

# ACTIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DA TRANSMISSÃO GABAÉRGICA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: BENZODIAZEPINAS E AGONISTAS GABAÉRGICOS

DANIEL MOURA, PATRÍCIO SOARES-DA-SILVA

Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Medicina do Porto. Porto. Portugal

## RESUMO

O GABA é um transmissor com efeito neurofrenador geral. Não tem, no entanto, interesse terapêutico por não penetrar no SNC. A transmissão GABAérgica pode entretanto ser intensificada pela administração de outros agonistas (progabide) ou de compostos que potenciam os efeitos do GABA endógeno, através do bloqueio da sua degradação enzimática (dipropilacetato de sódio) ou da facilitação da sua fixação ao receptor (benzodiazepinas). As *beta*-carbolinas são possivelmente substâncias endógenas que actuam sobre a transmissão GABAérgica nos mesmos locais de fixação das benzodiazepinas, e podem, por acção estimulante ou bloqueadora desses receptores, regular fisiologicamente a transmissão neuronal mediada pelo GABA.

## SUMMARY

### Stimulation of GABAergic transmission: benzodiazepines and GABAergic agonists

GABA is an endogenous inhibitory transmitter, present throughout the CNS. However this amino acid is not of therapeutic value due to its incapacity to cross the blood-brain barrier. For clinical purposes, an increased GABAergic transmission is achieved by using either direct agonists (progabide) or drugs that potentiate the actions of endogenous GABA. Sodium valproate (dipropylacetate) inhibits the enzymatic inactivation of GABA and benzodiazepine compounds increase the affinity of GABA for its receptor. Beta-carbolines are putative endogenous ligands for benzodiazepine binding sites. There are marked differences in the pharmacological activity of different members of this group: beta-carbolines may act either as agonists or antagonists at these so-called benzodiazepine receptors. They may have a physiological role to play in neuronal activity as *endogenous benzodiazepines* or *anti-benzodiazepines*.

O conceito da neurotransmissão química tornou-se muito familiar a todos os que trabalham em ciências biológicas e tem como base a possibilidade dos neurónios libertarem substâncias (mediadores ou neurotransmissores) que aumentam ou reduzem a actividade dos órgãos efectores por eles innervados ou de outros neurónios situados na proximidade do local (sinapses) em que essas substâncias são libertadas.

As provas essenciais para se considerar que um composto químico é um neurotransmissor são, por isso, a sua presença em neurónios de onde seja libertado após estimulação nervosa e a sua capacidade de provocar efeitos iguais aos produzidos pela actividade desses neurónios. Como os conhecimentos sobre a neurotransmissão se desenvolveram principalmente pela investigação dos mecanismos adrenérgicos periféricos, considera-se ainda, por analogia com o que se observou para esses mediadores adrenérgicos, que são critérios adicionais a existência no sistema nervoso de enzimas capazes de sintetizar esse eventual neurotransmissor, de estruturas que o armazenem no interior das células, de mecanismos que o captem do exterior e de enzimas que o destruam.

### Provas de que o GABA é um neurotransmissor

Existem abundantes dados experimentais para se considerar o ácido *gama*-aminobutírico (GABA) como um importante transmissor no SNC. A presença no SNC, em elevadas concentrações, deste ácido aminado poderia significar apenas que se trata de uma substância interveniente no metabolismo geral das células do tecido nervoso, mas a sua distribuição heterogénea pelo neuroeixo e a sua acumulação dentro das células em vesículas próprias aproximam-no fortemente dos neurotransmissores mais bem conhecidos (acetilcolina, catecolaminas, 5-hidroxitriptamina).

O argumento mais decisivo reside no efeito marcado que o GABA possui sobre a fisiologia neuronal, reduzindo a actividade de todos os neurónios sobre que actua: aplicado sobre as dendrites ou sobre o corpo celular de um neurónio (estruturas pós-sinápticas) diminui a sua excitabilidade aos estímulos provenientes do neurónio pré-sináptico; se actuar sobre as terminações pré-sinápticas diminui a quantidade de neurotransmissores que esse neurónio é capaz de libertar. Este efeito neurofrenador do GABA é consequência da sua reacção com macromoléculas específicas (receptores

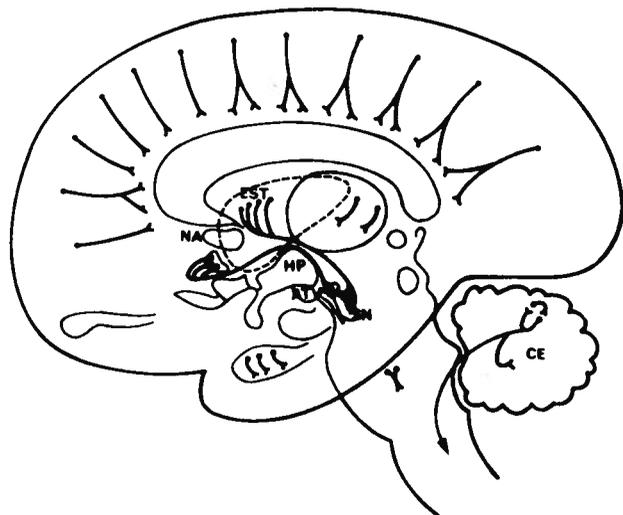


Figura 1: Sistemas neuronais GABAérgicos. SN (substância nigra), ATV (área tegmental ventral), EST (estriado), NA (núcleo accumbens), HP (hipocampo), CE (cerebelo).

GABAérgicos) existentes nas membranas neuronais, da qual resulta um aumento na permeabilidade dessas membranas aos cloretos, o que permite ao íão deslocar-se por difusão passiva no sentido da maior para a menor concentração. Existe habitualmente um nível superior de cloretos no exterior das células e o movimento dá-se para dentro dos neurónios, acentuando-se por isso o potencial eléctrico negativo, normalmente presente no meio intracelular. A este aumento na diferença de potencial entre as faces exterior e interior da membrana neuronal (hiperpolarização) corresponde também um aumento no limiar da excitabilidade desse neurónio. Noutras células, cuja actividade é igualmente frenada pelo GABA, tem-se verificado uma despolarização, admitindo alguns autores que esses neurónios pudessem ter no seu interior uma concentração de cloretos superior à do meio extracelular. A abertura da membrana ao movimento dos cloretos, provocada pela reacção GABA + receptor GABAérgico permitiria assim a saída de cargas negativas e a redução da diferença de potencial transmembranoso. Esta despolarização sustentada das células em repouso faria com que os potenciais de acção fossem menos amplos e por isso também estes neurónios ficariam com a sua actividade reduzida. Acrescente-se que o tecido nervoso pode sintetizar GABA, a partir do ácido glutâmico, por acção de uma descarboxilase, pode captar GABA dos líquidos de incubação, atingindo concentrações intra-neuronais 100 vezes superiores às do meio exterior, pode libertar GABA por estímulos diversos e pode metabolizar o GABA em semi-aldeído succínico, que posteriormente se reduz a ácido *gama*-hidroxi-aminobutírico.

