

Tesis Doctoral

Modulación redox de los receptores GABA_c p1

Calero, Cecilia Inés

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Calero, Cecilia Inés. (2010). Modulación redox de los receptores GABA_c p1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Calero, Cecilia Inés. "Modulación redox de los receptores GABA_c p1". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

MODULACIÓN REDOX DE LOS RECEPTORES GABA_c ρ1

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**.

Nombre del autor: Lic. Cecilia Inés Calero

Nombre del director: Dr. Daniel Juan Calvo
Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI).

Buenos Aires, 2010

RESUMEN.

MODULACIÓN REDOX DE LOS RECEPTORES GABA_Cρ₁.

En condiciones fisiológicas en el SNC la producción de especies reactivas de oxígeno es una consecuencia natural del metabolismo celular y el posible daño oxidativo se encuentra balanceado por antioxidantes intrínsecos.

La actividad de un gran número de receptores sinápticos y canales iónicos puede ser modulada por agentes redox endógenos y/o farmacológicos. Estos incluyen a los NMDAR y AChR, así como también a los GABA_AR, entre otros.

Aunque, los GABA_AR son susceptibles a diversos agentes redox, estudios previos sugerían una falta de sensibilidad de los GABA_CR a este tipo de modulación.

Con el fin de estudiar si compuestos con propiedades redox son capaces de modular la actividad de los GABA_CR se expresaron heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* GABA_CR ρ₁ homoméricos (GABA_{ρ1}R), y sus respuestas -corrientes de Cl⁻ evocadas por GABA- se registraron electrofisiológicamente.

Nuestros resultados muestran que los GABA_{ρ1}R, al igual que otros miembros de la familia *cys-loop*, son sensibles a los agentes redox. En presencia de compuestos reductores las curvas D-R se desplazaron hacia la izquierda, mientras que los oxidantes produjeron el efecto opuesto, esto indica un aumento o una disminución, respectivamente, en la afinidad aparente por el agonista de los GABA_{ρ1}R. Asimismo, encontramos que la modulación inducida por ácido ascórbico, un antioxidante celular, presenta tanto componentes redox como alostéricos. La modulación de los GABA_{ρ1}R fue susceptible a la modificación química de los grupos sulfhidrilos y a la mutación H141D, indicando que estos sitios, localizados en el dominio extracelular, tienen un importante rol en el proceso.

PALABRAS CLAVES: GABA, RECEPTORES IONOTRÓPICOS, REDOX, ÁCIDO ASCÓRBICO, MODULACIÓN ALOSTERICA, QUERCETINA.

RESUMEN EN INGLÉS.

REDOX MODULATION OF GABA_C ρ₁ RECEPTORS.

Free radical production is a natural consequence of metabolism and the possible oxidative damage is limited by cellular antioxidant mechanisms.

Activity of many receptors and channels in the CNS can be regulated by redox mechanisms. Whereas the action of redox agents has been demonstrated on GABA_A receptors, the sensitivity of GABA_C receptors has not been studied.

Here we report the effects of ascorbic acid, together with several reducing and oxidizing agents on homomeric GABA_{ρ1} receptors (GABA_{ρ1}R) expressed in *X. laevis* oocytes.

Our results showed that, similarly to others members of the *cys-loop* family, GABA_{ρ1}R were highly sensitive to redox modulation. Dose–response curves for GABA were shifted to the left in the presence of reducing agents, whereas oxidizing agents produced the opposite effect. Susceptibility was strongly dependent on GABA concentration. We also found that ascorbic acid modulation had both redox and non-redox components. GABA_{ρ1}R modulation was affected by chemical modification of SH- and site-directed mutagenesis of H141, indicating that these sites, located in the extracellular domain, play a key role in this process.

KEY WORDS: GABA, IONOTROPIC RECEPTORS, REDOX, ASCORBIC ACID, ALLOSTERIC MODULATION, QUERCETIN.

A Guido.

“Nada, absolutamente nada, que tenga que hacerse por la mañana vale realmente la pena”. (Bobby vs Flores 2006 – 2009)

AGRADECIMIENTOS.

A Dani por las oportunidades.

A la Dra Flawia y al resto del INGEBI por abrirme las puertas.

Al CONICET por otorgarme la beca para poder realizar esta tesis.

A Guido porque sin vos nada de todo esto hubiera sido posible.

A mi hermano por creer en mi, siempre.

A mis viejos por todo.

A Marce por los sambuches de miga.

A Jime porque Chayanne es un vampiro.

A Beck por ser incondicional.

Al Dr. Zorrilla de San Martín por enseñarme el camino de la luz.

A Lidia por ser mi consejera espiritual.

A mamá Caro por enseñarme a volar.

A Diego por los buenos chistes.

A Lucas por creer en la bondad de la gente.

A Guille por ser malo.

A Pablito Nuñez por no ser tan bueno.

Al Dr. Laplagne por los chats.

A María por estar desde el principio.

A Dieguito Weinger por hacerme sonreír siempre.

A Teté por ser siempre tan linda conmigo.

A mi madrina por regalarme mi primer microscopio.

A Guchi por discutir conmigo.

A Javi, Juan, Vivi, Flor, Clau, Fran y Andrea por el día a día.

A Andreita por la energía joven.

A Belén y Eleo por haberme apoyado.

A Rubén, Gladys, a Irma y a Mariano por hacer las cosas más fáciles.

ÍNDICE

RESUMEN EN CASTELLANO	2
RESUMEN EN INGLÉS	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	6
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	10
I. MODULACIÓN REDOX	11
ii. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GABA	12
ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	13
CARACTERÍSTICAS DE LAS RESPUESTAS MEDIADAS POR LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GABA	15
LOCALIZACIÓN DE LOS GABA _c R	17
III. MODULACIÓN POR AGENTES REDOX	19
IV. ÁCIDO ASCÓRBICO	22
V. MODULACIÓN DE LOS GABA _{ρ1} R POR FLAVONOIDES	27
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
CAPÍTULO 1	41
I. MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA _{ρ1} R POR AGENTES REDUCTORES Y OXIDANTES	42
II. MODULACIÓN REDOX DE LOS RECEPTORES GABA _{ρ1} R	57
III. PARTICIPACIÓN DE LAS CISTEINAS 177 Y 191 EN LA MODULACIÓN POR AGENTES REDOX	59
CAPÍTULO 2	68
I. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS GABA _{ρ1} R POR ÁCIDO ASCÓRBICO	69
ii. EFECTO DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LAS RESPUESTAS DE LOS GABA _{ρ1} R	75
iii. AMINOÁCIDOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN POR ÁCIDO ASCÓRBICO DE LOS GABA _{ρ1} R	79
CAPÍTULO 3	92

I. EL ÁCIDO ASCÓRBICO PREVIENE EL EFECTO MODULATORIO DEL FLAVONOIDE QUERCETINA SOBRE LOS GABAρ_1R	93
II. EFECTOS DE DISTINTOS AGENTES REDUCTORES EN LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR QUERCETINA SOBRE LOS GABAρ_1R	95
III. EFECTOS DE LA INCORPORACIÓN DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR QUERCETINA EN LAS RESPUESTAS DE GABAρ_1R	98
IV. EL ÁCIDO ASCÓRBICO NO PREVIENE COMPLETAMENTE LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR QUERCETINA EN LOS H^{141D} GABAρ_1R	100
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	114
REFERENCIAS	116

ABREVIATURAS.

AChR = Receptores de Acetilcolina

ADNc= Acido DesoxirriboNucleico copia

Asc = Acido Ascórbico

(Asc)₂Ca = ascorbato de calcio

ARNm = Acido RiboNucleico mensajero

ASIC = Canales iónicos sensibles al ácido

Cl⁻ = Ión cloruro

Cys-loop = Lazo de cisteínas

D = ácido aspártico

DAR = Receptores de Dopamina

DHA = DeHidroAscorbato

D iso-Asc = D-iso ácido ascórbico

D-R = Dosis-Respuesta

DTNB = 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

DTT = Dithiothreitol

DTT = Dithiothreitol oxidado

EC₅₀ = Concentración Efectiva al 50 por ciento

ED₅₀ = Dosis Efectiva al 50 %

ERO = Especies Reactivas de Oxígeno

ERN = Especies Reactivas de Nitrógeno

E. S. = Error Estándar

GABA = Acido Gamma Amino Butírico

GABA_A = Receptores Acido Gamma Amino Butírico tipo A

GABA_C = Receptores Acido Gamma Amino Butírico tipo C

GABA_{ρ1}R = Receptores de GABA_C Rho 1 homoméricos

H^{141D}GABA_{ρ1}R = mutantes de los GABA_{ρ1}R con la sustitución H141D

GHS = Glutación

GSSG = Glutación oxidado

H = histidina

H141D = mutación de la histidina 141 por un ácido aspártico

IC₅₀ = Concentración Inhibitoria al 50 por ciento

I-V = Corriente - Voltaje

LTP = potenciación de largo término

min = minutos

mM = milimolar

μ M = micromolar

n = número de repeticiones realizadas

nA = nano amperios

NAc = N- Acetil Cisteína

NEM = N-etil maleimida

nHill = n de Hill.

NMDAR = Receptores de ácido N-metil-D-aspartico

Que = quercetina

seg o s = segundos

SH- = grupos sulfhidrilos libres

SNC = sistema nervioso central

SOD = superoxido dismutasa

SVCT2 = *Sodium-dependent Vitamin C Transporters 2*, Transportadores de vitamina C dependientes de sodio tipo 2

τ_{act} = Constante cinética de activación

τ_{deact} = Constante cinética de deactivación

wt = salvajes

5-HTR= Receptores de Serotonina

INTRODUCCIÓN

I. MODULACIÓN REDOX.

La *Teoría de radicales libres* sugiere que moléculas altamente reactivas conocidas como radicales libres provocan daños que, acumulados en el tiempo, dan lugar a procesos de envejecimiento celular (Harman, 1960) (Youdim et al, 2004). Por lo tanto, aunque las neuronas posean la capacidad de mantener de manera más o menos estricta la homeostasis del estado redox celular, el medio intra y extracelular del sistema nervioso central (SNC) a lo largo de los años se vería afectado en favor de la oxidación. Este desbalance, según la teoría de radicales libres, sería consecuencia directa del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) y/o de la disminución en la actividad de mecanismos antioxidantes de protección, (Reiter, 1995; Dirksen, 2002). En base a esto, durante los últimos 50 años, se han analizado las consecuencias de la producción continua de especies reactivas oxidantes en neuronas y la vulnerabilidad que muestran estas células a los desbalances redox, (Berg et al., 2004; Harrison et al., 2005).

No obstante, aunque los radicales libres se han considerado como resultados tóxicos de la célula, y son asociados a enfermedades neurodegenerativas, como el mal de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Rice, 2000), y a la muerte celular, (Abramov et al., 2007), recientemente ha sido demostrada su participación fisiológica en el metabolismo celular, (Biswas et al., 2006).

Dentro de cada neurona se generan normalmente numerosas ERO, éstas incluyen al radical hidroxil (HO^\bullet), al anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ERN, especies derivadas del óxido nítrico (NO), (Annunziato et al., 2002; Biswas et al., 2006; Finkel, 2006), que se mantienen en equilibrio con antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre las enzimas antioxidantes, se puede hacer una distinción entre las intracelulares, como la Mn-superóxido dismutasa (SOD), la forma intracelular de CuZn SOD, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión S-transferasa, y las extracelulares como por ejemplo, la forma extracelular de CuZn SOD (Coyle and Puttfarcken, 1993). Dentro de los antioxidantes más importantes no enzimáticos se encuentran la bilirrubina, el ácido úrico, el glutatión, la vitamina

E y C, la carnitina, los derivados de la cisteína y el caroteno, entre otros (Reiter, 1995; Agostinho et al., 1997; Sen, 1998; Rice, 2000; Rice et al., 2002).

El sistema redox, integrado por los oxidantes y reductores nombrados, da lugar a procesos como la S-tiolación y la S-nitrosación de las proteínas, (Foster and Stamler, 2004; Jones et al., 2004; Radi, 2004; Biswas et al., 2006). Estas modificaciones, entre otras, son mecanismos propuestos como procesos de señalización celular dentro del SNC, (Spencer et al., 2003) y han sido involucrados en el control de funciones a varios niveles, abarcando desde aumentos y disminuciones de transcripción y traducción de distintos genes, (Spencer et al., 2003; Shih et al., 2004; Yu et al., 2004), inactivación de cascadas de señales (Gopalakrishna et al., 1993; Schroeter et al., 2002), cambios en el potencial de membranas (Matalon et al., 2003) y modulación de la síntesis proteica, (Spencer, 2008).

En particular, la transmisión sináptica (Avshalumov et al., 2000; Safiulina et al., 2006; Sidlo et al., 2007), y procesos que incluyen a la sinaptogénesis, al desarrollo neuronal, el LTP y a las respuestas adaptativas de neuro-protección (Bernard et al., 1997; Rice, 2000; Knapp and Klann, 2002b, a; Schnorr et al., 2010), son fenómenos que pueden ser modulados por compuestos redox tanto endógenos como exógenos. Por ejemplo, el trabajo de Safiulina y colaboradores demostró que las neuronas inmaduras del hipocampo de ratas son sensibles a las ERO, dado que bajas dosis de H_2O_2 son suficientes para aumentar significativamente la frecuencia de eventos sinápticos espontáneos de GABA, (Safiulina et al., 2006). Por otra parte, Bernard y colaboradores mostraron que la plasticidad mediada por los NMDAR disminuía en presencia de oxidantes como el DTNB, (Bernard et al., 1997).

II. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GABA.

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN.

La clasificación de los receptores de GABA se realizó sobre la base de sus propiedades farmacológicas. Los receptores ionotrópicos de $GABA_A$ ($GABA_A R$) se caracterizan por su sensibilidad al antagonista bicuculina,

mientras que los receptores metabotrópicos GABA_B (GABA_BR) son insensibles a la inhibición por éste antagonista, pero activables por baclofen. Al mismo tiempo, los receptores GABA_C (GABA_CR), se clasificaron como un grupo distinto de receptores ionotrópicos de GABA dada su insensibilidad a la bicuculina y también al baclofen (Woodward et al., 1992, 1993).

Los GABA_AR y GABA_CR son canales iónicos que presentan una alta permeabilidad al ión cloruro (Cl⁻). Al unirse el GABA al receptor genera la apertura del canal. En consecuencia el Cl⁻ permea a través, lo cual lleva al potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio para el Cl⁻, disminuyendo la excitabilidad.

Por su estructura, se considera que los GABA_AR y GABA_CR forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, y dentro de ésta, a la familia de receptores con lazo de cisteína (*cys-loop* receptors), que incluye a los receptores de glicina, serotonina y los colinérgicos nicotínicos, (Connolly and Wafford, 2004).

La topología típica de una subunidad perteneciente a esta familia consta de una región N-terminal extracelular larga, seguida por 4 dominios transmembrana (denominados M1, M2, M3 y M4) y un extremo C-terminal corto extracelular. El N-terminal contiene un péptido señal, sitios de glicosilación y un lazo de 15 residuos cerrado por un puente disulfuro que se propone como un determinante conformacional importante para la interacción con el ligando correspondiente, (Lu, 1997), aún cuando no forma parte del sitio de unión del agonista, (Sedelnikova et al., 2005; Harrison and Lummis, 2006a, b). Entre las regiones M3 y M4, además, se extiende un largo lazo intracelular que presenta sitios de fosforilación para PKA, PKC y tirosina-quinasa, enzimas que pueden modular la amplitud de la respuesta del receptor y la tasa de desensibilización (Feigenspan et al., 1993; Zhang et al., 2001), (Figura 1).

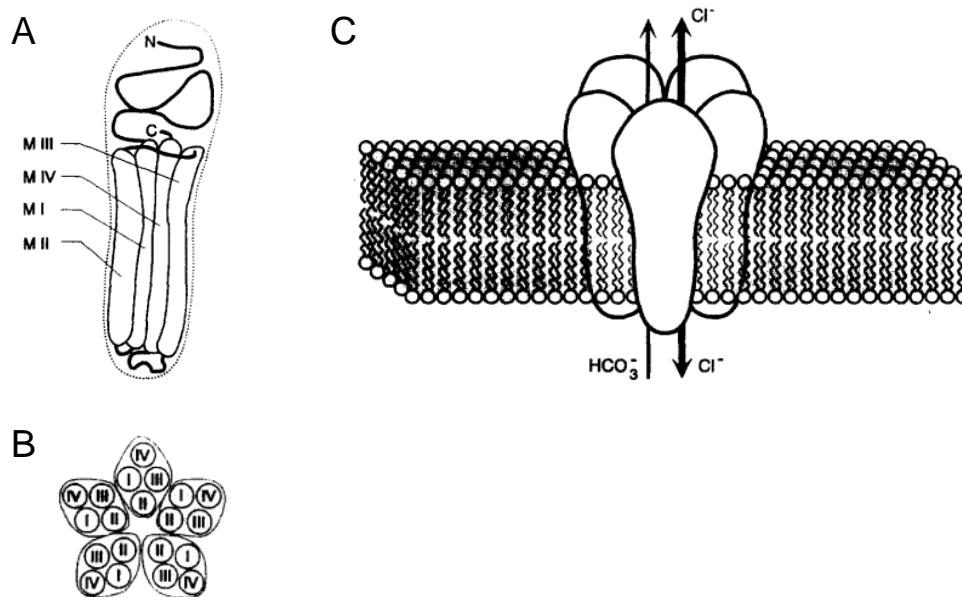


Figura 1: Estructura propuesta para los receptores ionotrópicos de GABA. **A.** Esquema de la conformación que adopta una subunidad de un receptor. Cada paso transmembrana (M) se encuentra indicado con números romanos. **B y C.** Vista superior y lateral, respectivamente, de un receptor de GABA ensamblado en membrana. En C se puede observar como el dominio M2 queda expuesto formando el poro del canal. (Figura modificada de Kaila, 1994)

Como se puede apreciar en la Figura 1 las subunidades se ensamblan para formar una estructura en forma de anillo que rodea el poro central, el cual está revestido por los segmentos M2 contribuidos por cada una de las subunidades. Esta región resulta crucial para la apertura y cierre del canal (*gating*) y le confiere selectividad al paso de iones.

Sobre la base del análisis cristalográfico del AChR presente en la electro-placa de Torpedo se propone una estructura pentamérica para los GABA_AR y GABA_CR. Compartiendo esta característica con los otros miembros de ésta superfamilia de receptores. Hasta el momento 5 subunidades diferentes de GABA_AR se clonaron y un total de 16 subtipos, α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ y ϵ . Mientras que existiría sólo 1 subunidad de GABA_CR y 3 subtipos ρ_{1-3} .

CARACTERÍSTICAS DE LAS RESPUESTAS MEDIADAS POR LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GABA.

A pesar de sus similitudes, las propiedades funcionales de los dos tipos de receptores ionotrópicos GABAérgicos son marcadamente diferentes. Los GABA_CR poseen una mayor sensibilidad por GABA pero constantes cinéticas de activación y deactivación menores que los GABA_AR, (Amin et al., 1994). Además los GABA_CR no presentan desensibilización en sus corrientes, mientras que los GABA_AR exhiben una fuerte disminución de la respuesta durante la aplicación del agonista, (Figura 2).

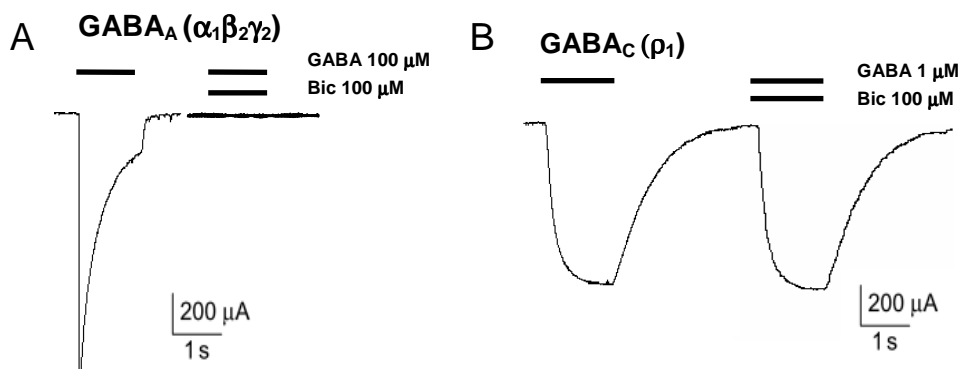


Figura 2: Respuestas de los receptores ionotrópicos de GABA. A y B. Trazo representativo de un respuesta evocada por GABA en los GABA_AR y GABA_CR, respectivamente.

Estas diferencias funcionales podrían ser consecuencia de una arquitectura distinta en los sitios de unión al GABA entre ambos tipos de receptores. La hipótesis de un sitio de unión para el ligando diferente se encuentra sostenida por los resultados obtenidos para el perfil de agonistas y antagonistas de los GABA_CR y GABA_AR, (Sedelnikova et al., 2005; Harrison and Lummis, 2006a).

La sensibilidad al GABA de los GABA_CR recombinantes es mucho mayor que la de los GABA_AR, con valores de EC₅₀ que varían entre 0.7-2.2 μ M para receptores recombinantes ρ_1 o ρ_2 homoméricos o heroméricos, (Enz and

Cutting, 1999; Qian et al., 1999; Zhang et al., 2001) y 7.5 μM para receptores ρ_3 homoméricos, (Shingai et al., 1996). Los valores de EC_{50} para $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ nativos de neuronas de la retina son similares o levemente mayores a los de los receptores recombinantes ρ_1 y ρ_2 , (Feigenspan et al., 1993; Vigh et al., 2005) .

El análogo conformacional restringido TACA es un potente agonista de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$, ($\text{EC}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$). Al contrario, el iso-isómero de TACA, CACA, es un agonista mucho más débil de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ que de los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, ($\text{EC}_{50} = 74 \mu\text{M}$). Este resultado sugiere que el GABA se uniría a los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ en una conformación trans, (Harrison and Lummis, 2006a, b). El muscimol también activa a los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$, sin embargo es una agonista más potente para los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$.

Una diferencia crucial entre los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ y los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, es que los primeros son insensibles a la bicuculina, un alcaloide conocido por ser el antagonista competitivo clásico de los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, (Cutting et al., 1991; Shimada et al., 1992; Greka et al., 2000). Otros antagonistas competitivos de los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, como la estricnina y el SR95531 (Gabazina) son inhibidores débiles de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$, (Feigenspan et al., 1993; Woodward et al., 1993).

Varios agonistas de los $\text{GABA}_{\text{B}}\text{R}$, como el ácido 3-aminopropilfosfónico (3-APA) y el ácido 3-aminopropil(metil)-fosfónico (3-APMPA) son antagonistas potentes de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$, (Woodward et al., 1993; Lukasiewicz and Shields, 1998). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, otros agonistas clásicos de los $\text{GABA}_{\text{B}}\text{R}$, como el baclofen y el saclofen no tienen efectos sobre los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$.

El ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-yl) ácido metilfosfónico (TPMPA), un híbrido de la isoguvacina y el 3-APMPA, es un antagonista fuerte de la actividad de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$, mientras que tiene efectos débiles sobre los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ y los $\text{GABA}_{\text{B}}\text{R}$ (Ragozzino et al, 1998). El TPMPA es un antagonista competitivo mucho más potente de los receptores recombinantes que poseen la subunidad ρ_1 , que de los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ y actúa como un agonista débil de los $\text{GABA}_{\text{B}}\text{R}$.

LOCALIZACIÓN DE LOS GABA_CR.

La localización de los GABA_CR ha sido estudiada a nivel de ARNm, de expresión de proteína y en experimentos funcionales. En la tabla 1 se encuentra un breve resumen de los resultados reportados hasta el momento.

Los datos de la bibliografía se encuentran separados en función del tipo de subunidad rho estudiada y del área donde se llevaron a cabo dichos estudios.

Como puede observarse existen numerosas áreas del SNC donde se encuentran presentes los GABA_CR, éstas incluyen a la retina, áreas de procesamiento visual y al hipocampo. En la tabla 1, los datos se encuentran separados en dos categorías (hasta P8 y adulto). Durante el desarrollo existe un marcado cambio en la expresión de los subtipos de ρ , así como también de las subunidades.

Como se mencionó, corrientes iónicas evocadas por GABA con las características similares a las observadas para GABA_CR recombinantes se describieron en la retina de distintas especies animales. En las células bipolares de la retina de rata y salamandra tigre se reportaron corrientes iónicas evocadas por GABA insensibles a bicuculina y baclofen (Feigenspan et al., 1993; Lukasiewicz et al., 1994). En el caso de las células bipolares se postuló un rol inhibitorio presináptico producto de la activación de los GABA_CR, (Lukasiewicz et al., 1994; Pan and Lipton, 1995). Por otra parte, la transmisión GABAérgica de las células amácrinas hacia las terminales de las células bipolares forma un lazo de realimentación negativo ya que una parte de la información que las células bipolares envían a las células amácrinas vuelve a su terminal (Lukasiewicz et al., 1994). De esta manera, la sinapsis amácrina-bipolar proveería un sitio de control de la ganancia para la sinapsis bipolar-ganglionar.

Tabla 1: Localización de los GABA_CR.

Region	ρ1		ρ2		ρ3	
	Hasta P8	Adulto	Hasta P8	Adulto	Hasta P8	Adulto
Hipocampo	X X X	X X X	X X X	X X	X X X	X X X
Corteza		X		X		X
Superior colliculus	X X	X X	X X X	X X X	X X	No habria
Ganglio de la raiz dorsal		X				X
Cerebelo (células dePurkinje)	X X	X X X	X X	X X X	X	X
Retina (células amacrinas y bipolares)	X	X X X	X X	X X X		X X
Tallo cerebral	X	X X	X	X	X	X
Tálamo		X		X		
Dorsal lateral geniculate nucleus		X X		X X		X X
Médula espina	X X	X X X	X X	X X	X X	X X

X mRNA
 X receptor funcional
 X proteína

(Datos modificados de (Strata and Cherubini, 1994; Enz et al., 1995; Martina et al., 1995; Ogurusu and Shingai, 1996; Albrecht et al., 1997; Martina et al., 1997; Boue-Grabot et al., 1998; Wegelius et al., 1998; Enz and Cutting, 1999; Ogurusu et al., 1999; Zhu and Lo, 1999; Boller and Schmidt, 2001; Grabauskas and Bradley, 2001; Schmidt et al., 2001; Zhang et al., 2001; Didelon et al., 2002; Rozzo et al., 2002; Boller and Schmidt, 2003; Liu et al., 2004; Alakuijala et al., 2005; Mejia et al., 2008)

La participación de la sinapsis bipolar-ganglionar se estudió extensamente. Asimismo, se demostró que en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para la subunidad p1, donde las respuestas de tipo GABA_C están completamente ausentes, (McCall et al., 2002), el procesamiento visual resulta alterado. Esto sugeriría que la subunidad p1 es requerida para la expresión de receptores funcionales de GABA_C y que la ausencia de los mismos afecta al flujo de información dentro de la retina.

Además como se muestra en la Tabla 1, existen otras áreas en el cerebro de mamíferos en las cuales se observaron respuestas de tipo GABA_C, las cuales incluyen al hipocampo de animales jóvenes. Los trabajos realizados por Strata, Martina y Didelon, y sus respectivos colaboradores indican que los GABA_CR se encontrarían funcionales en neuronas del hipocampo de rata sólo durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal, (Martina et al., 1994; Strata and Cherubini, 1994; Martina et al., 1995; Didelon et al., 2002). Aún así, Alakuijala y colaboradores reportaron la existencia de respuestas de tipo GABA_CR en hipocampo maduro, (Alakuijala et al., 2005).

Por sus propiedades y su localización, los GABA_CR serían receptores extrasinápticos, los cuales contribuirían con la inhibición tónica de las neuronas, (Semyanov and Kullmann, 2002; Harvey et al., 2006). Estos se activarían por el GABA que escapa del espacio sináptico liberado por las terminales sinápticas o por sinapsis vecinas de la misma neurona o de neuronas adyacentes, (Farrant and Nusser, 2005).

III. MODULACIÓN POR AGENTES REDOX.

Los canales iónicos son los principales mecanismos de la transducción de señales externas a través de la membrana de las neuronas al interior de las mismas. Por lo tanto, los procesos que controlan su actividad son de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular, (Matalon et al., 2003). Durante años se estudió el efecto de diversos compuestos farmacológicos, sobre la función de los canales iónicos. Sin embargo, el papel que ejercen los radicales libres y los antioxidantes clásicos sobre su funcionamiento sólo se comenzó a evaluar recientemente, (Gozlan and Ben-Ari, 1995; Lipton et al., 2002).

Un gran número de receptores ionotrópicos pueden ser modulados por agentes oxidantes y reductores, (Aizenman et al., 1989; Sucher and Lipton, 1991; Sullivan et al., 1994; Pan and Lipton, 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b). También canales iónicos activados por voltaje, canales de K⁺, canales

de Cl^- , (DiChiara and Reinhart, 1997; Todorovic et al., 2001; Liu and Gutterman, 2002; Li et al., 2005; McCartney et al., 2005; Chu et al., 2006) y la mayoría de los receptores miembros de la familia *cys-loop* son sensibles a la modulación redox (Bouzat et al., 1991; Ruiz-Gomez et al., 1991; Ruppertsberg et al., 1991).

En particular, la existencia de sitios blanco para la modulación redox en receptores neuronales de $GABA_A$ y NMDA ha sido reportada, (Gozlan and Ben-Ari, 1995; Pan and Lipton, 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b; Herin and Aizenman, 2004).

Los agentes reductores, como ditioneitol (DTT), el cual es capaz de romper los enlaces disulfuro, potencian la actividad de los NMDAR, mientras que agentes oxidantes, tales como 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico ácido (DTNB) que forma enlaces disulfuro de tiol libres, disminuyen la función del receptor NMDAR (Aizenman et al., 1989). Esta modulación de las respuestas se describió tanto para receptores endógenos, presentes en la retina de pollo como en rodajas de hipocampo, corteza y estriado de ratas, (Sucher and Lipton, 1991; Gozlan and Ben-Ari, 1995), así como también en receptores expresados en sistemas heterólogos, (Majewska et al., 1990; Sullivan et al., 1994). En ambas condiciones, los compuestos reductores y oxidantes presentaron efectos concentración dependientes, (Figura 3).

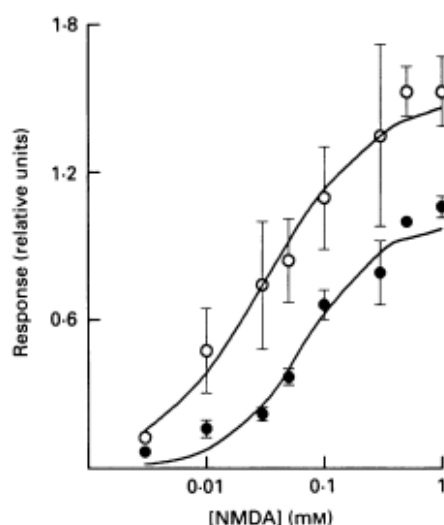


Figura 3: El DTT aumenta la afinidad de los receptores de NMDA. Curva dosis-respuesta (D-R) para los receptores de NMDA en ausencia (●) y presencia

de DTT (4 mM) (o). Los valores se normalizaron a la corriente máxima (NMDA 500 μ M), (Figura de Tang et al, 1993)

Por otra parte, los trabajos Pan y Amato demostraron que de la misma manera que los NMDAR, los GABA_AR, tanto endógenos como recombinantes, también son sensibles a la modulación redox, (Pan et al., 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b). En estos trabajos se mostró que la co-aplicación de compuestos reductores (DTT, GSH) con GABA potenciaba significativamente las respuestas mediadas por los GABA_AR y que los oxidantes presentaban un efecto contrario, inhibiendo las corrientes, (DTNB, DTTox y GSSG).

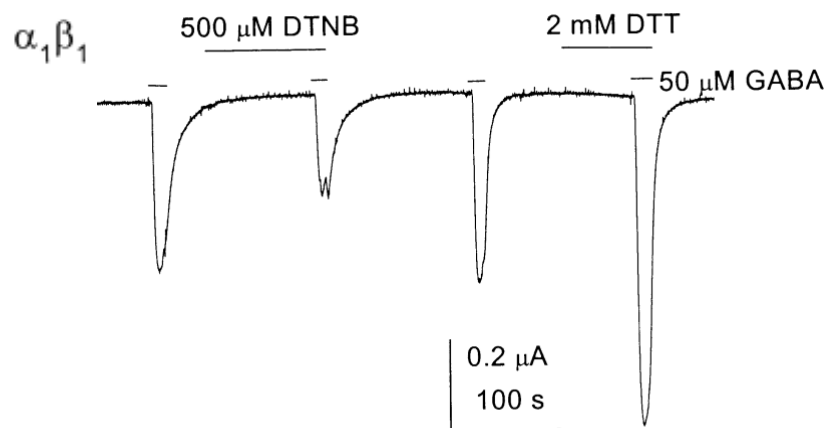


Figura 4: Trazos representativos de los efectos para el DTNB y el DTT sobre las repuestas mediadas por GABA_AR. (Figura modificada de Pan et al, 2000).

Dicha sensibilidad resultó ser dependiente de la composición de los GABA_AR. La respuestas evocadas por GABA en receptores que contenían a la subunidad γ_2 , expresados tanto en células HEK como en ovocitos de *Xenopus laevis*, presentaron una modulación menor por compuestos redox, (Pan et al., 2000b). En todas las combinaciones de subunidades estudiadas la incorporación de la subunidad γ produjo una disminución de los efectos de los reductores y los oxidantes, (Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b).

En resumen, en las condiciones estudiadas, tanto en receptores nativos, como en aquellos expresados en sistemas recombinantes, la modulación redox

dependió de la concentración de GABA utilizada para evocar las respuestas. Además la utilización de concentraciones mayores del modulador generó un efecto más pronunciado sobre las corrientes de Cl⁻. Asimismo, los reductores tanto endógenos como exógenos, disminuyeron los EC₅₀ de los GABA_AR estudiados, es decir, generaron una mayor afinidad por el agonista, (Pan et al., 1995; Pan et al., 2000b) y produjeron un aumento de las corrientes máximas. (Pan et al., 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b).

Pan y colaboradores, además de estudiar a GABA_AR recombinantes, también realizaron un experimento con GABA_CR homoméricos para la subunidad ρ_1 , (GABA ρ_1 R). Los GABA ρ_1 R, en las condiciones experimentales evaluadas, presentaron respuestas insensibles a la modulación redox.

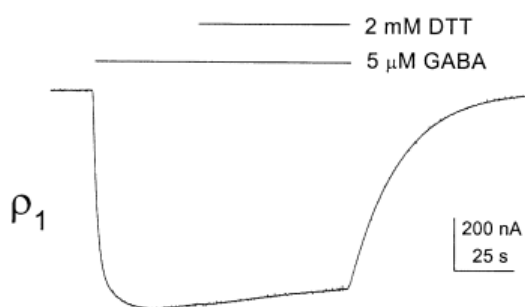


Figura 5: Trazo representativo del efecto del DTT sobre las repuestas mediadas por GABA ρ_1 R. (Figura modificada de Pan et al, 2000).

Dadas las similitudes estructurales mencionadas anteriormente con los GABA_AR y el hecho de que todos los miembros pertenecientes a la familia *cys-loop* estudiados hasta el momento son modulados por agentes oxidantes y reductores, la falta de sensibilidad de los GABA ρ_1 R resulta llamativa.

IV. MODULACIÓN POR ÁCIDO ASCÓRBICO.

Dentro de los reductores endógenos del cerebro, el ácido ascórbico se destaca como el principal antioxidante no enzimático, (Grunewald, 1993). Esta vitamina soluble en agua, que también participa en numerosas funciones

vitales, las cuales incluyen, la participación en absorción de hierro y como cofactor de la hidroxilación de la prolina y la lisina en la síntesis de colágeno, (Arrigoni and De Tullio, 2002), tiene la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno, (Rebec, 1994).

Mediante su oxidación, primero a un intermediario inestable y luego a dehidroascorbato (DHA), un residuo no tóxico también soluble en agua, el ácido ascórbico es capaz de eliminar oxidantes intra y extracelulares. Y a su vez, el DHA puede reciclarse a ácido ascórbico rápidamente mediante glutatión y otros tioles intracelulares, (Pietronigro et al., 1985; Winkler et al., 1994; Arrigoni and De Tullio, 2002) (Figura 6)

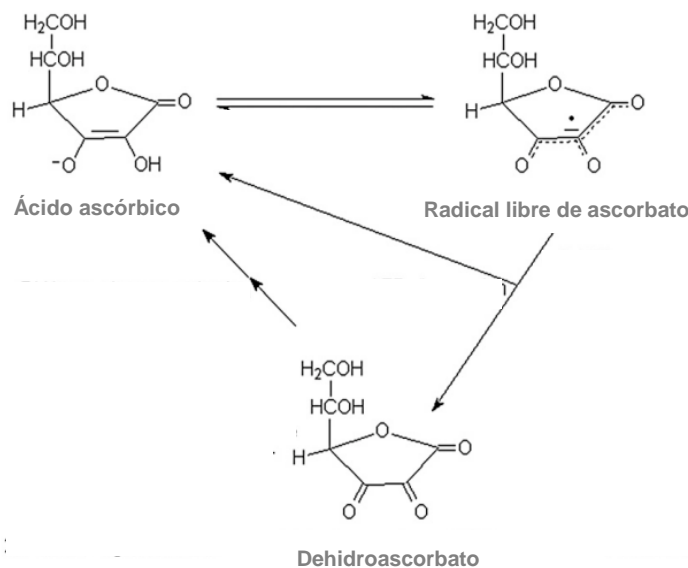


Figura 6: Metabolismo del ácido ascórbico. Estructuras químicas y reacciones.

Aunque el ácido ascórbico se encuentra presente en todo el SNC, alcanza particularmente altas concentraciones en retina y en regiones que incluyen a la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo en rata, y en humanos en el núcleo acumbens y el hipocampo, (Milby et al., 1982; Stamford et al., 1984; Grunewald, 1993; Rice, 2000). Los humanos, al igual que los primates no humanos, los conejillos de India y los murciélagos, perdieron la capacidad de sintetizar esta vitamina porque llevan un gen no-funcional para la enzima L-

gulono- γ -lactona oxidasa, que se requiere para el último paso de la biosíntesis del ácido ascórbico. Por lo tanto, lo adquieren de la dieta, y luego al igual que los animales que si pueden sintetizarlo, (esto ocurre sólo en el hígado (mamíferos) o los riñones (reptiles)), lo distribuyen posteriormente a todos los otros tejidos a través del plasma, ($[\text{Ácido ascórbico}]_{\text{plasma}} = 200\text{-}400 \mu\text{M}$, (Schenk et al., 1982)).

En consecuencia, todos los demás tejidos disponen de mecanismos para la captación y almacenamiento de ácido ascórbico, (Wilson, 2005). En el SNC el almacenamiento de esta vitamina se realiza a través de transportadores específicos, (SVCT2, Km: $22.2 \mu\text{M}$), (Daruwala et al., 1999; Tsukaguchi et al., 1999; Castro et al., 2001; Portugal et al., 2009) y transportadores de glucosa, (GLUT1 y GLUT3), (Rumsey et al., 1997; Rumsey et al., 2000) alcanzando concentraciones intracelulares de hasta 10 mM en neuronas y 1 mM en glia, (Rebec, 1994; Rice, 2000; Harrison et al., 2009). Particularmente, en la retina el Asc puede llegar a concentraciones 100 veces mayores a la concentración plasmática (Rose and Bode, 1991; Hediger, 2002), (Figura 7).

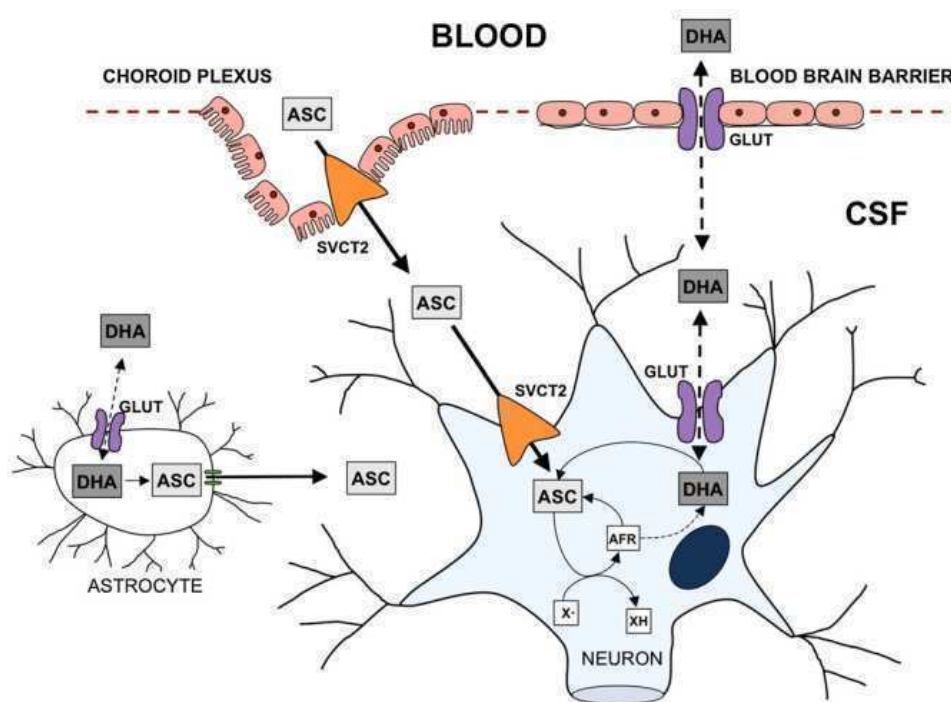


Figura 7: Absorción y el metabolismo del ácido ascórbico en el SNC. ASC, ácido ascórbico; AFR, radicales libres de ascorbato; DHA, ácido dehidroascórbico, LCR, líquido cefalorraquídeo; X·, oxidantes radicales libres de las especies.

En el cerebro la concentración de ácido ascórbico extracelular fluctúa con la actividad neuronal. Aunque los niveles basales se encuentran entre 200-400 μM , mediante técnicas de voltametría cíclica, se observó que los valores muestran fluctuaciones regionales dependiendo de la actividad presente en las neuronas. Por ejemplo, la medición continua de voltametría cíclica durante periodos de varios días mostró que existe un ritmo circadiano de ácido ascórbico extracelular en el estriado de rata, que es paralelo al nivel de actividad motora, (O'Neil et al 1982).

Asimismo, Miele y colaboradores demostraron que la liberación del antioxidante dependía de los impulsos sinápticos, la concentración de Ca^{2+} que entra durante la transmisión sináptica y de la recaptación de glutamato, (Miele, 1994). De esta manera el ácido ascórbico en el espacio sináptico puede alcanzar valores entre 1-3 mM, (Rice, 2000).

Los niveles de ácido ascórbico en el cerebro se encuentran regulados durante el desarrollo y son mayores en fetos que en adultos, (tanto en ratas como en humanos), (Adlard et al., 1973; Kratzing et al., 1985; Zalani et al., 1989).

Por sus propiedades y su disponibilidad el ácido ascórbico ha sido postulado como un neuromodulador, (Grunewald, 1993; Rebec, 1994; Rice, 2000).

Por ejemplo, Bigelow y colaboradores reportaron que el GABA podría evocar la liberación de ácido ascórbico en tejido neostriatal, por un mecanismo mediado por los receptores GABAérgicos. Ellos postulan en su trabajo que las neuronas GABAérgicas fuera del neostriado regularían directa o indirectamente la liberación neostriatal de la vitamina, y que su liberación modificaría la recaptación de glutamato, (Bigelow et al., 1984; Christensen et al., 2000).

Asimismo, Kalir y Mytilineou determinaron que los altos niveles de ácido ascórbico en los estadios tempranos ejercen un efecto amplio en la morfología

de las neuronas dopaminérgicas y en su funcionamiento bioquímico, ya sea directamente, por medio de aumento de la proliferación glial o por ambos, (Kalir and Mytilineou, 1991; Grunewald, 1993).

Aunque existen algunos antecedentes que muestran a distintos niveles los efectos del ácido ascórbico en el SNC, son contados los trabajos que proponen al ácido ascórbico como un modulador de canales iónicos. Entre ellos, el trabajo de Majewska y colaboradores sugiere al ácido ascórbico como un modulador negativo de los NMDAR, (Majewska et al., 1990), (Figura 8).

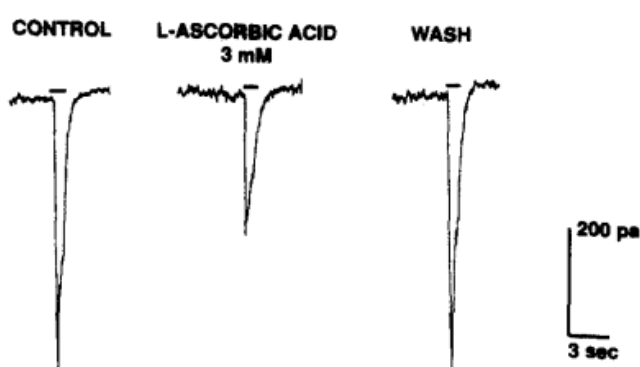


Figura 8: Efectos del ácido ascórbico sobre respuestas evocadas por NMDAR. (Figura modificada de Majewska et al, 1990).

