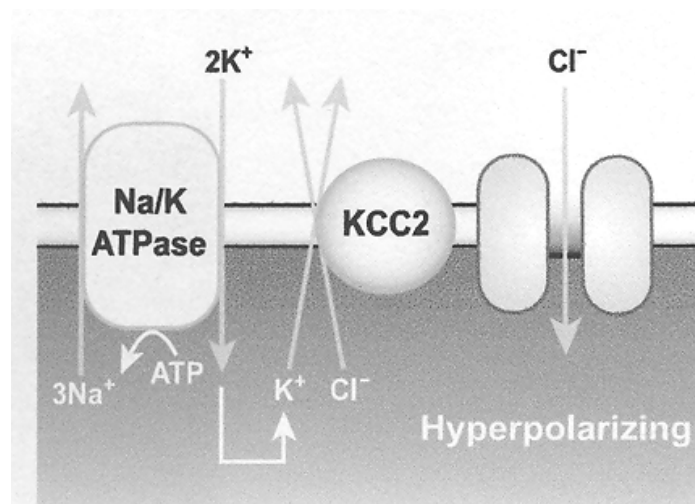


Figura 2: A Acción despolarizante del GABA en el sistema nervioso inmaduro; B Acción hiperpolarizante del GABA en el sistema nervioso maduro.

Los receptores GABA_A están formados por subunidades codificadas por 18 genes, dichas subunidades pueden ser divididas en siete clases de acuerdo a sus homologías de

secuencia: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ (1-3), θ , π , (Fig. 3). La diversidad estructural del receptor GABA_A se ve incrementada por el *splicing* alternativo de algunos de los genes de las subunidades que conforman el receptor. Sin embargo, la mayoría de los receptores GABA_A están compuestos por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ . Las subunidades δ , ϵ y π pueden reemplazar a la subunidad γ , mientras que la subunidad θ puede reemplazar a la subunidad β . Si bien la cantidad de combinaciones de subunidades posibles para la formación de los receptores GABA_A es enorme, existe un número limitado de subtipos de receptores que se expresan en las diferentes regiones del cerebro, siendo el más abundante el conformado por las subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (Fig. 4) (Whiting 2003).

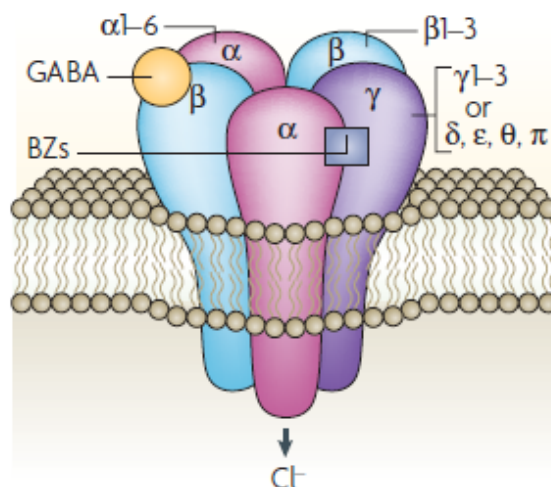


Figura 3: Estructura del receptor GABA_A . Cinco subunidades pertenecientes a distintas subfamilias se ensamblan para formar el canal heteropentamérico permeable a Cl^- . La unión a GABA se produce en la interfase entre las subunidades α y β . La unión a benzodiazepinas se produce en la interfase entre las subunidades α (1, 2, 3 o 5) y las subunidades γ .

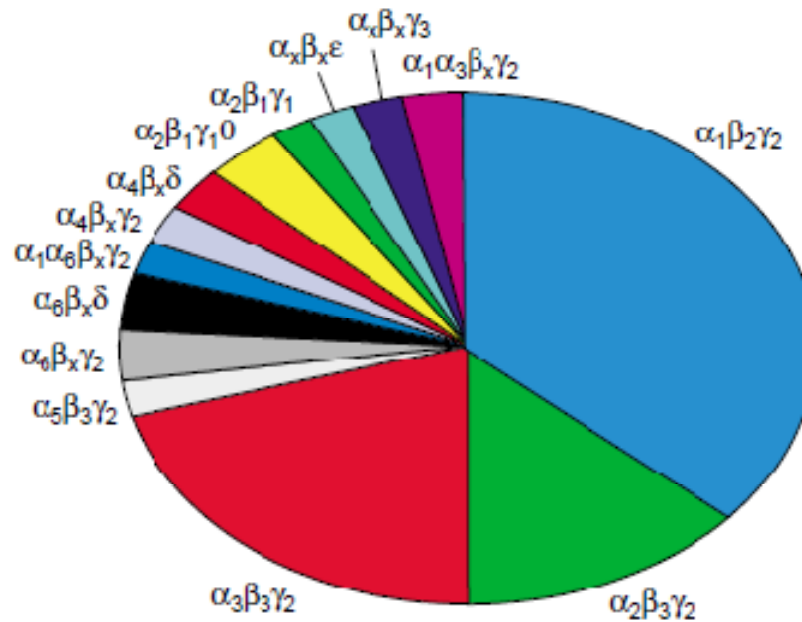


Figura 4: Representación aproximada de la abundancia de los subtipos de receptores GABA_A en cerebro de rata. El subíndice x indica que el subtipo de subunidad no es conocido. (Whiting 2003)

Las distintas subunidades presentan una distribución diferente en el sistema nervioso central (Uusi-Oukari and Korpi 2010). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridización *in situ* demuestran que las subunidades α_1 , β_1 -3 y γ_2 presentan un patrón de expresión amplio, mientras que el resto de las subunidades están localizadas en áreas restringidas del cerebro. Las subunidades α_1 , β_2 y γ_2 exhiben el mayor grado de co-localización apoyando las evidencias que indican que esta combinación de subunidades representa al subtipo de receptor más abundante en el cerebro. La subunidad α_1 está presente en casi todas las áreas del cerebro y es considerada la subunidad α más ubicua. Se encuentran niveles bajos de expresión de α_1 en el estriado, núcleo talámico reticular y la capa granular interna del bulbo olfatorio. La subunidad α_2 es más abundante en el bulbo olfatorio accesorio, capa molecular del giro dentado y CA3 del hipocampo, núcleo amigdalóide, septum, estriado, accumbens e hipotálamo. En contraste, la subunidad α_3 es predominante en el bulbo olfatorio principal (capas moleculares y plexiforme externa). La subunidad α_4 se expresa en

el tálamo, estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y giro dentado (capa molecular). La expresión de la subunidad $\alpha 5$ es alta en el bulbo olfatorio, capas internas de la corteza cerebral, núcleo endopiriforme, subculículo, cuerno de Amón y núcleo hipotalámico ventromedial. La subunidad $\alpha 6$ exhibe la localización más restringida y solo se encuentra en las células granulares del cerebelo y el núcleo coclear. La subunidad $\beta 2$ es la más abundante de las tres subunidades β en el cerebro. Las tres subunidades β se expresan ampliamente en el cerebro, especialmente en la corteza cerebral. La subunidad $\gamma 2$ es la subunidad γ más ampliamente distribuida y tiene altos niveles de expresión en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, septum, núcleos de la base e hipotálamo. Los mayores niveles de expresión de la subunidad $\gamma 1$ se encuentran en el globo pálido, sustancia nigra, septum, núcleos amigdaloides central y medial, núcleo del lecho de la estría terminal. La subunidad $\gamma 3$ se expresa escasamente en la mayoría de las regiones del cerebro, con mayores niveles de expresión en la corteza cerebral y núcleo geniculado medial. La subunidad δ está co-distribuida con la subunidad $\alpha 4$ y es más abundante en las células granulares del cerebelo, tálamo, capa molecular del giro dentado, subculículo, corteza cerebral y estriado. La subunidad ϵ se localiza en áreas pre-óptica y septal y en varios núcleos hipotalámicos. La subunidad π está presente en el hipocampo y en tejidos no neuronales, tales como el útero y ovarios. La subunidad θ exhibe un patrón restringido de expresión en neuronas monoaminérgicas y está enriquecida en el locus cerúleo (Laurie, Wisden et al. 1992; Pirker, Schwarzer et al. 2000).

Los receptores $GABA_A$ compuestos por diferentes subunidades presentan propiedades fisiológicas, farmacológicas y localizaciones subcelulares distintas (Fig. 5). La isoforma particular de la subunidad α es el principal determinante de la sensibilidad de los receptores a benzodiazepinas, principales moduladores alostéricos. Los receptores compuestos por las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, o $\alpha 5$ junto con las subunidades β y γ son sensibles a la modulación por benzodiazepinas y, exceptuando a los que contienen la subunidad $\alpha 5$, poseen una localización principalmente sináptica mediando la inhibición fásica en el cerebro. Los receptores conteniendo las subunidades $\alpha 5\beta\gamma$ están situados principalmente en regiones extrasinápticas y median la inhibición tónica. Los receptores compuestos por las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ junto con las subunidades β y δ son insensibles a la modulación por benzodiazepinas, poseen ubicación extrasináptica y median la inhibición

tónica (Jacob, Moss et al. 2008). Además, hay receptores GABA_A pre-sinápticos cuya activación regula la liberación de neurotransmisor (Engelman and MacDermott 2004).

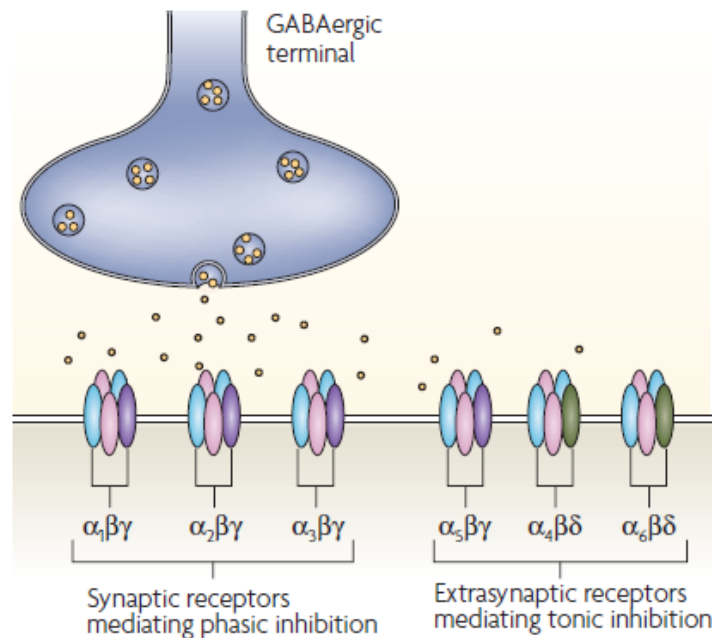


Figura 5: Localización del receptor GABA_A. Los receptores conformados por las subunidades α (1-3) junto con las subunidades β y γ poseen localización principalmente sináptica. Los receptores conteniendo las subunidades α5βγ son mayoritariamente extrasinápticos. Los receptores formados por α (4, 6) en combinación con β y δ son insensibles a las benzodiazepinas y poseen localización extrasináptica. Tomado de Jacob, Mosset *al.* 2008.

2. Drogas que interactúan con el receptor GABA_A

Los receptores GABA_A son el blanco de acción de las benzodiazepinas, medicamentos usados para tratar la ansiedad e insomnio, que poseen también efectos anti-convulsivante y relajante muscular (efecto pre-anestésico) (Bateson 2004; Balon 2013). Además de las benzodiazepinas, los receptores GABA_A son modulados por agentes anestésicos, tales como barbitúricos, alcoholes de cadena larga, esteroides neuroactivos, etomidato, propofol

y también por etanol. Las acciones de estas drogas que modulan la actividad del receptor GABA_A dependen en gran parte de la composición de subunidades del receptor con el cual interaccionan (Michels and Moss 2007) (Tabla 1).

Subunidad	Propiedades farmacológicas
$\alpha 1$	Acciones sedativas, amnésicas y anticonvulsivantes de las benzodiazepinas
$\alpha 2$	Efectos ansiolíticos y miorrelajantes (a dosis iniciales mayores) de las benzodiazepinas.
$\alpha 3$	Efectos ansiolíticos y miorrelajantes (a dosis altas) de las benzodiazepinas.
$\alpha 4$	Sensibilidad al etanol.
$\alpha 5$	Acciones amnésicas y miorrelajantes de las benzodiazepinas.
$\alpha 6$	Sensibilidad al etanol.
$\beta 1$	Sin propiedades específicas
$\beta 2$	Acción anestésica del etomidato
$\beta 3$	Acción anestésica del propofol y etomidato
$\gamma 1$	Sin propiedades específicas
$\gamma 2$	Sin propiedades específicas
$\gamma 3$	Sin propiedades específicas

δ	Sensibilidad a etanol y neuroesteroides
----------	---

Tabla 1: Propiedades farmacológicas de los receptores GABA_A conteniendo las principales subunidades. Modificado de Michels y Moss 2007.

Las características de los principales moduladores alostéricos del receptor GABA_A se describen a continuación:

2.1 Neuroesteroides

Entre los esteroides que regulan la función del receptor GABA_A se encuentra una serie de compuestos llamados neuroesteroides, los cuales son sintetizados *de novo* a partir del colesterol en el tejido nervioso (neuronas y glía) constituyendo los moduladores endógenos más potentes del receptor (Akk, Covey et al. 2007; Herd, Belelli et al. 2007).

Ciertos neuroesteroides actúan como potenciadores de la función del receptor GABA_A mientras que otros presentan función inhibitoria. Los más potentes neuroesteroides con acción potenciadora son alopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona) y tetrahydrodesoxicorticosterona (5 α -21-dihidroxi-5 α -pregnan-20-ona), mientras que los principales neuroesteroides inhibitorios son la pregnenolona sulfato y la dihidroepiandrosterona sulfato. A bajas concentraciones (nanomolares) los neuroesteroides con acción potenciadora aumentan la respuesta producida por GABA mientras que a altas concentraciones (sub- y micromolares) producen la apertura del canal en ausencia de GABA. Se identificaron residuos críticos para el aumento en la respuesta del GABA por neuroesteroides en la subunidad α y para la activación directa del receptor en la interfase entre las subunidades α y β . Por lo tanto, la acción moduladora parecería estar mediada por un sitio de unión al receptor diferente del que media la apertura directa del canal. Si bien todos los receptores GABA_A responden a los neuroesteroides, en los receptores conteniendo la subunidad δ el efecto máximo producido es mayor (Akk, Covey et al. 2007; Michels and Moss 2007). El efecto estimulador de las acciones del GABA por

neuroesteroides se manifiesta como un aumento en la frecuencia de apertura del canal y en la probabilidad de entrada del canal a estados abiertos de larga duración que ocurren naturalmente (Herd, Belelli et al. 2007).

Los niveles endógenos de neuroesteroides no son estáticos sino que sufren oscilaciones en respuesta a una variedad de condiciones tales como: desarrollo, pubertad, estrés, preñez y ciclo menstrual. Perturbaciones en las concentraciones de neuroesteroides pueden contribuir al desarrollo de desórdenes neurológicos como la epilepsia catamenial y han sido implicadas en ciertas condiciones psicológicas tales como ataques de pánico, depresión mayor, depresión post-parto, tensión pre-menstrual y esquizofrenia (Herd, Belelli et al. 2007).

2.2 Barbitúricos

El pentobarbital fue sintetizado por E. Fischer de Bayer en 1911 y fue introducido en la clínica en 1912. Los barbitúricos han sido utilizados como ansiolíticos, sedativos, hipnóticos anestésicos y anticonvulsivantes (Estes 1995; Ito, Suzuki et al. 1996). Al igual que ciertos neuroesteroides, los barbitúricos potencian el efecto de GABA a concentraciones bajas y activan el receptor directamente a concentraciones altas. Estos dos efectos son mediados por la unión a dos sitios distintos en el receptor GABA_A. La acción potenciadora de los barbitúricos se manifiesta prolongando el tiempo de apertura del canal de Cl⁻ (Mehta and Ticku 1999).

A diferencia de las benzodiazepinas, la sensibilidad de los receptores GABA_A a barbitúricos no parece depender de una composición de subunidades específica. Ha sido demostrado que receptores homoméricos conteniendo la subunidad $\beta 1$ expresados en oocitos de *Xenopus* son activados directamente por pentobarbital sugiriendo que la sensibilidad a barbitúricos no requiere la presencia de las subunidades α o γ . Sin embargo, la presencia de las subunidades δ o ϵ sustituyendo a la subunidad γ modifica drásticamente la respuesta a barbitúricos (Greenfield 2013).

2.3 Benzodiazepinas

La primera benzodiazepina, clordiazepóxido, fue sintetizada por L. H. Sternbach y L.O. Randall en 1955 y sus propiedades hipnóticas y sedativas fueron descubiertas accidentalmente dos años después (Fig. 6). Unos años más tarde una benzodiazepina más potente, el diazepam, fue introducida en la clínica. Posteriormente, numerosas benzodiazepinas y otros derivados fueron sintetizados y evaluados clínicamente (Fig. 7). Actualmente, aproximadamente 30 de estos compuestos son de uso clínico (Saari, Uusi-Oukari et al. 2011).

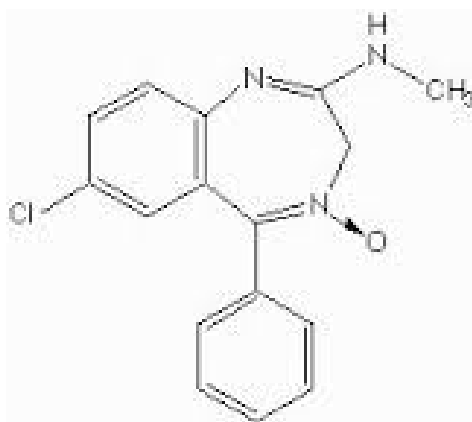


Figura 6: Estructura química del clordiazepóxido

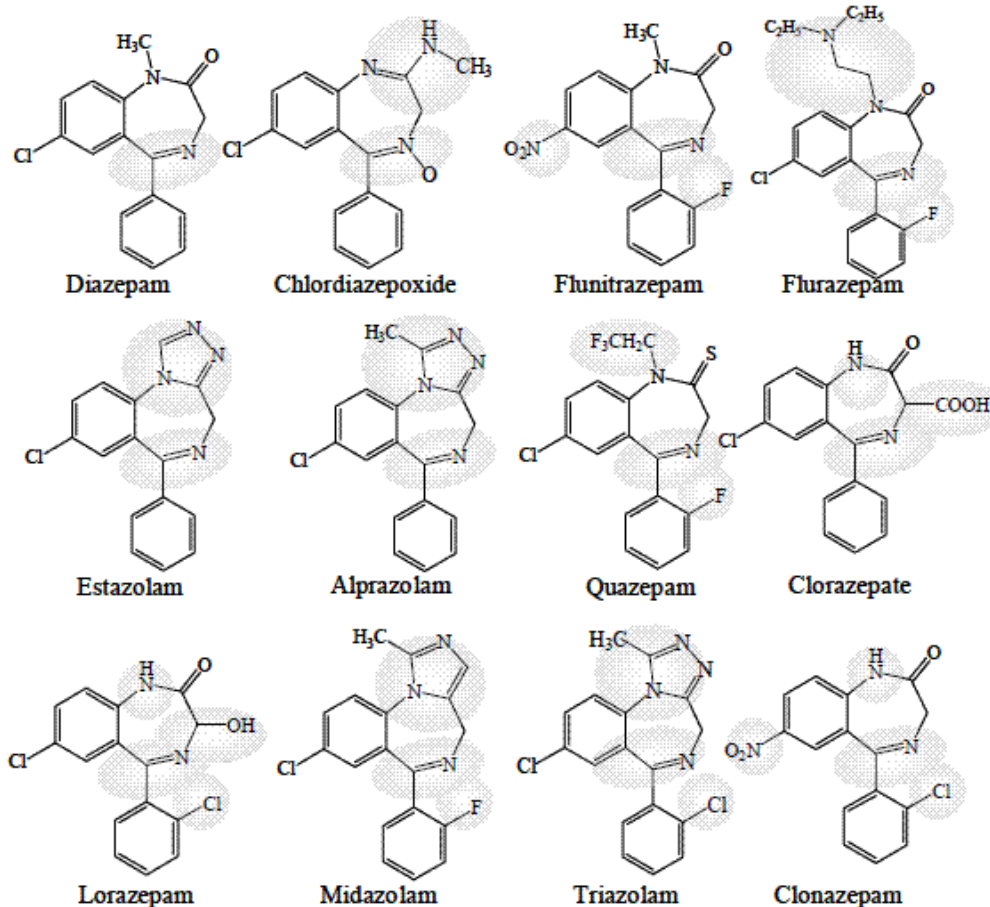


Figura 7: Estructura química de las principales benzodiazepinas

Las benzodiazepinas presentan una amplia variedad de acciones terapéuticas, incluyendo: ansiólisis, sedación, relajación muscular, inducción del sueño, y como anticonvulsivantes. Como fármacos sedantes-hipnóticos, han reemplazado esencialmente a los barbitúricos, debido a un alto índice terapéutico y baja toxicidad (Saari, Uusi-Oukari et al. 2011).