#### Esboço da neuroanatomia do sistema GABAérgico

Dos sistemas neuronais GABAérgicos descritos no SNC podemos caracterizar dois tipos de circuitos: os circuitos curtos e os circuitos longos.

Os circuitos GABAérgicos (Fig. 1) curtos são predominantemente localizados no córtex cerebral, estruturas sub-corticais como o hipocampo e estriado, cerebelo e espinal medula. Estes sistemas neuronais exercem uma influência inibitória sobre outros sistemas, e, por meio de colaterais recorrentes regulam a sua própria actividade (mecanismo de feed-back negativo). O facto de estes circuitos serem curtos permite-lhes veicular as suas influências inibitórias com uma

alta frequência, sujeitando assim as estruturas pós-sinápticas a uma frenação que em qualquer momento e muito rapidamente pode ser intensificada ou reduzida. A interrupção deste normal funcionamento pode ter como consequências uma hiperactividade neuronal como a que se verifica na epilepsia (córtex cerebral) e na confusão mental relacionada com crises ansiosas (hipocampo).

Quanto aos circuitos GABAérgicos longos apontam-se os relacionados com os sistemas dopaminérgicos estriado e mesocortical. O sistema GABAérgico estriado tem os corpos celulares dos seus neurónios localizados no estriado, enquanto os terminais neuronais estão distribuídos à substância nigra, onde exercem uma influência nitidamente inibitória, que tem como consequência uma diminuição da dopamina libertada no estriado pelos neurónios nigroestriados. Por sua vez uma menor libertação de dopamina no estriado diminui a activação dos neurónios estriado GABAérgicos.

O segundo sistema GABAérgico longo acima referido não está ainda suficientemente caracterizado, apontando-se no entanto a favor da sua existência algumas provas, como sejam a da descrição neuroanatómica de uma via aferente cujos corpos celulares estão localizados na área do núcleo accumbens e com os terminais neuronais distribuídos à área tegmental ventral (local de origem dos neurónios dopaminérgicos do sistema mesocortical); a estimulação de áreas como o núcleo accumbens é capaz de inibir a actividade das células existentes na área tegmental ventral (com diminuição da libertação da dopamina nas áreas de distribuição do sistema mesocortical). Esta inibição é bloqueada pela bicuculina (antagonista clássico do receptor GABAérgico). A presença de concentrações tecidulares moderadas de GABA e de descarboxilase do ácido L-glutâmico na área tegmental ventral é ainda outro argumento a considerar. Perante estes dados é de admitir que o sistema dopaminérgico mesocortical com origem na área tegmental ventral esteja, tal como o nigroestriado, sujeito a uma regulação de tipo feed-back negativo, cujo transmissor responsável seria o GABA.

A importância da integridade destes sistemas neuronais está patente na hiperactividade motora descoordenada da coreia de Huntington, situação relacionada com uma grave lesão estriado que priva o doente da retroinibição dos sistemas neuronais dopaminérgicos nigroestriados.

#### Estimulação farmacológica da transmissão GABAérgica

O GABA, tal como a dopamina, é uma substância com importância fisiológica mas terapeuticamente inútil porque não atinge os neurónios quando se administra do exterior. A estimulação dos mecanismos GABAérgicos humanos, com fins terapêuticos, consegue-se com a utilização de compostos quimicamente aparentados daquele ácido e que estimulam directamente os mesmos receptores (agonistas GABAérgicos) ou através de fármacos que, de forma indirecta, aumentam a eficácia do GABA endógeno (benzodiazepinas).

Agonistas GABAérgicos inicialmente descobertos, como o muscimol, não tiveram aplicação terapêutica em virtude da sua toxicidade inaceitável. Da procura intencional de agonistas GABAérgicos desenvolveu-se o dipropilacetato de sódio (valproato de sódio) que veio encontrar larga utilização terapêutica sobretudo na epilepsia. No entanto, e ao contrário do que inicialmente se supôs, verificou-se que os efeitos do dipropilacetato de sódio não se deviam a uma acção directa, mas dependiam da acumulação neuronal de GABA. O dipropilacetato de sódio antagoniza a metabolização do GABA pela sua transaminase e pela desidrogenase do semi-aldeído succínico.

Recentemente foi sintetizado um novo agonista dos receptores GABAérgicos cujo estudo pormenorizado permitiu um aprofundamento dos conhecimentos sobre esses receptores e as influências que exercem sobre outros sistemas neuronais, nomeadamente o noradrenérgico, o dopaminérgico e o 5-hidroxitriptaminérgico.

O fármaco em causa é o progabide (SL76002 ou 4-[(C 4-clorofenil) (5-fluor-2-hidroxifenil) metileno] amino} butanamida). Embora seja metabolizado no SNC num composto que apresenta também actividade agonista GABAérgica, o SL75102 (ácido 4- (C 4-clorofenil) (5-fluor-2-hidroxifenil) metileno amino butírico) e que mais tarde se converte no próprio GABA, o progabide deve os seus efeitos a uma acção directa estimulante dos receptores GABAérgicos.

A utilização de radioligandos demonstrou que tanto o progabide como o SL75102 apresentam capacidade de inibir a ligação de (<sup>3</sup>H)-GABA, assim como de outros agonistas GABAérgicos como o (<sup>3</sup>H)-muscimol e a (<sup>3</sup>H)-isoguvacina, ao respectivo receptor. O progabide apresenta uma maior capacidade de inibição da ligação do (<sup>3</sup>H)-muscimol e da (<sup>3</sup>H)-isoguvacina do que do (<sup>3</sup>H)-GABA (locais de ligação GABA-A ou GABA-B).<sup>1, 2</sup> O SL75102 é várias vezes mais potente que o progabide, embora menos potente que o próprio GABA.

Em relação aos receptores adrenérgicos ( $\alpha$  e  $\beta$ ), dopaminérgicos, 5-hidroxitriptaminérgicos, histaminérgicos (H<sub>1</sub>) e colinérgicos (muscarínicos), o progabide e o SL75102 são completamente inactivos, assim como em relação aos locais de ligação para a (<sup>3</sup>H)-estricnina, (<sup>3</sup>H)-imipramina, (<sup>3</sup>H)-diidromorfina e (<sup>3</sup>H)-ácido cáinico.<sup>3</sup>

Estes estudos da inibição da fixação de radioligandos permitem sugerir que tanto o progabide como o SL75102 actuam directamente no receptor GABAérgico dado que, em baixas concentrações, são capazes de inibir a ligação dos três radioligandos responsáveis pela sua identificação, o (<sup>3</sup>H)-GABA, o (<sup>3</sup>H)-muscimol e a (<sup>3</sup>H)-isoguvacina.