De la misma manera, los resultados reportados por Nelson y colaboradores proponen que el ácido ascórbico disminuye significativamente las corrientes de los canales de Ca^{2+} tipo T, (Fan and Yazulla, 1999; Alshuaib and Mathew, 2006; Nelson et al., 2007).

Cabe descartar que los efectos del ácido ascórbico sobre las respuestas mediadas por receptores de GABA no han sido estudiados hasta el momento.

V. MODULACIÓN DE LOS GABA_{ρ1}R POR FLAVONOIDES.

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular presentes en plantas vasculares, pertenecientes al grupo de las fenil-benzopironas y que

presentan una variedad de estructuras básicas. Generalmente se hallan conjugados a azúcares, aunque la forma libre también se ha identificado en la naturaleza. Los flavonoides son importantes constituyentes de la dieta humana, ya que se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos y flores, (Manach et al., 1999).

Se describieron una amplia variedad de actividades biológicas para los flavonoides. Estas incluyen propiedades antivirales y antiinflamatorias, actividades vasculo-protectora, (Terao et al., 1994; Perez-Pinzon et al., 1997) y antitrombótica, espasmolítica y efectos estrogénicos, antioxidantes y protectores del riñón. Así como también se caracterizaron acciones neurofarmacológicas como analgesia, (Valerico et al. 2009), efectos sobre la movilidad y el sueño, la modulación del metabolismo oxidativo neuronal, (Sutherland et al., 2005), y efectos proconvulsivantes, anticonvulsivantes, sedantes y ansiolíticos, (Ren et al., 2010; Wang et al., 2010). SNC son complejos e involucran diferentes mecanismos, incluyendo acciones sobre receptores sinápticos y/o canales iónicos, (Goutman et al., 2003; Campbell et al., 2004).

En particular, trabajos previos de nuestro laboratorio caracterizaron las acciones farmacológicas de diversos flavonoides sobre los receptores ionotrópicos de GABA expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos compuestos antagonizaron a las respuestas de los GABA_AR $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$, así como a los GABA_CR ρ_1 , (Goutman et al., 2003).

La quercetina fue el más efectivo de todos los compuestos estudiados, sin embargo, otros como la apigenina, la morina y la crisina, también mostraron efectos similares, (Figura 9) (Goutman et al., 2003). Este flavonoide inhibió significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R, su efecto fue uso-independiente, reversible y resultó en una modificación de las constantes cinéticas de las corrientes evocadas por GABA. Así como también generó una disminución de la activación y un aumento de la deactivación de las constantes cinéticas de las respuestas GABA ρ_1 R.

La quercetina presentó un IC_{50} de $4.4 \mu\text{M}$ y un coeficiente de *Hill* de 1.5, (Goutman et al., 2003).

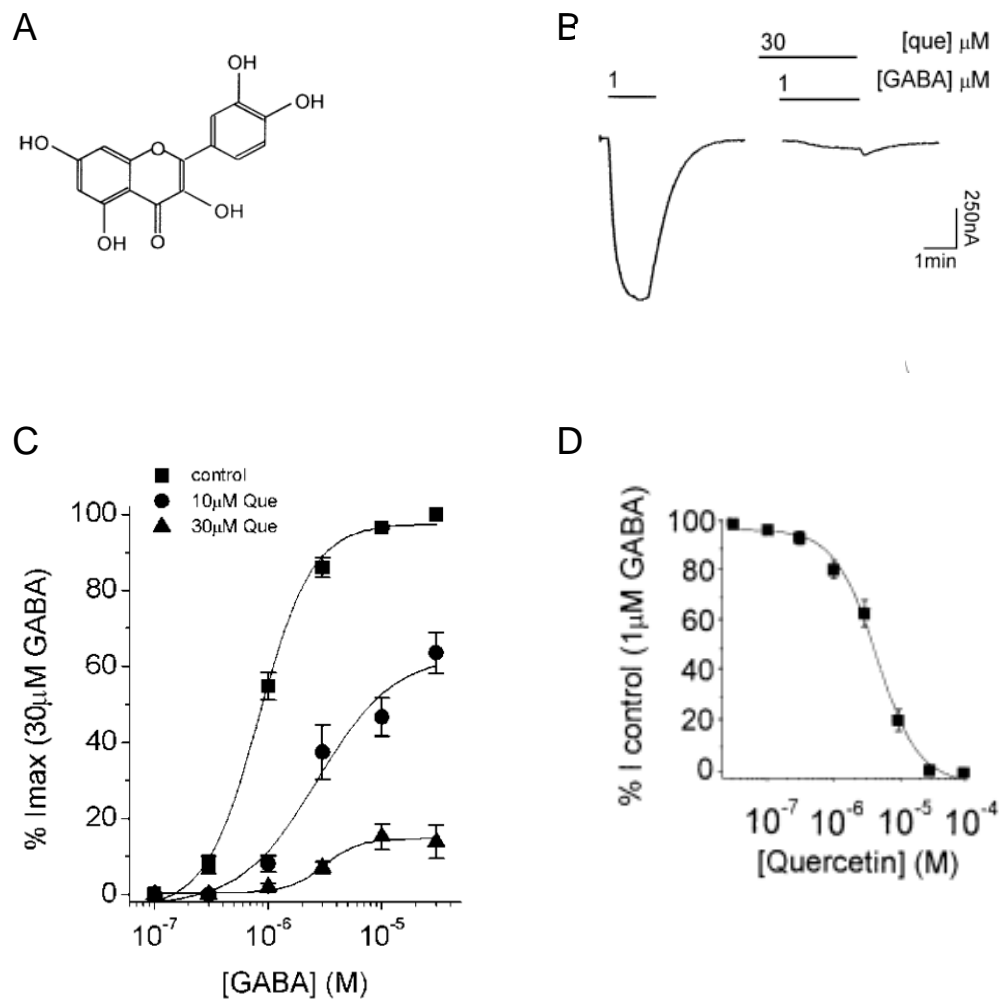


Figura 9: Efectos de la quercetina en GABA_{p1}R expresados en *Xenopus laevis*. **A.** Estructura química de la quercetina. **B.** Trazos representativos de las respuestas mediadas por los GABA_{p1}R antes y después de la exposición a quercetina (que). **C.** Curvas D-R para GABA en ausencia (control) y presencia de quercetina 10 y 30 μM. Las respuestas se normalizaron a GABA 30 μM. **D.** Curva de inhibición para quercetina realizada a GABA 1 μM. (Figura modificada de Goutman et al, 2003 y 2004)

Los resultados de Goutman y colaboradores sugieren que la quercetina es un antagonista no competitivo de las respuestas mediadas por los GABA_{p1}R. Sin embargo, en este trabajo no se postularon posibles mecanismos de acción sobre los receptores.

Es importante mencionar que los flavonoides, en particular la quercetina son descritos como compuestos tanto oxidantes como reductores, (Cao et al., 1997; Heim et al., 2002; Justino et al., 2004; Robaszkiewicz et al., 2007). Aunque parecería no existir un consenso sobre las propiedades redox de la quercetina, los reportes indican que la misma actuaría de manera diferente dependiendo del medio y del entorno proteico que la rodean.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

- 1.** Evaluar la acción de un grupo de agentes reductores y oxidantes sobre las respuestas mediadas por receptores de GABA rho 1 homoméricos (GABA ρ 1R).
- 2.** Caracterizar la modulación del antioxidante endógeno ácido ascórbico sobre las respuestas evocadas por GABA en los GABA ρ 1R.
- 3.** Estudiar los mecanismos de acción de los agentes redox en los GABA ρ 1R.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

Las propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores ionotrópicos de GABA se estudiaron mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y el registro de las corrientes iónicas evocadas por agonistas a través de técnicas electrofisiológicas. En las próximas secciones se expondrán detalladamente los procedimientos utilizados.

I. EXPRESIÓN DE RECEPTORES SINÁPTICOS EN OVOCITOS DE RANA.

La expresión de los receptores estudiados se realizó mediante la inyección de los ovocitos con soluciones de distintos ARN mensajeros (ARNm). Los ARN se obtuvieron, a su vez, por transcripción in vitro de templados de ADN copia (ADNc).

PREPARACIÓN DE LOS TEMPLADOS DE ADNc Y TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE LOS ARNc.

Se utilizó la secuencia completa de ADNc de la subunidad de los receptores GABA_C ρ 1 (GABA ρ 1R), subclonada en plásmidos aptos para realizar la reacción de transcripción in vitro.

Particularmente, la subunidad ρ 1 utilizada en este trabajo, se subclonó en el sitio EcoRI del plásmido pBluescript KS+ (donado por Dres. Ricardo Miledi y Ataúlfo Martínez-Torres). Para lograr mayores niveles de expresión de esta subunidad se utilizó el plásmido pGEMHE. Éste plásmido se diseñó especialmente para aumentar la expresión en ovocitos de *Xenopus* mediante el aumento de la vida media de los ARNc en citoplasma.

El ADNc de ρ 1 se subclonó en el pGEMHE que fue donado por Dra. A. Belen Elgoyhen. El subclonado fue realizado por la Dra. Mariana del Vas.

A continuación se detallan los materiales utilizados para la expresión en ovocitos de los receptores.

El ARNc (sentido) de la subunidad p1 se sintetizó usando el kit de transcripción T7 mMessage mMachine (Promega). El ARNc sintetizado se purificó con columnas específicas para ARN (Rneasy MiniKit, Qiagen, Valencia, CA) y se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización.

Para chequear la integridad del ARNc obtenido cada vez se hicieron corridas en geles de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio durante no más de 30 min. La determinación de la cantidad de ARNc sintetizado se realizó mediante la medición de la absorbancia de luz con longitud de onda de 240 nm en espectrofotómetro y por comparación de las bandas en las fotos obtenidas con el transiluminar en corridas previas.

Como se mencionó, se utilizó el sistema de expresión de los ARNc en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS OVOCITOS.

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas de uña africanas de la especie *Xenopus laevis* (Nasco, Modesto, CA). El procedimiento general de las ranas se realizó de acuerdo a lo establecido en el Manual de Ranario realizado por los Licenciados J. Gasulla y J. Boffi.

Las ranas se mantuvieron en un ambiente controlado (18-20°C) con ciclos de luz/oscuridad, (12hs./12hs.), en bachas con agua filtrada y declorada. En particular para aumentar la dureza del agua en la que se encuentran los animales se utiliza sulfato de magnesio y cloruro de calcio. (dureza total 200 g/L).

Las ranas se alimentan dos veces por semana con pellets de alimento balanceado para rana toro (el consumo aproximado es de 3 a 5 % del peso vivo) (GANAVE S.A.) y alimento balanceado para perro.

Los ovocitos se aislaron mediante microcirugía. Los animales se anestesiaron añadiendo 1g de NaHCO_3 y 1,5g de éster etil-3-aminobenzoato ((MS 222), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al agua sin cloro, y manteniéndolos en ésta solución durante no más de 30 minutos.

A través de una pequeña incisión en el abdomen (1cm. aprox.) se extrajeron varios ovarios, con cientos de ovocitos cada uno. Los lóbulos de ovarios extraídos se mantienen durante 2 horas en Barth's (88 mM NaCl; 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0.41 mM CaCl_2 ; 1.0 mM KCl; 0.82 mM MgSO_4 ; 2.4 mM NaHCO_3 ; 10 mM HEPES; pH 7.4 ajustado con NaOH, y gentamicina 1.0 mg/ml) antes de realizar la colagenización.

Luego son tratados durante 4 hs con una solución de colagenasa tipo IA (Sigma) (400 Ux/ml) disuelta en la solución salina para colagenizar, (sin Ca^{2+} , NaCl 96 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM, MgCl_2 5 mM; pH 7.6) para disgregar los ovocitos. El tratamiento enzimático se detuvo lavando repetidamente las células con 8 a 10 volúmenes de solución de colagenización y luego Barth's.

Posteriormente se seleccionaron los ovocitos maduros (estadios V y VI) por su mayor tamaño relativo. Aún a simple vista, se puede advertir que estas células presentan un patrón de pigmentación muy particular. Una mitad ("hemisferio") es blanca o ligeramente amarillenta, y la otra, oscura. La integridad en la separación de los pigmentos se utilizó como criterio de viabilidad de los ovocitos.

Finalmente, los ovocitos fueron mantenidos en cultivo en viales de vidrio a 16°C, en grupos de 20 a 40, en una solución Barth's.

INYECCIÓN DE LOS OVOCITOS.

La introducción del ARNc dentro de los ovocitos se realizó con un microinyector manual (Drummond Scientific Company, Broomall, PA). El microinyector posee un émbolo sobre el cual se montan jeringas de vidrio. Éstas se prepararon con capilares (Drummond) estirados por calor con un estirador de pipetas PB-7 (Narishige Co. Ltd., Tokyo, Japan). Las jeringas se llenaron con aceite mineral (Sigma) y se cargaron por su punta con la solución del ARNc. Este paso se llevó a cabo colocando una gota de alrededor de 1.5 μ l de la solución sobre una trozo de Parafilm, y con la ayuda de un micromanipulador se introdujo la punta de la jeringa en la gota, y se desplazó lentamente el émbolo de carga del microinyector.

Una vez preparado el microinyector los ovocitos se colocaron dentro de una cámara de inyección que constaba de una caja de petri plástica de 35 mm. de diámetro y cuyo fondo posee membrana de polietileno con pocillos que limitan el movimiento de los ovocitos. La cámara se llena con solución Barth's y los ovocitos se colocan tal que el ecuador de los ovocitos queda hacia arriba, dado que es en esa zona donde se realiza la inyección.

La inyección se realizó en el citoplasma celular posicionando el microinyector con micromanipuladores, observando estas maniobras bajo la lupa (12 a 40X). Cada ovocito se inyectó con 50 nl. de solución de ARNc de p1 (~ 0.2 ng./nl.) y luego se mantuvieron en la incubadora (ver sección anterior). Los máximos niveles de expresión de los receptores homoméricos p1 se logran aproximadamente en las 72 hs. después de la inyección.

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS CORRIENTES IÓNICAS MEDIADAS POR RECEPTORES.

Las corrientes iónicas mediadas por los distintos receptores estudiados se registraron por la técnica electrofisiológica fijación de voltaje con dos electrodos.

El “set up” de registro electrofisiológico se describirá a continuación:

El dispositivo utilizado para registrar corrientes iónicas mediadas por receptores ionotrópicos transplantados en ovocitos consta de: una lupa con aumentos de 15 a 100X para la observación de la célula y una cámara de registro que se colocan sobre una mesa anti-vibratoria, un sistema de perfusión de soluciones por gravedad acoplada a una bomba de succión con trampa de vacío, una fuente de luz con lámpara halógena y fibra óptica, el conjunto de instrumentos de registro electrofisiológico compuesto por amplificador, electrodos, filtro de señal pasabajo y sistema de adquisición y digitalización de señales, y finalmente una jaula de Faraday dentro de la cual se coloca la mesa, parte del sistema de perfusión y el extremo de la fibra óptica que ilumina la preparación.

REGISTRO POR LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE CON DOS ELECTRODOS DE LOS OVOCITOS DE *XENOPUS*.

Esta técnica permite evaluar la corriente iónica a través de los receptores expresados en toda la superficie del ovocito. La célula se coloca en una cámara de registro, hecha a partir de una placa de acrílico en la que se talló una canaleta (volumen 100 μ l) con un orificio de entrada de la perfusión para la aplicación de soluciones en un extremo y un capilar conectado al sistema de succión en el otro.

Los micro-electrodos de registro se construyeron con capilares de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, New Haven, CT), estirados con el estirador PB-7 (Narishige), controlando el diámetro de la punta a través de la medición de la resistencia que oponen al paso de una corriente eléctrica (que debe ser de 0.8 a 1.2 M Ω). Su interior se llena con una solución de 3 M KCl y además se les introduce un alambre de plata (Ag) que previamente se cloruró en lavandina pura (5 min). De esta manera, el alambre se constituye en un electrodo de Ag/AgCl, que permite la reacción redox con la solución de KCl,

habilitando la continuidad eléctrica entre el amplificador y el microelectrodo de registro.

Los dos electrodos de registro se montaron sobre cabezales (preamplificadores) con ganancias de 0.1 y 1X y éstos se conectaron a un amplificador Axoclamp 2-B (Axon Instruments, Foster City, CA). Cada cabezal de registro estaba asociado a un micromanipulador (Newport Co., Irvine, CA) para el posicionamiento de los electrodos. Como “tierra” del sistema se utilizaron otros dos electrodos de Ag/AgCl sumergidos en la misma solución salina que los ovocitos, dentro de unos pocillos conectados a la cámara de registro mediante un puente de agar.

Los ovocitos se colocaron en el interior de la cámara, las puntas de los microelectrodos se apoyaron sobre la célula y se baja lentamente logrando el acceso al interior celular.

Los ovocitos se perfundieron continuamente (10-20 ml./min.) con una solución de Ringer de rana (115 mM NaCl; 2 mM KCl; 1.8 mM CaCl₂; 5 mM HEPES, pH 7). Los valores del potencial de membrana (V_m) normalmente fueron de -20 a -60 mV y el registro de la actividad de los receptores evocada por neurotransmisor se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje con el amplificador descrito anteriormente que permite el control del potencial de membrana.

El potencial de membrana al que se fijaron los ovocitos (V_{clamp}) en todos experimentos fue de -70 mV (salvo indicaciones en contrario, como en las mediciones de la relación corriente-voltaje, I-V), que determina una fuerza electromotriz para el ión Cl⁻ de alrededor de -55 mV (en consecuencia en los ovocitos, el potencial de equilibrio para Cl⁻, $E_{Cl^-} \cong -25$ mV).

Las señales se adquirieron con un conversor analógico digital de 12 bits TL-1 DMA en una PC (486 DX2) mediante el programa Axotape o pClamp v. 5.1 (Axon Instruments). Los resultados se analizaron utilizando los programas

Clampfit 8.1 (Axon Instruments) y GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$).

El agonista y todas las drogas (Sigma) fueron preparadas en el día a partir de stocks concentrados en solución Ringer, en H_2O o en DMSO (concentración máxima de 0.1% (V/V)) dependiendo de la solubilidad y las propiedades del agente, con la cual no se encontraron alteraciones en las propiedades o respuestas del ovocito durante el tiempo de registro. En particular muchos de los compuestos redox utilizados en el presente trabajo son altamente sensibles a la luz y el aire, por lo tanto, cuando fuera necesario los tubos fueron cubiertos por papel aluminio y mantenidos tapados.

El pH de cada solución fue ajustado a 7.0 con NaOH (1 o 5 M).

GENERACIÓN DE RECEPTORES MUTANTES.

La mutación puntual de la histidina 141 por un ácido aspártico (H141D) de los ADNc de la subunidad p1 de retina humana se realizó utilizando el siguiente protocolo:

Con tal fin, se diseñaron oligonucleótidos específicos (*forward* y *reverse*) que incorporaran las mutaciones deseadas. En la tabla se muestra el sitio mutado y las secuencias correspondientes de los primers utilizados.

Mutación	Primer
H14D - <i>Foward</i>	5' GAC ATG TTT TTC GTG GAC TCC AAA CG
H14D - <i>Reverse</i>	5' GGA GCG TTT GGA GTC CAC GAA AAA CA

Las reacciones de mutagénesis se realizaron utilizando el *kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA). En resumen, se mezclaron los siguientes componentes:

Componente	Volumen (μ l)
Buffer (5X)	5
DNA templado	1
Primer forward (50 ng/ μ l)	2,5
Primer reverse (50 ng/ μ l)	2,5
dNTP mix	1
H ₂ O (c.s.p. 50 μ l)	37
PfuUltra DNA polimerasa (2.5 U/ μ l)	1

Como ADN templado se utilizó ADN plasmídico conteniendo los cDNAs codificantes para la subunidad ρ 1.

El protocolo de amplificación, implementado en un MJ Research PTC-200 fue el siguiente:

- 1- 95°C 30 segundos
- 2- 95°C 50 segundos
- 3- 55°C 1 minuto
- 4- 68°C 5 minutos
- 5- Ir al paso 2 16 veces
- 6- 68°C 7 minutos
- 7- 15°C

Los productos de las amplificaciones fueron digeridos con la enzima de restricción DpnI. Esta enzima corta específicamente ADNs metilados; de esta forma, se digieren las cadenas parentales, conservando solamente las portadoras de la mutación.

El producto de la digestión se utilizó para transformar bacterias SoloPack Gold Supercompetent Cells (Stratagene). Se crecieron cultivos a partir de las colonias obtenidas y se purificó ADN plasmídico utilizando el *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* (Promega, Madison, WI, USA). Para confirmar la incorporación de la mutación (y chequear la ausencia de errores de la polimerasa en la amplificación) los ADNs plasmídicos fueron secuenciados (Macrogen). De esta manera se obtuvieron plásmidos conteniendo los ADNc de la subunidad ρ 1.

CAPÍTULO 1

I. MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_{ρ1} POR AGENTES REDUCTORES Y OXIDANTES.

La actividad de diversas proteínas sinápticas puede ser modulada por agentes redox (Trotti et al. 1997; Chu et al. 2006). En particular, la modulación mediada por compuestos oxidantes y reductores ha sido reportada para receptores que incluyen a los NMDAR y DAR, así como también para miembros de la superfamilia de *cys-loop*, los GABA_AR, 5-HTR y AChR, (Bouzat et al. 1991; Ruiz-Gomez et al. 1991; Ruppertsberg et al. 1991; DiChiara and Reinhart 1997; Todorovic et al. 2001; Lipton et al. 2002).

Como se mencionó anteriormente, los GABA_AR son sensibles a la modulación redox. Aún así, Pan y colaboradores descartaron a los receptores de GABA_C Rho 1 homoméricos, (GABA_{ρ1}R), como posibles blancos de compuestos antioxidantes después de realizar un estudio poco detallado (Pan et al 2000). Este resultado era particularmente llamativo dado que los GABA_{ρ1}R pertenecen a la superfamilia de los receptores *cys-loop*, cuyos miembros casi en su totalidad han sido reportados como sensibles a dicha modulación, (Bouzat 1991, Lipton 2002, Amato et al 1999, Pan et al 1995, 5-HT, Harikumar et al 2000). Además, es importante mencionar que en trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que los flavonoides, compuestos con propiedades redox, son capaces de modular las repuestas de los GABA_{ρ1}R (Goutman, 2003 y Goutman, 2004).

Por lo tanto, a continuación se estudiará si los GABA_{ρ1}R son sensibles a agentes redox, tanto endógenos como exógenos.