Las benzodiazepinas median su acción a través de un sitio de unión modulador (el sitio de benzodiazepina) que se encuentra en la interfase de los dominios amino terminal,

ubicados entre la subunidad α y la subunidad γ de los receptores GABA_A (Berezhnov D. 2007). Estos compuestos potencian el influjo de Cl⁻ inducido por GABA aumentando la frecuencia de apertura del canal. En contraste con los barbitúricos, la modulación del receptor GABA por benzodiazepinas es auto-limitante: la conductancia del canal en presencia de GABA y benzodiazepinas no es mayor que la conductancia inducida por altas concentraciones de GABA solo. Por otra parte, también en contraste con los barbitúricos, las benzodiazepinas no abren los canales de cloro en ausencia de GABA (Rudolph and Knoflach 2011).

Existen tres clases principales de ligandos del sitio de unión de benzodiazepinas: moduladores positivos (“agonistas”) los cuales son anticonvulsivantes y ansiolíticos, moduladores negativos (“agonistas inversos”) que son convulsivantes y ansiogénicos y moduladores neutros (“antagonistas”) que no producen efectos pero que bloquean los efectos de los moduladores positivos y negativos. Actualmente existen compuestos abarcando el espectro completo de eficacias desde moduladores positivos a moduladores negativos (Fig. 8) (Haefely, Martin et al. 1993).

Las benzodiazepinas potencian las respuestas del GABA a concentraciones no saturantes de GABA, mediante un aumento en la afinidad del neurotransmisor por el receptor. Dado que este efecto no está acompañado por un aumento en la eficacia de apertura del canal, se postuló originalmente que las benzodiazepinas actúan únicamente aumentando la afinidad de los agonistas del sitio de unión de GABA. Sin embargo, este concepto clásico ha ido cambiando ya que se demostró que “agonistas” benzodiazepínicos potencian las respuestas inducidas por concentraciones saturantes de agonistas parciales del sitio de unión de GABA y abren directamente el canal de receptores GABA_A mutantes que son espontáneamente activos (Bianchi and Macdonald 2001; Downing, Lee et al. 2005). Más recientemente, ha sido demostrado que las benzodiazepinas pueden modular positivamente la función del receptor por medio del “desplazamiento” del equilibrio entre los receptores unidos al neurotransmisor en reposo y los receptores en estado pre-activado previo a la apertura del canal (Gielen, Lumb et al. 2012).

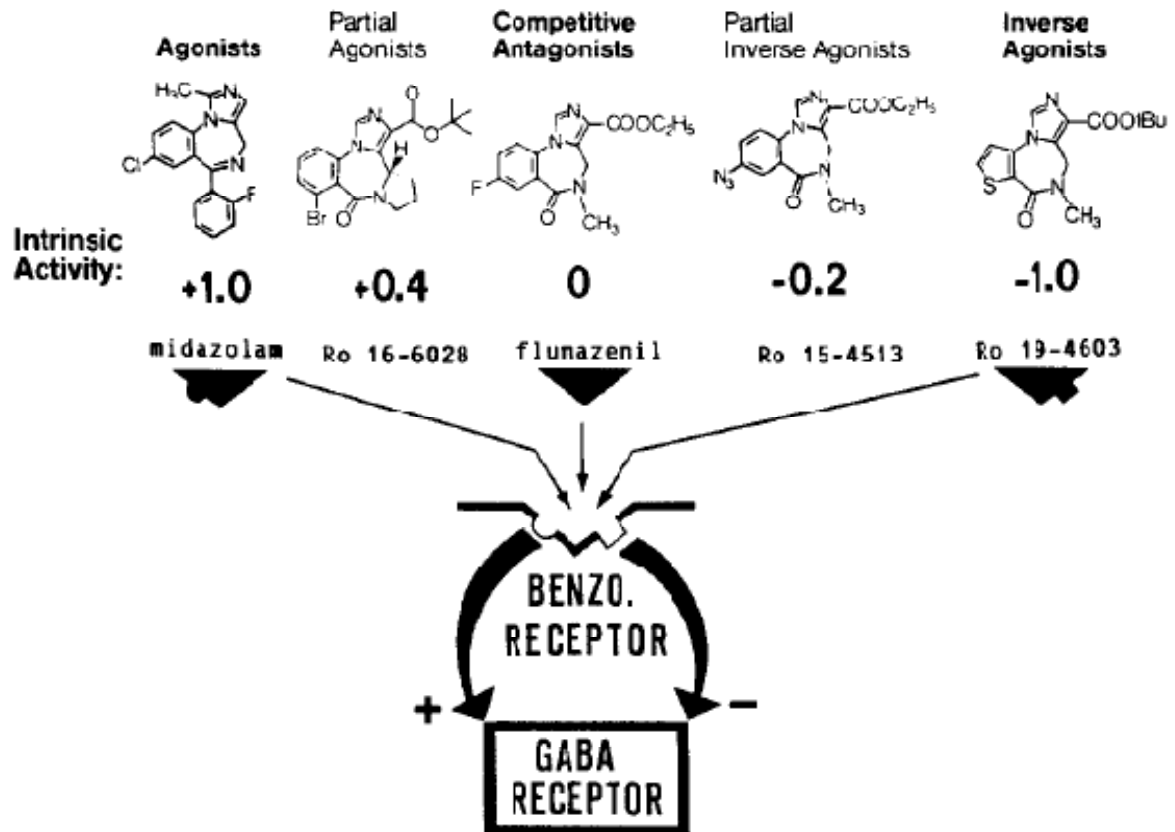


Figura 8: Ligandos del sitio de unión de benzodiazepinas en el receptor GABA_A con diferentes eficacias. Tomado de Haefely, Martin et al. 1993

La mayoría de las benzodiazepinas clásicas se unen con similar afinidad a receptores conteniendo la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ en combinación con las subunidades $\beta\gamma 2$. En contraste, varios compuestos no benzodiazepínicos que se unen al sitio de las benzodiazepinas, tales como zolpidem y zaleplon, tienen alta afinidad por receptores $\alpha 1\beta\gamma 2$ y afinidad intermedia por receptores conteniendo las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$. El zolpidem tiene afinidad muy baja por receptores conteniendo las subunidades $\alpha 5\beta\gamma 2$ (Saari, Uusi-Oukari et al. 2011).

Por otro lado, la eficacia con la cual las benzodiazepinas clásicas potencian la acción del GABA depende del subtipo de subunidad α presente en el receptor, con el siguiente orden: $\alpha 3 > \alpha 1 / \alpha 5$ (Puia, Vicini et al. 1991; Wafford, Whiting et al. 1993; Smith, Alder et al. 2001).

3. Tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas

Distintas líneas de evidencias indican la existencia de mecanismos homeostáticos que controlan la inhibición sináptica a través de cambios en el número, estructura y/o función de los receptores GABA_A postsinápticos. La actividad neuronal regula la ubiquitinación y degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma en el retículo endoplasmático, produciendo alteraciones en la expresión del receptor en la superficie celular (Saliba, Michels et al. 2007). La actividad neuronal también controla la inserción (Saliba, Kretschmannova et al. 2012) y las propiedades de difusión de los receptores GABA_A (Bannai, Levi et al. 2009) en la membrana celular. La regulación del receptor GABA_A inducida por la activación del propio receptor es también una forma de plasticidad homeostática que es relevante en condiciones fisiológicas, patológicas, de consumo de drogas y farmacológicas. En condiciones fisiológicas tales como el ciclo menstrual y preñez, en las cuales los receptores GABA_A están continuamente expuestos a altas concentraciones de alopregnanolona, se desencadena un mecanismo de tolerancia acompañado por alteraciones selectivas en las subunidades del receptor GABA_A (Turkmen, Backstrom et al. 2011). La regulación dependiente del uso de los receptores GABA_A es aún más evidente bajo ciertas condiciones patológicas. Por ejemplo, las neuronas GABAérgicas disparan a muy alta frecuencia (800 Hz) durante accesos epilépticos en gatos (Timofeev, Grenier et al. 2002). Además, se han observado alteraciones en la expresión de ciertas subunidades del receptor GABA_A durante la epileptogénesis en modelos de epilepsia en roedores (Brooks-Kayal, Shumate et al. 1998; Brooks-Kayal, Raol et al. 2009). El consumo prolongado de etanol induce tolerancia a los efectos ansiolíticos, sedativos y de incoordinación motora del etanol. Esta tolerancia está acompañada por alteraciones en los niveles de algunas subunidades del receptor GABA_A (Devaud LL 1997).

En cuanto a las benzodiazepinas, existen evidencias que indican que pacientes que consumen estas drogas crónicamente sufren diferentes trastornos tales como déficits cognitivos, problemas de coordinación motora y de memoria. Uno de los problemas más comúnmente reportado como consecuencia de la administración prolongada de estos fármacos es el desarrollo de tolerancia a sus efectos farmacológicos y dependencia (Bateson 2002). La tolerancia inducida por el tratamiento crónico con benzodiazepinas constituye un mecanismo de adaptación, y puede por lo tanto ser considerado como un ejemplo de plasticidad neuronal.

El fenómeno de la tolerancia es complejo ya que se desarrolla siguiendo diferentes cursos temporales y presenta distintos grados dependiendo del efecto farmacológico analizado. La tolerancia a los efectos sedativos se desarrolla más rápidamente que a los efectos anticonvulsivantes. En cuanto a los efectos ansiolíticos, la tolerancia no se observó en todos los modelos animales y si se observa parece manifestarse luego de un período de tiempo de administración aún más largo. Además, ha sido difícil demostrar la tolerancia a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas en humanos. Por lo tanto, se ha hipotetizado la existencia de diferentes mecanismos de tolerancia dependiendo del efecto farmacológico, o del subtipo de receptor GABA_A activado y de la región del cerebro involucrada. Es posible también que múltiples mecanismos adaptativos coexistan, lo cual complica aún más el estudio de la tolerancia a las benzodiazepinas (Bateson 2002; Vinkers and Olivier 2012).

Los distintos subtipos de subunidades α del receptor GABA_A parecen contribuir diferencialmente al desarrollo de tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas. Ha sido demostrado que el tratamiento crónico de ratones con diazepam, una benzodiazepina no selectiva por los receptores GABA_A conteniendo los diferentes subtipos de subunidad α , produce tolerancia a los efectos ansiolíticos, hipotérmicos y sedativos del diazepam. En ratones tratados crónicamente con bretazenil, un modulador alostérico positivo parcial no selectivo, se desarrolla tolerancia a los efectos ansiolíticos e hipotérmicos pero no a los efectos sedativos del diazepam. El tratamiento crónico en ratones con zolpidem, selectivo por receptores conteniendo la subunidad α_1 , induce tolerancia a los efectos hipotérmicos del diazepam, tolerancia parcial a los efectos ansiolíticos y ninguna tolerancia a los efectos sedativos del diazepam. Finalmente, el

tratamiento crónico con TPA023, selectivo por receptores conteniendo las subunidades $\alpha 2/3$, no produce tolerancia a los efectos ansiolíticos, hipotérmicos o sedativos del diacepam (Vinkers, van Oorschot et al. 2012). Estos resultados sugieren que el desarrollo de tolerancia a los efectos sedativos del diacepam necesita la activación conjunta de receptores GABA_A conteniendo las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 5$. Estos resultados están de acuerdo a estudios realizados con ratones modificados genéticamente en los cuales una mutación puntual en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ del receptor GABA_A resulta en insensibilidad al diacepam. En ratones salvajes y ratones con la mutación en las subunidades $\alpha 2$ o $\alpha 3$ del receptor, el tratamiento crónico con diacepam produce una gran disminución en el efecto sedativo del diacepam, medido como una reducción en la actividad motora. Los ratones con la mutación en la subunidad $\alpha 1$ no presentan ninguna modificación en la actividad motora con el tratamiento crónico con diacepam mientras que los ratones con la mutación en la subunidad $\alpha 5$ no desarrollan tolerancia a los efectos sedativos del diacepam. De este modo, estos experimentos también sugieren que la activación crónica de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 5$ es crucial para el desarrollo de tolerancia a los efectos sedativos del diacepam (van Rijnsoever, Tauber et al. 2004).

Existen evidencias sugiriendo que alteraciones farmacocinéticas no contribuyen fundamentalmente al desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas. Ha sido reportado que un tratamiento con diacepam en ratas durante 7 días indujo tolerancia a los efectos sedativos a pesar de que las concentraciones en suero de diacepam eran mayores que luego de la administración aguda (Fernandes, File et al. 1996). Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de diacepam luego de una administración aguda entre pacientes tratados previamente en forma crónica con alprazolam y pacientes no tratados, a pesar de que se observó tolerancia al efecto amnésico y sedante (Cowley, Roy-Byrne et al. 1995). El candidato más importante para mediar los cambios adaptativos producidos por el tratamiento crónico con benzodiazepinas parece ser el receptor GABA_A.

4. Alteraciones del receptor GABA_A inducidas por la exposición prolongada a benzodiazepinas

4.1. Cambios en el número de receptores GABA_A

La disminución en el número de receptores GABA_A como consecuencia de la exposición prolongada a benzodiazepinas es un mecanismo potencial de tolerancia. Si bien algunos estudios reportaron una disminución en el número de receptores GABA_A inducida por la administración crónica de fluracepam en ratas (Rosenberg and Chiu 1979; Rosenberg and Chiu 1981), se usaron concentraciones muy elevadas de benzodiazepina. En contraste, experimentos realizados en una línea celular expresando receptores GABA_A recombinantes sugieren que el tratamiento prolongado con diacepam induce un aumento en el número de receptores (Pericic, Atrac et al. 2007). Sin embargo, estos últimos resultados no fueron reproducidos cuando se estudiaron receptores GABA_A nativos. La mayoría de los trabajos indican que los tratamientos prolongados con benzodiazepinas, tanto *in vivo* (Gallager, Lakoski et al. 1984; Brett and Pratt 1995) como *ex vivo* (en cultivos neuronales, Fig. 9) (Roca, Schiller et al. 1990), no inducen cambios en el número de receptores GABA_A.

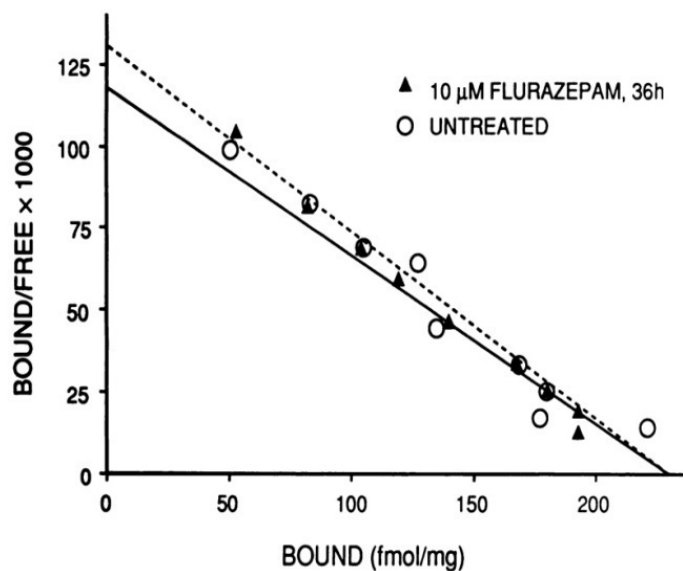


Figura 9: La exposición crónica de cultivos neuronales a fluracepam no modifica la unión máxima de [^3H]flunitracepam. Tomado de Roca, Schiller et al. 1990.

4.2. Desacoplamiento

Exposiciones prolongadas de cultivos corticales a GABA y moduladores alostéricos positivos, tales como benzodiazepinas, neuroesteroides, barbitúricos y etanol, inducen una disminución de la interacción alostérica entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas, fenómeno llamado desacoplamiento (Roca, Rozenberg et al. 1990; Roca, Schiller et al. 1990; Prasad and Reynolds 1992; Lyons, Gibbs et al. 2000) (Fig. 10). El desacoplamiento inducido por benzodiazepinas ha sido también observado en diferentes líneas celulares que expresan receptores GABA_A recombinantes. Los cursos temporales reportados varían desde minutos en células PA3 a horas en células WSS-1 (Klein, Whiting et al. 1994; Wong, Lyon et al. 1994).

Por otro lado, se ha observado que tratamientos prolongados con benzodiazepinas en roedores *in vivo* producen tolerancia a sus efectos farmacológicos junto con desacoplamiento de las interacciones alostéricas del receptor. El desacoplamiento ha sido detectado como una reducción tanto en la capacidad de las benzodiazepinas para potenciar

las acciones del GABA como en la habilidad del GABA para estimular la unión de benzodiazepinas (Gallager, Lakoski et al. 1984; Marley and Gallager 1989; Tietz, Chiu et al. 1989; Tietz, Zeng et al. 1999).

Ha sido demostrado que la administración crónica *in vivo* en ratas con flumacenil, “antagonista” del sitio de unión de las benzodiazepinas, no induce desacoplamiento mientras que el resto de los ligandos produce diferentes grados de desacoplamiento que están correlacionados con sus eficacias (Hernandez, Heninger et al. 1989).

Si bien se ha sugerido que el desacoplamiento es uno de los posibles mecanismos responsable del desarrollo de la tolerancia a las benzodiazepinas, no ha sido aún demostrado. Las bases moleculares del desacoplamiento aún se desconocen.

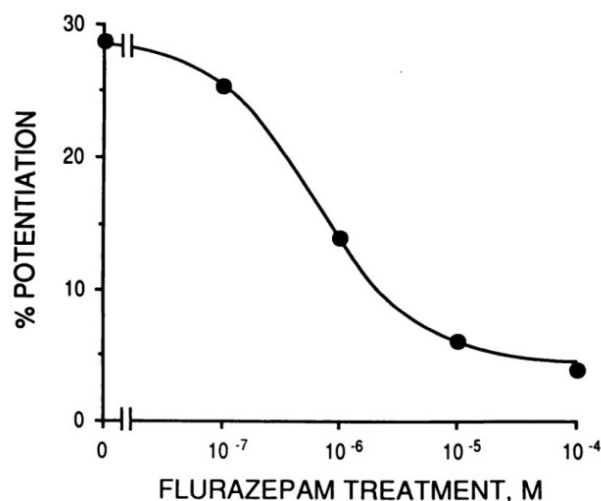


Figura 10: El tratamiento crónico con flurazepam en cultivos neuronales disminuye la potenciación de la unión de [³H]flunitrazepam por GABA en una manera concentración-dependiente. Tomado de Roca et al. 1990

4.3 Cambios en la composición de las subunidades del receptor

A pesar de que la administración prolongada de benzodiazepinas no parece inducir alteraciones en el número de receptores GABA_A, numerosos estudios demuestran que estos tratamientos producen cambios selectivos en los niveles de ARNm y proteína de las subunidades del receptor en ciertas áreas del cerebro (Uusi-Oukari and Korpi 2010). Por lo tanto, un posible mecanismo de tolerancia es un cambio en la composición de subunidades del receptor GABA_A.

Los resultados reportados son bastante confusos y parecen variar de acuerdo al tratamiento crónico empleado. Por ejemplo, ha sido demostrado que los niveles de la subunidad $\alpha 1$ en la corteza cerebral de rata disminuyen (Pesold, Caruncho et al. 1997; Chen, Huang et al. 1999), no cambian (Wu, Rosenberg et al. 1994) o aumentan (Pratt, Brett et al. 1998) dependiendo del tratamiento crónico. Además, las alteraciones en las subunidades parecen ser específicas de la región del cerebro. De este modo, ha sido descrito que la administración subcutánea de diazepam durante 21 días en rata induce una disminución en los niveles de $\alpha 1$ en el hipocampo pero no produce ninguna modificación en esta subunidad en la corteza cerebral (Wu, Rosenberg et al. 1994).