Outro dado sugere que ambos, o progabide e SL75102, actuam também em receptores GABAérgicos pré-sinápticos: é o da sua capacidade de inibição da libertação de (<sup>3</sup>H)-GABA induzida pelo potássio. Este efeito é consistente com a estimulação de receptores pré-sinápticos GABAérgicos situados nos terminais dos neurónios GABAérgicos estriónigras.

O progabide e o SL75102 apresentam afinidade quer para os receptores GABAérgicos clássicos (pós-sinápticos e sensíveis ao bloqueio preferencial pela bicuculina, TipoA) quer para os receptores GABAérgicos pré-sinápticos de tipo B, ou baclofeno-sensíveis.

O progabide como o SL75102 não interferem de forma alguma com os sistemas de recaptação neuronal para o GABA, nem com a normal actividade das enzimas (descarboxilase do ácido L-glutâmico e transaminase do GABA), observando-se contudo após a sua administração, uma elevação das concentrações tecidulares de GABA no SNC, a qual se deve à própria metabolização do progabide e SL75102.<sup>4</sup>

Em relação à influência exercida sobre os sistemas neuronais noradrenérgicos, observou-se que estes compostos aumentam o desaparecimento da noradrenalina induzido pela  $\alpha$ -metil-p-tirosina, e paralelamente provocam uma elevação dos níveis tecidulares de MOPEG, índice de um aumento da frequência de renovação da noradrenalina. No entanto, estes efeitos não se fazem sentir de uma forma generalizada ao nível do SNC, mas somente em determinadas áreas como o hipotálamo, tubérculo olfactivo e área septal.

A inervação noradrenérgica do SNC faz-se consideravelmente a partir do locus coeruleus para variadas áreas como

(GABA)  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$

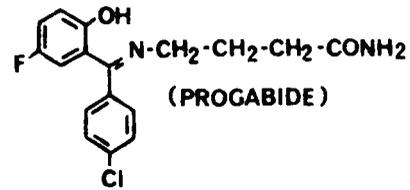


Figura 2: Semelhança de estrutura química entre o GABA e o progabide.

o cortex cerebral, cerebelo, mesencéfalo e diencefalo e a aplicação por microiontoforese de GABA ou de progabide neste núcleo tem como consequência uma diminuição da frequência de descarga daqueles neurónios noradrenérgicos.<sup>5, 6</sup>

Uma explicação possível para este aparentemente paradoxal aumento da frequência de renovação da noradrenalina induzida pelo progabide seria a de uma activação de receptores GABAérgicos localizados em neurónios frenadores da actividade dos neurónios noradrenérgicos com origem no segmento lateral. Os neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos com origem nos núcleos do rafe, que exercem uma acção reguladora de tipo inibitório têm a sua actividade diminuída com a administração de progabide, depreendendo-se que o aumento da frequência de renovação da noradrenalina seria a consequência da inibição destes mecanismos inibitórios.

A influência exercida sobre a actividade dos neurónios dopaminérgicos nigroestriados e mesocorticais, pelo progabide e SL75102, é coincidente com a de outros estudos realizados com outros agonistas dos receptores GABAérgicos. Confirma-se mais uma vez que a activação dos receptores GABAérgicos localizados nos neurónios dopaminérgicos nigroestriados leva a uma diminuição da dopamina libertada por esses mesmos neurónios no estriado. Estes dados são aliás consubstanciados pelo facto de o progabide potenciar a catalepsia induzida pelo haloperidol, efeito que é bloqueado pela bicuculina. A potenciação da catalepsia induzida pelo haloperidol está relacionada com uma diminuição da dopamina libertada no estriado. Em relação aos neurónios dopaminérgicos mesocorticais com origem na área tegmental ventral (A<sub>9</sub>, A<sub>10</sub>) e com distribuição dos terminais neuronais a áreas como o núcleo accumbens, hipotálamo, amígdala, hipocampo, núcleo olfactivo e cortex cerebral, observou-se também uma diminuição da libertação da dopamina por estes terminais, que no entanto não é tão intensa como a observada em relação aos neurónios nigroestriados.<sup>5</sup>

Esta diferença de comportamento estaria segundo alguns autores relacionada com a presença e ausência, respectivamente, de um sistema regulador de tipo feed-back negativo que seria da responsabilidade dos neurónios GABAérgicos. Como já atrás foi referido, discute-se ainda a existência de um sistema neuronal GABAérgico relacionado com o sistema dopaminérgico mesocortical.

A diminuição da libertação de dopamina, tanto nos neurónios dopaminérgicos do sistema nigroestriado como do sistema mesocortical, é sensível à bicuculina.

Tal como já tinha sido descrito para o GABA ou para o muscimol, também o progabide em baixas doses provoca um aumento da libertação de dopamina pelos terminais dos

neurónios dopaminérgicos nigroestriados, o que provavelmente está relacionado, segundo alguns autores, com a activação de receptores GABAérgicos localizados em neurónios não dopaminérgicos com origem na pars reticulata da substância nigra e que são cerca de 20 vezes mais sensíveis aos efeitos do GABA do que os neurónios dopaminérgicos da pars compacta. Estes neurónios localizados na pars reticulata por sua vez influenciam de forma positiva os neurónios dopaminérgicos da pars compacta. Torna-se assim compreensível, o facto de pequenas concentrações de GABA ou de um agonista GABAérgico apresentarem um efeito inverso ao obtido aquando da utilização de doses mais elevadas.<sup>7</sup>

A activação pelo progabide, dos receptores GABAérgicos que estão relacionados com os neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos, tem como consequência uma diminuição da actividade daqueles neurónios. A inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina pela  $\alpha$ -propildopacetamida (inibidor da hidroxilase do triptofano) e pelo NSD1015 (inibidor da descarboxilase do 5-hidroxitriptofano) é potenciada pelo progabide.

A diminuição da síntese de 5-hidroxitriptamina induzida pela activação dos receptores GABAérgicos não é um fenómeno generalizado a todas as estruturas do SNC que possuem inervação 5-hidroxitriptaminérgica, mas somente observável em áreas como o estriado. Isto faz presumir a activação dos referidos receptores GABAérgicos localizados nos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos com origem nos núcleos do rafe, responsáveis pela projecção rafe-substância nigra-estriado.