AGENTES REDUCTORES.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El dithiothreitol (DTT) es un agente reductor fuerte, comúnmente utilizado para abrir puentes disulfuros presentes en proteínas. Esta molécula no

sólo previene de manera reversible la formación de uniones entre cisteínas libres, sino también es capaz de reducir puentes previamente formados, (Lipton et al., 2002).

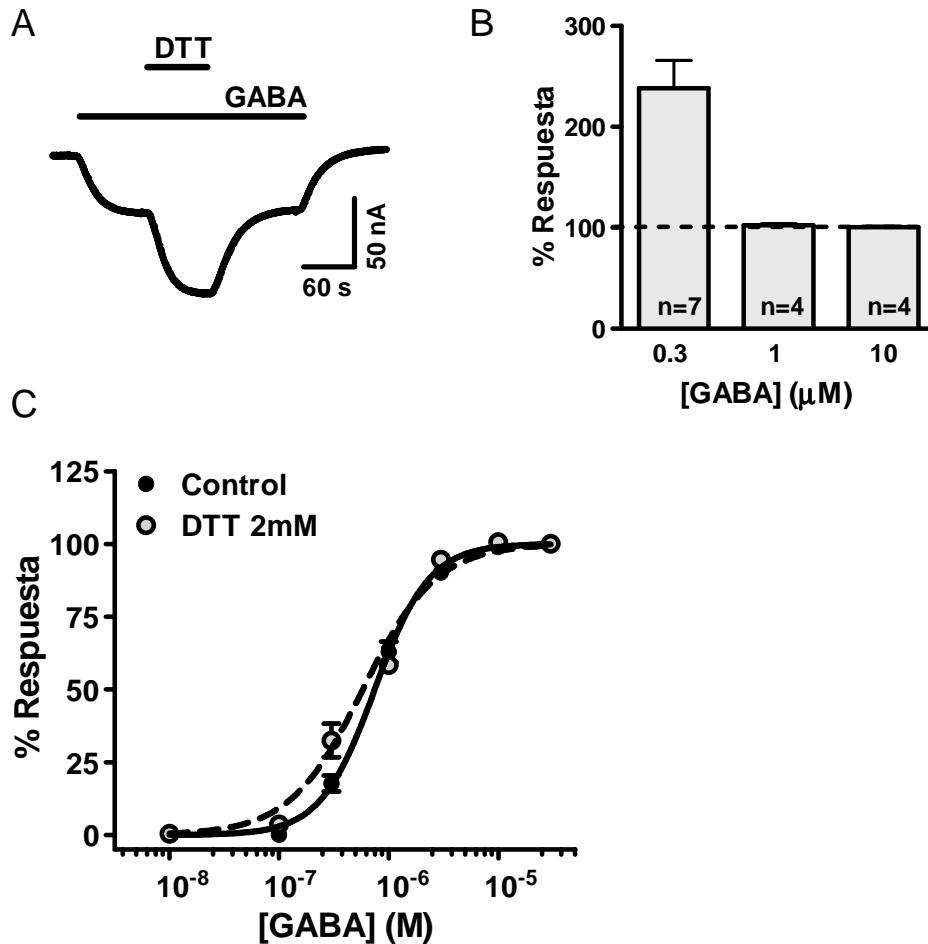


Figura 10: El DTT potencia las respuestas evocadas por GABA en los $\text{GABA}_{\text{p}1}\text{R}$. **A.** Trazo representativo (corrientes de Cl^-) mediado por $\text{GABA}_{\text{p}1}\text{R}$, en ausencia o después de la exposición a DTT 2 mM. El reductor se aplicó durante la exposición del agonista (GABA 0.3 μM). **B.** El histograma la potenciación obtenida en los experimentos realizados a tres concentraciones de GABA (0.3, 1 y 10 μM) en presencia de DTT (n = 4 - 7). **C.** Curva dosis-respuesta (D-R) para GABA realizada a concentraciones crecientes del agonista en presencia y ausencia de DTT (2 mM). La amplitud de las respuestas está normalizada a la corriente evocada por GABA 30 μM , (respuesta máxima). Cada punto de la curva representa la media y el error estándar (E.S.) de las respuestas obtenidas de 3-9 ovocitos. Todas las corrientes de los receptores registradas en ésta y las figuras siguientes se obtuvieron por fijación de voltaje con dos electrodos a -70 mV y los ejes representan la amplitud de la corriente (eje y) y el tiempo (eje x).

La Figura 10A ilustra un trazo representativo de una corriente evocada por GABA 0.3 μ M. El DTT 2 mM se aplicó *on top* a través del baño de perfusión cuando la respuesta al agonista solo alcanzaba un máximo estable. El agente reductor potenció significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R de manera rápida y reversible.

Las aplicaciones del agonista en las distintas condiciones experimentales (aplicaciones únicas, co-aplicaciones o preincubaciones) en el presente capítulo y los siguientes fue flanqueado siempre por exposiciones al agonista solo como control.

El gráfico de barras de la Figura 10B muestra la cuantificación del porcentaje de potenciación inducido por DTT (2 mM) sobre las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R por concentraciones crecientes de GABA; 0.3, 1 y 10 μ M. Los valores de potenciación obtenidos fueron; 238.0 \pm 27.8 %, 2.4 \pm 1.7 % y 0.6 \pm 1.0 %, respectivamente, ($p < 0.01$; $n = 4 - 7$). En el histograma evidencia una marcada dependencia entre la potenciación de las respuestas y la concentración del agonista utilizada para evocarlas, siendo esta relación inversamente proporcional.

La potenciación generada por DTT 2 mM fue también caracterizada mediante la construcción de curvas dosis-respuestas (D-R) para GABA. Como se observa en la Figura 10C, el reductor induce un aumento significativo de las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R sólo a concentraciones bajas del agonista (menores de 1 μ M). Aún así, el efecto es suficiente para generar una disminución significativa de los valores de EC₅₀ para las curvas en presencia del reductor, es decir, un aumento de la afinidad aparente de los receptores. Los valores de EC₅₀ obtenidos fueron los siguientes; control (círculos negros) = 0.74 \pm 0.01 μ M, ($nHill_{control} = 1.74 \pm 0.03$) y DTT (círculos grises) = 0.58 \pm 0.01* μ M, ($nHill_{DTT} = 1.30 \pm 0.07$), (* $p < 0.001$, $n = 3$), (Tabla 2).

El glutati3n, (GSH), es un agente end3geno reductor capaz de eliminar cualquier enlace disulfuro accesible presente en prote3nas. Adem3s, dado que act3a como un donante de electrones, tiene la capacidad para reducir otros amino3cidos sensibles a este tipo de modulaci3n (Makar et al., 1994; Sen, 1998; Biswas et al., 2006).

En la Figura 11A se ilustra un trazo representativo de una respuesta evocada por GABA 0.3 μM en ausencia y presencia de GSH 5 mM. La aplicaci3n en el ba3o de perfusi3n del reductor potenci3 significativamente la respuesta mediada por los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$. Un lavado con ringer rana normal elimin3 el efecto inducido por GSH, luego de haber sido removido 3ste junto con el agonista del ba3o de perfusi3n.

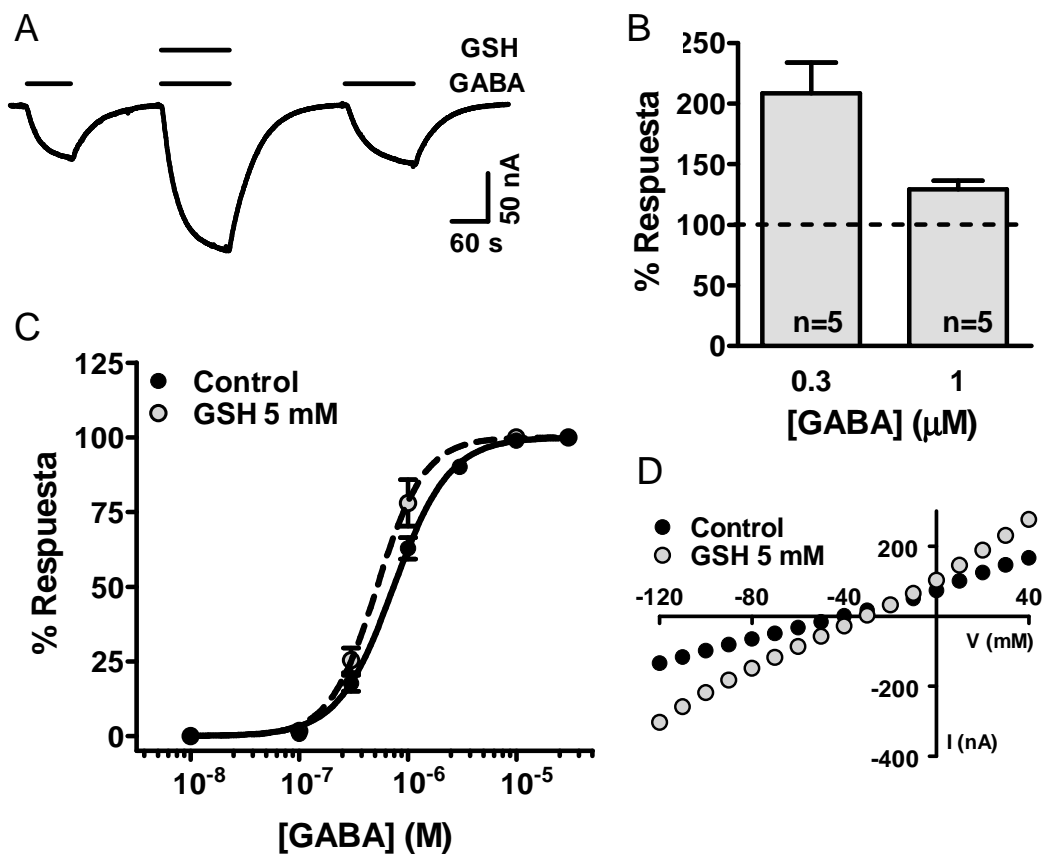


Figura 11: Las respuestas evocadas en los $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ son potenciadas significativamente por GSH. A. Trazos representativos (corrientes de Cl^-) mediado por $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$, en ausencia o presencia de GSH 5 mM. El reductor se aplic3 conjuntamente con el agonista (GABA 0.3 μM). **B.** El histograma resume la potenciaci3n inducida por GSH en 5 experimentos, realizados a tres concentraciones de GABA (0.3, 1 y 10 μM). **C.** Curva D-R para GABA realizada a

concentraciones crecientes del agonista en presencia y ausencia de GSH. La amplitud de las respuestas está normalizada a la respuesta máxima. Cada punto de la curva representa la media y el E.S. de las respuestas obtenidas de 5 ovocitos. **D.** Trazo representativo de las relaciones I-V para los GABA_{ρ1}R. Corrientes evocadas por GABA 0.3 μM en presencia y ausencia de GSH 5 mM

De la misma manera que se observaba con el (DTT 2 mM), la potenciación de las corrientes es dependiente de la concentración de GABA utilizada para evocarlas. Esto puede observarse en el gráfico de barras de la Figura 11B, donde se muestran los porcentajes de potenciación de las respuestas evocadas en los GABA_{ρ1}R en presencia de GSH 5 mM. Los valores obtenidos se listan a continuación; 108.7 ± 25.2 % para GABA 0.3 μM, y 29.5 ± 7.1 % para GABA 1 μM (n = 5), ambos fueron significativamente mayores a su control correspondiente, (p < 0.05).

Se estudió también la naturaleza de la potenciación mediante curvas D-R utilizando éste agente redox. En la Figura 11C se observan las curvas obtenidas para GABA en ausencia (control, círculos negros) y presencia de GSH 5 mM (círculos grises). Los valores de EC₅₀ calculados se listan a continuación, control = 0.74 ± 0.02 μM, (*nHill*_{control} = 1.69 ± 0.11) y GSH = 0.52 ± 0.01* μM, (*nHill*_{GSH} = 1.98 ± 0.04), (*p < 0.001, n = 3 - 5), (Tabla 2). El GSH es capaz también de incrementar la afinidad aparente de los GABA_{ρ1}R.

Cabe destacar que aunque los efectos del GSH son similares a los obtenidos con el DTT, al comparar las curvas D-R, para ambos reductores se observan algunas diferencias (Figura 10C y 11C). Por ejemplo, el aumento de las respuestas evocadas por GABA 1 μM fue significativo en presencia de GSH 5 mM y no con DTT 2 mM. Esto podría estar indicando la participación de mecanismos de potenciación diferentes para ambos reductores. Asimismo, ni el DTT 2 mM ni el GSH 5 mM fueron capaces de modificar las respuestas evocadas por altas concentraciones del agonista.

En la Figura 11D se ilustran las relaciones de corriente-voltaje (I-V) para los GABA_{ρ1}R expresados en ovocitos en ausencia y presencia de GSH. Las I-V

se realizaron cuando las respuestas evocadas por GABA 0.3 μM (círculos negros) y GABA 0.3 μM en presencia de GSH 5 mM (círculos grises) alcanzaban un máximo estable. Como se puede observar el GSH 5 mM no afectó la linealidad de la relación I-V pero provocó un aumento de la pendiente, consecuente con el incremento de las corrientes en presencia del reductor. El potencial de reversión de la corriente de Cl^- no fue afectado, ni se evidenció un efecto dependiente del voltaje dado que el grado de inhibición de las corrientes de Cl^- por el ión fue el mismo tanto a potenciales hiperpolarizados como despolarizados.

El último reductor estudiado en éste capítulo fue la N-acetil cisteína (NAC). Al igual que el GSH, la NAC es un agente endógeno capaz de reducir puentes disulfuro y otros aminoácidos (Sen, 1998; Parasassi et al., 2010).

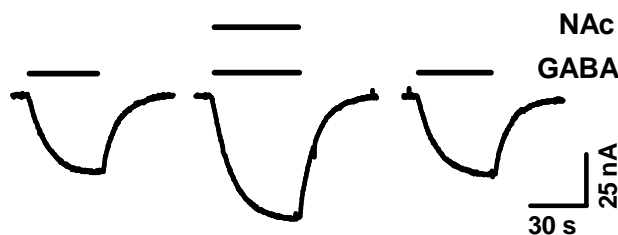


Figura 12: Las respuestas evocadas por GABA 0.3 μM en los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ son potenciadas significativamente por NAc. A. Trazos representativos mediados por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$, en ausencia o presencia de NAc 1 mM. El reductor se coaplicó con el agonista (GABA 0.3 μM).

En la Figura 12 se pueden observar los trazos representativos de las respuestas a las aplicaciones de GABA 0.3 μM en presencia y ausencia de NAc 1 mM. La potenciación inducida por el reductor fue de $197.2 \pm 73.8\%$ ($p < 0.05$; $n = 4$). Los efectos observados fueron, al igual que con los reductores anteriores, rápidos y reversibles luego de un lavado con Ringer rana normal.

AGENTES OXIDANTES.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los estudios realizados con diversos compuestos reductores en las respuestas mediadas por los GABA_A receptors demostraron que los receptores son significativamente sensibles a los mismos. Por lo tanto, a continuación se caracterizaron los efectos de agentes oxidantes sobre los receptores expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El dithiothreitol oxidado (DTTox) es un agente oxidante capaz de convertir cisteínas libres a puentes de disulfuro, (Lipton et al., 2002; Chu et al., 2006).

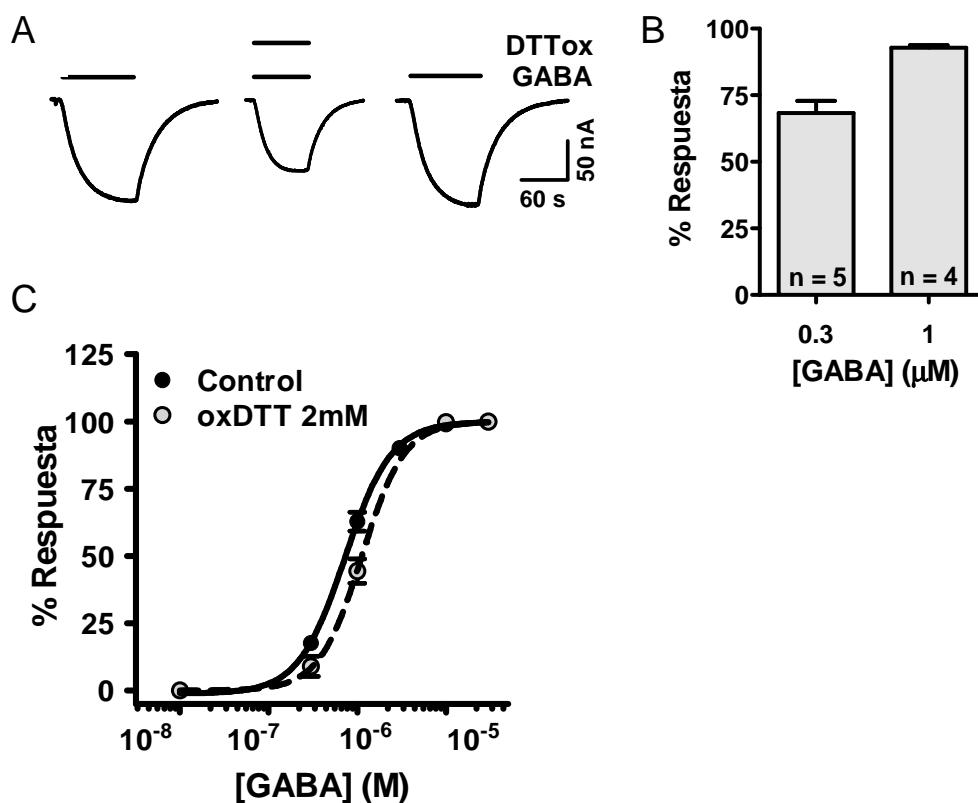


Figura 13: El DTTox es capaz de inhibir las respuestas evocadas sobre los GABA_A receptors. **A.** Trazos representativos de las respuestas inducidas por GABA 0.3 μM en presencia y ausencia de DTTox 2 mM. **B.** El histograma resume la inhibición generada por DTTox a dos concentraciones de GABA, 0.3 y 1 μM, (n = 4 - 5). **C.** Curva D-R para GABA realizada en presencia y ausencia de DTTox. La amplitud de las respuestas está normalizada a la corriente evocada por GABA 30

μM . Cada punto de la curva representa la media y el E.S. de las respuestas obtenidas de 4 ovocitos.

Como se muestra en la Figura 13A, la aplicación conjunta de GABA 0.3 μM con DTTox 2 mM inhibió significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R. Los efectos producidos por el DTTox fueron rápidos y reversibles luego de un lavado con Ringer Rana normal.

El gráfico de barras de la Figura 13B cuantifica el porcentaje de inhibición para las respuestas evocadas por aplicaciones de GABA 0.3 μM y 1 μM ; $31.8 \pm 9.3 \%$ y $7.1 \pm 1.9 \%$, respectivamente, en presencia de DTTox 2 mM, ($p < 0.05$; $n = 4 - 5$).

Asimismo, la naturaleza de la inhibición por DTTox se analizó mediante la construcción de curvas D-R para GABA en presencia o ausencia del oxidante a una concentración fija de 2 mM. Los valores de EC_{50} obtenidos fueron los siguientes; control (círculos negros) = $0.73 \pm 0.04 \mu\text{M}$, ($nHill_{\text{control}} = 1.65 \pm 0.24$) y DTTox (círculos grises) = $1.13 \pm 0.01^* \mu\text{M}$, ($nHill_{\text{DTTox}} = 1.81 \pm 0.05$); (* $p < 0.001$, $n = 4$), (Tabla 2, Figura 13C). El oxidante produjo un aumento significativo de los valores de EC_{50} , esto indica que el DTTox inhibe las respuestas mediadas por GABA ρ_1 R, disminuyendo la afinidad aparente de los receptores.

El glutatión oxidado (GSSG), también llamado disulfuro de glutatión por poseer un puente disulfuro en su estructura, tiene la capacidad de oxidar proteínas que tengan expuestos cisteínas libres u otros aminoácidos susceptibles a ser modificados (Sen, 1998). La capacidad de modular las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R se estudió a continuación.

Luego de la co-aplicación de GABA 0.3 μM en presencia de GSSG 3 mM se produjo una significativa disminución de las respuestas evocadas. Como se ilustra en la figura 14A, la corriente control es de mayor amplitud que la

obtenida en presencia del oxidante. La inhibición observada fue rápida y desapareció luego de un solo lavado con Ringer Rana normal.

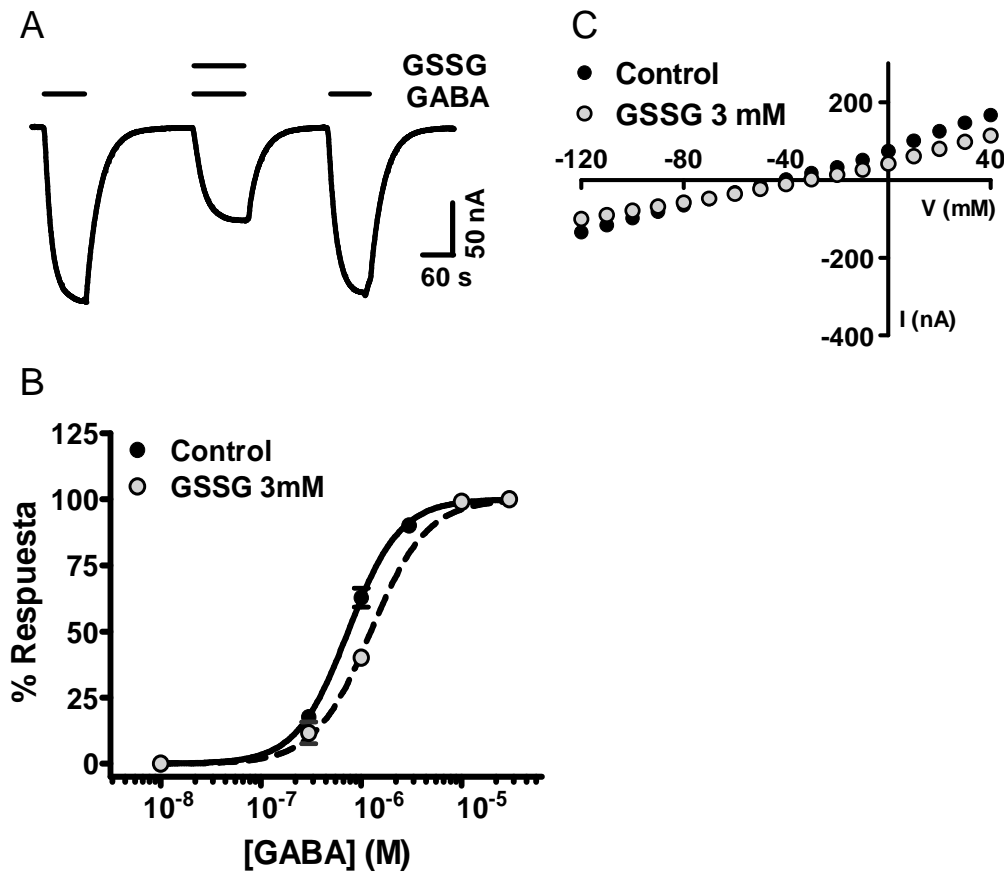


Figura 14: Las respuestas evocadas en los $GABA_{p1R}$ son inhibidas significativamente por GSSG 3 mM. A. Trazos representativos de respuestas evocadas en los $GABA_{p1R}$ en ausencia o presencia de GSSG 3 mM. El oxidante se coaplicó con el agonista (GABA 0.3 μ M) mediante el baño de perfusión. **B.** Curva D-R para GABA realizada a concentraciones crecientes del agonista en presencia y ausencia de GSSG. La amplitud de las respuestas está normalizada a la corriente máxima. Cada punto de la curva representa la media y el E.S. de las respuestas obtenidas de 4 ovocitos. **C.** Trazo representativo de las relaciones I-V para los $GABA_{p1R}$. Corrientes evocadas por GABA 0.3 μ M en presencia y ausencia de GSSG 3 mM

Continuando con la caracterización de la inhibición inducida por agentes oxidantes, se realizaron curvas D-R en ausencia y presencia de GSSG 3 mM. La Figura 14B muestra las curvas obtenidas en ambas condiciones. Los

valores de EC_{50} calculados fueron los siguientes; control (círculos negros) = $0.74 \pm 0.02 \mu\text{M}$, ($nHill_{\text{control}} = 1.68 \pm 0.12$) y GSSG (círculos grises) = $1.25 \pm 0.03 \mu\text{M}$, ($nHill_{\text{GSSG}} = 1.56 \pm 0.08$), ($*p < 0.01$, $n = 4$), (Tabla 2). El efecto del GSSG sobre las curvas D-R para GABA fue similar al observado para el DTTox.