Hasta la fecha no se ha investigado directamente el efecto de la administración crónica de benzodiazepinas sobre la composición de subunidades del receptor GABA_A. Ha sido reportado que la exposición prolongada de cultivos de hipocampo de rata a flurazepam durante 24 horas induce un aumento en la degradación lisosomal de receptores GABA_A conteniendo la subunidad $\alpha 2$ luego de su endocitosis, que conduce a una reducción en la eficacia de la inhibición sináptica (Jacob, Michels et al. 2012). Estos resultados sugieren que la exposición prolongada con benzodiazepinas produce un cambio en el tráfico de receptores GABA_A selectivo con respecto al subtipo de receptor que resulta en una reducción en el número de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 2$ en la superficie celular. Por lo tanto, la exposición crónica de flurazepam resultaría en un cambio en la composición de subunidades del receptor GABA_A en la membrana post-sináptica.

4.4 Modificaciones post-traduccionales del receptor

La fosforilación de los receptores de neurotransmisores es un mecanismo potencial de plasticidad en el sistema nervioso. El bucle intracelular mayor (ubicado entre las regiones TM3 y TM4) de ciertas subunidades del receptor GABA_A puede ser fosforilado en residuos serina, treonina y tirosina por una variedad de proteínas quinasas tales como la proteína quinasa A (PKA), C (PKC), tirosina quinasa Src, Fyn y quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina tipo II (CaMKII) (Moss and Smart 1996). Las subunidades β1-3 poseen sitios de fosforilación en treonina y serina, mientras que la subunidad γ2, puede ser fosforilada en residuos treonina, serina y tirosina (Moss, Doherty et al. 1992; Jurd, Tretter et al. 2010). Un mismo residuo puede ser fosforilado por más de una proteína quinasa. En la Figura 11 se resumen los sitios de fosforilación principales del receptor GABA_A.

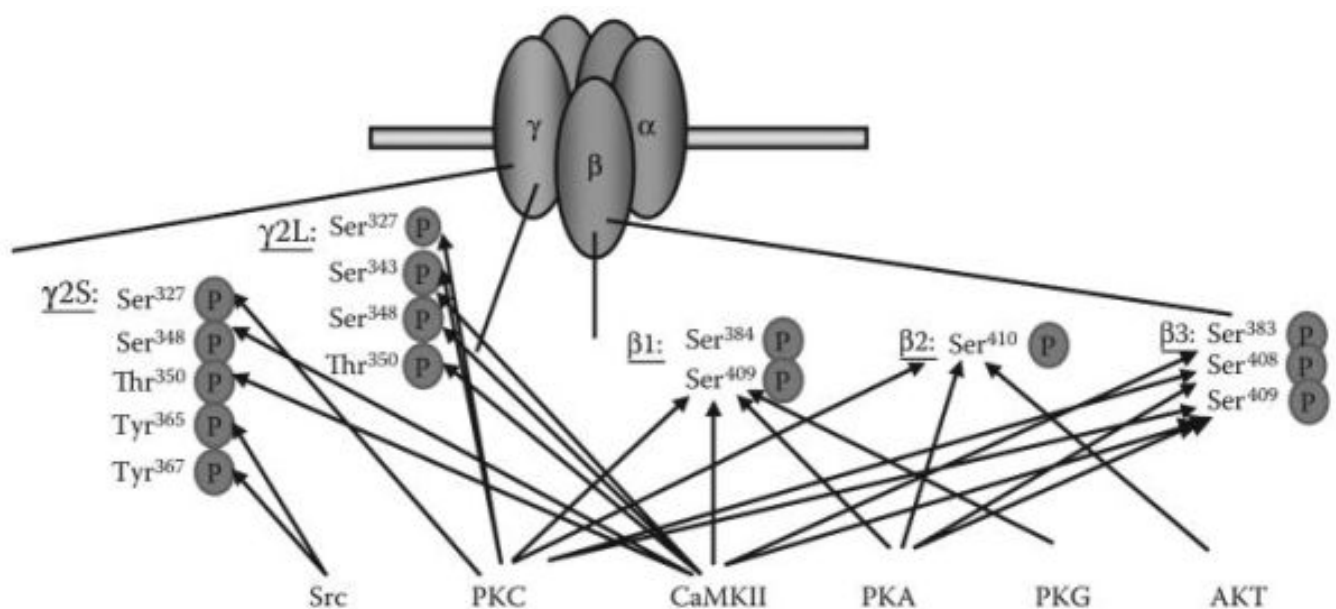


Figura 11: Fosforilación de las subunidades del receptor GABA_A. PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc; PKC: proteína quinasa dependiente de calcio; PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc; CaMKII: proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina; Src: proteína quinasa de sarcoma; AKT: proteína quinasa de serina/treonina.

Numerosos estudios han descrito que la fosforilación puede estimular o inhibir la función del receptor GABA_A dependiendo de su composición de subunidades. Por ejemplo, la fosforilación de la serina 409 de la subunidad β 1 inhibe las corrientes evocadas por GABA, mientras que la fosforilación del residuo equivalente de la subunidad β 3 estimula la actividad del receptor (McDonald, Amato et al. 1998; Houston, Lee et al. 2007; Houston, He et al. 2009).

La acción de los moduladores alostéricos del receptor GABA_A es modificada por la actividad de proteínas quinasas. Algunos estudios sugieren que la activación de PKC aumenta la estimulación por benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides de las corrientes evocadas por GABA en oocitos de *Xenopus* (Leidenheimer, Whiting et al. 1993; Leidenheimer and Chapell 1997). En contraste, resultados de otros grupos de investigación, realizados en células de tipo neuronal NT2-N, indican que la activación de PKC produce una disminución en la potencia de las benzodiazepinas para estimular la acción del GABA (Gao and Greenfield 2005). Además, ratones modificados genéticamente que carecen de PKC ϵ son más sensibles a los efectos comportamentales agudos de barbitúricos, benzodiazepinas y neuroesteroides (Hodge, Mehmert et al. 1999). Estas observaciones sugieren que PKC ϵ inhibe la regulación del receptor GABA_A por moduladores alostéricos positivos.

La fosforilación regula además el tráfico intracelular de los receptores. La endocitosis del receptor GABA_A es un mecanismo dependiente de clatrina y está mediada por la interacción de la proteína adaptadora de clatrina AP2 y las subunidades β , γ y δ del receptor. La fosforilación de ciertos residuos en el bucle intracelular de estas subunidades inhibe su interacción con AP2 y previene de este modo la internalización de los receptores aumentando el número de receptores en la membrana plasmática (Comenencia-Ortiz, Moss et al. 2014). Las vías de señalización que controlan el estado de fosforilación del receptor no se conocen completamente.

Ciertos estudios indican que el efecto de los tratamientos crónicos con benzodiazepinas sobre el receptor GABA_A está mediado por la activación de diferentes

proteínas quinasas. Experimentos de exposición crónica a diazepam en líneas celulares expresando receptores recombinantes sugieren que la activación de PKA regula la función del receptor GABA_A (Ali and Olsen 2001). Por otro lado, estudios realizados en cultivos de cerebelo indican que la activación de PKC está involucrada en la regulación de los niveles de las subunidades del receptor GABA_A inducida por la exposición a flurazepam (Johnston, Price et al. 1998). No ha sido demostrado que los efectos de la administración crónica con benzodiazepinas estén mediados por cambios en el estado de fosforilación del receptor GABA_A.

4.5. Rol de los canales de calcio activados por voltaje

La exposición prolongada a moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, tales como benzodiazepinas y etanol, y otras drogas de abuso, modulan los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CCDV) (Walter and Messing 1999; Rajadhyaksha and Kosofsky 2005). En particular, la administración crónica de benzodiazepinas potencia las corrientes de Ca²⁺ mediadas por los CCDV de tipo L (CCDV-L) en neuronas de hipocampo del área CA1 (Xiang, Earl et al. 2008). Además, la reducción en las corrientes mediadas por el receptor GABA_A inducida por la administración crónica de benzodiazepinas en hipocampo es bloqueada por inhibidores de los CCDV-L (Xiang and Tietz 2008). Estas evidencias sugieren que el mecanismo de tolerancia a las benzodiazepinas estaría mediado por vías de señalización activadas por los CCDV-L.

5. Antecedentes de la línea de investigación

La ocupación continua del receptor GABA_A por diferentes ligandos desencadena una serie de mecanismos conocidos como regulación dependiente del uso. Las bases moleculares de esta regulación dependiente de la activación de los receptores GABA_A han sido principalmente investigadas en cultivos celulares. Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la exposición de cultivos neuronales primarios de corteza cerebral de rata a GABA durante 5-10 minutos ($t_{1/2} = 3$ min) inicia un proceso que resulta

en desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas 24-48 horas más tarde ($t_{1/2} = 12$ horas) (Gravielle, Faris et al. 2005) (Fig. 12). Este proceso regulatorio ocurre en ausencia de cambios en el número de receptores GABA_A. La etapa inicial del desacoplamiento es inhibida por picrotoxina, un bloqueante del canal de Cl⁻, indicando que este fenómeno regulatorio depende de la activación del receptor GABA_A. En trabajos más recientes hemos demostrado que el desacoplamiento inducido por la breve activación del receptor GABA_A en cultivos neuronales de corteza cerebral de rata está acompañado por una disminución en el porcentaje de receptores GABA_A conteniendo la subunidad $\alpha 3$, un subtipo de receptores que exhibe el mayor grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, sugiriendo que el desacoplamiento es el resultado de un cambio en la composición de subunidades del receptor (Gutiérrez, Ferreri et al. 2014). Además, nuestros resultados indican que el desacoplamiento está mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A por PKC (Gutiérrez, Ferreri et al. 2014).

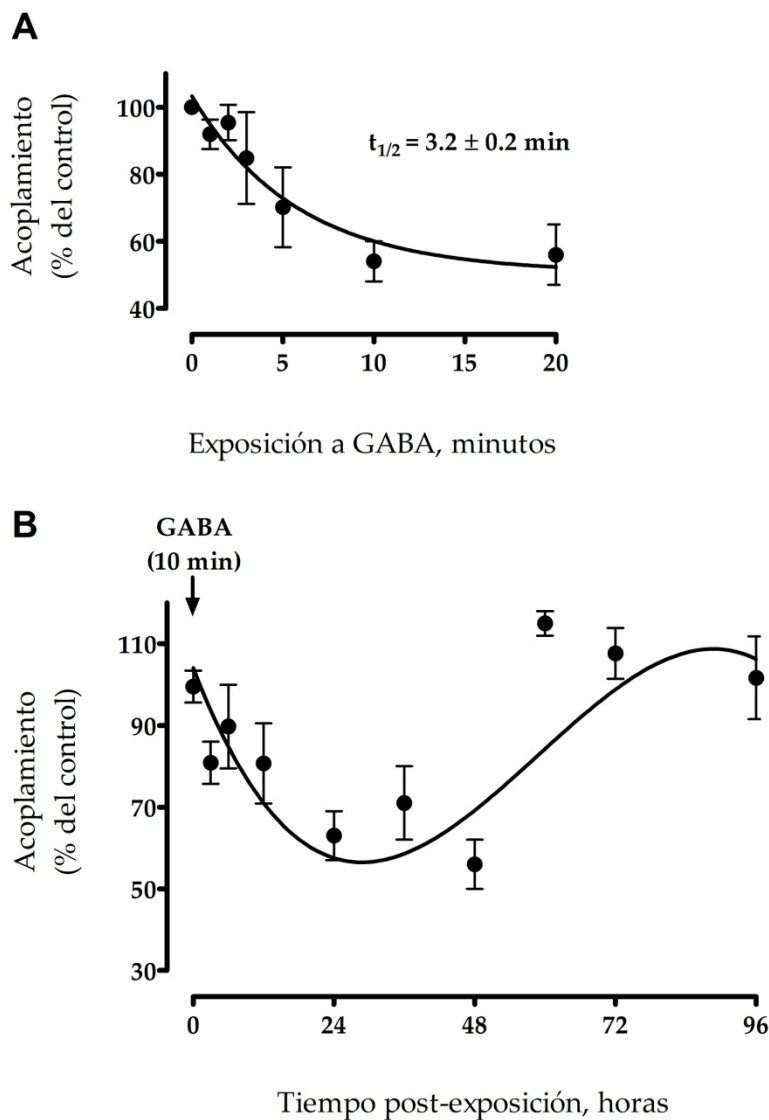


Figura 12: Curso temporal del desacoplamiento entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas inducido por una breve exposición a GABA. **A** Cultivos neuronales incubados con GABA 1 mM durante los tiempos indicados y cosechados 48 horas más tarde. **B** Cultivos incubados con GABA 1 mM durante 10 minutos y luego cosechados a los tiempos indicados. Tomado de Gravielle, Faris *et al.* 2005.

La exposición crónica de cultivos neuronales a GABA durante 48 horas también induce desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas pero a

diferencia de la exposición breve, produce además una reducción en el número de receptores GABA_A ($t_{1/2} = 24-25$ horas) (Roca, Rozenberg et al. 1990). La disminución en el número de receptores está mediada por la represión transcripcional de los genes que codifican las subunidades del receptor a través de la activación de CCDV-L (Fig. 13).

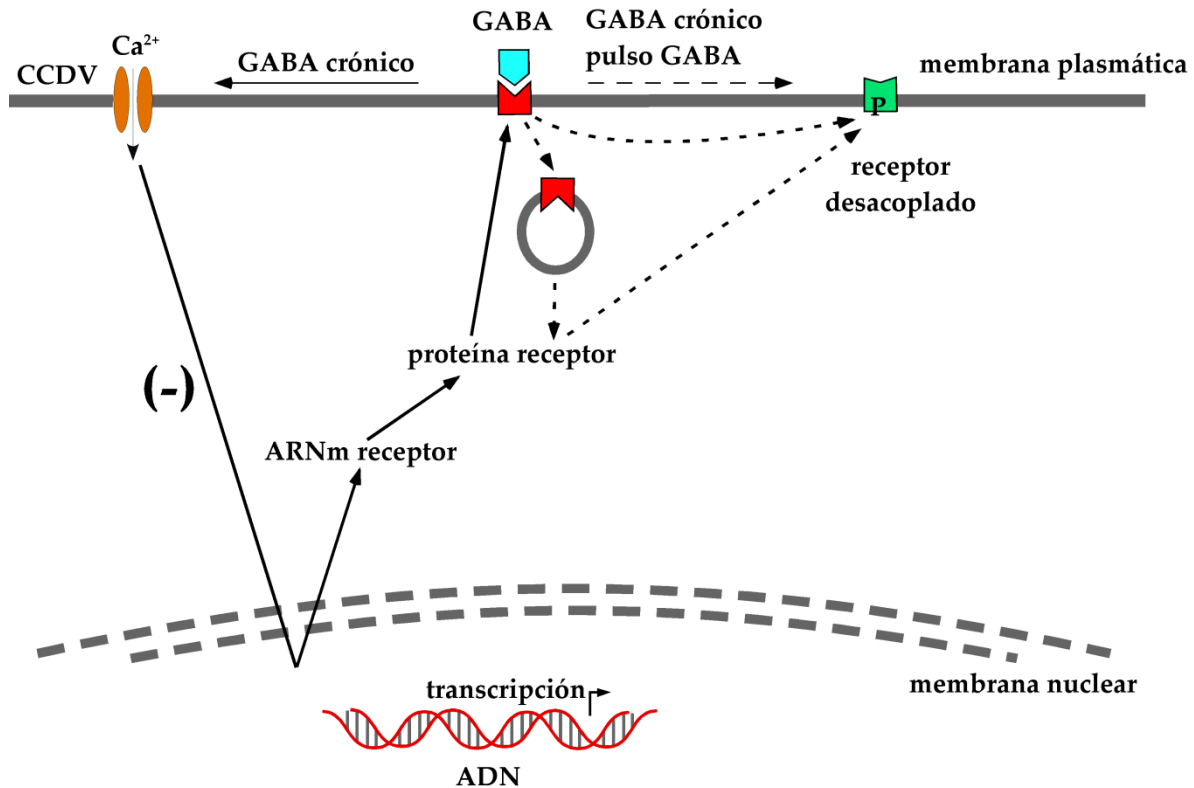


Figura 13: Mecanismo de regulación del receptor GABA_A inducida por la exposición a GABA. La exposición crónica a GABA induce desacoplamiento y una reducción en la transcripción de las subunidades del receptor GABA_A vía activación de CCDV. La exposición breve a GABA (pulso) produce sólo desacoplamiento y está acompañada por un cambio en la composición de subunidades del receptor y un aumento en la fosforilación de la subunidad $\gamma 2$.

Aunque la escala de tiempo es mucho más rápida que en experimentos con animales, los cultivos neuronales parecen representar un buen modelo para el estudio de tolerancia a

la acción de diferentes drogas. La exposición prolongada (48 horas) de neuronas en cultivo a moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, tales como benzodiazepinas, barbitúricos o neuroesteroides, produce desacoplamiento pero sin alteraciones en el número de receptores (Roca, Schiller et al. 1990). Estos resultados podrían sugerir que el desacoplamiento es parte del mecanismo de tolerancia.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general:

Numerosos trabajos han estudiado el efecto de la administración crónica de benzodiazepinas, sin embargo, muy pocos analizan en forma simultánea el desarrollo de tolerancia mediante ensayos conductuales y el mecanismo molecular subyacente.

Ha sido reportado que la administración subcutánea diaria (una inyección por día) de diazepam (15 mg/kg) en ratas (Sprague-Dawley) induce rápidamente tolerancia a los efectos sedativos mientras que se desarrolla tolerancia a los efectos ansiolíticos luego de un período más prolongado de administraciones con la benzodiazepina (Fernandes, Arnot et al. 1999). El objetivo general del presente proyecto fue dilucidar el mecanismo molecular de la tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas utilizando este modelo de administración crónica de diazepam en ratas durante 7 o 14 días. A tal fin, se llevaron a cabo en forma paralela experimentos conductuales para evaluar la tolerancia a los efectos sedativos y ansiolíticos de la benzodiazepina y experimentos bioquímicos para analizar el mecanismo molecular implicado. También se investigaron las bases moleculares de la tolerancia en un modelo *ex vivo* de cultivos neuronales tratados crónicamente con diazepam.

Hipótesis:

Se investigó la hipótesis de que el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas está mediado por diferentes mecanismos adaptivos que alteran la estructura y función del receptor GABA_A, tales como:

1) *Disminución en la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas:*

Diferentes trabajos demostraron que el tratamiento crónico con benzodiazepinas induce el desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas,

sugiriendo que este proceso es responsable de la reducción de la acción de las benzodiazepinas.

2) *Cambios en la composición de subunidades α del receptor:*

Dado que la acción de las benzodiazepinas depende del subtipo de subunidad α presente en el receptor, es posible que la tolerancia esté mediada por un cambio en el subtipo de esta subunidad.

3) *Alteraciones en el grado de fosforilación del receptor:*

La acción de distintos moduladores alostéricos del receptor, tales como benzodiazepinas y neuroesteroides, está regulada por cambios en el estado de fosforilación del receptor, por lo tanto, esta modificación post-traducciona l podría ser responsable del desarrollo de tolerancia.

Ha sido reportado que la administración crónica de benzodiazepinas estimula las corrientes de calcio mediadas por los CCDV de tipo L. Por consiguiente, se analizó en un modelo *ex vivo* de cultivos neuronales la hipótesis de que el mecanismo de tolerancia está mediado por la activación de CCDV.

Objetivos específicos:

A) Analizar el desarrollo de tolerancia a los efectos sedativo y ansiolítico del diazepam luego de tratamientos crónicos de 7 o 14 días mediante experimentos conductuales.

B) Determinar la concentración de diazepam en la corteza cerebral de ratas tratadas en forma aguda o crónica con la benzodiazepina a fin de descartar que la tolerancia esté mediada por alteraciones en factores farmacocinéticos.

C) Estudiar el efecto de la administración crónica de diazepam sobre el acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, mediante ensayos de unión de [³H]flunitrazepam ([³H]FNZ) en una fracción de membranas de corteza cerebral de rata.

D) Determinar el efecto del tratamiento crónico con diazepam sobre la composición de subunidades del receptor GABA_A en la corteza cerebral de rata. A tal fin, se estudió primero el efecto del tratamiento con la benzodiazepina sobre los niveles totales de ciertas subunidades α del receptor mediante experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real y *western blot*. Luego se investigaron cambios en el porcentaje de los distintos subtipos de receptor mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y *western blot*.