Em resumo, e tendo principalmente em consideração as alterações bioquímicas induzidas pelo progabide, entre as quais se destacam o aumento da frequência da renovação da noradrenalina, a diminuição da síntese e libertação da 5-hidroxitriptamina, que são de certo modo comparáveis às induzidas por certos antidepressivos (tricíclicos e tetracíclicos), é de prever que além da sua eficácia como anticonvulsivante o progabide tenha actividade antidepressiva, o que foi já evidenciado em alguns ensaios clínicos em doentes deprimidos.

A redução pelo progabide, da libertação da dopamina pelos neurónios nigroestriados, apresenta-se com potencial interesse clínico em determinadas situações como a discinesia tardia induzida pelos neurolépticos, os movimentos involuntários anormais induzidos pela L-DOPA e a coreia de Huntington.

### Benzodiazepinas

Grande parte, se não todos, os efeitos das benzodiazepinas (BDZ) ao nível do SNC estão dependentes de uma elevação da actividade de determinadas sinapses que utilizam como mediador o GABA. As BDZ não têm actividade directa sobre os receptores GABAérgicos mas devem os seus efeitos à potenciação do próprio GABA endógeno. Esta ideia é reforçada quando se observa que uma diminuição da formação do GABA, por inibição da descarboxilase do ácido glutâmico pela tiosemicarbazida, conduz a uma redução da eficácia do diazepam (DZP). Por sua vez, uma elevação das concentrações de GABA na biofase, quer por bloqueio da transaminase do GABA pelo ácido amino-oxiacético (passo catabólico) quer pelo bloqueio da captação neuronal pelo ácido nipecótico e ácido diaminobutírico, potenciam os efeitos do DZP e das BDZ em geral.<sup>8-13</sup>

Esta acção facilitadora dos efeitos do GABA evidenciada pelas BDZ, poderia ser teoricamente devida a uma indução da síntese do mediador, a um aumento na sua libertação, a uma inibição da sua metabolização ou a um bloqueio da

sua captação para o interior das terminações GABAérgicas, alcançando o GABA uma maior concentração na fenda sináptica. Porém, as BDZ não exibem de forma marcada nenhuma destas acções e a sua acção potenciadora não se deve por isso a um aumento nas quantidades disponíveis do GABA, mas à *melhoria* da resposta dos neurónios às concentrações habituais do mediador.

Pensa-se que as BDZ não actuam sobre os receptores do GABA, mas que se fixam a uma molécula da proximidade, que passou a ser conhecida como receptor das BDZ, e que dessa ligação, por um mecanismo não esclarecido, resulta uma maior acessibilidade do receptor GABAérgico para o GABA.<sup>10, 15-17</sup>

É óbvio que a designação *receptor* das BDZ é introduzida por comodidade de exposição, uma vez que não é logicamente aceitável que se denomine uma estrutura endógena pelas substâncias exógenas que nela actuam. Por analogia seria o mesmo dizer que os peptídeos opiáceos são agonistas dos receptores da morfina.

Facto confirmativo do sinergismo entre GABA e BDZ é o de que o DZP aumenta a fixação do (<sup>3</sup>H)-GABA quando se incubam membranas neuronais com o GABA marcado com trítio. Por outro lado, quando se faz a incubação com (<sup>3</sup>H)-DZP, o GABA potencia a sua fixação.

Além do GABA outros agonistas GABAérgicos como o muscimol, o ácido trans-4-aminocrotónico, o B (p-clorofenil) GABA (baclofeno) e a *gamma*-butirolactona aumentam a afinidade das BDZ para o receptor por alteração da constante de equilíbrio caracterizada por um aumento da frequência de associação sem alteração da frequência de dissociação. A bicuculina, no entanto, diminui esta afinidade o que, segundo alguns autores, seria devido ao bloqueio dos receptores GABAérgicos.<sup>18-19</sup>

Estes factos, aliados ao conhecimento de que o GABA e outros fármacos agonistas GABAérgicos provocam uma diminuição da fixação de (<sup>3</sup>H)-GABA a membranas neuronais, o mesmo se passando em relação à diminuição da fixação do (<sup>3</sup>H)-DZP induzida por BDZ não marcadas com trítio, são a favor tanto da existência de um receptor GABAérgico como de um receptor benzodiazepínico, receptores estes com afinidade e especificidade bem definidas. Observou-se também uma elevação da afinidade das BDZ para o respectivo receptor quando a incubação se fazia na presença de vários iões tais como o Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e o Zn<sup>2+</sup>.<sup>18</sup> Este aumento da afinidade manifesta-se igualmente em relação a iões monovalentes sendo de carácter aditivo quando se faz a incubação com GABA e NaCl.<sup>20</sup>

O conhecimento do processo molecular intrínseco ao funcionamento do receptor GABAérgico, receptor benzodiazepínico e ionóforo do cloreto não está ainda esclarecido na sua totalidade, mas o facto da activação do receptor GABAérgico aumentar a permeabilidade da membrana neuronal ao cloreto por uma interacção com o respectivo ionóforo, aumento este que é potenciado pela presença de um agonista dos receptores benzodiazepínicos, permite sugerir um relacionamento muito próximo destes três elementos.<sup>21, 22</sup> A identificação recente de uma terceira proteína diferente do receptor do GABA e do receptor das BDZ e designada por *modulina do GABA*,<sup>15-16, 23</sup> que existe em grande quantidade no SNC e que dificulta a transmissão nervosa nas sinapses em que o GABA é mediador (porque reduz a afinidade deste neurotransmissor para o seu receptor), é o elo de ligação que sustenta uma interpretação dos fenómenos atrás descritos. O DZP e outras BDZ competem com a modulina do GABA para o mesmo local de fixação. Admite-se assim que a modulina do GABA se encontra habitualmente fixa aos receptores nos quais também actuam as BDZ e que