En la Figura 14C se muestran las relaciones de corriente-voltaje (I-V) para los $\text{GABA}_{\rho 1}\text{R}$. Las I-V se realizaron cuando las corrientes evocadas por GABA $0.3 \mu\text{M}$ (círculo negro) solo o en presencia de GSSG 3 mM (círculo grises), alcanzaban un máximo estable. Como se puede observar los efectos del GSSG 3 mM fueron independientes del potencial de membrana fijado, en el rango de -120 a $+40 \text{ mV}$. Asimismo, la linealidad de la relación I-V se mantuvo, sin existir ningún cambio en el potencial de reversión del Cl^- .

El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), (DTNB), es un químico utilizado para modificar grupos tioles de manera reversible. Este agente oxidante es capaz de reaccionar con sulfhidrilos libres, oxidando al aminoácido y en consecuencia a la proteína que lo contenía (Choi et al., 2001; Chu et al., 2006).

La Figura 15A ilustra los trazos representativos obtenidos en experimentos realizados co-aplicando al agonista con DTNB $500 \mu\text{M}$. Como se observó para todos los oxidantes estudiados en este capítulo, la aplicación conjunta de GABA $0.3 \mu\text{M}$ con DTNB disminuyó marcadamente las respuestas evocadas. Su acción también fue rápida y reversible luego de un sólo lavado con Ringer normal (2 minutos).

El porcentaje de inhibición de las respuestas en presencia de DTNB ($500 \mu\text{M}$) obtenido para GABA $0.3 \mu\text{M}$ fue $25.3 \pm 6.1^{**} \%$ y para GABA $1 \mu\text{M}$ fue $22.62 \pm 4.3^* \%$, ($**p < 0.01$; $*p < 0.05$; $n = 5$). Como se muestra en el gráfico de barras de la Figura 15B la dependencia de la inhibición generada por el oxidantes (DTNB) con la concentración del agonista no es tan marcada como para los otros agentes redox estudiados.

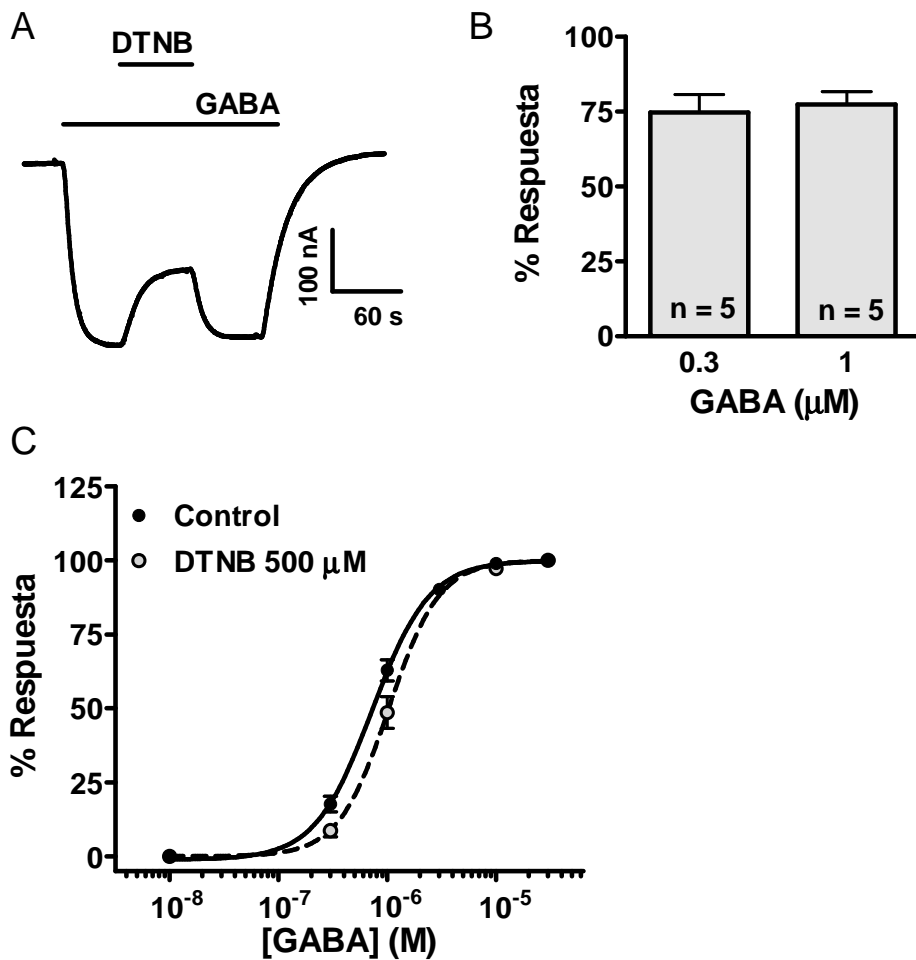


Figura 15: El DTNB inhibe significativamente las respuestas evocadas por GABA sobre los GABA_ρ1R. **A.** Corrientes representativas de las respuestas inducidas por GABA 0.3 μM sobre los receptores en presencia y ausencia de DTNB 500 μM. **B.** El histograma resume la inhibición generada por DTNB a dos concentraciones de GABA, 0.3 y 1 μM, (n = 5). **C.** Curva D-R para GABA realizada en presencia y ausencia de DTNB 500 μM. La amplitud de las respuestas está normalizada a la corriente evocada por GABA 30 μM, (respuesta máxima). Cada punto de la curva representa la media y el E.S. de las respuestas obtenidas de 5 ovocitos.

La inhibición por DTNB fue caracterizada mediante la generación de curvas D-R en ausencia y presencia de oxidante (500 μM). La Figura 15C muestra los resultados obtenidos. Los valores de EC₅₀ fueron los siguientes; control (círculos negros) = 0.72 ± 0.02 μM, ($nHill_{control} = 1.65 ± 0.23$) y DTNB (círculos grises) 1.03 ± 0.01 μM*, ($nHill_{DTNB} = 1.88 ± 0.03$), (*p < 0.01, n = 5),

(Tabla 2). El DTNB también produjo una disminución de la afinidad aparente de los GABA_{p1}R al igual que todos los agentes oxidantes estudiados en el presente capítulo.

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo demostraron que al igual que en los GABA_AR, (Pan et al., 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000a), los GABA_{p1}R tienen una marcada sensibilidad frente a compuestos redox tanto endógenos y exógenos. Los resultados de las secciones I y II del presente capítulo muestran que mientras los agentes reductores potencian las respuestas evocadas por GABA, los agentes oxidantes son capaces de inhibir las corrientes de Cl⁻ de los GABA_{p1}R (Figuras 10 - 15). Cabe destacar que las concentraciones elegidas para realizar los experimentos fueron similares a las reportadas anteriormente en literatura.

Los compuestos de naturaleza reductora produjeron un aumento de la afinidad aparente de los GABA_{p1}R. Esto se observa en las curvas D-R de las Figuras 10C y 11C como un corrimiento hacia la izquierda en presencia del reductor con respecto al control, lo cual se traduce como una disminución significativa de los EC₅₀, (Tabla 2). Es importante mencionar nuevamente que aunque el DTT y el GSH producen un aumento de la afinidad aparente de los GABA_{p1}R, ambas curvas presentan un perfil levemente diferente, sugiriendo la presencia de más de un mecanismo involucrado en la potenciación de los receptores. Además, ninguno de los reductores en las concentraciones utilizados fue capaz de modificar las respuestas a concentraciones altas del agonista (GABA 10 y 30 μM).

Estos resultados son consistentes con los encontrados en estudios previos realizados por Pan y colaboradores en células ganglionares de retina. Donde la construcción de curvas D-R en presencia de DTT (2 mM) generó curvas desplazadas hacia la izquierda con respecto al control, y con un

consecuente valor de EC₅₀ significativamente menor. Asimismo, las respuestas evocadas por aplicaciones altas del agonista no se vieron modificadas por la presencia del reductor, (Pan et al., 1995).

Contrariamente, los experimentos reportados para GABA_AR compuestos por las subunidades $\alpha_1\beta_2$ y $\alpha_1\beta_1$ expresados en células HEK y ovocitos de *Xenopus*, respectivamente, demostraron el DTT (2 mM) si era capaz de potenciar significativamente las respuestas a concentraciones saturantes de GABA. Sin embargo, el reductor no fue capaz de modificar la afinidad aparente de los GABA_AR, (Amato et al., 1999; Pan et al., 2000b).

Tabla 2			
Parámetros de las curvas D-R para los reductores y oxidantes			
	EC ₅₀ (μM)	n Hill	n
Control	0.74 ± 0.01	1.74 ± 0.03	3
DTT 2 mM	0.58 ± 0.01*	1.30 ± 0.07	3
Control	0.74 ± 0.02	1.69 ± 0.11	3-5
GSH 5 mM	0.52 ± 0.01*	1.98 ± 0.04	3-5
Control	0.73 ± 0.04	1.65 ± 0.24	4
DTTox 2 mM	1.13 ± 0.01*	1.81 ± 0.05	4
Control	0.74 ± 0.02	1.68 ± 0.12	4
GSSG 3 mM	1.25 ± 0.03	1.56 ± 0.08	4
Control	0.72 ± 0.02	1.65 ± 0.32	5
DTNB 500 μM	1.03 ± 0.01	1.88 ± 0.03	5

Previamente, Pan y colaboradores sugirieron que los GABA_Aρ₁R eran insensibles a la modulación redox, (Pan et al., 2000). En este estudio las respuestas mediadas por los receptores, expresados también en ovocitos de *Xenopus*, eran evocadas por GABA 5 μM en ausencia y presencia de DTT 2 mM. Analizando en conjunto los experimentos de dicho trabajo con nuestros resultados queda en evidencia porque en este trabajo previo no observaron los

efectos del reductor sobre las respuestas. Los resultados del presente capítulo demuestran que el porcentaje de potenciación observado depende marcadamente de la concentración del agonista utilizado. Por lo tanto, dado que la concentración de GABA utilizada por Pan y colaboradores era saturante no pudieron observar los efectos del DTT sobre las corrientes.

Las respuestas mediadas por los GABA_{ρ1}R fueron sensibles también a compuestos oxidantes. Como se observa en las Figuras 13 - 15 estos agentes inhibieron significativamente las corrientes evocadas por GABA. A diferencia de lo observado con los agentes reductores, los perfiles de las curvas D-R en presencia de DTTox, GSSG y el DTNB fueron similares. Mostrando un rango de acción equivalente. No obstante, así como ocurría en presencia de los reductores, las respuestas evocadas por aplicaciones de GABA 10 y 30 μM no fueron modificadas por los agentes oxidantes a las concentraciones utilizadas.

Los agentes oxidantes DTTox, GSSG y DTNB originaron un desplazamiento significativo de las curvas D-R hacia la derecha (Figuras 13C, 14B y 15C). Esta disminución de la afinidad aparente de los GABA_{ρ1}R al encontrarse oxidados se traduce en un aumento significativo de los EC₅₀ calculados (Tabla 2).

Cabe destacarse que, tanto la potenciación inducida por los agentes reductores como la inhibición generada por los oxidantes, fue nula para respuestas inducidas por altas concentraciones de GABA. Los resultados obtenidos indican que existiría una relación inversamente proporcional entre la concentración del agonista utilizada para evocar las respuestas y la potenciación/inhibición observada en los GABA_{ρ1}R.

La Figura 16 resume en un gráfico de barras el porcentaje de cambio de las respuestas evocadas por GABA 0.3 μM en presencia de los diferentes agentes redox estudiados en éste capítulo (Tabla 3).

Compuesto	Concentración	% Potenciación	n
DTT	2 mM	138.0 \pm 27.8	9
GSH	5 mM	108.7 \pm 25.2	5
NAc	1 mM	197.2 \pm 73.8	6
DTTox	2 mM	31.7 \pm 9.3	3
GSSG	3 mM	31.6 \pm 8.1	4
DTNB	500 μ M	25.3 \pm 6.1	5

Se eligió mostrar nuevamente estos porcentajes a GABA 0.3 μ M, porque es a ésta concentración del agonista donde se observaron los efectos máximos para los reductores y oxidantes estudiados. La susceptibilidad de los GABA ρ_1 R a agentes redox sugiere que las subunidades ρ_1 que lo componen se encuentran en un equilibrio entre formas oxidadas y reducidas. Es importante mencionar que a concentraciones comparables, el efecto potenciador de los reductores (> 100 %) fue siempre significativamente mayor a la inhibición generada por los agentes oxidantes (\approx 30 %). Esta asimetría sugiere que los GABA ρ_1 R se encontrarían mayormente en una forma oxidada, siendo entonces más sensibles a la acción de compuestos reductores.

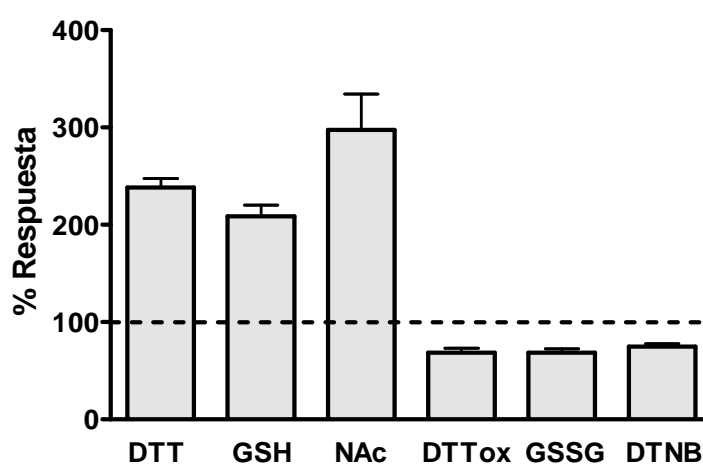


Figura 16. Efecto de los agentes reductores y oxidantes sobre las respuestas de los GABA ρ_1 R. El histograma resume los datos obtenidos por la modulación

redox obtenida por los diferentes compuestos redox. Las respuestas fueron normalizadas a la corriente control (GABA 0.3 μ M), indicada como una línea de puntos. Cada valor corresponde a la media y el E.S. de las respuestas obtenidas.

II. MODULACIÓN REDOX DE LOS RECEPTORES GABA ρ_1 R.

La modulación de tipo redox de receptores como los GABA $_A$ R y NMDAR puede ser encubierta por niveles basales de Zn $^{2+}$ en las soluciones de registro. Trazas de este catión divalente son suficientes para generar una inhibición parcial y persistente en las respuestas evocadas por los agonistas correspondientes (Choi and Lipton, 1999; Choi et al., 2001; Wilkins and Smart, 2002).

Asimismo, la acción del Zn $^{2+}$ sobre las subunidades ρ_1 ha sido estudiada en varios trabajos previos (Calvo et al., 1994; Chang et al., 1995; Wang et al., 1995). Dicha inhibición es de menor potencia para los GABA ρ_1 R comparada, por ejemplo, con los receptores heteroméricos $\alpha\beta$ de GABA $_A$, (Draguhn et al., 1990). Por lo cual, suponemos que las trazas presentes de Zn $^{2+}$ en el Ringer normal tendrían un efecto casi imperceptible o nulo sobre las respuestas de los GABA ρ_1 R. (Las trazas de Zn $^{2+}$ pueden llegar a ser de alrededor de 100 nM, (Choi et al., 2001)).

No obstante, dado que la acción quelante del DTT ha sido reportada para iones que incluyen al Zn $^{2+}$ (Pan et al., 1995; Choi et al., 2001)), se evaluó si la naturaleza de la potenciación, inducida sobre las respuestas de GABA por el reductor, estaba en parte mediada por la eliminación del catión divalente de las soluciones de registro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A continuación se muestran las curvas D-R realizadas en presencia y ausencia de tricina (10 mM), un agente quelante de metales pesados, capaz de

acomplejarse con el Zn^{2+} libre, eliminándolo por completo de las soluciones (Wilkins and Smart, 2002; Chu et al., 2006).

La Figura 17A muestra superpuestas las corrientes evocadas por concentraciones crecientes de GABA en ausencia y presencia de tricina 10 mM.

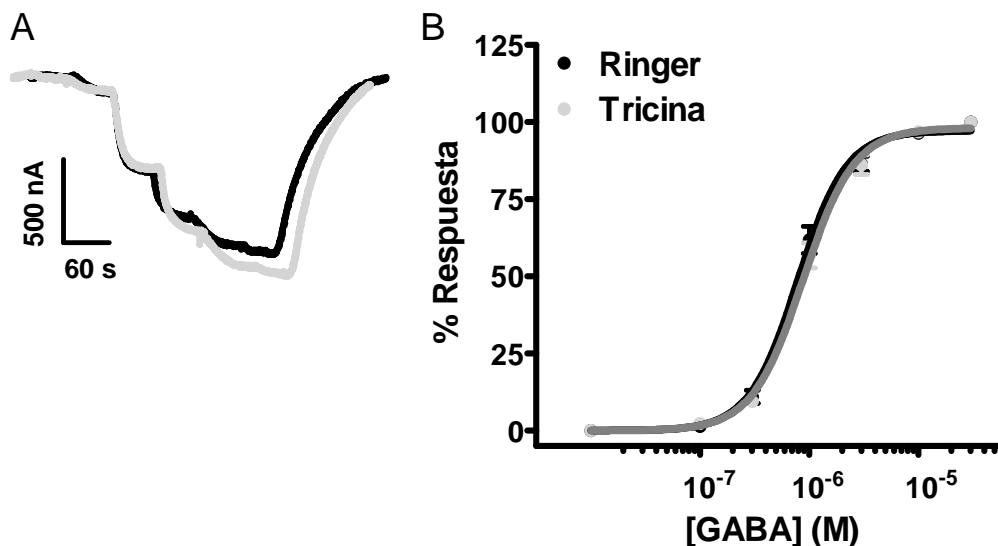


Figura 17: Las respuestas mediadas por los $GABA_{\rho 1}R$ no se encuentran afectadas por trazas de Zn^{2+} presentes en las soluciones de registro. A. Corrientes representativas de las respuestas inducidas por concentraciones crecientes de GABA en presencia y ausencia de tricina 10 mM. Los trazos se superponen para una mejor ilustración de los resultados obtenidos. **B.** Curva D-R para GABA realizada en ausencia (control) y presencia del quelante de Zn^{2+} . Las amplitudes de las respuestas se encuentran normalizadas a la corriente máxima. Cada punto de la curva representa la media y el E.S. de las respuestas obtenidas de 5 ovocitos.

Mediante la cuantificación de estos experimentos se construyeron las curvas D-R que se ilustran en la Figura 17B, ($n = 5$). Los valores de EC_{50} obtenidos luego del ajuste de las curvas a una sigmoidea simple se listan a continuación; control (círculos negros) = $0.79 \pm 0.02 \mu M$, ($nHill_{control} 1.95 \pm 0.08$) y en presencia de tricina (círculos grises) = $0.88 \pm 0.05 \mu M$, ($nHill_{tricina} 1.8 \pm 0.06$). Las curvas no presentaron parámetros significativamente diferentes.

Al igual que lo que ocurría luego de la eliminación de trazas de Zn^{2+} para los receptores heteroméricos $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ de $GABA_A$, donde la incorporación de tricina (10 mM) no generaba cambios significativos de las corrientes, (Wilkins and Smart, 2002), los resultados ilustrados en la Figura 17 sugieren que, en nuestras condiciones de registro, los $GABA_{\rho_1}R$ tampoco se encuentran bajo la inhibición basal de trazas de Zn^{2+} u otros metales pesados

En consecuencia, la potenciación inducida por el DTT, en las respuestas evocadas por GABA sobre los $GABA_{\rho_1}R$, no estaría mediada por la remoción de trazas de Zn^{2+} extracelular. Este resultado sería coherente con un efecto directo del DTT sobre los receptores, involucrando posiblemente una modulación redox.

III. PARTICIPACIÓN DE LAS CISTEINAS 177 Y 191 EN LA MODULACIÓN POR AGENTES REDOX.

Los resultados obtenidos en las secciones anteriores sugieren fuertemente que la modulación inducida por los agentes reductores y oxidantes sobre los $GABA_{\rho_1}R$ sería de tipo redox. Considerando que los $GABA_{\rho_1}R$ forman parte de la superfamilia de los receptores *cys-loop* (Connolly and Wafford, 2004), éste tipo de modulación podría estar mediada por los únicos dos grupos sulfhidrilos presentes en las subunidades ρ_1 , que son parte de las cisteínas 177 y 191 (Cutting et al., 1991).

Para evaluar esta hipótesis se utilizó al alquilante de tioles llamado N-etil maleimida, (NEM). El NEM forma uniones covalentes irreversible con las cisteínas libres, evitando de esta manera que se produzca cualquier otra reacción química sobre dichos residuos.