E) Investigar si el tratamiento prolongado con diazepam induce cambios en el estado de fosforilación del receptor GABA_A en la corteza cerebral de rata, mediante ensayos de *western blot*.

F) Estudiar el efecto de la exposición prolongada de diazepam sobre la función del receptor GABA_A en cultivos primarios de corteza cerebral de rata. Primero se analizó el efecto de un tratamiento con diazepam durante 48 horas sobre el acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Posteriormente, se estudió el rol de los CCDV-L sobre el desarrollo de desacoplamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tratamientos crónicos *in vivo* con diacepam

Se utilizaron ratas machos adultas (Sprague-Dawley) con un peso de 250 g al comienzo de los tratamientos. Estos animales fueron tratados durante 7 o 14 días mediante una inyección diaria subcutánea con diacepam (15 mg/kg peso, 1 ml/kg peso) o vehículo (aceite de sésamo, control). Este tratamiento está basado en estudios previos de otro grupo de investigación (Fernandes, Arnot et al. 1999). Las inyecciones subcutáneas tienen por objeto producir niveles plasmáticos más estables de diacepam que los producidos por un tratamiento de inyecciones intra-peritoneales. Con el objeto de igualar la manipulación y el número de inyecciones y para realizar los ensayos conductuales el mismo día, todos los animales recibieron un total de 14 inyecciones. Los animales se separaron en cuatro grupos experimentales que recibieron los siguientes tratamientos:

- 1) Control: 14 días de inyecciones con vehículo.
- 2) Agudo: 13 días de inyecciones con vehículo y luego 1 día de inyección con diacepam.
- 3) Crónico 7 días: 7 días de inyecciones con vehículo y luego 7 días de inyecciones con diacepam.
- 4) Crónico 14 días: 14 días de inyecciones con diacepam.

2. Ensayos conductuales

2.1 Medición del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas

Luego de dos horas de la última inyección, cuando se alcanzó la máxima concentración de diacepam en el cerebro (Fernandes, Arnot et al. 1999), se realizó el test del laberinto en cruz elevado (*Elevated plus-maze*, EPM), para la medición del efecto ansiolítico de las benzodiazepinas. Dicho test fue realizado en una sala de conducta

totalmente aislada e insonorizada a una temperatura de 20 ± 2 °C y con una intensidad lumínica de 40 lux. El EPM fue construido en madera negra y consta de 2 brazos abiertos opuestos de 40 x 10 cm y dos brazos cerrados opuestos de la misma medida con paredes de 35 cm de alto y se dispuso a una altura de 80 cm con respecto al suelo. Una cámara filmadora fue montada verticalmente por encima del laberinto y el comportamiento fue monitoreado desde un monitor en una sala adyacente. Las ratas fueron colocadas en el centro del laberinto (10 x 10 cm) enfrentando un brazo abierto, y se las dejó explorar libremente el laberinto por 5 minutos. Al final de cada prueba el laberinto fue aseado con etanol al 70%. El número de entradas y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos o cerrados, fueron recogidos por el programa Ethovision XT (Noldus). Se calcularon los porcentajes de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los mismos. Un incremento en el porcentaje de entradas y de tiempo en los brazos abiertos son interpretados como una respuesta ansiolítica (Fernandes, Arnot et al. 1999). Además, se determinaron el número total de entradas a los brazos y la distancia total recorrida. No es posible testear el grupo tratado en forma aguda con diazepam pues los animales se caen del laberinto debido al efecto sedativo de la benzodiazepina.

2.2 Medición del efecto sedativo de las benzodiazepinas

Para medir el efecto sedativo de las benzodiazepinas fue utilizado el test de campo abierto (*Open field*, OF) el cual se llevó a cabo a continuación del test en el EPM. El OF fue construido en madera con un tamaño de 1x1 m y con paredes de 1 m de altura. El ensayo fue llevado a cabo en la misma sala y bajo las mismas condiciones de temperatura e intensidad lumínica anteriormente mencionadas. Al final de cada prueba el OF fue aseado con etanol al 70%. Los animales fueron colocados individualmente en una esquina del OF y la actividad locomotora espontánea, medida como la distancia total recorrida, fue estimada durante 20 minutos mediante el programa Ethovision XT (Noldus). Una disminución en la actividad locomotora espontánea es una medida del efecto sedativo de las benzodiazepinas. También se determinó la distancia recorrida en la zona central de la arena (40 x 40 cm). Al finalizar los ensayos conductuales los animales fueron sacrificados por decapitación y las cortezas cerebrales disecadas.

3. Cuantificación de diacepam en corteza cerebral

Las determinaciones de diacepam por cromatografía líquida de alta resolución (high-performance liquid chromatography, HPLC) fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Medicina Nuclear Dr. M. Schere.

Las cortezas cerebrales de los animales tratados con vehículo (basal) o diacepam fueron homogeneizadas en ácido perclórico 0,2 N (7,5 ml/g tejido) en un homogeneizador de vidrio con émbolo de vidrio. Los homogenatos fueron centrifugados a 9.800g durante 5 min. Los sedimentos fueron descartados y el pH de los sobrenadantes fue ajustado a 5 con NaOH 5 N. Luego de una extracción líquido-líquido con diclorometano, el solvente se evaporó a sequedad y se reconstituyó la muestra en una mezcla de buffer fosfato y acetonitrilo.

Se utilizó un cromatógrafo AGILENT modelo 1100, con inyector automático y detector UV de longitud de onda variable. Se empleó una columna de fase reversa C18. La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de buffer fosfato y acetonitrilo. Se utilizó una longitud de onda de 220 nm para la detección.

Los valores de concentración se calcularon a partir de una curva de calibración donde la concentración es función de la relación entre las áreas de los picos del analito y del estándar interno, clonazepam. La curva de calibración estuvo compuesta por una muestra cero y ocho muestras con las siguientes concentraciones de diacepam: 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 y 5000 ng/ml.

4. Ensayo de unión de [³H]FNZ

El tejido fue homogeneizado en 10 volúmenes de 0,32 M de sacarosa en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón y centrifugado a 1.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 27.000 g durante 30 minutos y el nuevo sobrenadante descartado. Para los experimentos donde se estudió el efecto de un shock osmótico, el sedimento (P2) fue homogeneizado en 10 volúmenes de agua

bidestilada y centrifugado a 27.000 g durante 30 minutos. El sedimento (con o sin shock osmótico) fue homogeneizado en un *buffer* ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. En el caso de los experimentos con cultivos neuronales (ver preparación en los puntos 9 y 10), al finalizar los tratamientos con diazepam el medio fue aspirado y las células cosechadas con un rastrillo plástico con *buffer* fosfato salino (PBS). La suspensión fue centrifugada a 500 g durante 5 minutos y el sedimento fue homogeneizado con *buffer* EDTA 1 mM y PMSF 1 mM. Los homogenatos obtenidos fueron dializados toda la noche contra 1,5 l de *buffer* fosfato (4 cambios de *buffer*). La concentración de proteínas en los homogenatos fue medida por Bradford. Alícuotas de homogenato, conteniendo 100 µg de proteína, se incubaron a 0°C durante 1 hora en un volumen final de 0,5 ml de PBS conteniendo [³H]FNZ (Perkin Elmer Life Sciences) 0,01 a 20 nM en experimentos de saturación de la unión de benzodiazepinas. Para medir la potenciación de la unión de benzodiazepinas por GABA, [³H]FNZ 0,5 nM fue utilizado solo o en presencia de GABA 1 mM. La unión inespecífica fue determinada en presencia de diazepam 100 µM. La reacción se detuvo agregando 3 ml de PBS frío y filtrando inmediatamente la suspensión con vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B). Los filtros se lavaron 2 veces con 3 ml de PBS frío y la radioactividad retenida en los mismos se cuantificó mediante un contador de centelleo líquido en líquido de centelleo Optiphase Hisafe 2 (Perkin Elmer Life Sciences). Los datos del ensayo de saturación de la unión de [³H]FNZ fueron analizados por medio de regresión no lineal. El acoplamiento representa el grado de interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas y se lo estimó como porcentaje de la potenciación de la unión de [³H]FNZ por GABA, con respecto al control (tratamiento con vehículo). Se lo calculó como: (% potenciación tratado / % potenciación control) x 100. El desacoplamiento se lo calculó como: [1 - (% potenciación tratado / % potenciación control)] x 100 (Gravielle, Faris et al. 2005).

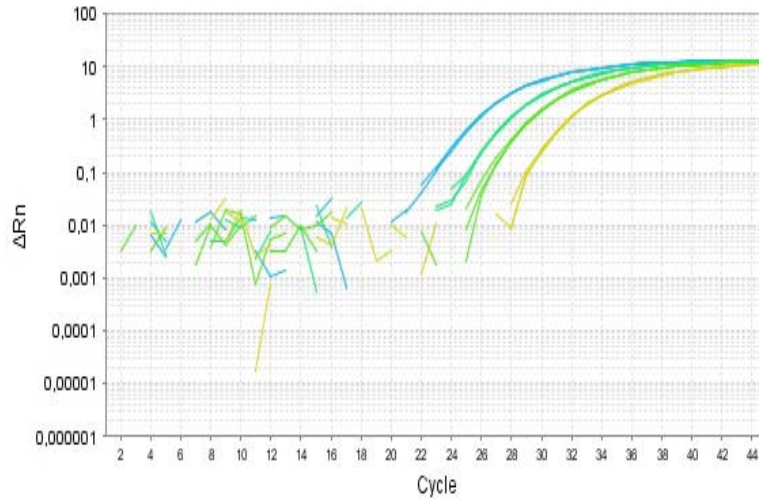
5. PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total fue extraído a partir de las cortezas cerebrales de rata utilizando un kit comercial (RNeasy midi kit, Qiagen). Los cebadores (Tecnolab) y la sonda (TaqMan,

Applied Biosystem) para la amplificación de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystem). La sonda y los cebadores para amplificar el ARN ribosomal (ARNr) 18S fueron comprados a Applied Biosystem. Las secuencias de los cebadores fueron: $\alpha 1$, 5'-CCCCGGCTTGGCAACTAT-3' y 5'-TGTCTCAGGCTTGACTTCTTTCG-3'; $\alpha 3$, 5'-CACCATGACCACCTTGAGTATCA-3' y 5'-CCGTCGCGTATGCCACTT-3'; $\alpha 5$, 5'-CAACATCACAATATTCACCAGGATCT-3' y 5'-CCCAGG CCGCAGTCTGT-3'. La secuencia de las sondas fueron: $\alpha 1$, 5'-TAAAAGTGCGACCATAGAA-3'; $\alpha 3$, 5'-TGCCAGAACTCTTTAC-3'; $\alpha 5$, 5'-CTCTTGGATGGCTATGAC-3'. Estas secuencias fueron diseñadas para amplificar la región que codifica para el bucle citoplasmático ubicados entre los dominios TM3 y TM4, un área con una secuencia de aminoácidos diferentes entre los distintos tipos de subunidades del receptor. Se utilizó un ensayo de PCR cuantitativa de un solo paso utilizando una mezcla enzimática comercial (AgPathIDTM one-step RT PCR kit, Ambion). El equipo empleado para los ensayos fue el modelo 7500 de Applied Biosystem. La curva estándar para la cuantificación relativa se realizó utilizando un rango de concentraciones de 0,1 a 4 ng/ μ l de ARN total aislado de cortezas controles tratadas con vehículo (Fig. 14). Cada reacción fue realizada por triplicado en un volumen total de 25 μ l conteniendo: la sonda para la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (250 nM), cebadores para las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (900 nM), sonda para el ARNr de 18S (50 nM) y cebadores para el ARNr 18S (50 nM). Las condiciones de incubación fueron: 45°C durante 10 minutos, 95°C durante 10 minutos seguidos por 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 45 segundos. La cantidad relativa de ARN de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ fue normalizada con respecto a la cantidad relativa del ARNr 18S (control interno) (Gravielle, Faris et al. 2005).

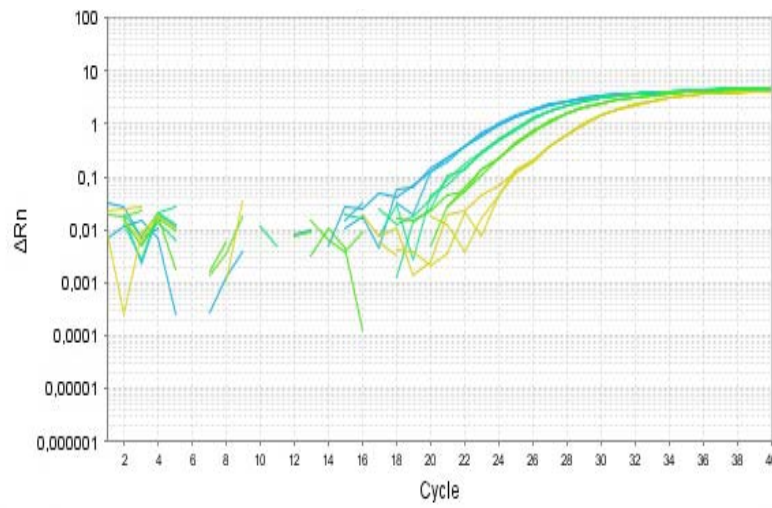
A

$\alpha 5$



B

ARNr 18 S



C

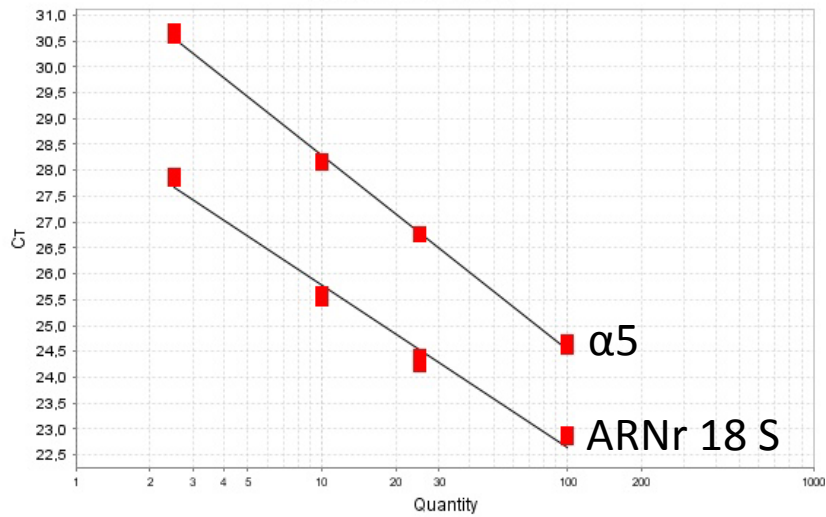


Figura 14: Experimento representativo de PCR cuantitativa en tiempo real. A) y B) Gráficos de amplificación utilizados para generar las curvas estándares. Se representa la magnitud de la fluorescencia normalizada con respecto a la referencia pasiva, en función del número de ciclo. C) Curva estándar. Se representa el ciclo umbral (Ct) en función de la cantidad inicial relativa de ARN total.

6. Cuantificación de la subunidad $\alpha 1$ total del receptor $GABA_A$ por *western blotting*.

La fracción de membrana P_2 fue obtenida como se mencionó en el punto 4 pero en este caso el sedimento fue homogeneizado en *buffer* de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) conteniendo 50 mM Tris pH 7,4, 1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 3 % Triton X-100, 0,1 % dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,5 % de deoxicolato de sodio y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche), incubado a 4°C con rotación vertical durante 30 minutos y centrifugado a 27.000 g por 30 minutos. El sedimento obtenido fue descartado. Se midió la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Bradford y la muestra (30 μ g de proteína) fue resuspendida en buffer de siembra conteniendo 5% de β -mercaptoetanol (volumen total 30 μ l), calentada durante 5 minutos a 95°C y centrifugada por 5 minutos a 2.000 g.

Las proteínas del sobrenadante fueron separadas en geles de acrilamida 10% desnaturalizante (125 mV) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (25 mV durante 2 horas). Las membranas fueron bloqueada durante 2 horas con leche descremada 5% en *buffer* Tris salino 20 mM (TBS) conteniendo 0,1% de Tween-20. Las membranas fueron luego incubadas durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo (Santa Cruz) que reconoce la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A, utilizado en una dilución 1:250. Las señales fueron detectadas incubando la membrana durante 1,5 hs a temperatura ambiente con agitación, con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo (Santa Cruz, dilución 1:2.000) acoplado a peroxidasa de rábano, mediante quimioluminiscencia (ECL detection kit, Pierce). Las membranas fueron sometidas a un tratamiento de desnudamiento ácido (*stripping*) con una solución de glicina 1 M y SDS 2% pH 2,5, e incubadas, durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo (dilución 1:500) que reconoce a actina (Sigma). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1,5 horas a temperatura ambiente, dilución 1:2.000). La señal de actina fue detectada también por quimioluminiscencia. La señal inmunorreactiva de $\alpha 1$ fue normalizada con respecto a la señal de actina.

7. Inmunoprecipitación del receptor GABA_A y ensayo de *western blot*

El sedimento de la fracción de membrana P₂ fue homogeneizado en un *buffer* deoxicolato conteniendo Tris- HCl 10 mM pH 8,5, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 0,5 %, fosfatidilcolina 0,05 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM e incubado por 20 minutos con rotación vertical a 4°C. Este *buffer* de lisis mantiene unidas las subunidades del receptor. Luego de esta incubación el homogenato fue centrifugado a 27.000 g por 30 minutos a 4°C y el sedimento se descartó (Jechlinger, Pelz et al. 1998). Se midió la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Bradford y se diluyó este lisado con *buffer* deoxicolato hasta obtener una concentración de 1 mg de proteína /ml. Con el objeto de reducir el efecto de la unión inespecífica de la proteína A-agarosa a proteínas del lisado, se realizó un paso de pre-aclaramiento mediante incubación de 500 μ l de este lisado con 20 μ l de proteína A-agarosa (Santa Cruz) durante 40 minutos a 4°C con agitación. Luego se centrifugó el lisado durante 5 minutos a 2.000 g y el sobrenadante fue incubado durante

toda la noche a 4°C con rotación vertical con 2 µg de un anticuerpo de conejo (Alpha Diagnostic) que reconoce la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A. Los inmunocomplejos fueron precipitados adicionando 20 µl de proteína A-agarosa e incubados durante toda la noche a 4°C con rotación. Las esferas de agarosa unidas al inmunocomplejo fueron precipitadas mediante centrifugación (5 minutos a 2.000 g, 4°C). Los sedimentos fueron lavados 3 veces con 500 µl de buffer deoxicolato mediante resuspensión seguida de centrifugación (Ravindran and Ticku 2006). El sedimento final fue resuspendido en 25 µl de buffer de siembra conteniendo 5% de β -mercaptoetanol y calentado por 5 minutos a 95°C para separar el inmunocomplejo de las esferas de agarosa y disociar las subunidades del receptor. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y transferidas a membranas de nitrocelulosa de la misma forma que en el punto 6. Luego del bloqueo, las membranas fueron incubadas con anticuerpos de cabra que reconocen la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ del receptor GABA_A (Santa Cruz), diluidos 1:200 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego se incubaron con un anticuerpo anti IgG de cabra (Santa Cruz), diluido 1:2.000 en solución de bloqueo, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación. La señal inmunorreactiva fue detectada por quimioluminiscencia. Luego de un proceso de desnudamiento ácido las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, dilución 1:4.000 en solución de bloqueo) durante 1,5 horas a temperatura ambiente y la señal fue detectada por quimioluminiscencia. Las bandas correspondientes a las diferentes subunidades fueron normalizadas con respecto a la señal del anticuerpo anti $\gamma 2$ utilizado para inmunoprecipitar al receptor. Se realizaron experimentos controles (controles negativos) en ausencia del anticuerpo anti subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A, para verificar la especificidad de la inmunoprecipitación, descartando la unión inespecífica de las subunidades del receptor a las esferas de proteína A-agarosa.