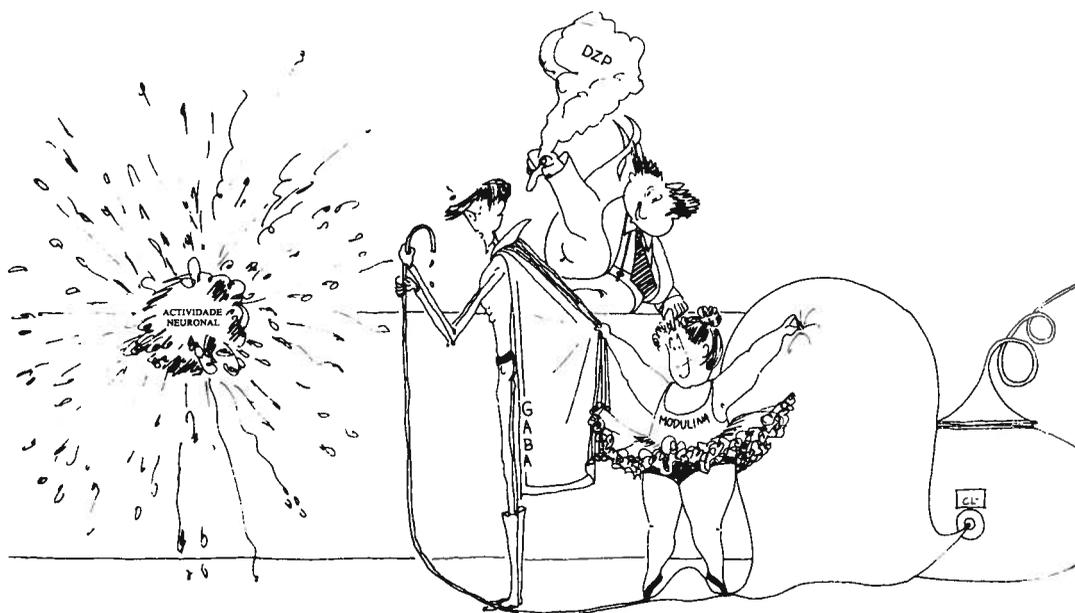


Figura 3: O GABA é um frenador da actividade neuronal porque aumenta a permeabilidade ao cloreto. Esta acção está submetida a uma inibição constante pela modulina, que é removida pelas benzodiazepinas.

estas, ao deslocarem a proteína, *desbloqueiam* o receptor GABAérgico<sup>24</sup> (Fig. 3). A constituição química da modulina do GABA está ainda insuficientemente estudada, conhecendo-se para já a sua natureza proteica e que existe no SNC sob duas formas de diferentes pesos moleculares (15 000 e 1800). A distribuição e proporção entre estas duas formas, no SNC, não está ainda caracterizada.

O estudo do desenvolvimento ontogénico dos locais de ligação do (<sup>3</sup>H)-DZP a membranas neuronais de rato permitiu definir o carácter evolutivo destes locais, estando descrito que ao 16.º dia de gestação estes locais de ligação representam 5% dos encontrados no adulto, atingindo os 26% na altura do nascimento e níveis próximos dos do adulto por volta do 21.º dia de vida.<sup>19, 25</sup> Observa-se também um paralelismo entre o desenvolvimento ontogénico dos locais de ligação para o (<sup>3</sup>H)-DZP e o (<sup>3</sup>H)-GABA.<sup>18, 26</sup> Tal como para o (<sup>3</sup>H)-DZP, a percentagem de fixação de (<sup>3</sup>H)-GABA durante a maturação do SNC deve-se essencialmente a uma alteração do número de locais de ligação sem modificações significativas na afinidade.<sup>19</sup>

A introdução recente de uma técnica, na qual se incubam membranas neuronais com (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam na presença de radiação ultra-violeta, permite que a ligação entre o fármaco e o receptor se torne irreversível. A posterior separação das proteínas fixadas ao (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam por electroforese (SDS-gel) e posterior fluorografia permitiu a caracterização de determinados componentes dos receptores das BDZ.<sup>27, 28</sup> Inicialmente tinha sido descrita uma proteína com peso molecular de 51 000 daltons (p51), mas com esta técnica observou-se a existência de outras proteínas com peso molecular de 53 000 (p53), 55 000 (p55) e 59 000 (p59) que são fixadas pelo (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam com intensidades variáveis. Destas três últimas a de fixação mais intensa é a p55, em membranas hipocámpais.

A posterior caracterização destas duas proteínas p51 e p55 permitiu concluir que estamos na presença de dois receptores ou de parte de dois receptores das BDZ, acoplados ao receptor GABAérgico, bicuculino-sensível, com diferentes localizações no SNC. A reforçar a ideia da existência de dois tipos de receptores formalmente diferentes, está a demonstração, por experiências de radioligandos, da exis-

tência de duas populações de receptores distintos. Estudos mais recentes indicam inclusivamente que estes diferentes tipos de receptores das BDZ apresentam um desenvolvimento pós-natal diverso.<sup>29</sup> Os receptores identificados apresentam uma afinidade diferente em relação a um agonista, o CL218872 (3-metil-6-a-3-trifluorometil -1,2,4,-triazolo 4,3-b piridazina) (derivado triazolopiridazínico), o que se manifesta por uma capacidade deste fármaco em deslocar o (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam dos respectivos locais de ligação.<sup>30</sup>

Assim classificaram-se conforme a afinidade para o CL218872, os receptores para as BDZ em tipo 1 (BDZ-1) (alta afinidade) e tipo 2 (BDZ-2) (baixa afinidade). Experiências de tipo comportamental permitiram relacionar tanto a actividade ansiolítica como a actividade anticonvulsivante das BDZ (protecção em relação às convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol) com a activação preferencial dos receptores de tipo 1, enquanto a actividade sedativa e atáxica estaria mais especificamente relacionada com os receptores de tipo 2.

Em relação à distribuição dos diferentes receptores pelo SNC constata-se que o tipo 1 e tipo 2 têm localização diferente, apresentando o cerebelo uma grande percentagem de receptores de tipo 1 enquanto o cortex cerebral possui ambos os tipos de receptores.<sup>18, 24</sup> Estão descritas, áreas que apresentam uma maior densidade de receptores de tipo 2, como a lâmina superior do colículo superior, o núcleo caudado e o núcleo putamen e parte do dentado.<sup>31</sup>

Comparando a actividade ansiolítica e sedativa evidenciada por fármacos agonistas dos diferentes tipos de receptores e as acções mediadas por determinadas estruturas cerebrais tentou-se encontrar, sem êxito, uma predominância dos receptores de tipo 1 em estruturas mais directamente relacionadas com a ansiedade. No hipocampo, amígdala e cortex frontal, áreas tidas como implicadas fortemente na ansiedade, não existe uma predominância dos receptores de tipo 1 em relação ao tipo 2, excepto na lâmina IV do cortex frontal.<sup>32</sup>

Quanto à variação da densidade de receptores benzodiazepínicos, tem-se observado uma diminuição acentuada em determinadas situações patológicas como a coreia de Huntington e na coreia induzida pela injeção de ácido cálcico

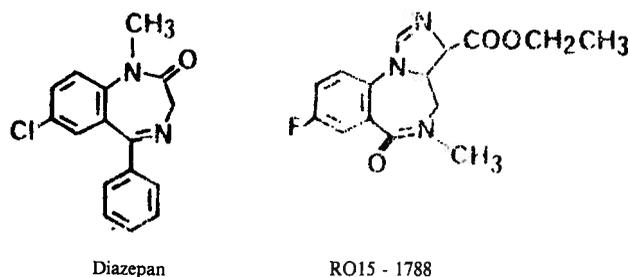


Figura 4: Estrutura química do diazepam e do seu antagonista competitivo.

nos gânglios da base.<sup>33</sup> Existe igualmente uma diminuição dos receptores benzodiazepínicos no cerebelo e substância nigra quando se faz a injeção intra-cerebelar ou intra-substância nigra de ácido cáinico, dados estes que são a favor de uma localização neuronal dos receptores das benzodiazepinas.<sup>9</sup> Outra situação que está relacionada com uma diminuição do número de receptores BDZ é a relacionada com o fenómeno de tolerância quando da administração prolongada de benzodiazepinas.