Este agente ha sido utilizado previamente en literatura para estudiar la participación de grupos SH- en diversos receptores, los cuales incluyen a los receptores de adenosina A_1 , los ASICs, los de glicina, los de ACh (Allende et

al., 1991; Bouzat et al., 1991; Boot, 1996; Chu et al., 2006) e incluso a los GABA_AR (Pan et al., 1995).

Dado que los trabajos realizados en células ganglionares de retina, mostraron que la alquilación irreversible inducida por NEM en los receptores de GABA_A nativos incrementaba significativamente las respuestas evocadas el agonista, así como también prevenía los efectos de los agentes reductores, (Pan et al., 1995). En primer lugar se determinó si la modificación inducida por NEM era suficiente para modular las respuestas evocadas por el agonista en los GABA_{ρ1}R. Luego se estudió si dichas modificaciones prevenían, parcial o completamente, la modulación por agentes redox.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La Figura 18A muestra el protocolo utilizado para modificar a los GABA_{ρ1}R con el alquilante. El experimento constó de incubaciones con NEM solo (30 μM) durante 30 segundos (indicado con las líneas grises), seguida luego por aplicaciones de GABA 1 μM (indicado con las líneas negras). Es importante destacar en el protocolo construido para evaluar los efectos del NEM 30 μM que las incubaciones con NEM solo no modificaron significativamente la línea de base de los registros.

Las aplicaciones discretas del alquilante permitieron evaluar la existencia de cambios en la magnitud de las respuestas del agonista luego de cada preincubación. De esta manera se logra entonces determinar el curso temporal de la acción del NEM. La irreversibilidad de los efectos inducidos por NEM permite realizar lavados con Ringer normal luego de cada aplicación de GABA, sin modificar su acción.

Los trazos representativos superpuestos de la Figura 18B ilustran la corriente control (línea negra) y los cambios inducidos en las respuestas a GABA (1 μM) luego de las preincubaciones consecutivas con NEM 30 μM

(líneas grises). La cuantificación de dichos experimentos permitió determinar que luego de la incubación número 3 con el alquilante las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R no aumentaron significativamente, esto se observa en el gráfico de barras de la Figura 18C. Es decir, que la exposición a NEM durante 1 minuto con 30 segundos sería suficiente para modificar todas las cisteínas presentes en las subunidades ρ_1 .

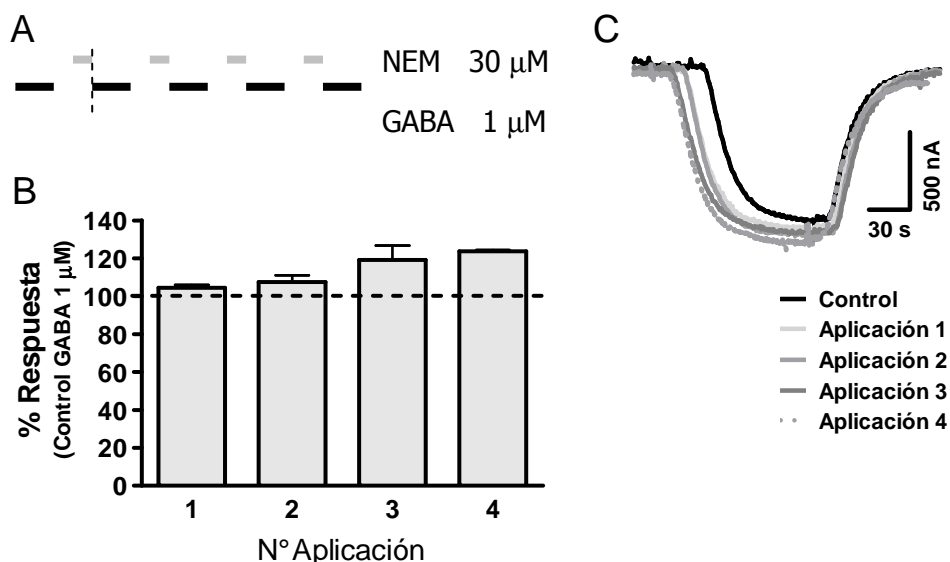


Figura 18: Efectos del NEM sobre las respuestas evocadas por GABA 1 μ M en los GABA ρ_1 R. **A.** Protocolo experimental. Las aplicaciones con NEM duraron 30 seg cada una y fueron flanqueadas siempre por aplicaciones del agonista para evaluar los cambios en las respuestas. **B.** Respuestas representativas mediadas por GABA ρ_1 R evocadas por GABA 1 μ M en ausencia (línea negra) o luego de las aplicaciones sucesivas de NEM 30 μ M (líneas grises). Los trazos se superpusieron por simplicidad. **C.** El histograma resume los valores calculados para los porcentajes de respuesta obtenidos luego de las preincubaciones con NEM, (n = 3)

Los efectos del NEM 30 μ M fueron evaluados también en respuestas evocadas por una concentración mayor de GABA (10 μ M), en una serie de experimentos similares a los descritos para la Figura 18. La Figura 19 muestra a continuación los resultados obtenidos.

Los resultados de la Figura 19 son similares a los obtenidos en la Figura 18. Los efectos máximos de la exposición a la NEM 30 μ M fueron alcanzados

luego de 1 minuto. Si a medida que la concentración de GABA utilizada para evocar las respuestas aumenta, el tiempo de preincubación necesaria disminuye, esto significaría que a concentraciones menores de GABA los efectos del NEM se alcanzarían a tiempos más largos de incubación. Por lo tanto, en los protocolos subsiguientes que involucren al alquilante el pretratamiento usado será de 2 minutos con 30 segundos. Garantizando de esta manera que la modificación de los grupos sulfhidrilos sea completa.

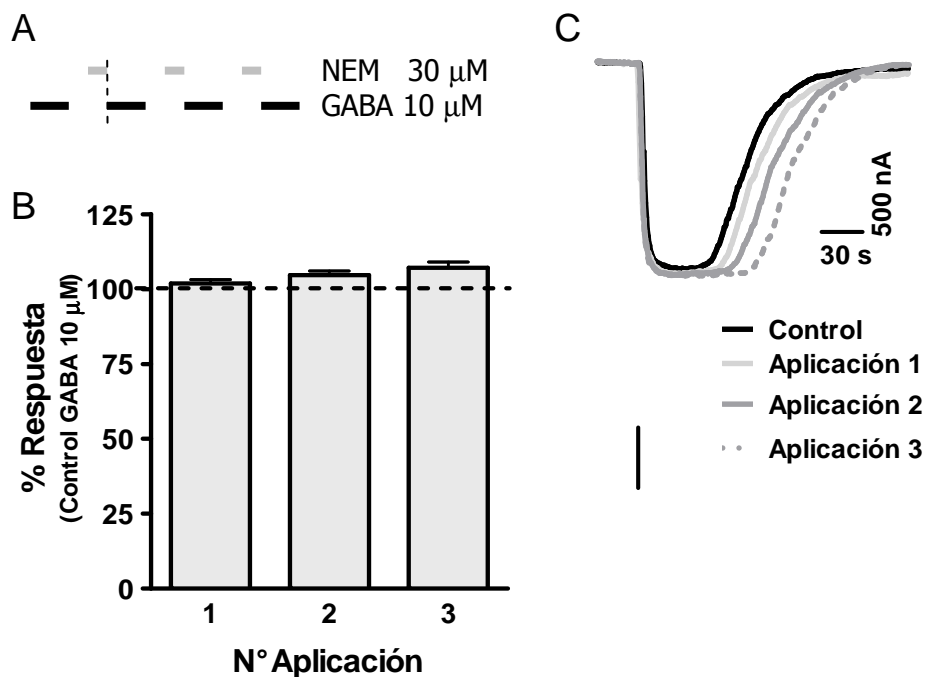


Figura 19: Efectos del NEM sobre las respuestas evocadas por GABA 10 μ M en los GABA ρ ₁R. **A.** Respuestas representativas mediadas por GABA ρ ₁R evocadas por GABA 10 μ M en ausencia (línea negra) o luego de las aplicaciones sucesivas de NEM 30 μ M (líneas grises). Los trazos se superpusieron por simplicidad. **B.** El histograma resume los valores calculados para los porcentajes de respuesta obtenidos luego de las preincubaciones con NEM, (n = 5)

La Figura 20A ilustra el protocolo utilizado para estudiar los efectos de la alquilación de los grupos sulfhidrilos de los GABA ρ ₁R. Para esto se realizaron curvas D-R (aplicaciones crecientes del agonista, las cuales están indicadas en la Figura como líneas escalonadas negras), antes y después de una preincubación de 2 minutos con 30 segundos de NEM 30 μ M (línea gris). El

tiempo de exposición al alquilante fue determinado a partir de los resultados experimentales obtenidos en las Figuras 18 y 19.

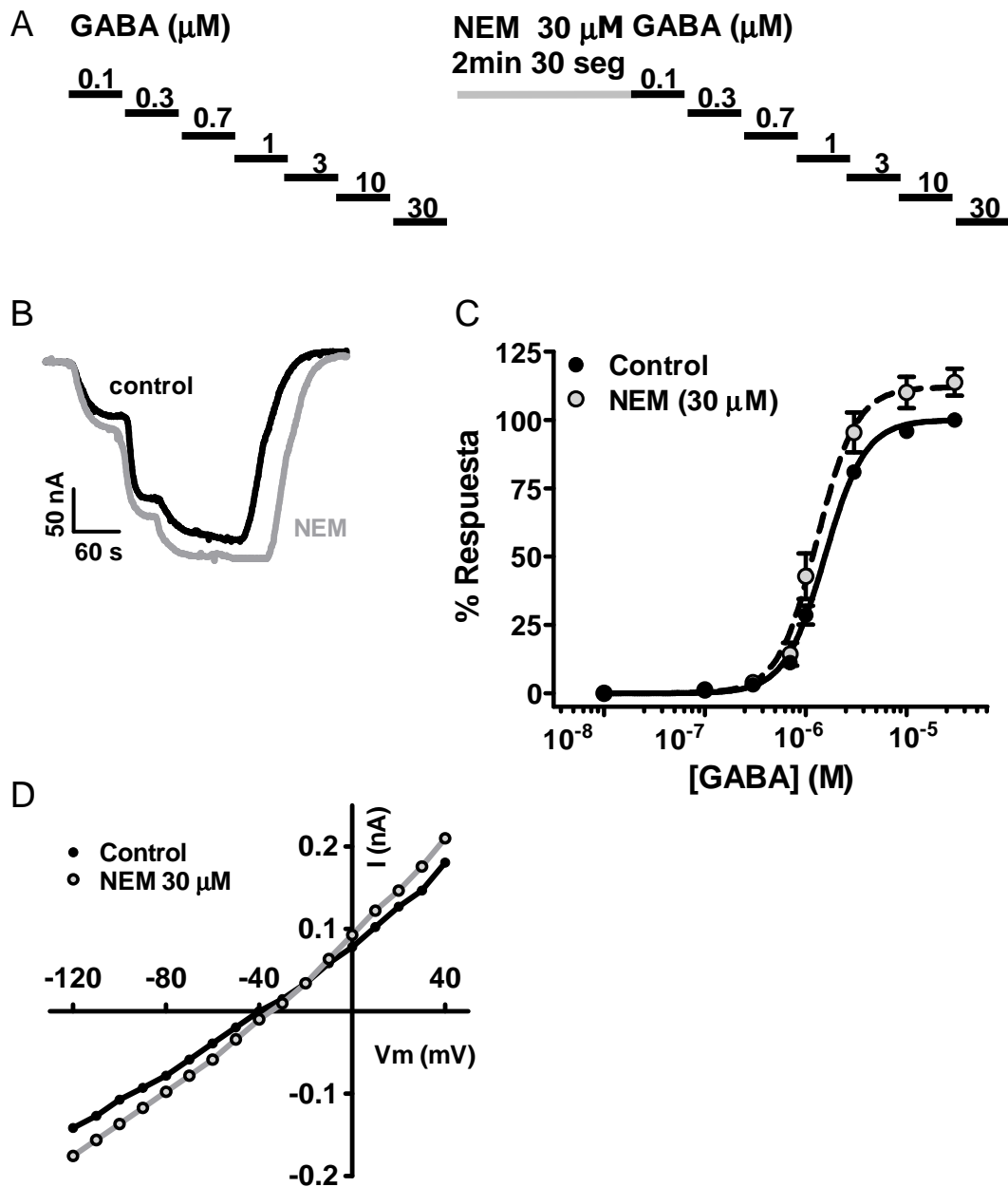


Figura 20: Efectos del tratamiento con NEM en los GABA ρ_1 R expresados en *Xenopus oocytes*. **A.** Protocolo experimental. **B.** Trazos superpuestos de las corrientes iónicas evocadas por concentraciones crecientes de GABA antes (control, línea negra) y después de la preincubación con NEM (30 μM , 2'30'') (línea gris). **C.** Curvas D-R para GABA antes (control) y después del pre-tratamiento con NEM, (n = 4). Las amplitudes de las respuestas fueron normalizadas a la respuesta evocada por GABA 30 μM . **D.** Trazo representativo de las relaciones I-V para los GABA ρ_1 R. Corrientes evocadas por GABA 0.3 μM antes y después del pre-tratamiento con NEM.

La Figura 20B y 20C ilustra las curvas D-R que se realizaron para evaluar la modulación luego de la preincubación con NEM (30 μM) de las repuestas evocadas en los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$. La Figura 20B muestra superpuestos dos trazos representativos; control (negro) y post tratamiento con NEM (gris). La cuantificación de éstas corrientes permitió la construcción de las curvas D-R que se observan en la Figura 20C. Los valores obtenidos luego de ajustarlas fueron los siguientes; para el control $\text{EC}_{50} = 1.52 \pm 0.04 \mu\text{M}$ y $n\text{Hill}$ fue 2.24 ± 0.05 (círculos negros) y para NEM $\text{EC}_{50} = 1.29 \pm 0.02 \mu\text{M}$, y el $n\text{Hill}$ NEM fue 2.24 ± 0.10 (círculos grises), ($n = 4$), (Tabla 4).

En la membrana de los ovocitos de *Xenopus laevis* se encuentra presente el co-transportador de K^+/Cl^- el cual puede ser activado no sólo por un aumento del volumen celular y depleción de K^+ , sino también por la alquilación mediada por NEM, (Lauf et al., 1984; Adragna et al., 2004). La activación del co-transportador podría modificar las concentraciones intracelulares del anión y considerando que los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ son canales de Cl^- esto, a su vez, tendría un efecto directo sobre las repuestas. Aunque las concentraciones de NEM utilizadas en los experimentos presentes en literatura para estudiar al co-transportador K^+/Cl^- era significativamente más altas, (entre 0.1 y 2 mM), se corroboró si el efecto observado sobre las corrientes de los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ era producto de la modificación de los SH- presentes en la subunidades ρ_1 .

Para ello se realizaron curvas I-V para GABA 1 μM , antes y después de la incubación con NEM 30 μM durante 2 minutos 30 segundos. La Figura 20D muestra que la incubación con NEM no modifica significativamente el potencial de reversión para el Cl^- . Los efectos del alquilante fueron independientes del potencial de membrana fijado, en el rango de -120 a +40 mV. Asimismo, la linealidad de la relación I-V se mantuvo constante, observándose solamente un aumento en la pendiente de curva I-V post tratamiento con NEM, el cual era esperado dado que la alquilación de las cisteínas incrementaba las repuestas inducidas por GABA, (Figura 20B y 20C).

Los resultados obtenidos previamente revelan que el DTT es un modulador de las respuestas de los GABA ρ_1 R. Este reductor ha sido descrito como un agente modificador de grupos sulhidrilos y de otros residuos dependiendo de la concentración utilizada, (Rose and Bode, 1991; Chu et al., 2006). Para estudiar la naturaleza de la potenciación del DTT sobre las respuestas a GABA, se realizaron nuevamente curvas D-R en presencia y ausencia de DTT 2 mM, pero en este caso las mismas se construyeron antes y después del pre-tratamiento con NEM 30 μ M (2 minutos y 30 segundos).

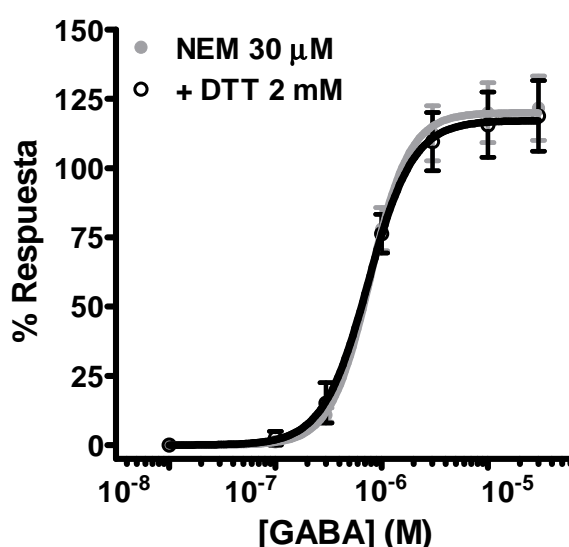


Figura 21. La alquilación de los grupos tioles por NEM previene los efectos del DTT en las respuestas evocadas por GABA. Curvas D-R para GABA en ausencia y presencia de DTT 2 mM, antes (Trazo gris) y después del pre-tratamiento con NEM (Trazo negro), (n = 3). Las amplitudes de las respuestas fueron normalizadas a la respuesta evocada por GABA 30 μ M.

En la Figura 21 se muestran las curvas D-R para las cuales los valores de EC₅₀ obtenidos fueron los siguientes; control = $0.86 \pm 0.10 \mu$ M, ($nHill_{control} = 2.58 \pm 0.30$), NEM (círculos grises) = $0.78 \pm 0.09 \mu$ M, ($nHill_{NEM} = 2.32 \pm 0.1$); DTT+NEM (círculos vacíos) = $0.74 \pm 0.06 \mu$ M, ($nHill_{DTT+NEM} = 2.04 \pm 0.08$); (*p < 0.001, n = 3), (Tabla 4).

Como se observa en la Figura 21 la alquilación de las cisteínas presentes en las subunidades ρ_1 de los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ previene completamente la modulación del DTT en las respuestas evocadas por aplicaciones GABA. Indicando fuertemente que el efecto potenciador estaría mediado por la reducción de las cisteínas 177 y 191.

Dado que la modificación química inducida por NEM previno la modulación del DTT sobre las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$, se estudió a continuación el efecto de éste pre-tratamiento sobre la potenciación inducida por GSH.

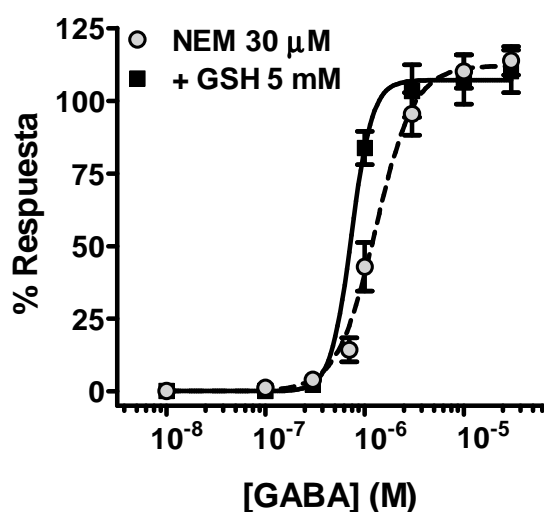


Figura 22. El efecto potenciador del GSH sobre los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ no es ocluido por el pre-tratamiento con NEM. Curvas D-R para GABA en ausencia y presencia de GSH 5 mM, antes (Trazo gris) y después del pre-tratamiento con NEM 30 μM (Trazo negro), ($n = 3$). Las amplitudes de las respuestas fueron normalizadas a la respuesta evocada por GABA 30 μM .

Las curvas D-R en presencia y ausencia de GSH 5 mM, antes y después del tratamiento con NEM se encuentran graficadas en la Figura 22. Los valores obtenidos de EC_{50} fueron los siguientes; NEM (círculos grises) $1.29 \pm 0.05 \mu\text{M}$, ($n\text{Hill}_{\text{NEM}} = 2.24 \pm 0.42$); GSH+NEM (cuadrados negros) $= 0.73 \pm 0.07^* \mu\text{M}$, ($n\text{Hill}_{\text{GSH+NEM}} = 4.13 \pm 1.86$); ($*p < 0.001$, $n = 3$), (Tabla 4).

Contrariamente a los resultados obtenidos con DTT, el análisis de las curvas D-R reveló que la preincubación con NEM 30 μM no modificó los efectos

del GSH sobre las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R. El desplazamiento de la curva en presencia del reductor, el cual se traduce como un aumento de la afinidad aparente por el agonista, persistió luego del pre-tratamiento e incluso se hizo más pronunciado.

Tabla 4

Parámetros de las curvas D-R realizadas en presencia de NEM

	EC ₅₀ (μ M)	n Hill	n
Control	1.52 \pm 0.04	2.24 \pm 0.05	4
NEM 30 μ M	1.29 \pm 0.02	2.24 \pm 0.10	4
Control	0.86 \pm 0.10	2.58 \pm 0.30	3
NEM 30 μ M	0.78 \pm 0.09	2.32 \pm 0.10	3
NEM 30 μ M + DTT 2 mM	0.74 \pm 0.06*	2.04 \pm 0.08	3
Control	1.38 \pm 0.20	1.89 \pm 0.11	3
NEM 30 μ M	1.29 \pm 0.05	2.24 \pm 0.42	3
NEM 30 μ M + GSH 5 mM	0.73 \pm 0.07*	4.13 \pm 1.86	3

En conjunto, los resultados sugieren fuertemente que la modulación inducida por los agentes estudiados en este capítulo podría ser de tipo redox. Además los experimentos realizados con NEM permiten proponer que en parte, esta modulación estaría mediada por los grupos sulfhidrilos de cisteínas presentes en las subunidades ρ_1 . Pero también que deben estar involucrados otros residuos aminoacídicos, dado que el pre-tratamiento con el alquilante no es capaz de prevenir los efectos del GSH.

CAPÍTULO 2

I. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS GABA_{p1}R POR ÁCIDO ASCÓRBICO.

El ácido ascórbico es el antioxidante más importante del sistema nervioso central dada su habilidad como donador de electrones, (Rice, 2000), su capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno y su rápido reciclaje mediante glutatión y otros tioles intracelulares, (Winkler et al., 1994; Arrigoni and De Tullio, 2002). Numerosos estudios postulan a ésta vitamina como un posible neuromodulador endógeno en el cerebro, (Grunewald, 1993; Rebec, 1994; Rice, 2000; Rebec et al., 2005).

Como se destacó en la introducción, dentro del SNC, la retina es el área donde el ácido ascórbico alcanza las mayores concentraciones, tanto intra como extracelulares, (Rose and Bode, 1991). Asimismo, se mencionó, que es en éste tejido donde particularmente se encuentran altos niveles de expresión de los GABA_{p1}R.