8. Ensayo de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A

El sedimento de la fracción de membranas P₂ fue resuspendido en *buffer* HEPES conteniendo NaCl 0,3 N, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, TritonX-100 0,1%, β -

glicerofosfato 0,5 mM, metavanadato de sodio 0,1 mM, 0,8 mM DTT y 1 mM PMSF e incubado durante 20 minutos con rotación vertical a 4°C. El lisado fue centrifugado a 27.000 g por 30 minutos a 4°C y el sedimento final se descartó. Se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford. La muestra final (30 µg de proteína) fue resuspendida en buffer de siembra (volumen final 35 µl) y calentada durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas fueron separadas en un gel de acrilamida desnaturalizante y transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió previamente. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche con un anticuerpo de conejo que reconoce a la forma fosforilada de la subunidad $\gamma 2$ del receptor (serina 327) (Abcam, dilución 1:250). Las señales inmunorreactivas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, incubación 1,5 horas, dilución 1:1.000). Para la normalización de los resultados, las membranas fueron sometidas a un tratamiento de desnudamiento ácido e incubadas con un anticuerpo que reconoce la subunidad $\gamma 2$ total (fosforilada y no fosforilada) del receptor (Millipore, dilución 1:500). Las señales fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, incubación 1,5 horas, dilución 1:1.000) .

9. Cultivos primarios

Cultivos primarios neuronales de corteza cerebral de rata (Sprague-Dawley) fueron preparados a partir de embriones de 18 días de gestación (Gravielle, Faris et al. 2005). Los cerebros totales fueron removidos, las cortezas cerebrales fueron disecadas bajo lupa y colocadas en solución Hank's fría. El tejido fue cortado con tijeras, triturado con una pipeta serológica de 5 ml y centrifugado durante 5 minutos a 500 g. El sedimento resultante fue resuspendido en 5 ml de medio de plaqueo (medio NeurobasalTM más 10 % suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y 2 mM de glutamina, Invitrogen) y triturado nuevamente con pipeta. La suspensión fue agregada al volumen final de medio de plaqueo y se sembró en placas de 100 mm (Nunc) con una cubierta de poli-L-lisina (0,1 mg/ml, Sigma) a una densidad de 0,75 cortezas por placa. Los cultivos fueron

incubados durante una hora a 37°C en 5 % CO₂ y luego el medio fue aspirado y reemplazado con medio libre de suero conteniendo suplemento B27 (Invitrogen).

10. Tratamientos crónicos *ex vivo* con diacepam:

Luego de una semana de incubación los cultivos fueron tratados con vehículo (control), diacepam (50 µM final), flumaceniil (50 µM final), flumaceniil más diacepam, nifedipina (10 µM final), nifedipina más diacepam, picrotoxina (100 µM final) o diacepam más picrotoxina durante 48 horas.

Las soluciones stocks de estas drogas fueron preparadas con dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,5 %.

11. Análisis de datos

11.1. *Western blotting*

Para la cuantificación de las bandas obtenidas se utilizó el programa Image J del *National Institute of Health* (NIH). Se utilizó la herramienta para medir densidad óptica de geles, estableciendo una región de interés rectangular.

11.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Prism 5.00 para Windows (Graph Pad Software). En todos los casos un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los datos fueron analizados mediante la prueba de *t* de Student de una sola muestra y por medio del Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía, según corresponda.

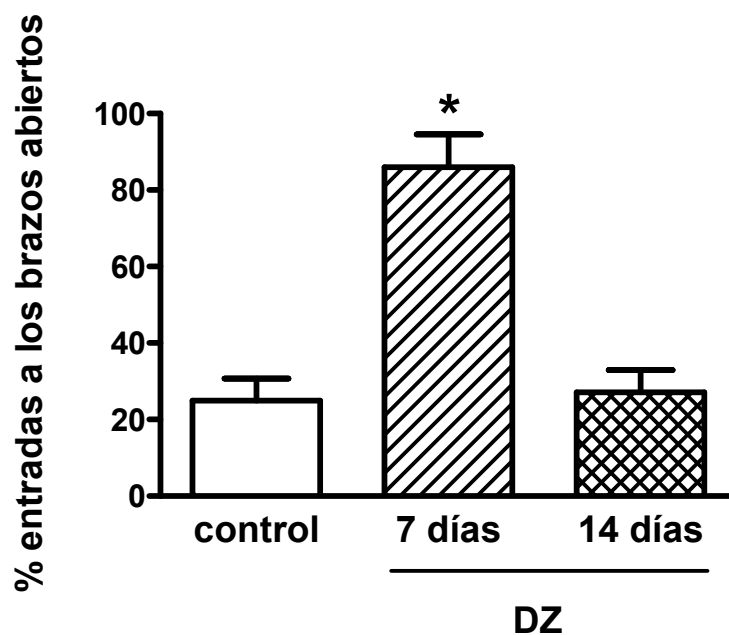
RESULTADOS

1. Desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos y sedativos del diacepam

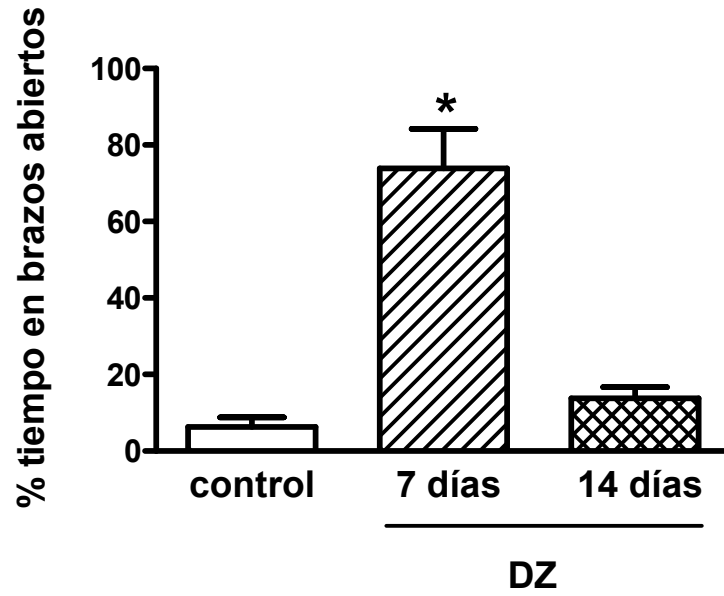
Con el objeto de investigar el efecto del tratamiento crónico con benzodiazepinas sobre las acciones sedativas y ansiolíticas del diacepam, ratas macho Sprague-Dawley fueron tratadas con inyecciones subcutáneas diarias de vehículo o diacepam (15 mg/kg, una inyección diaria) durante 1 (agudo), 7 o 14 días. Con el objeto de verificar el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos y sedativos del diacepam se estudió el efecto de estos tratamientos mediante ensayos conductuales 2 horas luego de la última inyección, momento al cual se detectó el pico de máxima concentración de diacepam (Fernandes, Arnot et al. 1999).

El efecto ansiolítico del diacepam se estimó en el ensayo del EPM. Se registraron tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto (Fig. 15).

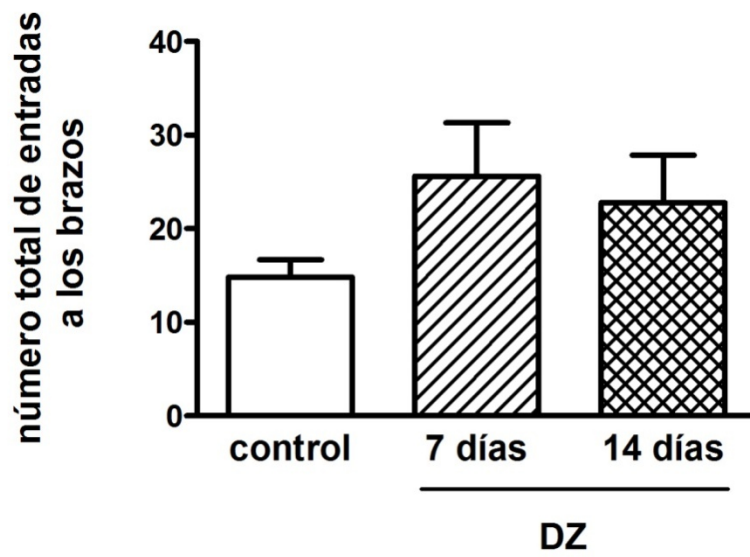
A



B



C



D

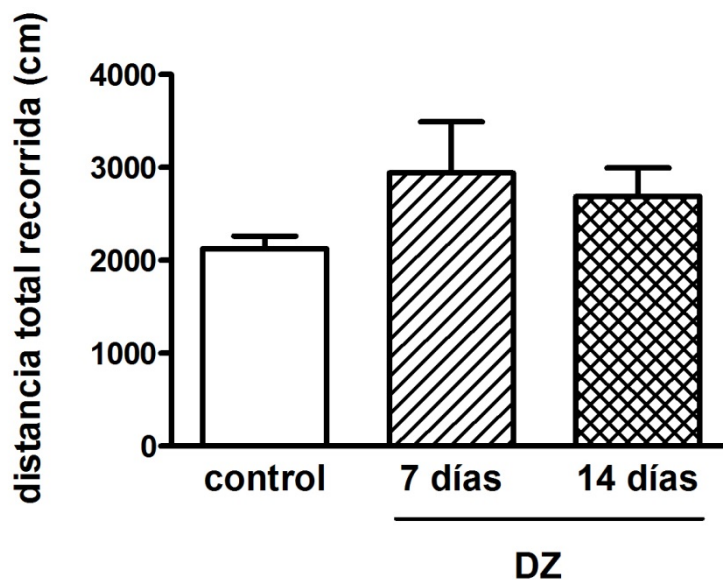


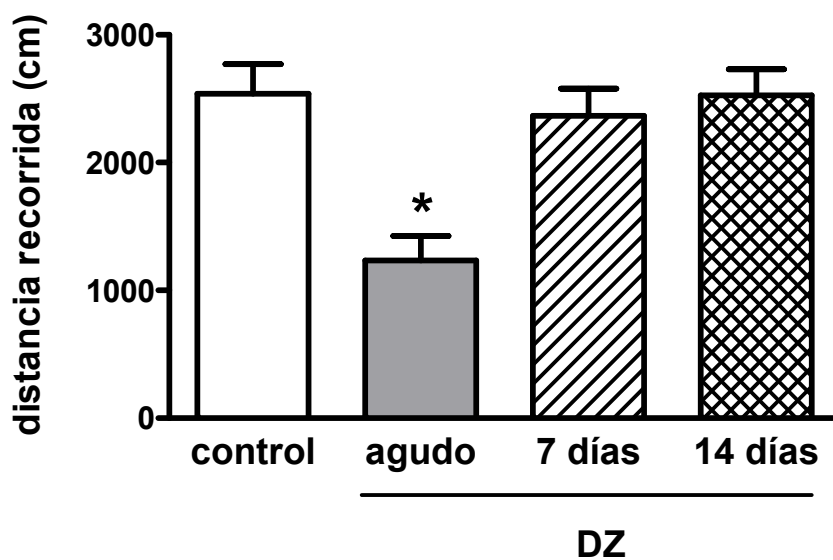
Figura 15: Laberinto en cruz elevado Los animales fueron tratados con vehículo (control) o diazepam (DZ) durante 7 o 14 días. Los resultados se expresan como: **A** número de entradas en los brazos abiertos (porcentaje con respecto al total de entradas en los brazos), **B** tiempo de permanencia en los brazos abiertos (porcentaje con respecto al tiempo total en los brazos), **C** número total de entradas en los dos brazos y **D** distancia total recorrida en el EPM. Los datos representan las medias \pm SEM de 15 determinaciones independientes. * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (ANOVA de una vía y test de Dunnett).

El efecto ansiolítico del diazepam se observó luego del tratamiento crónico de 7 días con diazepam como un aumento tanto en el número de entradas como en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto (Fig. 15 A y B). Sin embargo, este efecto no se manifestó luego de 14 días de tratamiento crónico con diazepam. Estos resultados demuestran que la tolerancia al efecto ansiolítico de esta benzodiazepina se detecta en nuestro protocolo experimental luego de 14 días de tratamiento crónico. El número total de entradas en los brazos del laberinto y la distancia total recorrida no se alteraron luego de los

tratamientos con diazepam en relación al grupo control (Fig. 15 C y D), sugiriendo la ausencia de efectos sedativos probablemente debido al desarrollo de tolerancia.

El efecto sedativo del diazepam se midió como una disminución en la actividad locomotora espontánea de la rata en el test de OF registrándose la distancia total recorrida (Fig. 16 A).

A



B

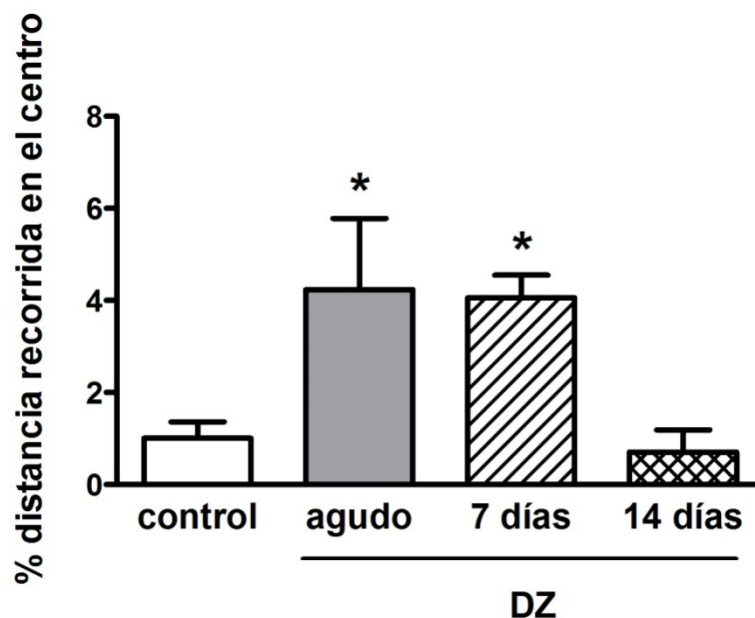


Figura 16: Test de campo abierto. Los animales fueron tratados en forma aguda o crónica durante 7 o 14 días con diazepam (DZ) o vehículo (control). Los resultados se expresan como distancia total recorrida (A) o como la distancia recorrida en el centro del OF (porcentaje con respecto a la distancia total, B). Los datos representan las medias \pm SEM de 15 determinaciones independientes. * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (ANOVA de una vía y test de Dunnett).

Los animales que recibieron una única dosis de diazepam (agudo) mostraron un clásico efecto sedativo mientras que este efecto no se observó luego de los tratamientos crónicos con diazepam de 7 o 14 días (Fig. 16 A). Estos resultados indican que la tolerancia a los efectos sedativos del diazepam se manifestó en a partir de los 7 días de tratamiento con la benzodiazepina.

El test de OF es también usualmente utilizado para medir efectos ansiolíticos o ansiogénicos. Nuestros resultados muestran un aumento en la distancia recorrida en la zona central del campo abierto luego de los tratamientos agudos y de 7 días con diazepam en

relación al grupo control, sugiriendo un efecto ansiolítico (Fig. 16 B). La ausencia de efecto ansiolítico luego del tratamiento de 14 días con diacepam demuestra nuevamente el desarrollo de tolerancia.

Por lo tanto, en los experimentos siguientes se emplearon estos tratamientos crónicos con diacepam para estudiar el mecanismo molecular de tolerancia a los efectos ansiolíticos y sedativos de las benzodiazepinas.

2. Concentraciones de diacepam en la corteza cerebral de ratas

Es posible que la tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas sea la consecuencia de cambios en la absorción, distribución, metabolismo o excreción de la droga resultando en una menor concentración de la misma en los sitios efectores. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que factores farmacocinéticos no poseen un rol importante en el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas (Cowley, Roy-Byrne et al. 1995; Fernandes, File et al. 1996). Con el objeto de investigar la posibilidad de que cambios en estos factores sean parte del mecanismo de la tolerancia, se determinó la concentración de diacepam en las cortezas cerebrales de ratas tratadas en forma aguda o crónica con diacepam (Fig. 17).

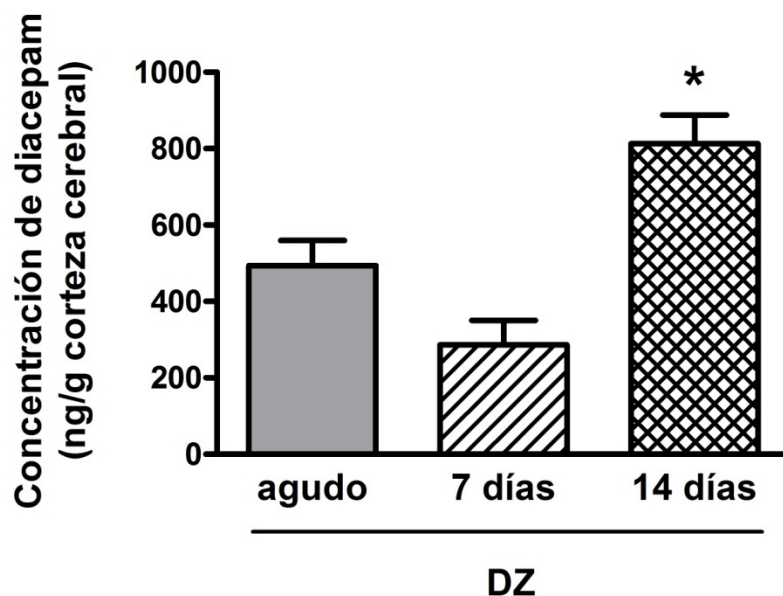


Figura 17: Concentración de diazepam en corteza cerebral. Los animales fueron tratados en forma aguda o crónica durante 7 o 14 días con diazepam (DZ) o vehículo. Los resultados se expresan como concentración de diazepam en ng/g de tejido. Los datos representan las medias \pm SEM de 3 determinaciones independientes. * Significativamente diferente del agudo y 7 días, $p < 0,05$ (ANOVA de una vía y test de Tukey).

Los resultados indican que la concentración de diazepam en la corteza cerebral fue similar en animales tratados en forma aguda y durante 7 días con la benzodiazepina. Sin embargo, el tratamiento de 14 días con diazepam resultó en una acumulación significativa de la droga en la corteza cerebral. De este modo, se descartaría que la tolerancia se deba a una disminución en la concentración de benzodiazepinas en esa región del cerebro.

3. Efecto de la administración crónica de diazepam sobre la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas del receptor GABA_A

Ha sido reportado que la exposición crónica a benzodiazepinas induce una reducción en la interacción alostérica entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas del

receptor GABA_A, fenómeno llamado desacoplamiento (Gallager, Lakoski et al. 1984; Marley and Gallager 1989; Roca, Schiller et al. 1990). El desacoplamiento ha sido detectado como una disminución en la potenciación de las acciones del GABA por benzodiazepinas o como una reducción en la estimulación de la unión de benzodiazepinas por GABA. Sin embargo, no se han realizado hasta la fecha estudios donde se analice el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas en forma paralela con la investigación de la ocurrencia de desacoplamiento.

Con el objeto de determinar si la tolerancia a los efectos sedativos y/o ansiolíticos del diazepam está asociada a un cambio en el acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, se estudió el efecto de los tratamientos crónicos de 7 y 14 días con diazepam sobre la estimulación de la unión de [³H]FNZ por GABA en homogenatos de corteza cerebral de rata (Fig. 18).

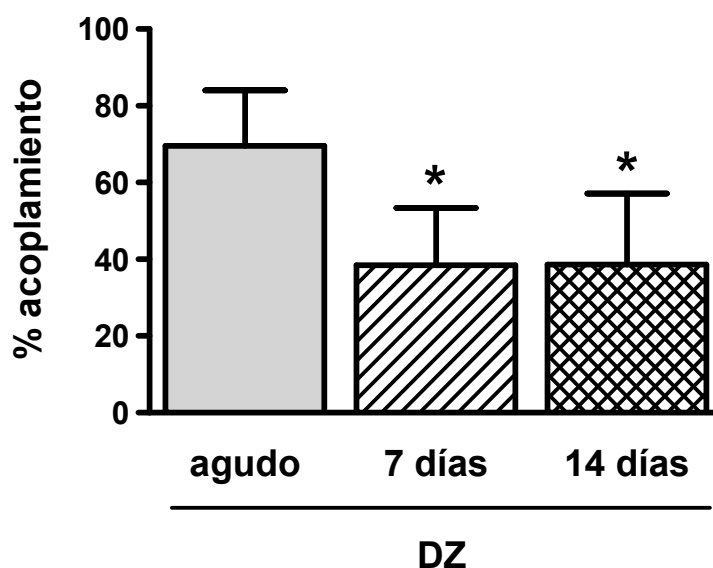


Figura 18: Efecto de la administración con diazepam sobre el grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Los animales fueron tratados en forma aguda o crónica durante 7 o 14 días con diazepam (DZ). Los resultados se expresan como porcentaje de acoplamiento con respecto al control (tratamiento con vehículo, 100 %). Los datos representan las

medias \pm SEM de 3 a 6 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 100, $p < 0,05$ (test t de Student de una sola muestra).