Outro acontecimento que enriqueceu a nossa compreensão dos mecanismos de activação dos receptores das BDZ foi o desenvolvimento de antagonistas específicos. Um dos mais bem estudados é o RO15-1788 (Fig. 4) que apresenta capacidade de inibir a ligação de (<sup>3</sup>H)-DZP e de (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam a membranas neuronais isoladas de cérebro de rato. A afinidade de RO15-1788 para os locais de fixação é 4 vezes superior à do próprio DZP.<sup>34-39</sup>

A evidência obtida com estudos de radioligandos não indica, por si só, que haja antagonismo dos receptores BDZ. Constituem prova de que há inibição da fixação das BDZ a estruturas neuronais que podem ou não corresponder aos receptores, isto é, a locais de acção farmacológica. A confirmação do antagonismo pelo RO15-1788 manifesta-se indiscutivelmente pela capacidade de reverter, rápida e completamente, os efeitos induzidos pela administração aguda das BDZ. Este fenómeno, que se pode comparar ao antagonismo exercido pela naloxona em relação aos efeitos agudos da morfina, terá seguramente importância clínica.<sup>35, 40, 41</sup> O RO15-1788 ou compostos idênticos são o antídoto específico para a intoxicação aguda por BDZ, pois antagonizam imediatamente os efeitos terapêuticos e laterais das BDZ.

Como também seria de esperar, o RO15-1788 bloqueia especificamente alterações bioquímicas provocadas pelas BDZ no SNC: assim, embora seja desprovido de qualquer efeito directo sobre o conteúdo de GMP cíclico (3,5-guanosina monofosfato) é capaz de antagonizar (quando administrado depois) a redução deste nucleotídeo induzida pelas BDZ. A diminuição deste conteúdo de GMP cíclico é um efeito comum a outros fármacos com actividade sedativa, como os barbitúricos, o etanol, os neurolépticos ou o meprobamato. A selectividade de acção do RO15-1788 para as BDZ está bem patente na ausência de efeito frente à redução do GMP cíclico por estes fármacos.

Os efeitos electrofisiológicos das BDZ são igualmente abolidos pelo RO15-1788, que reverte a redução da actividade eléctrica espontânea provocada pelas BDZ em núcleos como a pars compacta da substância nigra e rafe dorsal.

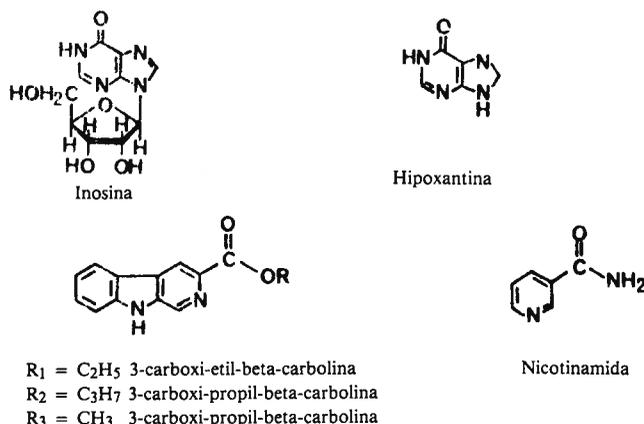


Figura 5: Candidatos a ligandos do «receptor» das benzodiazepinas.

A ideia muito simples de que a existência em tecidos normais de um receptor com actividade farmacológica importante faz prever que exista também normalmente uma substância endógena capaz de actuar sobre ele, foi coroada de êxito com a descoberta recente, entre os constituintes normais da hipófise e do SNC, de peptídeos opiáceos (endorfinas e encefalinas), isto é, de compostos que fisiologicamente estimulam os receptores que também são activados pela morfina, fármaco que não entra evidentemente na composição normal dos organismos animais. Compreende-se que após a detecção dos receptores das BDZ se tenha iniciado uma busca activa no tecido nervoso de substâncias endógenas capazes de se ligarem a esses receptores e que pudessem por isso ter importância no funcionamento normal do SNC ou que contribuíssem para as situações patológicas de ansiedade, insónia, convulsões ou hipertonia muscular acessíveis ao efeito terapêutico das BDZ. Tais substâncias não foram ainda identificadas, mas existem já descritos alguns possíveis candidatos.

As purinas (adenina, guanina, hipoxantina) (Fig. 5) ou os seus nucleosídeos (adenosina, guanosina, inosina) foram inicialmente alvo de interesse em genética molecular como simples precursores ou produtos de fragmentação dos ácidos nucleicos, mas têm vindo nos últimos anos a ser também estudados como fármacos e até como possíveis neurotransmissores libertados de neurónios não-adrenérgicos e não-colinérgicos designados por *purinérgicos*. Contudo, estas purinas ou os seus nucleosídeos, embora apresentem uma ligação preferencial ao receptor das BDZ, têm uma afinidade baixa (cerca de 200 000 vezes inferior à do DZP) e à excepção de uma acção anticonvulsivante posta em evidência sob condições experimentais muito particulares, não conseguem reproduzir nem bloquear os efeitos típicos das BDZ.<sup>42</sup>

Pelo contrário, a nicotinamida, substância também abundante no SNC, bem conhecida como vitamina do grupo B com actividade anti-pelagra, exhibe acção anticonvulsivante, relaxante muscular e hipno-indutora e tem efeitos sobre a actividade electrofisiológica das membranas e sobre o comportamento de animais de experiência, fortemente semelhantes ao das BDZ. Contudo, a sua *avidez* para os receptores das BDZ é ainda 4 vezes mais baixa do que a das purinas, o que significa serem necessárias grandes concentrações de nicotinamida nas áreas onde existem esses receptores para que os seus efeitos se produzam; não são conhecidos resultados que levem a admitir a hipótese de uma libertação em tal quantidade.