Por lo tanto, considerando en conjunto los resultados obtenidos en el capítulo I, la naturaleza reductora del ácido ascórbico y su distribución y la marcada expresión de los receptores en retina, se estudiaron a continuación los efectos del ácido ascórbico sobre los GABA_{p1}R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El ácido ascórbico potenció significativamente las respuestas mediadas por los GABA_{p1}R, ($\approx 150\%$, $n = 7$). La Figura 23A muestra los efectos de la co-aplicación del agonista ($0.3 \mu\text{M}$) con el antioxidante (3 mM).

Consistentemente con los resultados obtenidos en el capítulo I, donde las moléculas con capacidad reductora evaluadas potenciaban las aplicaciones al GABA, el ácido ascórbico incrementó marcadamente las respuestas mediadas por los GABA_{p1}R. Este efecto es contrario al reportado por Majewska

y colaboradores, quienes propusieron al antioxidante como un modulador negativo para los receptores de NMDA, (Majewska et al., 1990).

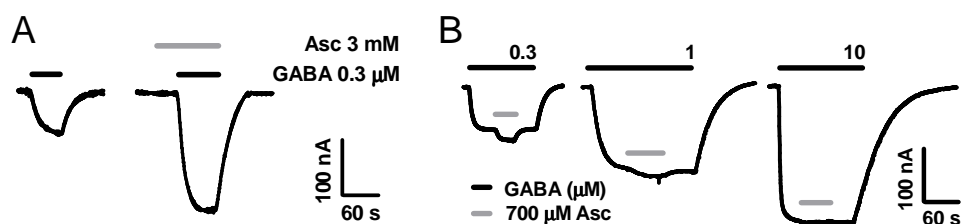


Figura 23. El ácido ascórbico potencia significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R. **A.** Respuestas a GABA evocadas en los GABA ρ ₁R antes, (control, GABA 0.3 μM) y después de la aplicación de ácido ascórbico 3 mM. El porcentaje de potenciación obtenido: $162 \pm 22.6\%$ (n=3). **B.** Trazos representativos mediados por los GABA ρ ₁R a concentraciones crecientes de GABA (0.3, 1 y 10 μM), en ausencia y presencia de ácido ascórbico 700 μM. El antioxidante se co-aplicó cuando las respuestas a GABA alcanzaban un máximo estable. En todos los casos las barras rojas indican cuando se realizó la aplicación de ácido ascórbico.

A continuación se estudió si la preincubación con ácido ascórbico 3 mM modificaba el porcentaje de potenciación de las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R. El efecto de la exposición al antioxidantes a distintos tiempos de incubación (0, 30'', 1', 1'30'', 5' y 10') se evaluó sobre respuestas evocadas por dos concentraciones de GABA, (0.3 y 1 μM). Como se observa en la Figura 24, la preincubación no modificó significativamente la potenciación inducida sobre las corrientes. Por consiguiente, en los todos experimentos que involucren la utilización del ácido ascórbico, éste se co-aplicará con el agonista en el baño de perfusión, sin preincubaciones previas.

La Figura 23B ilustra la potenciación inducida por ácido ascórbico 700 μM sobre respuestas las respuestas de los GABA ρ ₁R, (GABA 0.3, 1 y 10 μM). La co-aplicación del reductor se realizó en el máximo de las corrientes evocadas para las tres concentraciones del agonista utilizadas. Los porcentajes de potenciación se listan a continuación; $43.8 \pm 12.7\%$ para GABA 0.3 μM (n=6), $11.1 \pm 2.1\%$ para GABA 1 μM (n=6) y $0.8 \pm 0.3\%$ para GABA 10 μM

(n=4). Por lo tanto, los efectos del antioxidante se mantuvieron significativos a concentraciones menores del ácido ascórbico, 700 μM . Esta concentración, reportada como fisiológica, es suficiente para potenciar las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\text{P}1\text{R}}$.

Al igual que se encontró con los reductores estudiados en el capítulo I, las acciones del ácido ascórbico dependieron de la concentración de GABA utilizada para evocar las respuestas. Así como sus efectos también fueron rápidos, estables y completamente reversibles luego de un lavado con *ringer* normal. No se observaron tampoco efectos uso-dependiente.

Se evaluó también el efecto del ácido ascórbico sobre la cinética de activación y deactivación de las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\text{P}1\text{R}}$. Las constantes correspondientes se obtuvieron ajustando a exponenciales de primer orden crecientes o decrecientes a respuestas evocadas por aplicaciones de GABA 0.3 μM en presencia y ausencia de ácido ascórbico 3 mM. Se obtuvieron las siguientes constantes de activación, τ_{act} , control 24.8 ± 1.6 s y la correspondiente a la constante de deactivación, τ_{deact} , 23.5 ± 3.8 s (n=6). Al mismo tiempo, en presencia de ácido ascórbico 3 mM el τ_{act} fue 22.6 ± 2.6 s y el de τ_{desct} fue 28.1 ± 3.3 s (n=6). Los resultados muestran que la aplicación de ácido ascórbico no modificó significativamente la cinética de las respuestas inducidas por GABA. (Tabla 5a).

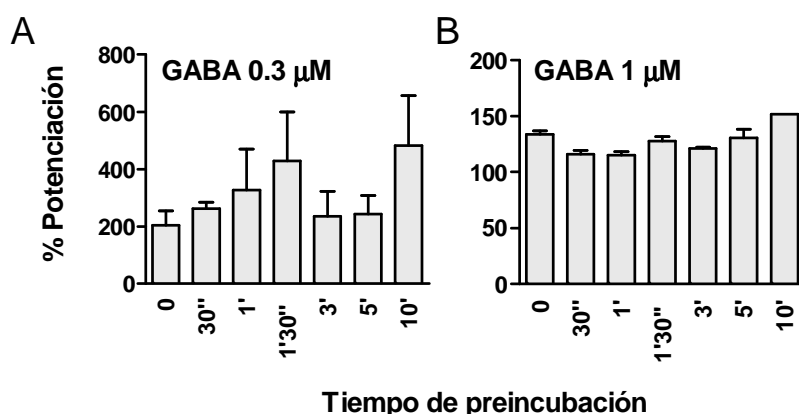


Figura 24. La preincubación con ácido ascórbico produce efectos similares que la co-incubación sobre las respuestas de los $\text{GABA}_{\text{P}1\text{R}}$. A y B. Los gráficos de barra representan el porcentaje de potenciación inducido sobre las

respuestas evocadas por GABA 0.3 y 1 μM , respectivamente, a distintos tiempos de incubación con ácido ascórbico 3 mM. Los valores obtenidos no son significativamente diferentes dentro de cada grupo experimental, (n= 3 - 5).

Con el fin de caracterizar la naturaleza de la potenciación generada por el ácido ascórbico en las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ se construyeron curvas D-R para GABA y relaciones de corriente-voltaje (I-V) en presencia y ausencia del antioxidante (3 mM).

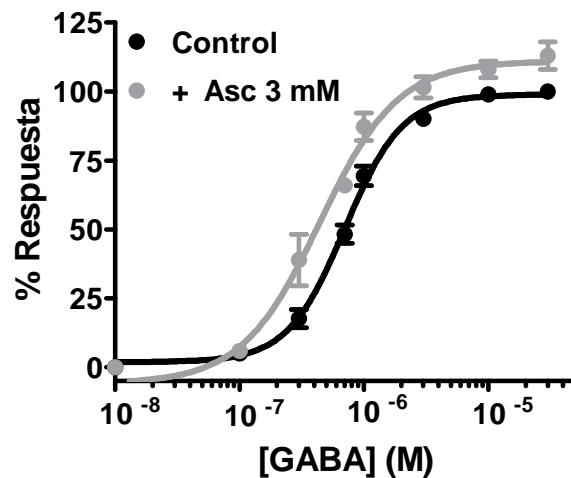


Figura 25. El ácido ascórbico modifica la afinidad aparente y la probabilidad de apertura de los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$. Curvas D-R para GABA en ausencia (control, círculos negros) y presencia de ácido ascórbico 3 mM (círculos grises). Las amplitudes de las respuestas se expresan normalizadas a la corriente máxima evocada por aplicación de GABA 30 μM .

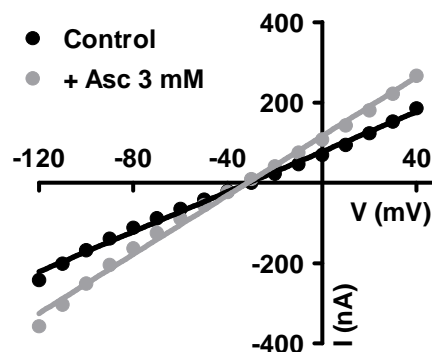


Figura 26. Las relaciones I-V de los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ son modificadas por el ácido ascórbico. Trazo representativo de las relaciones I-V para los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$. Corrientes evocadas por GABA 0.3 μM en ausencia (control, círculos negros) y presencia de ácido ascórbico 3 mM, (círculos grises)

Como indica la Figura 25 las curvas D-R se desplazaron hacia la izquierda en presencia del ácido ascórbico 3 mM. Este cambio es producto de un aumento significativo en la afinidad aparente de los GABA_{p1}R en presencia del antioxidante. El cálculo de los valores de EC₅₀ muestra una disminución para las curvas realizadas co-aplicando ácido ascórbico; EC₅₀ control (círculos negros) = $0.74 \pm 0.01 \mu\text{M}$, ($n_{Hill} = 1.58 \pm 0.04$) y EC₅₀ Asc (círculos grises) = $0.49 \pm 0.01^* \mu\text{M}$, ($n_{Hill} \text{ Asc} = 1.88 \pm 0.07$), ($n = 5 - 10$; $*p < 0.03$), (Tabla 5b).

A diferencia de los resultados obtenidos cuando se realizaron las curvas D-R para los agentes reductores mostrados en el capítulo I, el ácido ascórbico generó un aumento leve pero significativo en las corrientes máximas de GABA, ($14.8 \pm 3.4 \%$ para GABA 30 μM ; $p < 0.05$; $n=7$). Esto indicaría que el ácido ascórbico no sólo tiene un efecto modificando la afinidad aparente de los GABA_{p1}R, sino que también incrementa la probabilidad de apertura de los mismos.

La Figura 25 muestra las relaciones de corriente voltaje registradas en el máximo de la respuestas evocadas por GABA 0.3 μM en presencia y ausencia de ácido ascórbico 3 mM. En este caso, como previamente se observó en experimentos realizados con GSH (5 mM), no se hallaron diferencias en el porcentaje de potenciación generado a los distintos potenciales de membrana. Tampoco el potencial de reversión de las corrientes de Cl⁻ se modificó en presencia del antioxidante. El ácido ascórbico no afectó la linealidad de la relación I-V pero provocó un aumento de la pendiente, consecuente con el incremento que éste genera sobre las respuestas a GABA, (círculos grises).

La potenciación de las respuestas de los GABA_{p1}R es significativamente mayor sobre respuestas evocadas por bajas concentraciones del agonista. Este resultado es similar al observado en el capítulo 1 para la mayoría de los moduladores redox estudiados. La Figura 27 ilustra el porcentaje de potenciación inducido por el ácido ascórbico en función de las concentraciones crecientes de GABA utilizadas para evocar las respuestas. Los experimentos se realizaron en presencia de ácido ascórbico 3 ó 30 mM.

La potenciación de las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R generada por el antioxidante disminuye marcadamente a medida que la concentración del agonista aumenta. Este comportamiento se observa tanto en presencia del antioxidante a 30 mM como a 3 mM. No obstante es importante destacar que la potenciación de las respuestas llega a un mínimo estable no nulo, (13 % aproximadamente, (Tabla 6)).

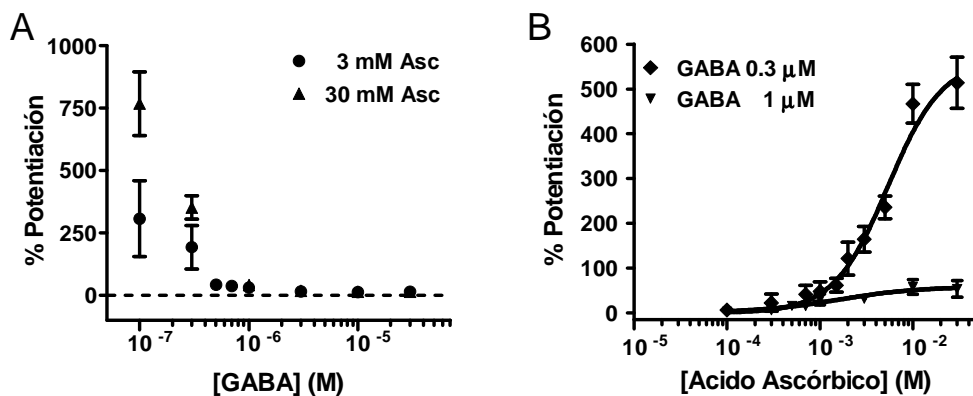


Figura 27. El porcentaje de potenciación de las respuestas de los GABA ρ ₁R inducido por ácido ascórbico depende fuertemente de la concentración del agonista. A. Los datos graficados muestran el porcentaje de cambio de la respuesta control evocada por concentraciones crecientes del agonista en presencia de ácido ascórbico 3 mM (círculo negro) y 30 mM (triángulos negros), (n = 3 - 7). Nótese que, aunque a concentraciones altas de GABA la potenciación cae marcadamente, ésta no se hace cero. **B.** Curva dosis-efecto para concentraciones crecientes de ácido ascórbico a dos concentraciones fijas de GABA, (0.3 (rombos negros) o 1 μM (triángulos invertidos negros)). Los valores de potenciación se normalizaron a la amplitud de la respuesta control correspondiente, (GABA 0.3 o 1 μM).

La aplicación de Asc 30 mM produjo un incremento aproximadamente 60 veces más grande para respuestas evocadas por bajas (0.1 y 0.3 μM) concentraciones de GABA que para las altas (10 y 30 μM). Esta diferencia se redujo a 25 veces cuando la concentración de ácido ascórbico utilizada en los experimentos fue 3 mM. Los valores de potenciación obtenidos se listan en la Tabla 6, por ejemplo, el Asc 30 mM produjo un aumento en las corrientes evocadas por GABA 0.1 μM de 767.4 ± 127.5 %, sin embargo la misma

concentración de Asc sólo generó una potenciación de $13.3 \pm 3.9\%$ sobre las respuestas a GABA $30 \mu\text{M}$, ($n=3$).

Tabla 6				
Porcentaje de potenciación				
[GABA] (μM)	Asc 3 mM	n	Asc 30 mM	N
0.1	306.9 ± 152.3	6	767.4 ± 127.5	3
0.3	192.9 ± 87.5	7	352.0 ± 46.9	4
0.5	42.2 ± 6.1	3	-	-
0.7	37.4 ± 9.9	3	-	-
1	31.3 ± 4.2	7	-	-
3	15.9 ± 3.9	6	40.7 ± 0.8	3
10	12.9 ± 2.9	6	17.6 ± 1.0	3
30	14.7 ± 3.4	6	13.9 ± 3.9	3

La Figura 25B muestra la curva dosis-efecto obtenida para respuestas evocadas por GABA, (0.3 y $1 \mu\text{M}$) en presencia de concentraciones crecientes de ácido ascórbico. Los valores de potenciación obtenidos para cada una de las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas se ajustaron a una curva sigmoidea, obteniéndose los siguientes valores de dosis efectiva al 50 % (ED_{50}); para GABA $0.3 \mu\text{M}$, $3.52 \pm 0.41 \text{ mM}$; ($nHill$ 1.23 ± 0.19) y para GABA $1 \mu\text{M}$, $1.6 \pm 0.5 \text{ mM}$; ($nHill = 0,99 \pm 0,15$), ($n= 3-9$).

II. EFECTO DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LAS RESPUESTAS DE LOS GABA_{p1R}.

El análisis de los resultados obtenidos hasta el momento, en el marco de las propiedades del ácido ascórbico, sugiere que la modulación ejercida por el ácido ascórbico sobre las respuestas de los GABA_{p1R} podría ser de tipo redox.

Como primera aproximación para evaluar ésta hipótesis, se estudió si la naturaleza de la potenciación era producto de un efecto de óxido-reducción sobre los receptores o, si existía una interacción de tipo alostérica positiva entre la molécula de ascorbato y los receptores. Para ello se realizaron una serie de experimentos en presencia de ascorbato de calcio, ((Asc)₂Ca 1.5 mM) y ácido dehidroascórbico (DHA 3 mM), dos formas de ascorbato incapaces de donar protones y de D-iso ácido ascórbico (D iso-Asc 3 mM), un iso-isómero del ácido ascórbico que puede donar protones pero posee una estructura química diferente. La Figura 28 muestra las estructuras químicas de compuestos utilizados.

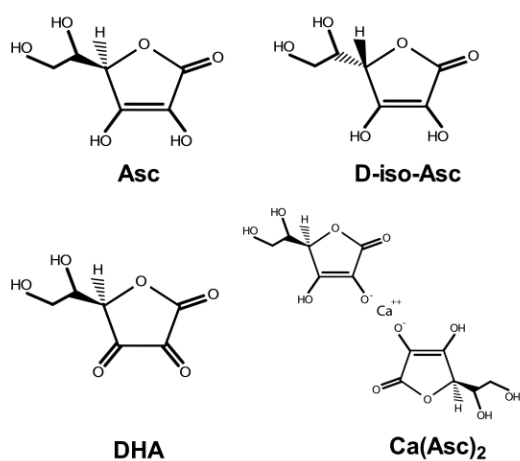


Figura 28. Estructura química de los análogos del ácido ascórbico estudiados.

Con el fin de evaluar si los efectos observados en la sección I se debían a la presencia de ascorbato en la solución, y no a la capacidad donadora de protones del ácido ascórbico, se utilizó al (Asc)₂Ca. Sin embargo, cabe destacarse que el ascorbato no se encuentra presente en las células como una sal. Sino que al ser oxidado el ácido ascórbico es transformado, primero a una forma intermedia inestable y rápidamente se convierte en DHA. Por lo tanto, se estudió la capacidad de potenciar las respuestas mediadas por los GABA_{ρ1}R de ésta forma fisiológica. Por último, se utilizó también al D iso-Asc. Esta molécula posee la capacidad de donar protones, no obstante, al ser un isómero permite evaluar si la estructura química, al menos en parte, media la potenciación de las respuestas.

Los compuestos se evaluaron a concentraciones que mantenían el número total de moléculas de ascorbato alcanzada en cada experimento similar a la de los estudios realizados con ácido ascórbico 3 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos para los análogos estudiados se ilustran en la Figura 29. Los trazos representativos corresponden a las respuesta evocadas tras la co-aplicación de cada uno los compuestos indicados junto con GABA 0.3 μ M y la línea de puntos marca la amplitud evocada por la respuesta control (GABA 0.3 μ M). La cuantificación de estos resultados se graficó en Figura 29B y se lista en la Tabla 5.

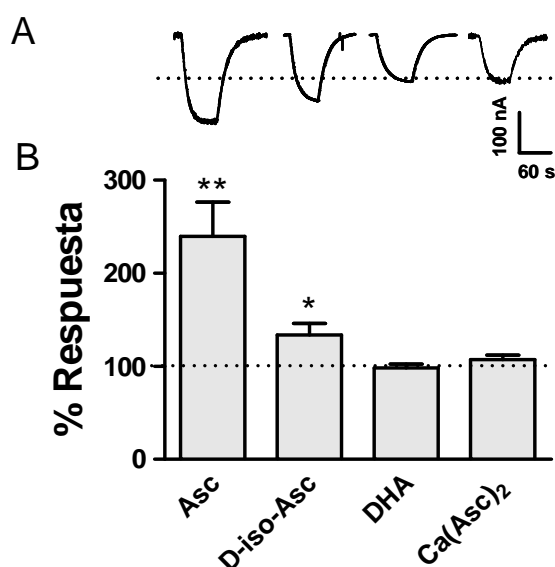


Figura 29. La potenciación por ácido ascórbico de los $GABA_{\rho_1}R$ es estereoselectiva. A. Trazos representativos de las respuestas mediadas por los receptores $GABA_{\rho_1}$ luego de la exposición a los diferentes análogos. La línea punteada representa la respuesta control (GABA 0.3 μ M). Las barras indican la amplitud (eje y) y tiempo (eje x). **B.** El gráfico de barras resume los datos obtenidos en 4 experimentos. Las respuestas se normalizaron al control, (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$).

Las respuestas evocadas por GABA 0.3 μ M en presencia de DHA (3 mM) y Ca(Asc)₂ (1.5 mM) no difirieron significativamente de la respuesta control, (-1.6 ± 4.2 ; (n = 3) y 7.4 ± 4.8 ; (n = 6), respectivamente).

Esto indica que ninguna de éstas moléculas, la sal de ascorbato o la forma oxidada del ácido ascórbico, sería capaz de modular las respuestas de los GABA ρ_1 R.

A diferencia de los otros análogos estudiados, el D iso-Asc (3 mM), potenció significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R ($33.5 \pm 12.5 \%$, (n = 4; *p<0.05)), aunque en menor medida que el ácido ascórbico (3 mM), ($139 \pm 87.5 \%$, (n = 4;**p<0.01)).

En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos del ácido ascórbico sobre las respuesta evocadas en los GABA ρ_1 R podrían estar ejercidos en parte por una modulación de tipo redox. En particular, podría existir un intercambio de protones, dando lugar a la reducción de los receptores y la oxidación consecuente del ácido ascórbico. Asimismo, dado que el D iso-Asc no fue capaz de reproducir completamente la potenciación inducida por el ácido ascórbico, aún teniendo una capacidad similar como donador protones, no puede descartarse que otro tipo de modulación forme parte del mecanismo de acción. La participación de un proceso alostérico que dependería de la estructura del ácido ascórbico podría estar involucrado.

Los efectos del ácido ascórbico y sus análogos sobre la cinética de las respuestas evocadas en los GABA ρ_1 R también se estudiaron. Las constantes de tiempo de activación y deactivación para los GABA ρ_1 R se obtuvieron ajustando a una función exponencial simple las respuestas evocadas por GABA 0.3 μ M (control), en presencia de los diferentes moduladores.

La constante de activación, τ_{act} , control fue 24.8 ± 1.6 s y la correspondiente constante de deactivación, τ_{deact} , fue 23.5 ± 3.8 s (n=6), (Tabla 5a). En la sección anterior se había reportado que en presencia de Asc 3 mM las constantes cinéticas no se modificaban. Asimismo las constantes de activación y deactivación de los GABA ρ_1 R no se modificaron significativamente en presencia de Ca(Asc) $_2$ 1.5 mM ($\tau_{act} = 22.5 \pm 2.4$ s y $\tau_{deact} = 27.4 \pm 4.3$ s;

(n=6)), DHA 3 mM, ($\tau_{act} = 26.1 \pm 2.8$ s y $\tau_{deact} = 32.0 \pm 2.8$ s; (n=6)) o D-iso-Asc, ($\tau_{act} = 28.5 \pm 2.5$ s y $\tau_{deact} = 33.4 \pm 1.9$ s; (n=4), (Tabla 4a)).