El tratamiento de 7 días con diacepam indujo una reducción significativa en la potenciación de la unión de FNZ por GABA, equivalente a un 60 % de desacoplamiento, que persistió luego del tratamiento de 14 días. Con el propósito de comprobar que el desacoplamiento está asociado a los tratamientos crónicos, se llevaron a cabo experimentos controles donde se estudió el efecto de una única inyección de diacepam (agudo). Los resultados de estos experimentos indican que este tratamiento no produjo un desacoplamiento significativo.

En ensayos de saturación de la unión de FNZ demostramos que ninguno de los dos tratamientos con diacepam produjo un cambio en el número o afinidad de los sitios de unión (Tabla I).

Tabla I. La exposición crónica con diacepam no tiene efecto sobre la unión de [³H]FNZ

	Unión de [³ H]FNZ	
	K _d (nM)	B _{max} (pmol/mg prot)
Control	0.37 ± 0.04	37.51 ± 3.88
7 días DZ	0.55 ± 0.07	48.10 ± 4.66
14 días DZ	0.55 ± 0.07	48.10 ± 4.66

Los animales fueron tratados con vehículo (control) o diacepam (DZ) durante 7 o 14 días. Los homogenatos de membrana fueron preparados a partir de las cortezas cerebrales. Los datos representan las medias ± S.E.M. de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Resultados obtenidos a partir de experimentos llevados a cabo en una línea celular expresando receptores GABA_A recombinantes sugieren que la exposición prolongada a diacepam induce un aumento en la internalización de los receptores en vesículas intracelulares (Ali and Olsen 2001). Dado que estos compartimentos intracelulares, los cuales están presentes en nuestras preparaciones de membrana, son permeables a las benzodiazepinas pero no al GABA, es posible que la reducción en la potenciación de la unión de FNZ por GABA observado luego de los tratamientos crónicos con diacepam sea el resultado de un incremento en la endocitosis del receptor. Con el objeto de investigar esta

posibilidad, estudiamos el efecto de un tratamiento con agua bidestilada en la preparación de membranas (shock osmótico) para lisar los compartimentos intracelulares (Tabla II).

Tabla II Efecto del shock osmótico sobre el desacoplamiento inducido por diacepam

Tratamiento	Unión de [³ H]FNZ estimulada por GABA (% acoplamiento)
Control	100
DZ	
7 días	44 ± 11 ^a
14 días	38 ± 10 ^a
Control, shock osmótico	100
DZ, shock osmótico	
7 días	42 ± 10 ^a
14 días	53 ± 9 ^a

Los animales fueron tratados con vehículo (control) o diacepam (DZ) durante 7 o 14 días. Homogenatos de membrana fueron preparados a partir de las cortezas cerebrales. Un tratamiento de shock osmótico fue realizado en algunas de las preparaciones como es indicado. El acoplamiento entre el GABA y las benzodiazepinas fue estimado como la potenciación de la unión de [³H]FNZ por GABA. Los datos representan las medias ± S.E.M. de 3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. Significativamente diferente del control: ^a p<0.05 (test *t* de *Student*)

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento no inhibió el desacoplamiento inducido por diacepam sugiriendo que este efecto no es el resultado de un proceso de internalización de receptores GABA_A.

4. La administración crónica con diacepam induce un aumento en los niveles de ARN mensajero y proteína de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A

Ha sido demostrado que la acción de las benzodiazepinas depende del subtipo de subunidad α presente en el receptor GABA_A con el siguiente orden: $\alpha 3 > \alpha 1 / \alpha 5$ (Puia, Vicini et al. 1991; Wafford, Whiting et al. 1993; Smith, Alder et al. 2001). Por lo tanto, es posible que la tolerancia sea el resultado de una disminución en el número de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 3$ y/o un aumento en el número de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 1 / \alpha 5$. Para comprobar esta hipótesis, en una primera etapa se realizaron experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real para medir el efecto de los tratamientos crónicos con diacepam sobre los niveles de ARN mensajero de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ en la corteza cerebral de rata (Fig. 19).

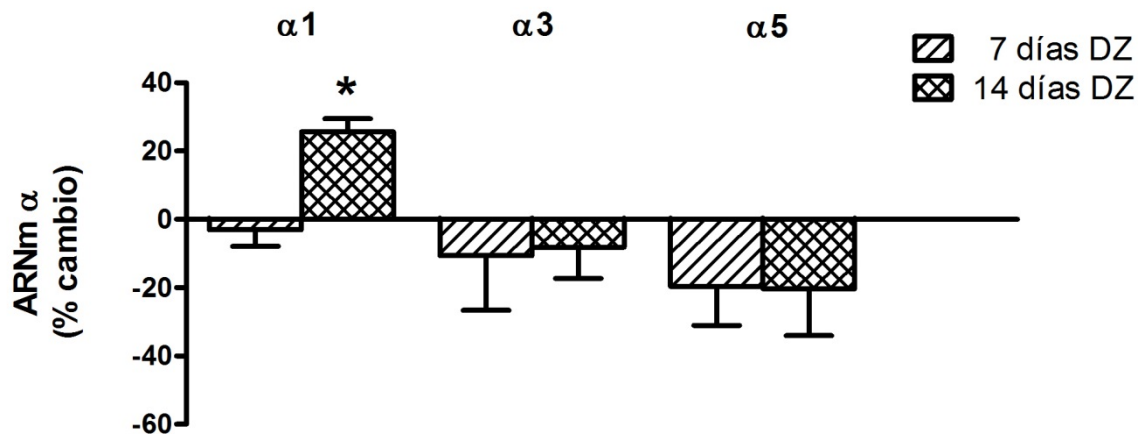


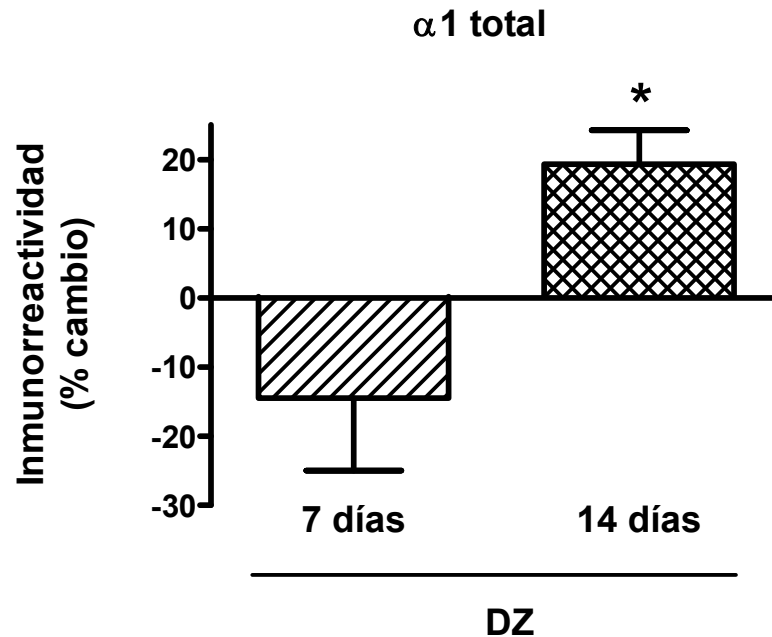
Figura 19: Efecto del tratamiento crónico con diacepam sobre los niveles de ARN mensajero de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ del receptor GABA_A. Los animales fueron tratados durante 7 o 14 días con diacepam (DZ) o vehículo (control). Los resultados se expresan como porcentaje de

cambio con respecto al control (0 %). Los datos representan las medias \pm SEM de 4 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 0, $p < 0,05$ (test t de Student de una sola muestra).

El tratamiento crónico con diazepam indujo un aumento en los niveles de ARN mensajero de la subunidad $\alpha 1$ del receptor $GABA_A$ luego del tratamiento crónico de 14 días con diazepam pero no se observó ningún cambio a los 7 días de tratamiento. No se detectaron alteraciones en los niveles de ARN mensajero de las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 5$ con ningún tratamiento.

Con el objeto de verificar que el aumento en los niveles de ARN mensajero de la subunidad $\alpha 1$ del receptor esté acompañado por el incremento en los niveles de proteína de esta subunidad, se llevaron a cabo experimentos de *western blot* (Fig. 20).

A



B

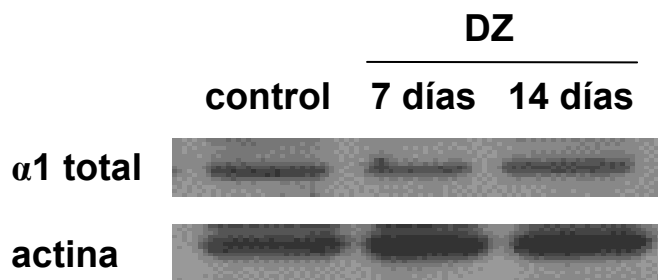


Figura 20: Efecto del tratamiento crónico con diazepam sobre la subunidad $\alpha 1$ del receptor $GABA_A$. Los animales fueron tratados durante 7 o 14 días con diazepam o vehículo (control). **A.** Los resultados fueron normalizados con respecto a los niveles de actina y se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control. Los datos representan las medias \pm SEM de 4 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 0, $p < 0,05$ (test t de Student de una sola muestra). **B.** Experimento representativo de *western blot*

Estos resultados sugieren un aumento en los niveles totales de la subunidad $\alpha 1$ del receptor $GABA_A$ que estaría asociado al desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam.

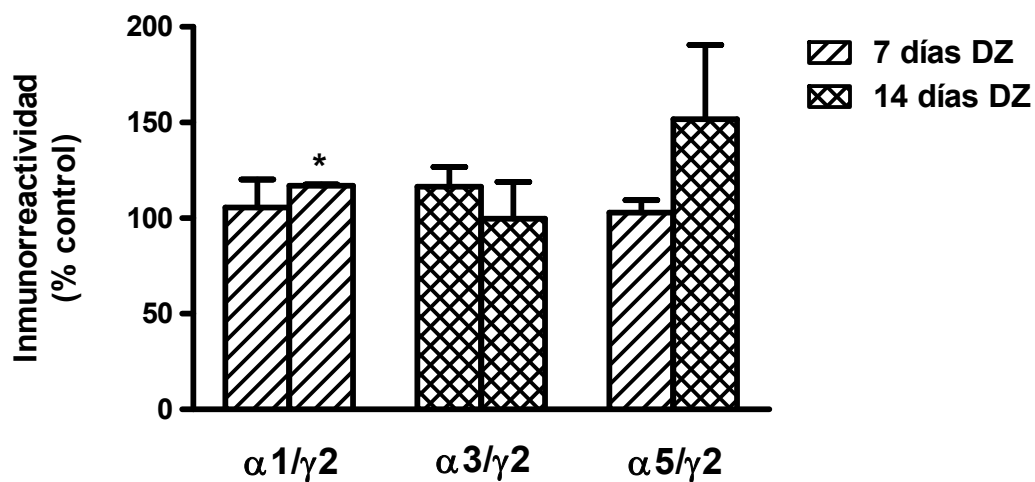
5. Cambios en la composición de subunidades del receptor $GABA_A$ inducidos por el tratamiento crónico con diazepam

Si bien existen evidencias indicando que la administración crónica de benzodiazepinas no induce cambios en el número de receptores $GABA_A$ (Gallager, Lakoski et al. 1984; Brett and Pratt 1995), ha sido reportado que este tratamiento induce alteraciones selectivas en los niveles de las subunidades del receptor (Uusi-Oukari and Korpi 2010). Sin embargo, no se ha investigado hasta el momento si el tratamiento crónico con benzodiazepinas induce cambios en la composición de subunidades del receptor $GABA_A$. Dado que nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico con diazepam produce

un aumento en los de la subunidad $\alpha 1$ del receptor, investigamos si este incremento resulta en un aumento en el porcentaje de receptores conteniendo esa subunidad mediante ensayos de inmunoprecipitación de receptores seguidos por experimentos de *western blot* (Fig. 21).

Los receptores GABA_A de la corteza cerebral de rata fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo que reconoce la subunidad $\gamma 2$, pues esta subunidad está presente en la mayoría de los receptores. El inmunoprecipitado fue analizado por medio de ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos dirigido contra las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$.

A



B

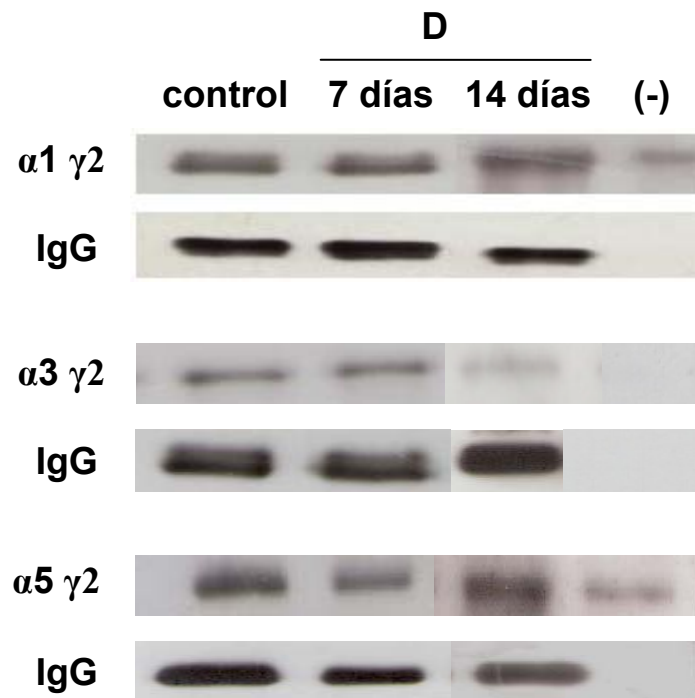


Figura 21: Efecto del tratamiento crónico con diazepam sobre la composición de subunidades del receptor GABA_A. Los animales fueron tratados durante 7 o 14 días con diazepam (DZ) o vehículo (control). **A.** Los resultados normalizados (con respecto a los niveles de IgG utilizada en la inmunoprecipitación) se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control (100 %). Los datos representan las medias \pm SEM de 3 a 6 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 100, $p < 0,05$ (test *t* de Student de una sola muestra). **B.** Experimento representativo de *western blot*. (-) Control negativo (inmunoprecipitación en ausencia de anticuerpo anti $\gamma 2$).

En concordancia con el aumento en los niveles de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A inducido por el tratamiento crónico de 14 días con diazepam, se observó un aumento en el porcentaje de receptores conteniendo $\alpha 1$ como resultado de este tratamiento. En contraste, no se observó ningún cambio en la proporción de receptores GABA_A compuestos por la subunidad $\alpha 1$ luego del tratamiento de 7 días con la benzodiazepina. Tampoco se observaron alteraciones en el número de receptores conteniendo las

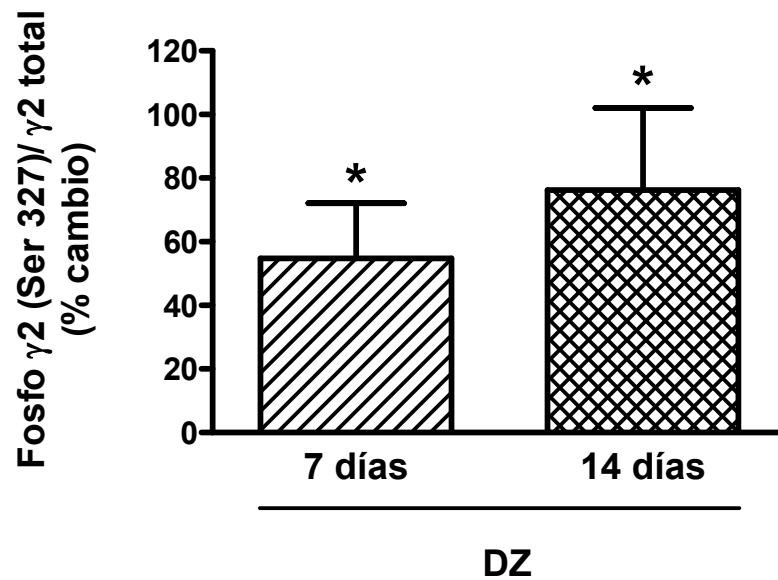
subunidades $\alpha 3$ o $\alpha 5$ con ninguno de los dos tratamientos crónicos. Estos resultados sugieren que la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diacepam estaría acompañada por un aumento en la subunidad $\alpha 1$ del receptor como así también en el porcentaje de receptores $GABA_A$ conteniendo dicha subunidad.

6. Efecto de la administración crónica de diacepam sobre el estado de fosforilación del receptor $GABA_A$

Resultados a partir de experimentos realizados con líneas celulares expresando receptores $GABA_A$ recombinantes sugieren que la exposición crónica a benzodiazepinas conduce a la activación de diferentes proteínas quinasas (Johnston, Price et al. 1998; Ali and Olsen 2001).

Estudios realizados por nuestro grupo en cultivos primarios de corteza cerebral de rata, demuestran que el desacoplamiento inducido por la activación continua del receptor $GABA_A$ por GABA está acompañado por un incremento en el estado de fosforilación de residuos serina de la subunidad $\gamma 2$ (Gutierrez, Ferreri et al. 2014). En el presente trabajo se investigó si los tratamientos crónicos con diacepam producen cambios en el estado de fosforilación del residuo serina 327 de la subunidad $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$ en la corteza cerebral de rata pues es uno de los principales residuos serina susceptibles de fosforilación de dicha subunidad. A tal fin, se efectuaron ensayos de *western blot* (Fig. 22).

A



B

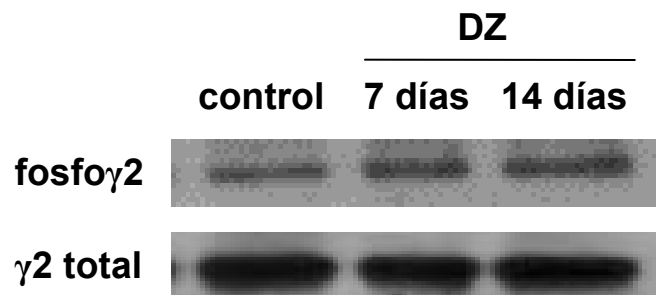


Figura 22: Efecto del tratamiento crónico con diazepam sobre el estado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$. Los animales fueron tratados durante 7 o 14 días con diazepam o vehículo (control). **A.** Los resultados normalizados (con respecto a los niveles de $\gamma 2$ totales) se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control (0 %). Los datos representan las medias \pm SEM de 4 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 0, $p < 0,05$ (test t de Student de una sola muestra). **B.** Experimento representativo de *western blot*.

Nuestros experimentos demuestran que la exposición crónica a diacepam durante 7 días produjo un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A que se mantuvo luego del tratamiento de 14 días. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la manifestación de tolerancia a los efectos sedativos de las benzodiazepinas está asociada a un cambio el estado de fosforilación del receptor.

7. Efecto de la exposición crónica a diacepam de neuronas de corteza cerebral en cultivo sobre la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas

Los cultivos neuronales han sido ampliamente utilizados para el estudio del mecanismo molecular de la tolerancia a las benzodiazepinas. Con el objetivo de completar de estudiar el mecanismo molecular de la tolerancia a las benzodiazepinas se emplearon cultivos neuronales primarios de corteza cerebral de rata expuestos crónicamente a diacepam.

7.1 La exposición crónica de neuronas de corteza cerebral a diacepam induce el desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas

Los resultados obtenidos en experimentos *ex vivo* con cultivos primarios parecen reproducir los experimentos *in vivo* de administración crónica de benzodiazepinas. Ha sido reportado que la exposición crónica (durante 48 horas) de cultivos neuronales de cerebro de pollo a fluracepam produce desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas (Roca, Schiller et al. 1990). Con el objeto de verificar si el tratamiento crónico con diacepam induce también desacoplamiento en neuronas de corteza cerebral de rata, se investigó el efecto de la exposición de cultivos primarios a diacepam durante 48 horas mediante experimentos de unión de [³H]FNZ estimulada por GABA (Fig. 23).