As *beta*-carbolicinas são um grupo de compostos já conhecidos em Botânica desde o século passado, quando os espantosos químicos alemães do século XIX isolaram uma delas (a harmalina) duma planta asiática (*Perganum harmala*), mas o interesse pelo seu estudo renovou-se cerca de 1970 porque se podem formar em tecidos animais a partir do triptofano, da triptamina ou da 5-hidroxitriptamina (5-HT). Três delas, a 3-carboxi-metil, a 3-carboxi-etil e a 3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina têm uma afinidade para os receptores das BDZ muito elevada, podendo ser superior à do próprio DZP. Estas três 3-carboxi-*beta*-carbolicinas só se têm conseguido isolar do tecido nervoso em condições muito particulares de extracção, o que levanta algumas dúvidas sobre se existem como tal no tecido intacto ou se são apenas um artefacto experimental.<sup>12</sup> Não existem, no entanto, dúvidas quanto à presença de outras *beta*-carbolicinas endógenas animais, nem quanto a potentes acções centrais de algumas delas (a harmalina, por exemplo, é um potente alucinogénio), mas nenhuma delas apresenta uma afinidade para os receptores BDZ comparável à dos derivados 3-carboxílicos.<sup>43</sup>

A ideia de que as *beta*-carbolicinas possam interagir com estes receptores começa a tomar um certo peso porque em experiências com radioligandos se observa que são capazes de antagonizar a fixação do (<sup>3</sup>H)-DZP a membranas neuronais. Este efeito é específico, uma vez que a fixação de certos radioligandos como o (<sup>3</sup>H)-GABA e (<sup>3</sup>H)-estricnina, não é afectada por estas *beta*-carbolicinas. A 3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina parece ter preferência pelo sub-tipo BDZ-1 enquanto que a 3-carboxi-etil-*beta*-carbolicina se fixa independentemente às duas subpopulações desses receptores.<sup>44</sup>

As experiências com radioligandos nada dizem sobre a actividade farmacológica das substâncias em estudo: apenas permitem demonstrar locais de fixação específicos e saturáveis. Só através de experiências de farmacodinamia se pode concluir se a essa fixação corresponde uma acção farmacológica (estimulante ou inibidora) dessas substâncias.

Só muito recentemente surgiram os estudos de farmacodinamia das *beta*-carbolicinas, e os seus resultados vieram aumentar, ainda mais, o interesse pelo trabalho científico com estes compostos. A 3-carboxi-metil bem como a 3-carboxi-etil-*beta*-carbolicina, esta última de uma forma menos intensa, apresentam a capacidade de induzir convulsões. O mecanismo de acção parece estar dependente da fixação destes compostos ao receptor das BDZ, dado que esta actividade convulsivante é antagonizada quer pela administração de DZP quer de RO15-1788. Verifica-se assim que o RO15-1788 é capaz de antagonizar não só o efeito anti-convulsivante do DZP como as convulsões provocadas pela 3-carboxi-metil-*beta*-carbolicina.<sup>45-46</sup>

A 3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina comporta-se como o RO15-1788: esta *beta*-carbolicina bloqueia a actividade anticonvulsivante do DZP e as convulsões induzidas pelas 3-carboxi-metil e 3-carboxietil. Tal como o RO15-1788, a 3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina não apresenta acções próprias convulsivante ou anti-convulsivante.

Parece assim ser possível distinguir três consequências diferentes da fixação ao receptor das BDZ. O DZP e as outras BDZ ligam-se ao receptor, potenciam o efeito do GABA e são anticonvulsivantes. A 3-carboxi-etil e a 3-carboxi-metil-*beta*-carbolicina fixam-se às mesmas estruturas, mas antagonizam o efeito do GABA e são convulsivantes. O RO15-1788 e a 3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina apresentam o comportamento característico dos antagonistas: não possuem actividade intrínseca (convulsivante ou anticonvulsivante) mas bloqueiam as acções das BDZ e das *beta*-carbolicinas convulsivantes.

Em resumo: se estas *beta*-carbolicinas forem, de facto, compostos com uma existência fisiológica, constituirão um sistema complexo de regulação da actividade neuronal, uma vez que o SNC disporia de substâncias com características sobreponíveis a *anti-benzodiazepinas* endógenas (3-carboxi-metil e 3-carboxi-etil-*beta*-carbolicina), e, simultaneamente, de substâncias capazes de antagonizar competitivamente as acções dessas *anti-benzodiazepinas* fisiológicas, (3-carboxi-propil-*beta*-carbolicina).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as críticas e sugestões preciosas dos Professores Walter Osswald e José Garrett e o paciente trabalho de desenho e dactilografia das Senhoras Cristina Soares da Silva, Eva Abrantes e Maria Luísa Vasques.

## BIBLIOGRAFIA

1. BOWERY, N. G.: Baclofen 10 years on. *Trends in Pharmacological Sciences* 1982; 3: 400-403.
2. DE FEUDIS, F. V.: Gama-aminobutyric acid and analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences* 1982; 3: 444-446.
3. WORMS, P.; DEPOORTERE, H.; DURAND, A.; MORSELLI, P. L.; LLOYD, K. G.; BARTHOLINO, G.: Gama-aminobutyric acid (GABA) receptor stimulation. I. Neuropharmacological profiles of progabide (SL76002) and SL 75102, with emphasis on their anticonvulsant spectra. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 660-671.
4. LLOYDE, K. G.; ARBILLA, S.; BEAUMONT, K. et al.: Gama-aminobutyric acid (GABA) receptor stimulation. II. Specificity of progabide (SL76002) and SL75102 for the GABA receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 672-677.
5. SCATTON, B.; ZIVKOVIC, B.; DEDEK, J. et al.: Gama-aminobutyric acid (GABA) receptor stimulation. III. Effect of progabide (SL 76002) on norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine turnover in rat brain areas. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 678-688.
6. BOWERY, N. G.; HUDSON, A.L.: Gama-aminobutyric acid reduces the evoked release of (<sup>3</sup>H)-noradrenaline from sympathetic nerve terminals. *Br J Pharmacol* 1979; 66: 108P.
7. GRACE, A. A.; BUNNEY, B. S.: Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur J Pharmacol* 1979; 59: 211-218.
8. SEPINWALL, J.; COOK, L.: Mechanism of action of the benzodiazepines: behavioral aspect. *Fed Proc* 1980; 39: 3024-3031.
9. HESDON, R. H.; COYLE, J. T.: Selective destruction of neurons by a transmitter agonist. *Science* 1977; 198: 71-72.
10. TALLMAN, J. F.; STEVEN, M. P.; SKOLNICK, P.; GALLAGER, D. W.: Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines. *Science* 1980; 207: 274-281.
11. LOSCHER, W.: GABA-Mimetics: A new type of anticonvulsants? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 321: R8.
12. BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R.: Brain specific benzodiazepine receptors. *Br J Psychiat* 1978; 133: 248-260.
13. BOWLING, C.; SQUIRES, R.: Brain specific benzodiazepine receptors. *Br J Psychiat* 1978; 133: 248-260.
14. MOHLER, H.; OKADA, T.: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 1977; 198: 849-851.