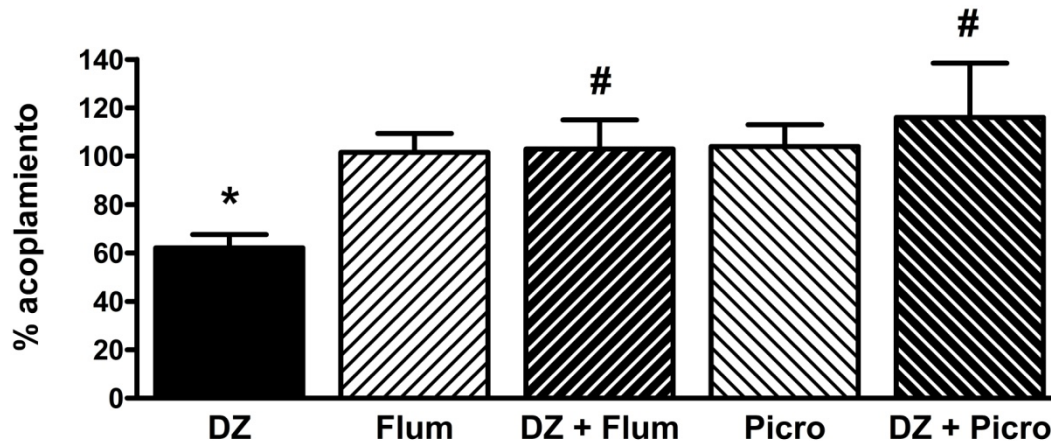


Figura 23: Grado de acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas en neuronas de corteza cerebral expuestas crónicamente a diacepam. Cultivos primarios de corteza cerebral de rata fueron expuestos durante 48 horas a vehículo, diacepam (DZ), flumacenil (Flum), diacepam más flumacenil (DZ + Flum), picrotoxina (Picro) o diacepam más picrotoxina (DZ + Picro). Los resultados se expresan como porcentaje de acoplamiento con respecto al control (tratamiento con vehículo, 100 %). Los datos representan las medias \pm SEM de 4 a 6 determinaciones independientes. Diferencias significativas: *DZ versus control, definido como 100 % ($p < 0,05$, test *t* de Student de una sola muestra), # DZ + Flum versus DZ y DZ + Picro versus DZ ($p < 0,05$, ANOVA de una vía y test de Tukey).

Los resultados muestran que la exposición prolongada de las neuronas en cultivo a diacepam induce, al igual que los tratamientos *in vivo*, una reducción en el grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Este desacoplamiento es prevenido en presencia de flumacenil, un antagonista del sitio de unión de benzodiazepinas, demostrando la especificidad de la acción del diacepam.

Con el objeto de evaluar si el desacoplamiento inducido por diacepam depende de la activación del receptor GABA_A, se evaluó el efecto de picrotoxina, un bloqueante del canal iónico del receptor (Fig. 23). Estos resultados muestran que en presencia de picrotoxina el

desacoplamiento inducido por diazepam es bloqueado, indicando que este proceso requiere de la activación del canal del receptor GABA_A.

7.2 Rol de la activación de CCDV-L sobre el desacoplamiento inducido por la exposición crónica a diazepam

Ha sido reportado que la reducción inducida por la administración crónica de benzodiazepinas de las corrientes mediadas por el receptor GABA_A está mediada por la activación de CCDV-L. Con el objeto de investigar si el desacoplamiento inducido por el tratamiento con diazepam depende la activación de dichos canales se investigó el efecto de nifedipina, un bloqueante de CCDV-L (Fig. 24).

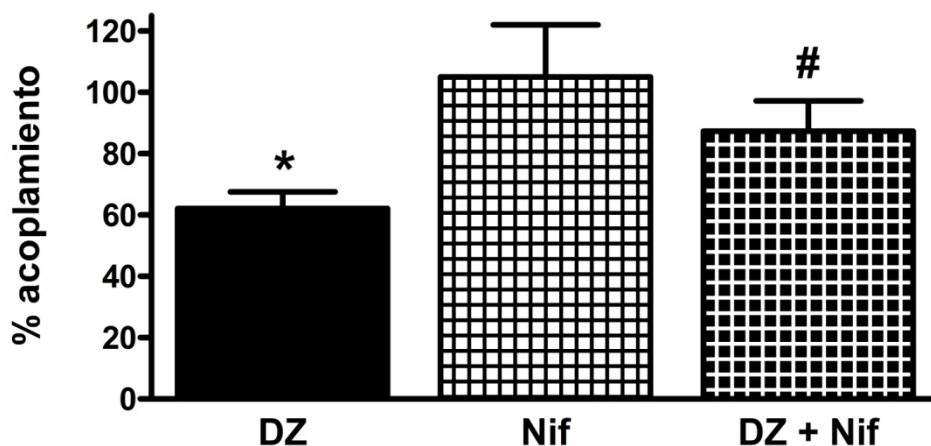


Figura 24: El desacoplamiento inducido por diazepam es inhibido en presencia de nifedipina.

Los cultivos de neuronas de corteza cerebral fueron tratados durante 48 horas con vehículo, diazepam (DZ), nifedipina (Nif) o diazepam más nifedipina (DZ + Nif). Los resultados se expresan como porcentaje de acoplamiento con respecto al control (tratamiento con vehículo, 100 %). Los datos representan las medias \pm SEM de 4 a 6 determinaciones independientes. Diferencias significativas: * DZ versus control, definido como 100 % ($p < 0,05$, test t de Student de una sola muestra), # DZ + Nif versus DZ ($p < 0,05$, ANOVA de una vía y test de Tukey).

El desacoplamiento inducido por diazepam fue prevenido en presencia de nifedipina indicando que este fenómeno depende del flujo de calcio a través de los CCDV-L.

DISCUSIÓN

La comprensión del mecanismo de tolerancia a las benzodiazepinas es muy importante desde un punto de vista clínico pues estas drogas, que poseen un alto índice terapéutico, podrían ser prescritas para tratamientos prolongados. Dado que las benzodiazepinas estimulan alostéricamente las acciones del GABA mediante la unión a receptores GABA_A, estos receptores son posibles candidatos para mediar las alteraciones adaptativas inducidas por el consumo prolongado de benzodiazepinas.

En el presente trabajo investigamos el mecanismo de tolerancia a las benzodiazepinas inducida por la administración crónica de diazepam durante 7 o 14 días. Nuestros resultados demuestran que la tolerancia a las acciones sedativas del diazepam se manifiesta luego de los tratamientos de 7 y 14 días mientras que la tolerancia a los efectos ansiolíticos es detectada solamente luego del tratamiento de 14 días (Fig. 15 y 16). Estos resultados están de acuerdo a las evidencias previas que demuestran que la tolerancia a las benzodiazepinas se desarrolla con diferentes cursos temporales dependiendo de la acción farmacológica (Bateson 2002; Vinkers and Olivier 2012).

Con el objeto de investigar si alteraciones en parámetros farmacocinéticos pueden contribuir al desarrollo de tolerancia, se midió la concentración de diazepam en la corteza cerebral por HPLC luego de los distintos tratamientos (Fig. 17). La concentración de diazepam en la corteza cerebral luego del tratamiento de 7 días fue similar a la del grupo que recibió el tratamiento agudo. Sin embargo, en animales tratados con diazepam por 14 días se detectó un aumento en los niveles de diazepam en la corteza cerebral comparado con el grupo agudo. Estos datos indican que se produjo acumulación de droga luego del tratamiento más prolongado que pudo deberse a una saturación de las vías metabólicas como ha sido previamente reportado como consecuencia de la administración de altas concentraciones de diazepam (St-Pierre and Pang 1995). Los valores de concentración corticales de diazepam reportados en este trabajo son muy similares a los reportados en un estudio previo donde se realizaron tratamientos crónicos semejantes (Fernandes, Arnot et al. 1999). Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos donde demuestran que las concentraciones plasmáticas y corticales de diferentes benzodiazepinas no disminuyen a lo largo del tiempo durante tratamientos prolongados (Miller, Greenblatt et al. 1988; Cowley, Roy-Byrne et al. 1995; Fernandes, File et al. 1996). En conclusión, los resultados

presentados en este trabajo demuestran que cambios en factores farmacocinéticos no son parte del mecanismo de tolerancia.

La disminución en la eficacia de las benzodiazepinas inducida por la exposición crónica podría ser mediada por una reducción en el acoplamiento alostérico entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Diversos trabajos demuestran que la administración prolongada *in vivo* de benzodiazepinas produce desacoplamiento de las interacciones entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. El desacoplamiento ha sido detectado empleando distintas metodologías experimentales, por ejemplo, como una disminución en la habilidad de zolpidem para prolongar el decaimiento de las corrientes post-sinápticas inhibitorias miniatura en el hipocampo de rata (Tietz, Zeng et al. 1999), una reducción en la potenciación del influjo de cloruro estimulado por GABA en corteza cerebral de rata (Marley and Gallager 1989) y una disminución en la estimulación de la unión de benzodiazepinas por GABA en corteza cerebral de rata (Gallager, Lakoski et al. 1984; Tietz, Chiu et al. 1989).

Los resultados de este trabajo demuestran que los tratamientos crónicos con diazepam durante 7 y 14 días resultan en desacoplamiento de las interacciones entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas en la corteza cerebral de rata (Fig. 18). Por lo tanto, la tolerancia al efecto sedativo del diazepam podría ser la consecuencia de un proceso de desacoplamiento. Este desacoplamiento ocurre en ausencia de cambios en el número o afinidad de los sitios de unión de benzodiazepinas. Debido a que la ocurrencia de desacoplamiento precede a la manifestación de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam, la tolerancia a este efecto farmacológico parece ser mediado por un mecanismo diferente. Los resultados obtenidos por Holt y col. (Holt, Bateson et al. 1999) indican que una única inyección de diazepam induce desacoplamiento en la corteza cerebral y cerebelo de rata, sugiriendo que este fenómeno no es parte del mecanismo de tolerancia. Sin embargo, la relevancia del desacoplamiento al desarrollo de tolerancia a ciertos efectos farmacológicos de las benzodiazepinas es avalado por diferentes estudios. Ha sido demostrado que el grado de desacoplamiento detectado en la corteza cerebral por tratamientos crónicos con distintos ligandos del sitio de las benzodiazepinas se correlaciona con la magnitud de tolerancia a las acciones anticonvulsivantes producida por estos

compuestos (Hernandez, Heninger et al. 1989). Además, Tietz y col. (Tietz, Chiu et al. 1989) demostraron que el tratamiento crónico pero no el agudo con benzodiazepinas produce desacoplamiento en la corteza cerebral, sugiriendo que esta alteración es producida por la exposición crónica. Resultados similares son presentados en este trabajo ya que no detectamos desacoplamiento luego del tratamiento agudo con diacepam.

La administración prolongada de benzodiazepinas produce desacoplamiento en forma dependiente de la región. Los estudios de Marley y col. (Marley and Gallagher 1989) indican que una disminución en la sensibilidad del influjo de cloruro estimulado por GABA al FNZ se observa en la corteza cerebral pero no en cerebelo de ratas tratadas crónicamente con diacepam. De la misma forma, Tietz y col. (Tietz, Chiu et al. 1989) demostraron que un tratamiento crónico con flurazepam en ratas produce una reducción en la habilidad del GABA para estimular la unión de flunitrazepam en la corteza cerebral, mientras que no se observó desacoplamiento en el cerebelo, médula, estriado, hipotálamo, cerebro medio, hipocampo y bulbo olfatorio. Estos datos indicarían que el mecanismo de tolerancia depende de la región del cerebro involucrada.

El mecanismo de tolerancia podría involucrar la expresión de receptores GABA_A aberrantes debido a alteraciones en la composición de subunidades. Numerosos estudios reportaron cambios en la expresión de las subunidades del receptor GABA_A pero los resultados son muy variados (Uusi-Oukari and Korpi 2010). Diferencias metodológicas, tales como especie, droga, longitud del tratamiento, ruta de administración, región del cerebro analizada, etc., contribuyen a las diferencias en los resultados publicados. La acción de las benzodiazepinas depende del subtipo particular de subunidad α del receptor GABA_A (Puia, Vicini et al. 1991; Wafford, Whiting et al. 1993; Smith, Alder et al. 2001), sugiriendo que alteraciones en este subtipo de subunidad son responsables del desarrollo de tolerancia. Los resultados presentados en el presente trabajo indican que la manifestación de tolerancia a los efectos sedativos del diacepam luego del tratamiento de 7 días con diacepam ocurre en ausencia de cambios en la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ del receptor GABA_A. En contraste, el tratamiento de 14 días con diacepam produce un aumento en los niveles de ARNm y péptido de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A que resulta en un incremento en el porcentaje de receptores conteniendo dicha subunidad (Fig.

19, 20 y 21). Estos datos sugieren que la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diacepam estaría mediada por un cambio en la composición de subunidades del receptor GABA_A.

La función y el tráfico intracelular de los receptores GABA_A son controlados por la fosforilación de residuos localizados en el principal bucle intracelular de las subunidades del receptor (Kittler and Moss 2003; Song and Messing 2005; Comenencia-Ortiz, Moss et al. 2014). Dado que este proceso de fosforilación regula la acción de moduladores alostéricos del receptor GABA_A (Hodge, Mehmert et al. 1999; Gao and Greenfield 2005), es posible que el fenómeno de desacoplamiento inducido por el tratamiento crónico con diacepam involucre un cambio en el estado de fosforilación del receptor. Previamente demostramos el desacoplamiento inducido por la continua activación del receptor GABA_A por GABA en cultivos primarios de corteza cerebral de rata está mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor en residuos serina (Gutiérrez, Ferreri et al. 2014). En el presente trabajo observamos que el tratamiento crónico con diacepam por 7 días produce un aumento en el grado de fosforilación del residuo serina 327 de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A que se mantiene luego de 14 días de tratamiento (Fig. 22). Estos resultados sugieren que la tolerancia a los efectos sedativos del diacepam estaría mediada por un cambio en el estado de fosforilación del receptor GABA_A en la corteza cerebral que resultaría en el desacoplamiento de las interacciones entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la tolerancia a los efectos sedativos y ansiolíticos del diacepam estarían mediados por diferentes alteraciones de la estructura y función del receptor GABA_A. Es posible, además, que el desacoplamiento y el aumento en el grado de fosforilación del receptor GABA_A, que persisten luego de 14 días de tratamiento, también contribuyan al desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diacepam. Por lo tanto, la tolerancia a las benzodiazepinas estaría mediada por múltiples mecanismos adaptativos que ocurren simultáneamente.

Nuestros previos trabajos realizados en cultivos de corteza cerebral de rata indican que el desacoplamiento inducido por GABA está mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A y además está asociado a una disminución en el porcentaje de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 3$, sin cambios en la proporción de receptores compuestos por la subunidad $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (Gutiérrez, Ferreri et al.

2014; Gutiérrez, Ferreri et al. 2014). Si bien los resultados presentados aquí demuestran que el desacoplamiento inducido por el tratamiento crónico con diazepam está acompañado por la estimulación de la fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor, no está correlacionado temporalmente con un cambio en la composición de subunidades del receptor. Por lo tanto, el desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas representaría un proceso de regulación de la función del receptor GABA_A que podría ser inducido por múltiples mecanismos dependiendo del ligando que se una al receptor.

Los modelos de cultivos neuronales primarios han demostrado ser muy útiles para estudiar la regulación de la estructura y función del receptor GABA_A por benzodiazepinas. Con el objeto de continuar estudiando el mecanismo molecular de la tolerancia a las benzodiazepinas, analizamos el efecto de la exposición crónica de cultivos primarios de corteza cerebral de rata a diazepam durante 48 horas. Los resultados de estos experimentos (Fig 23) indican que la exposición de los cultivos a diazepam resulta, al igual que los tratamientos *in vivo*, en un desacoplamiento significativo entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, estimado como una disminución en la potenciación de la unión de FNZ por GABA. Estas observaciones indicarían que este modelo de cultivos neuronales es apropiado para estudiar el efecto de la exposición crónica a benzodiazepinas. Este desacoplamiento es prevenido en presencia de flumazenil, un antagonista del sitio de unión de las benzodiazepinas, demostrando que el desacoplamiento está mediado por la unión del diazepam a su sitio de unión específico en el receptor GABA_A.

El desacoplamiento es además bloqueado por picrotoxina, un bloqueante del canal de cloruro, demostrando que es un proceso dependiente de la activación del receptor GABA_A (Fig. 23). Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores donde se demuestra que el desacoplamiento inducido por flurazepam en cultivos de corteza cerebral de pollo es reducido por la co-administración de bicuculina, un antagonista competitivo del receptor GABA_A (Prasad and Reynolds 1992). En contraste, otros dos estudios realizados en neuronas corticales de ratón (Hu and Ticku 1994) y neuronas de cerebro total de pollo (Roca, Schiller et al. 1990) indican que el desacoplamiento inducido por benzodiazepinas no es bloqueado por la co-incubación con otros antagonistas del receptor GABA_A, RU5135

y gabazina, respectivamente. Las diferencias en los tratamientos y en los cultivos neuronales utilizados podrían explicar esta discrepancia.

Ha sido reportado que la administración crónica de benzodiazepinas estimula las corrientes de calcio mediadas por los CCDV-L en hipocampo sugiriendo que la activación de estos canales contribuiría al mecanismo de tolerancia. Los resultados presentados en este trabajo (Fig. 24) indican que el desacoplamiento inducido por la exposición crónica de neuronas corticales a diazepam es prevenido por co-incubación con nifedipina, un bloqueante de los CCDV-L. Por consiguiente, el mecanismo de tolerancia a los efectos sedativos del diazepam, inducido por un tratamiento prolongado, podría estar mediado por un proceso de desacoplamiento que dependería de la activación de los CCDV-L. La estimulación de la entrada de calcio a través de estos canales podría activar a la PKC que a su vez fosforilaría la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A, lo cual resultaría en el desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. En contraste con estos resultados, el desacoplamiento inducido por GABA en cultivos neuronales de corteza cerebral de rata (Gravielle, Faris et al. 2005) y de cerebro total de pollo (Lyons, Land et al. 2001) no es bloqueado por nifedipina y por lo tanto es independiente de la activación de los CCDV-L. Nuevamente, estas discrepancias podrían sugerir que el desacoplamiento puede ser mediado por diferentes mecanismos.

CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo molecular de la tolerancia a los efectos sedativos y ansiolíticos de las benzodiazepinas utilizando un protocolo de administraciones crónicas *in vivo* de diazepam durante 7 o 14 días en ratas y un modelo *ex vivo* de cultivos primarios neuronales de corteza cerebral de rata expuestos crónicamente a diazepam. Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran la tolerancia al efecto sedativo del diazepam se manifiesta a partir de los 7 días de tratamiento mientras que la tolerancia al efecto ansiolítico de la benzodiazepina se detecta luego del tratamiento de 14 días, en concordancia con las evidencias previas que indican que el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas presenta diferentes cursos temporales dependiendo del efecto farmacológico. El desarrollo de tolerancia no es el resultado de cambios en factores farmacocinéticos que resulten en una disminución en la concentración del diazepam en la corteza cerebral.

Los resultados de este estudio parecen indicar que la tolerancia a los efectos sedativos y ansiolíticos del diazepam ocurre a través de diferentes mecanismos moleculares. La tolerancia a los efectos sedativos del diazepam está asociada con una disminución en el grado de interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, llamada desacoplamiento, que podría estar mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$ en la corteza cerebral. En cambio, la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam está asociada a un aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del receptor $GABA_A$ en la corteza cerebral que resultaría en un aumento en el porcentaje de receptores conteniendo dicha subunidad (Fig. 25).

Los experimentos realizados en este trabajo demuestran que la exposición prolongada de cultivos primarios neuronales de corteza cerebral de rata a diazepam durante 48 horas induce, al igual que los tratamientos crónicos *in vivo*, desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, sugiriendo que estos cultivos representan un modelo apropiado para el estudio de las bases moleculares de la tolerancia a las benzodiazepinas. Este desacoplamiento es inducido por la unión del diazepam a su sitio de unión específico en el receptor $GABA_A$, requiere la activación del canal del receptor y a su vez depende del flujo de calcio a través de la activación de los CCDV-L. Este aumento en la entrada de calcio podría inducir la activación de la PKC que a su vez fosforilaría a la subunidad $\gamma 2$ del

receptor $GABA_A$, lo cual finalmente resultaría en el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas (Fig. 25).