15. MOHLER, H.: Benzodiazepine receptors: are there endogenous ligands in the brain? *Trends in Pharmacological Sciences* 1981; 2: 116-119.
16. STUDY, R. E.; BARKER, J. L.: Cellular mechanisms of benzodiazepine action. *JAMA* 1982; 247: 2147-2157.
17. COSTA, E.; GUIDOTTI, A.: Molecular mechanism in the receptor actions of benzodiazepines. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1979; 531-545.
18. SPETH, R. C.; JOHNSON, R.W.; REGAN, J. et al.: The benzodiazepine receptor of mammalian brain. *Fed Proc* 1980; 39: 3032-3038.
19. GALLAGHER, D. W.; MALLORGA, P.; THOMAS, J. W.; TALLMAN, J. C.: GABA-benzodiazepine interactions: physiological and developmental aspects. *Fed Proc* 1980; 39: 3040-3049.
20. MARTIN, I.; CANDY, J.M.: Facilitation of benzodiazepine binding by sodium chloride and GABA. *Neuropharmacology* 1978; 17: 993-998.
21. GELLER, H. X.; HOFFER, B. J.; TAYLOR, D. A.: Electrophysiological actions of benzodiazepines. *Fed Proc* 1980; 39: 3016-3023.
22. HEAFELY, W.: The gabaergic synapse as the basis of benzodiazepine actions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 321: R7.
23. GUIDOTTI, A.; TOFFANO, G.; COSTA, F.: An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 1978; 275: 553-555.
24. GUIDOTTI, A.; BARALDI, M.; LEON, A.; COSTA, E.: Benzodiazepines: A tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. *Fed Proc* 1980; 39: 3039-3042.
25. MALLORGA, P.; HAMBERG, M.; TALLMAN, J.; GALLANGER, D.: Ontogenic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacology* 1980; 19: 405-408.
26. COYLE, J.; ENNA, S.: Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in rat brain. *Brain Res* 1976; 111: 119-133.
27. SIEGHART, W.; MOEHLER, H.: (<sup>3</sup>H)-clonazepam, like (<sup>3</sup>H)-flunitrazepam, is a photoaffinity label for the central type of benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 171-173.
28. SIEGHART, W.; KAROBATH, M.: Molecular heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Nature* 1980; 286: 285-287.
29. SIEGHART, W.: Heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 321: R8.
30. SUPAVILAI, P.; KAROBATH, M.: Action of pyrazolopyridines as modulators of (<sup>3</sup>H)-Flunitrazepam binding to the GABA Benzodiazepine receptor complex of the cerebellum. *Eur J Pharmacol* 1981; 70: 183-193.
31. YOUNGS, W. S.; NIEHOFF, D.; KUHAR, M. J.; BEER, B.; LIPPO, A. S.: Multiple Benzodiazepine receptor localization by light microscopy radiohistochemistry. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 216: 425-430.
32. BABBINI, M.; GAIARDI, M.; BARTOLETTI, M.: Anxiolytic versus sedative properties in the benzodiazepine series: Differences in structure-activity relationships. *Life Sciences* 1979; 25: 15-22.
33. MOHLER, H.; OKADA, T.: The benzodiazepine receptor in normal and pathological human brain. *Br J Psychiat* 1978; 133: 261-268.
34. DARRAGH, A.; BRICK, I.: Reversal of benzodiazepine induced sedation by intravenous R015-1788. *Lancet* 1981; 2: 1042.
35. DARRAGH, A.; LAMBLE, R.; SCULLY, M.: Investigation in man of the efficacy of a benzodiazepine antagonist, R015-1788. *Lancet* 1981; 2: 8-10P.
36. CLINESCHMIDT, B. V.: Effect of the benzodiazepine receptor antagonist R015-1788 on the anticonvulsant and anticonflict actions of MK-801. *Eur J Pharmacol* 1982; 84: 119-121.
37. LaSALLE, G. L. L.; FELDBLUM, S.: Reversal of the anticonvulsant effects of diazepam on amygdaloid-kindled seizures by a specific benzodiazepine antagonist: R015-1788. *Eur J Pharmacol* 1983; 86: 91-93.
38. HUNKELER, W.; MOHLER, H.; PIERI, L. et al.: Selective antagonists of benzodiazepine. *Nature* 1981; 290: 514-516.
39. MOHLER, H.: Benzodiazepine receptors: interaction of agonists and antagonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 321: R7.
40. THIEBOT, M. H.; DOARE, L.; PREECH, A. J.; SIMON, P.: U43, 465F: A benzodiazepine with antidepressant activity? Interaction with R015-1788 and d,1-propranolol. *Eur J Pharmacol* 1982; 84: 103-106.
41. BRAESTRUP, C.; SCHMIECHEN, R.; NEFF, G.; NIELSON, M.; PETERSON, E. N.: Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science* 1982; 216: 1241-1243.
42. SKOLICK, P.; PAUL, S. M.; MARANGOS, P. J.: Purines as endogenous ligands of the benzodiazepine receptor. *Fed Proc* 1980; 39: 3050-3055.
43. SHULGIN, A. T.: Chemistry of Psychomimetics. In: Hoffmeister F, Stille G, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. vol. 55/III. Berlin: Springer-Verlag, 1982; 3-29.
44. ROMMELSPACHER, H.; NANZ, C.; BORBE, H. O. et al.: Benzodiazepine antagonism by harmaline and other beta-carbolines in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 1981; 70: 409-416.
45. VALIN, A.; DODD, R. H.; LISTON, D. R.; POTIER, P.; ROSSIER, J.: Methyl-beta-carboline induced convulsions are antagonized by R015-1788 and by propyl-beta-carboline. *Eur J Pharmacol* 1982; 85: 93-97.
46. FEHSKE, K. J.; ZUBE, I.; BROBE, H. O.; WOLLERT, U.; MULLER, W. E.: Beta-carboline binding indicates the presence of benzodiazepine receptor subclass in the bovine central nervous system. *Neunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 319: 172-177.

Pedido de separatas: Daniel Moura  
Laboratório de Farmacologia  
Faculdade de Medicina do Porto  
Alameda Hernâni Monteiro  
4200 Porto. Portugal.