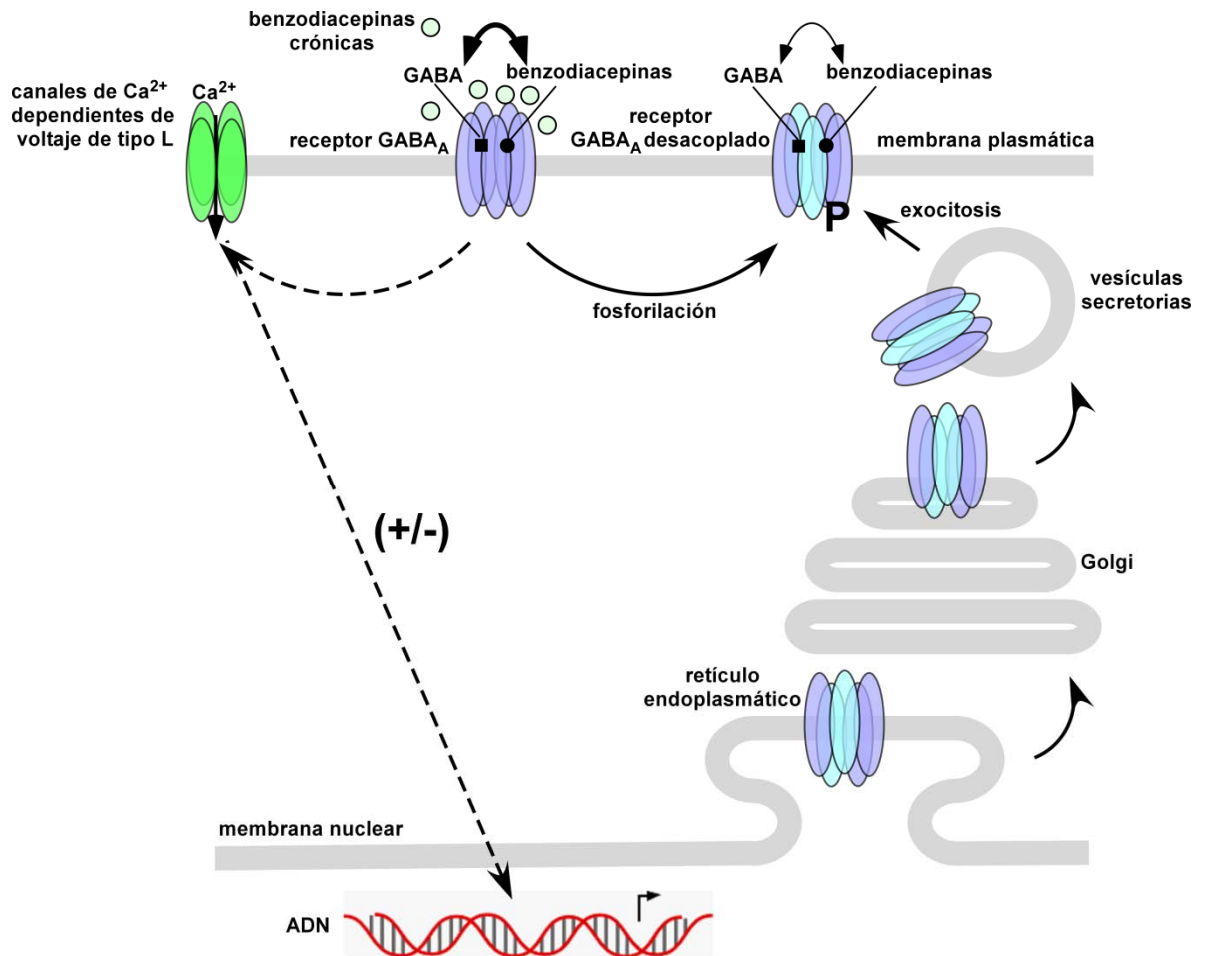


Figura 25: Alteraciones del receptor $GABA_A$ inducidas por la exposición prolongada a benzodiazepinas. El desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas estaría asociado a los siguientes cambios en el receptor $GABA_A$: a) desacoplamiento de las interacciones entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, b) cambios en la composición de subunidades del receptor y c) aumento en el estado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor. El desacoplamiento inducido por benzodiazepinas parece ser mediado por el aumento de flujo de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L.

BIBLIOGRAFÍA

- Akk, G., D. F. Covey, et al. (2007). "Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors." Pharmacol Ther **116**(1): 35-57.
- Ali, N. J. and R. W. Olsen (2001). "Chronic benzodiazepine treatment of cells expressing recombinant GABA(A) receptors uncouples allosteric binding: studies on possible mechanisms." J Neurochem **79**(5): 1100-1108.
- Balon, R. (2013). "Benzodiazepines revisited." Psychother Psychosom **82**(6): 353-354.
- Bannai, H., S. Levi, et al. (2009). "Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics." Neuron **62**(5): 670-682.
- Bateson, A. N. (2002). "Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal." Curr Pharm Des **8**(1): 5-21.
- Bateson, A. N. (2004). "The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential?" Sleep Med **5**(Supplement 1): S9-S15.
- Berezhnov D., G. M. C., and Farb D. H. (2007). Pharmacology of the GABAA receptor. The Handbook of Contemporary Neuropharmacology. I. H. David R. Sibley, Michael Kuhar, and Phil Skolnick, John Wiley & Sons, Inc.: 465-569.
- Bianchi, M. T. and R. L. Macdonald (2001). "Agonist Trapping by GABAA Receptor Channels." J Neurosci **21**(23): 9083-9091.
- Bormann, J. (2000). "The 'ABC' of GABA receptors." Trends Pharmacol Sci **21**(1): 16-19.
- Brett, R. R. and J. A. Pratt (1995). "Changes in benzodiazepine-GABA receptor coupling in an accumbens-habenula circuit after chronic diazepam treatment." Br J Pharmacol **116**(5): 2375-2384.
- Brooks-Kayal, A. R., Y. H. Raol, et al. (2009). "Alteration of epileptogenesis genes." Neurotherapeutics **6**(2): 312-318.
- Brooks-Kayal, A. R., M. D. Shumate, et al. (1998). "Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy." Nat Med **4**(10): 1166-1172.
- Comenencia-Ortiz, E., S. J. Moss, et al. (2014). "Phosphorylation of GABA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions." Psychopharmacol (Berl) **231**(17): 3453-3465.

- Cowley, D. S., P. P. Roy-Byrne, et al. (1995). "Benzodiazepine Sensitivity in Panic Disorder: Effects of Chronic Alprazolam Treatment." Neuropsychopharmacol **12**(2): 147-157.
- Chen, S., X. Huang, et al. (1999). "Benzodiazepine-mediated regulation of alpha1, alpha2, beta1-3 and gamma2 GABA(A) receptor subunit proteins in the rat brain hippocampus and cortex." Neurosci **93**(1): 33-44.
- Devaud LL, J.-M. F., Werner Sieghart, A. Leslie Morrow (1997). "Bidirectional Alterations of GABAA Receptor Subunit Peptide Levels in Rat Cortex During Chronic Ethanol Consumption and Withdrawal." J Neurochem **69**(1): 126-130.
- Downing, S. S., Y. T. Lee, et al. (2005). "Benzodiazepine modulation of partial agonist efficacy and spontaneously active GABAA receptors supports an allosteric model of modulation." Br J Pharmacol **145**(7): 894-906.
- Engelman, H. S. and A. B. MacDermott (2004). "Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release." Nat Rev Neurosci **5**(2): 135-145.
- Estes, J. W. (1995). "The road to tranquility: the search for selective anti-anxiety agents." Synapse **21**(1): 10-20.
- Fernandes, C., M. I. Arnot, et al. (1999). "The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam." Psychopharmacol (Berl) **145**(3): 251-259.
- Fernandes, C., M. I. Arnot, et al. (1999). "The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam." Psychopharmacol **145**(3): 251-259.
- Fernandes, C., S. E. File, et al. (1996). "Evidence against oppositional and pharmacokinetic mechanisms of tolerance to diazepam's sedative effects." Brain Res **734**(1-2): 236-242.
- Gallager, D. W., J. M. Lakoski, et al. (1984). "Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity." Nature **308**(5954): 74-77.
- Gao, L. and L. J. Greenfield (2005). "Activation of protein kinase C reduces benzodiazepine potency at GABAA receptors in NT2-N neurons." Neuropharmacol **48**(3): 333-342.

- Gielen, M. C., M. J. Lumb, et al. (2012). "Benzodiazepines modulate GABAA receptors by regulating the preactivation step after GABA binding." J Neurosci **32**(17): 5707-5715.
- Gravielle, M. C., R. Faris, et al. (2005). "GABA induces activity dependent delayed-onset uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions in neocortical neurons." J Biol Chem **280**(22): 20954-20960.
- Greenfield, L. J., Jr. (2013). "Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors." Seizure **22**(8): 589-600.
- Gutiérrez, M. L., M. C. Ferreri, et al. (2014). "GABA-induced uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions is associated with increased phosphorylation of the GABAA receptor." J Neurosci Res **92**(8): 1054-1061.
- Gutiérrez, M. L., M. C. Ferreri, et al. (2014). "GABA-induced uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions is mediated by increased GABA receptor internalization and associated with a change in subunit composition." Neurosci **257C**: 119-129.
- Haefely, W. E., J. R. Martin, et al. (1993). "The multiplicity of actions of benzodiazepine receptor ligands." Can J Psychiatry **38 Suppl 4**: S102-108.
- Herd, M. B., D. Belelli, et al. (2007). "Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors." Pharmacol Ther **116**(1): 20-34.
- Hernandez, T. D., C. Heninger, et al. (1989). "Relationship of agonist efficacy to changes in GABA sensitivity and anticonvulsant tolerance following chronic benzodiazepine ligand exposure." Eur J Pharmacol **170**(3): 145-155.
- Hodge, C. W., K. K. Mehmert, et al. (1999). "Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon." Nat Neurosci **2**(11): 997-1002.
- Holt, R. A., A. N. Bateson, et al. (1999). "Decreased GABA enhancement of benzodiazepine binding after a single dose of diazepam." J Neurochem **72**(5): 2219-2222.
- Houston, C. M., Q. He, et al. (2009). "CaMKII phosphorylation of the GABA(A) receptor: receptor subtype- and synapse-specific modulation." J Physiol **587**(Pt 10): 2115-2125.

- Houston, C. M., H. H. Lee, et al. (2007). "Identification of the sites for CaMK-II-dependent phosphorylation of GABA(A) receptors." J Biol Chem **282**(24): 17855-17865.
- Hu, X. J. and M. K. Ticku (1994). "Chronic flurazepam treatment produces decreased efficacy of the benzodiazepine ligands and pentobarbital with gamma-aminobutyric acidA receptors in cortical neurons." J Pharmacol Exp Ther **270**(2): 485-490.
- Ito, T., T. Suzuki, et al. (1996). "Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABAA receptors and molecular aspects." Life Sci **59**(3): 169-195.
- Jacob, T. C., G. Michels, et al. (2012). "Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABAA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(45): 18595-18600.
- Jacob, T. C., S. J. Moss, et al. (2008). "GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." Nat Rev Neurosci **9**(5): 331-343.
- Jechlinger, M., R. Pelz, et al. (1998). "Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits." J Neurosci **18**(7): 2449-2457.
- Johnston, J. D., S. A. Price, et al. (1998). "Flunitrazepam rapidly reduces GABA(A) receptor subunit protein expression via a protein kinase C-dependent mechanism." Br J Pharmacol **124**(7): 1338-1340.
- Jurd, R., V. Tretter, et al. (2010). "Fyn kinase contributes to tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma2 subunit." Mol Cell Neurosci **44**(2): 129-134.
- Kittler, J. T. and S. J. Moss (2003). "Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 341-347.
- Klein, R. L., P. J. Whiting, et al. (1994). "Benzodiazepine treatment causes uncoupling of recombinant GABAA receptors expressed in stably transfected cells." J Neurochem **63**(6): 2349-2352.
- Laurie, D. J., W. Wisden, et al. (1992). "The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development." J Neurosci **12**(11): 4151-4172.

- Leidenheimer, N. J. and R. Chapell (1997). "Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA(A) receptors." Brain Res Mol Brain Res **52**(2): 173-181.
- Leidenheimer, N. J., P. J. Whiting, et al. (1993). "Activation of calcium-phospholipid-dependent protein kinase enhances benzodiazepine and barbiturate potentiation of the GABAA receptor." J Neurochem **60**(5): 1972-1975.
- Lyons, H. R., T. T. Gibbs, et al. (2000). "Turnover and down-regulation of GABA(A) receptor alpha1, beta2S, and gamma1 subunit mRNAs by neurons in culture." J Neurochem **74**(3): 1041-1048.
- Lyons, H. R., M. B. Land, et al. (2001). "Distinct signal transduction pathways for GABA-induced GABA(A) receptor down-regulation and uncoupling in neuronal culture: a role for voltage-gated calcium channels." J Neurochem **78**(5): 1114-1126.
- Marley, R. J. and D. W. Gallager (1989). "Chronic diazepam treatment produces regionally specific changes in GABA-stimulated chloride influx." Eur J Pharmacol **159**(3): 217-223.
- McDonald, B. J., A. Amato, et al. (1998). "Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase." Nat Neurosci **1**(1): 23-28.
- Mehta, A. K. and M. K. Ticku (1999). "An update on GABAA receptors." Brain Res Brain Res Rev **29**(2-3): 196-217.
- Michels, G. and S. J. Moss (2007). "GABAA receptors: properties and trafficking." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(1): 3-14.
- Miller, L. G., D. J. Greenblatt, et al. (1988). "Chronic benzodiazepine administration. I. Tolerance is associated with benzodiazepine receptor downregulation and decreased gamma-aminobutyric acidA receptor function." J Pharmacol Exp Ther **246**(1): 170-176.
- Moss, S. J., C. A. Doherty, et al. (1992). "Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor." J Biol Chem **267**(20): 14470-14476.

- Moss, S. J. and T. G. Smart (1996). "Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation." Int Rev Neurobiol **39**: 1-52.
- Pericic, D., D. Atrac, et al. (2007). "Allosteric uncoupling and up-regulation of benzodiazepine and GABA recognition sites following chronic diazepam treatment of HEK 293 cells stably transfected with $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ subunits of GABAA receptors." Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **375**(3): 177-187.
- Pesold, C., H. J. Caruncho, et al. (1997). "Tolerance to diazepam and changes in GABA(A) receptor subunit expression in rat neocortical areas." Neurosci **79**(2): 477-487.
- Pirker, S., C. Schwarzer, et al. (2000). "GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain." Neurosci **101**(4): 815-850.
- Prasad, A. and J. N. Reynolds (1992). "Uncoupling of GABA-benzodiazepine receptors in chick cerebral cortical neurons requires co-activation of both receptor sites." Brain Res **591**(2): 327-331.
- Pratt, J. A., R. R. Brett, et al. (1998). "Benzodiazepine Dependence: From Neural Circuits to Gene Expression." Pharmacol Biochem Behav **59**(4): 925-934.
- Puia, G., S. Vicini, et al. (1991). "Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents." Mol Pharmacol **39**(6): 691-696.
- Rajadhyaksha, A. M. and B. E. Kosofsky (2005). "Psychostimulants, L-type calcium channels, kinases, and phosphatases." Neuroscient **11**(5): 494-502.
- Ravindran, C. R. and M. K. Ticku (2006). "Tyrosine kinase phosphorylation of GABA(A) receptor alpha1, beta2 and gamma2 subunits following chronic intermittent ethanol (CIE) exposure of cultured cortical neurons of mice." Neurochem Res **31**(9): 1111-1118.
- Rivera, C., J. Voipio, et al. (2005). "Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII." J Physiol **562**(Pt 1): 27-36.
- Roca, D. J., I. Rozenberg, et al. (1990). "Chronic agonist exposure induces down-regulation and allosteric uncoupling of the gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex." Mol Pharmacol **37**(1): 37-43.

- Roca, D. J., G. D. Schiller, et al. (1990). "gamma-Aminobutyric acidA receptor regulation in culture: altered allosteric interactions following prolonged exposure to benzodiazepines, barbiturates, and methylxanthines." Mol Pharmacol **37**(5): 710-719.
- Rosenberg, H. C. and T. H. Chiu (1979). "Decreased 3H-diazepam binding is a specific response to chronic benzodiazepine treatment." Life Sci **24**(9): 803-807.
- Rosenberg, H. C. and T. H. Chiu (1981). "Tolerance during chronic benzodiazepine treatment associated with decreased receptor binding." Eur J Pharmacol **70**(4): 453-460.
- Rudolph, U. and F. Knoflach (2011). "Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes." Nat Rev Drug Discov **10**(9): 685-697.
- Saari, T. I., M. Uusi-Oukari, et al. (2011). "Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology." Pharmacol Rev **63**(1): 243-267.
- Saliba, R. S., K. Kretschmannova, et al. (2012). "Activity-dependent phosphorylation of GABA(A) receptors regulates receptor insertion and tonic current." Embo J **31**(13): 2937-2951.
- Saliba, R. S., G. Michels, et al. (2007). "Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites." J Neurosci **27**(48): 13341-13351.
- Smith, A. J., L. Alder, et al. (2001). "Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using (36)Cl ion flux." Mol Pharmacol **59**(5): 1108-1118.
- Song, M. and R. O. Messing (2005). "Protein kinase C regulation of GABAA receptors." Cell Mol Life Sci **62**(2): 119-127.
- St-Pierre, M. V. and K. S. Pang (1995). "Concentration-dependent metabolism of diazepam in mouse liver." J Pharmacokinet Biopharm **23**(3): 243-266.
- Sun, M. K., W. Q. Zhao, et al. (2001). "Theta rhythm of hippocampal CA1 neuron activity: gating by GABAergic synaptic depolarization." J Neurophysiol **85**(1): 269-279.

- Tietz, E. I., T. H. Chiu, et al. (1989). "Regional GABA/benzodiazepine receptor/chloride channel coupling after acute and chronic benzodiazepine treatment." Eur J Pharmacol **167**(1): 57-65.
- Tietz, E. I., X. J. Zeng, et al. (1999). "Antagonist-induced reversal of functional and structural measures of hippocampal benzodiazepine tolerance." J Pharmacol Exp Ther **291**(3): 932-942.
- Timofeev, I., F. Grenier, et al. (2002). "The role of chloride-dependent inhibition and the activity of fast-spiking neurons during cortical spike-wave electrographic seizures." Neurosci **114**(4): 1115-1132.
- Turkmen, S., T. Backstrom, et al. (2011). "Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor." Br J Pharmacol **162**(2): 311-327.
- Unwin, N. (1989). "The structure of ion channels in membranes of excitable cells." Neuron **3**(6): 665-676.
- Uusi-Oukari, M. and E. R. Korpi (2010). "Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents." Pharmacol Rev **62**(1): 97-135.
- van Rijnsoever, C., M. Tauber, et al. (2004). "Requirement of alpha5-GABAA receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice." J Neurosci **24**(30): 6785-6790.
- Vinkers, C. H. and B. Olivier (2012). "Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators?" Adv Pharmacol Sci **416864**(10): 29.
- Vinkers, C. H. and B. Olivier (2012). "Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators?" Adv Pharmacol Sci **2012**: 416864.
- Vinkers, C. H., R. van Oorschot, et al. (2012). "GABA(A) Receptor alpha Subunits Differentially Contribute to Diazepam Tolerance after Chronic Treatment." PLoS One **7**(8): e43054.
- Wafford, K. A., P. J. Whiting, et al. (1993). "Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes." Mol Pharmacol **43**(2): 240-244.

- Walter, H. J. and R. O. Messing (1999). "Regulation of neuronal voltage-gated calcium channels by ethanol." Neurochem Int **35**(2): 95-101.
- Whiting, P. J. (2003). "GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?" Drug Discov Today **8**(10): 445-450.
- Wong, G., T. Lyon, et al. (1994). "Chronic exposure to benzodiazepine receptor ligands uncouples the gamma-aminobutyric acid type A receptor in WSS-1 cells." Mol Pharmacol **46**(6): 1056-1062.
- Wu, Y., H. C. Rosenberg, et al. (1994). "Subunit- and brain region-specific reduction of GABAA receptor subunit mRNAs during chronic treatment of rats with diazepam." J Mol Neurosci **5**(2): 105-120.
- Xiang, K., D. E. Earl, et al. (2008). "Chronic benzodiazepine administration potentiates high voltage-activated calcium currents in hippocampal CA1 neurons." J Pharmacol Exp Ther **327**(3): 872-883.
- Xiang, K. and E. I. Tietz (2008). "Chronic benzodiazepine-induced reduction in GABA(A) receptor-mediated synaptic currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons prevented by prior nimodipine injection." Neurosci **157**(1): 153-163.