Ninguno de las moléculas utilizadas, ni el ácido ascórbico, ni sus análogos modificaron de manera significativa la cinética de las respuestas de los GABA_{p1}R. Esto indicaría, que no existen cambios en la activación y deactivación de los receptores. No obstante no puede descartarse que el efecto de las moléculas sea tan rápido que no sea viable percibirlos con el sistema de perfusión utilizado para realizarlos experimentos.

Tabla 5

a. Efectos del ácido ascórbico y sus análogos sobre las respuestas de GABA_{p1}

Compuesto	% de Potenciación	n	τ_{ACT} (seg)	τ_{DEACT} (seg)	n
Control	-	6	24.8 ± 1.6	23.5 ± 3.8	6
Asc 3 mM	139.5 ± 87.5**	7	22.6 ± 2.6	28.1 ± 3.3	6
D-isoAsc 3 mM	33.5 ± 12.5*	4	28.5 ± 2.5	33.4 ± 1.9	6
DHA 3 mM	-1.6 ± 4.2	3	26.1 ± 2.8	32.0 ± 2.8	6
Asc(Ca) ₂ 1.5 mM	7.4 ± 4.8	6	22.5 ± 2.5	27.4 ± 4.3	4

b. Parámetros de las curvas D-R

	EC ₅₀ (μM)	nHill	n
Control	0.70 ± 0.02	1.91 ± 0.20	6
Asc 3 mM	0.49 ± 0.01*	1.88 ± 0.07	6

III. AMINOÁCIDOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN POR ÁCIDO ASCÓRBICO DE LOS GABA_{p1}R.

INTRODUCCIÓN.

En la sección IV del Capítulo I se determinó la participación de las cisteínas 177 y 191 en la modulación redox del DTT sobre los GABA_{p1}R. En este caso el bloqueo de los grupos sulfhidrilos por un metilo prevenía el efecto reductor del DTT, generando que los efectos del mismo desaparecieran. Dado

que la potenciación de las respuestas fue rápida y reversibles, y que el ácido ascórbico no es transportado hacia el interior de la célula en los ovocitos de *Xenopus*, (Dyer et al., 1994), los resultados en el presente capítulo sugieren que la modulación inducida por el ácido ascórbico también podría ser de tipo redox y podría estar mediada por las cisteínas presentes en el *cys-loop*, (Bensch et al., 1981). Para evaluar esta hipótesis se determinó si la modificación de los grupos sulfhidrilos por NEM interrumpía los efectos del antioxidante sobre las respuestas evocadas por los GABA ρ_1 R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para analizar los efectos del bloqueo de los grupos sulfhidrilos sobre la potenciación inducida por el ácido ascórbico se realizaron curvas D-R antes y después de la incubación con el alquilante. Es importante mencionar que el protocolo usado para realizar estos experimentos fue igual al utilizado para generar las curvas realizadas en la Figura 20, respetando los tiempos de preincubación (2 minutos y 30 segundos) y la concentración del alquilante (NEM 30 μ M).

La Figura 30 muestra las curvas D-R realizadas en ausencia (círculos grises) y presencia (círculos blancos) de ácido ascórbico 3 mM, luego del pre-tratamiento con NEM 30 μ M. Los valores de las corrientes se normalizaron a la corriente máxima control, (GABA 30 μ M).

Las respuestas máximas obtenidas en la curva D-R luego del tratamiento con NEM en presencia del ácido ascórbico no difirieron significativamente de aquellas obtenidas en ausencia del antioxidante, (Porcentaje de las respuestas obtenidas luego del pre-tratamiento con NEM para GABA 10 μ M: sin Asc = 110.1 ± 5.7 % y con Asc = 109.7 ± 2.6 % y para GABA 30 μ M: sin Asc = 113.8 ± 4.9 % y con Asc = 113.8 ± 2.7 %, (n = 4)). Este resultado sugiere que el ácido ascórbico no es capaz potenciar las respuestas

máximas a GABA si los puentes disulfuro presentes en las subunidad ρ_1 se encuentran reducidos.

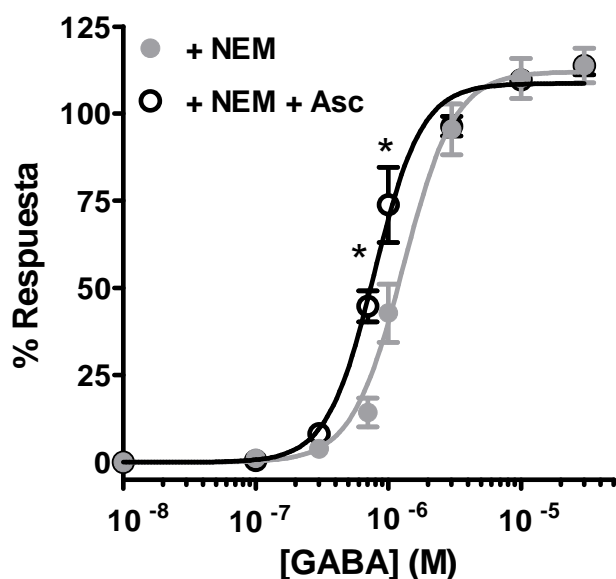


Figura 30. El pre-tratamiento con NEM elimina la potenciación del ácido ascórbico sobre las respuestas máximas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$. Curvas D-R para GABA en ausencia (+NEM, círculos grises) y presencia de ácido ascórbico 3 mM (+NEM+Asc, círculos blancos) antes y después de la preincubación con NEM 30 μM (2 minutos 30 segundos). Las amplitudes de las respuestas se expresan normalizadas a la corriente máxima evocada por aplicación de GABA 30 μM antes del pre-tratamiento.

En contraposición, la co-aplicación de ácido ascórbico 3 mM luego del pre-tratamiento con NEM (30 μM) si produjo un corrimiento significativo de la curva D-R hacia la izquierda. Este aumento en la afinidad aparente se traduce en una disminución en los valores de EC_{50} ; $\text{EC}_{50} \text{ NEM} = 1.29 \pm 0.02 \mu\text{M}$, ($n_{\text{Hill}} = 2.24 \pm 0.10$) y $\text{EC}_{50} \text{ NEM} + \text{Asc} = 0.75 \pm 0.01 \mu\text{M}$, ($n_{\text{Hill}} = 2.44 \pm 0.19$), ($n = 3$; $*p < 0.05$), Tabla 7).

Estos resultados sugieren que la potenciación generada por el ácido ascórbico de las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ a concentraciones altas del agonista (10 y 30 μM) podría ser explicada por una modulación tipo redox en los residuos de cisteína. La apertura y cierre de los puentes disulfuro

podría inducir un cambio conformacional sobre los receptores. El tratamiento con NEM forzaría a los GABA ρ_1 R a encontrarse siempre en el estado reducido (-SCH $_3$), eliminándose así el efecto del antioxidante sobre las respuestas evocadas por aplicaciones de GABA 10 y 30 μ M. Asimismo, la participación de al menos un segundo mecanismo de acción debe proponerse, dado que el aumento de la afinidad aparente de los GABA ρ_1 R inducido por ácido ascórbico no se ve modificado luego de la pre-incubación con el alquilante.

Tabla 7

Parámetros de las curvas D-R			
	EC_{50} (μ M)	<i>nHill</i>	n
Control	0.70 \pm 0.02	1.91 \pm 0.20	6
Asc 3 mM	0.49 \pm 0.01*	1.88 \pm 0.07	6
Control	1.28 \pm 0.05	2.22 \pm 0.18	5
NEM 30 μ M	1.09 \pm 0.09	2.53 \pm 0.29	5
NEM 30 μ M + Asc 3 mM	0.75 \pm 0.01	2.44 \pm 0.19	5

Los resultados obtenidos luego la modificación irreversible de los grupos sulfhidrilos presentes en las subunidades ρ_1 , sugieren la existencia de otro/s aminoácido/s involucrados en la potenciación del ácido ascórbico. A fin de continuar con la caracterización de los mecanismos moleculares subyacentes a la potenciación se realizó un mapeo de los posibles sitios de acción del antioxidante en los GABA ρ_1 R.

Además de las cisteínas, aminoácidos como metionina, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina y lisina han sido reportados como posibles blancos de la modulación redox de proteínas, (Annunziato et al., 2002; Chu et al., 2006).

```

1 MRGCIPELLW GWLATESR WPGREV E SKKGRPQRQ REV EDAH KQ VSPILRRSPD
61 IT S PLT SE QLLRID D S R PG GGPA IPVGV D VQVE S L D S I E V D D T T L Y L R
121 Y W K D E R L S P S T N N L S T D G R L V K K I W V P D M V S R S I D T T T D N V L R V Q P D G V
181 L Y S L R V T V T A C N D S R P L D T Q T C S L E I E S Y A Y T E D D L L Y W K G N D S L K T D E R I S L S
241 Q L I Q E T T T K L A Y S S T G W Y N R L Y I N T L R R I F F F L L Q T Y F P A T L M V M L S W V S F W I D
301 R R A V P A R V F L G I T T V L T M S T I I T G V N A S P R V S Y I K A V D I Y L W V S P V F V F L S V L E Y A A V N
361 Y L T T V Q E R K E Q K L R E K L P C T S G L P P P R T A M L D G N Y S D G E V N D L D N Y M P E N G E K P D R M M V Q
421 L T L A S E R S S P Q R K S Q R S S Y V S M R I D T H A I D K Y S R I I F F P A A Y I L F N L I Y W S I S

```

xxxx = dominios transmembrana

Y = tirosina

C = cisteína (cis loop)

K = Lisina

H = histidina

R = Fenilalanina

M = Metionina

Figura 31. Posibles sitios redox presentes en los GABA_ρ1R involucrados en la modulación del ácido ascórbico. Secuencia aminoacídica de la subunidad rho1 humana. En colores se indican los aminoácidos con capacidad redox y en celeste los dominios transmembrana.

La Figura 31 muestra un esquema de la secuencia aminoacídica de una subunidad de $\rho 1$. Los residuos marcados en colores son todos aquellos aminoácidos extracelulares que podrían estar mediando los efectos inducidos por el ácido ascórbico. Estos incluyen 5 triptofanos, 11 metioninas, 10 histidinas, 14 lisinas, 14 fenilalaninas y 9 tirosinas. En total se hallan presentes 63 posibles aminoácidos que podrían estar involucrados en la modulación de los GABA ρ 1R. Dado el gran número de sitios blanco se realizó una búsqueda extensa en bibliografía por posibles candidatos que ya hubieran sido caracterizados previamente.

Los resultados obtenidos por Wang y colaboradores, mediante mutagénesis dirigida demostraban que la modificación de la histidina 141 alteraba significativamente la sensibilidad al Zn^{2+} de los GABA ρ 1R, (Calvo et al., 1994; Wang et al., 1994; Wang et al., 1995), (Tabla 8). En particular, de las mutaciones realizadas en dicho trabajo, la sustitución no conservadora de la histidina por un ácido aspártico (H141D) generaba receptores funcionales y sensibles al Zn^{2+} , pero los cuales perdían la modulación del pH sobre la inhibición inducida por el catión. Wang y colaboradores, a partir de este resultado, proponen que el ácido aspártico es capaz de coordinar al Zn^{2+} , por lo cual la inhibición característica de los GABA ρ 1R no se ve modificada. Sin

embargo, dado que el ácido aspártico posee un bajo pK_R (3.86 en solución), la variación de los protones en el medio de registro deja de modular éste proceso inhibitorio.

Tabla 8. La Hys 141 se encuentra involucrada en la modulación por Zn^{2+} de los $GABA_{\rho_1}R$

Residuo Modificado	Sustitución	Parámetros evaluados
Hys 141	H141N H141C	Receptores no funcionales
	H141Y	Receptores funcionales insensibles a Zn^{2+} $EC_{50} = 2.1 \pm 0.3 \mu M$ Bloqueo por Picrotoxina
	H141D	Receptor funcional sensible a Zn^{2+} Insensible a modulación de pH de la inhibición por Zn^{2+}

Modificado del paper de (Wang et al., 1995)

Los resultados de la Tabla 8 indican que la naturaleza del aminoácido 141 tiene un papel crítico en la modulación alostérica por Zn^{2+} y sobre el efecto del pH en esta modulación. Consecuentemente, se eligió estudiar el rol de la histidina 141 en la modulación por ácido ascórbico sobre las respuestas mediadas por los $GABA_{\rho_1}R$.

Para ello se generaron, utilizando la técnica de mutagénesis dirigida, receptores mutantes $GABA_{\rho_1}R$ con la sustitución H141D, a los cuales se nombrará como $H^{141D}GABA_{\rho_1}R$. Antes de estudiar la implicancia de la sustitución H141D sobre la modulación redox, se realizó una breve caracterización de los $H^{141D}GABA_{\rho_1}R$, dado .que Wang y colaboradores sólo reportaban que los receptores eran funcionales.

Los $H^{141D}GABA_{\rho_1}R$ se expresaron en ovocitos de *Xenopus laevis* generando receptores funcionales, Figura 32.

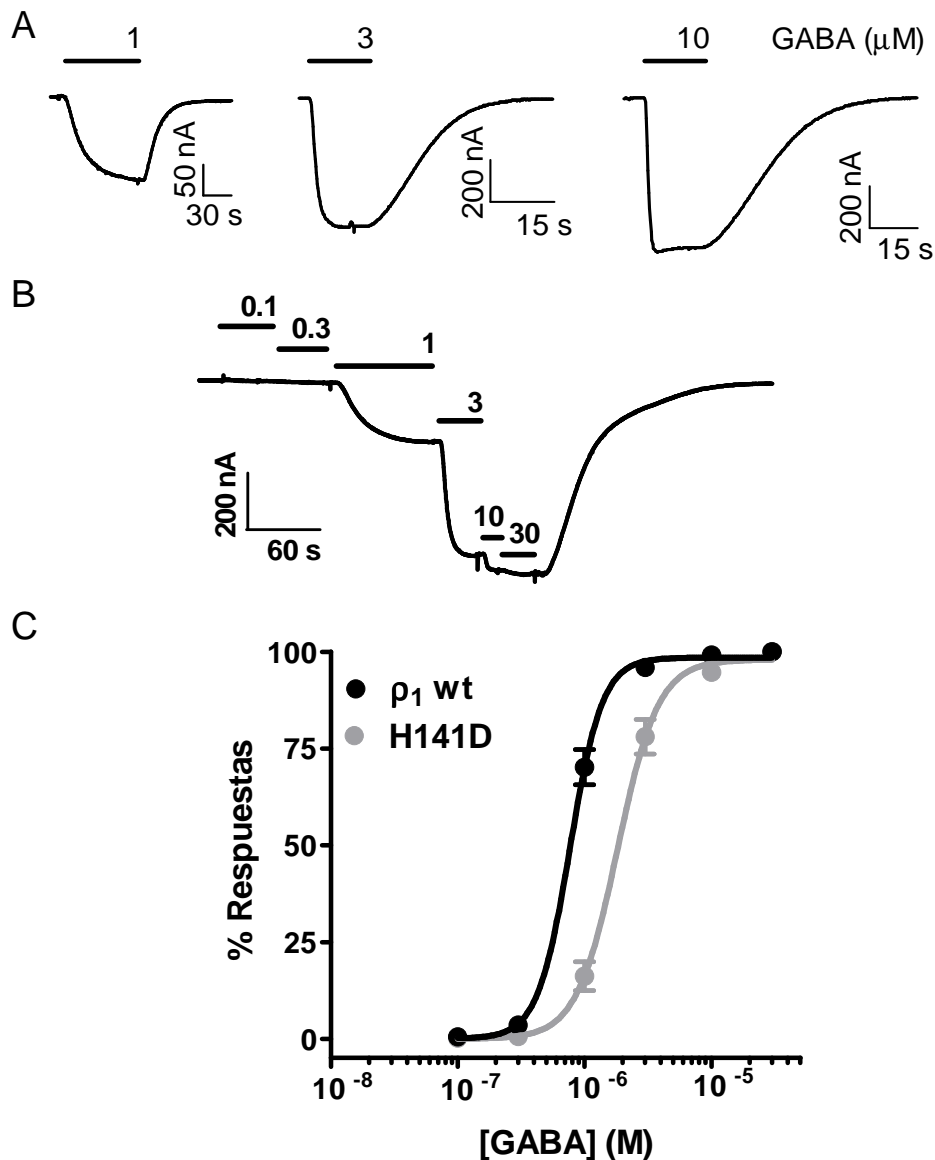


Figura 32. La sustitución H141D en los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ genera leves diferencias en las corrientes evocadas por GABA. **A.** Trazos representativos evocados por GABA 0.3, 1 y 10 μM en ovocitos que expresan $\text{H}^{141\text{D}}$ GABA_{ρ_1} . Los ejes indican la corriente (eje y) y el tiempo (eje x). **B.** Trazos de las corrientes de Cl^- evocadas por concentraciones crecientes de GABA en los receptores mutantes. Las barras indican las aplicaciones del agonista (μM). **C.** Curvas D-R para GABA realizadas para los receptores *wt* (puntos negros) y los $\text{H}^{141\text{D}}$ GABA_{ρ_1} (puntos grises). Las amplitudes de las respuestas se expresan normalizadas a la corriente máxima evocada por aplicación de GABA 30 μM para cada uno de los receptores.

La Figura 32A ilustra trazos representativos para los receptores mutantes evocados a distintas concentraciones de GABA, (1, 3 y 10 μM). Como

puede observarse las corrientes presentaron características similares a las de los receptores *wt*, con una rápida activación y una correspondiente deactivación lenta luego de la eliminación del agonista del baño de perfusión. Las respuestas evocadas en los ^{H141D}GABA_{ρ1}R no presentaron desensibilización y la mutación no provocó tampoco la aparición de aperturas espontáneas.

Al igual que con los GABA_{ρ1}R, la construcción de las curvas D-R en los receptores mutantes se realizó exponiendo a los mismos a concentraciones crecientes de GABA. El trazo de la Figura 32B representa una curva D-R realizada en los ^{H141D}GABA_{ρ1}R. Cabe destacar nuevamente que no se observaron cambios en la cinética de los canales mutantes luego de la exposición prolongada al agonista. La Figura 32C muestra la cuantificación de las curvas D-R realizadas para los GABA_{ρ1} y para los mutantes que poseen la sustitución H141D en todas las subunidades $\rho 1$ que lo componen. Se obtuvieron los siguientes valores de EC₅₀; EC₅₀ *wt* (círculos negros) = $0.76 \pm 0.10 \mu\text{M}$, (*nHill* control = 2.69 ± 0.21 , (*n* = 4)) y EC₅₀ H141D (círculos grises) = $1.76 \pm 0.21 \mu\text{M}$, (*nHill* H141D = 3.41 ± 0.61 , (*n* = 10), Tabla 9). Aunque la sustitución de la histidina 141 generó un cambio significativo en el EC₅₀ de las curvas D-R, las concentraciones del agonista utilizadas para construir las curvas D-R son del orden de las usadas para los GABA_{ρ1}R *wt*.

Con el fin de estudiar si la mutación H141D modificaba la sensibilidad de los GABA_{ρ1}R al ácido ascórbico se analizó primero el efecto del antioxidante para tres concentraciones de GABA (0.3, 1 y 10 μM) sobre los ^{H141D}GABA_{ρ1}R. Estos puntos experimentales se eligieron para evaluar la potenciación en las tres zonas críticas de las curvas D-R, a bajas concentraciones, sobre la pendiente de la curva y a concentraciones casi saturantes. Como puede observarse en la Figura 33, al comparar a los GABA_{ρ1}R *wt* y mutantes se encuentran diferencias significativas en la potenciación inducida por ácido ascórbico 3 mM. Los ^{H141D}GABA_{ρ1}R se comportan de manera similar a los receptores *wt* cuando el agonista se aplica en bajas (0.3 μM) y altas concentraciones (10 μM). Es decir, en esos casos no existen variaciones en el

porcentaje de potenciación generado por el antioxidante. Sin embargo, cuando se utiliza GABA 1 μ M para evocar las respuestas, mientras que los GABA ρ_1 R *wt* presentan un marcado incremento de sus respuestas cuando se co-aplica ácido ascórbico 3 mM, los receptores mutantes son insensibles a ésta potenciación.

Previamente en ésta sección se había evaluado la participación de las cisteínas 177 y 191 en la modulación por ácido ascórbico (Figura 30) utilizando NEM. Con el fin de determinar si los efectos del antioxidante sobre los GABA ρ_1 R podían ser anulados combinando la mutación H141D y la modificación irreversible de los grupos sulfhidrilos, se realizaron experimentos en ^{H141D}GABA ρ_1 R previamente incubados con NEM. La Figura 33 muestra los resultados obtenidos para las distintas concentraciones del agonista. Cuando se utilizó GABA 1 μ M para evocar las respuestas de los receptores, donde inicialmente el cambio H141D había bloqueado los efectos del antioxidante la preincubación con NEM 30 μ M no modificó este resultado. Sin embargo, cuando se evaluaron los efectos del pre-tratamiento a GABA 10 μ M, (concentración en la cual los receptores mutantes sin NEM seguían siendo sensibles al ácido ascórbico), se encontró que la potenciación era completamente bloqueada. Es importante mencionar que a concentraciones bajas del agonista ni la sustitución H141D ni el bloqueo de los grupos sulfhidrilos modificó la sensibilidad al ácido ascórbico.

Para profundizar en el estudio de la participación de la histidina 141 en la modulación del ácido ascórbico sobre los GABA ρ_1 R, se realizaron curvas D-R para los ^{H141D}GABA ρ_1 R, en ausencia y presencia del antioxidante. La Figura 34 muestra el efecto del ácido ascórbico 3 mM sobre las respuestas de los ^{H141D}GABA ρ_1 R. La mutación de la histidina 141 por un ácido aspártico elimina completamente el corrimiento hacia la izquierda de las curvas D-R que presentaban los GABA ρ_1 R *wt* en presencia del antioxidante, (ver Figura 25, Tabla 9). Por lo tanto, no se observan diferencias significativas entre los EC₅₀ antes y después de co-aplicar al ácido ascórbico. Es decir, que no existen cambios en la afinidad aparente de los receptores en presencia del

antioxidante. El valor obtenido de EC_{50} para los H^{141D} GABA ρ_1 R en presencia de ácido ascórbico 3 mM fue $2.07 \pm 0.32 \mu\text{M}$ con un $nHill$ Asc = 2.94 ± 0.38 , ($n = 5 - 10$; $p > 0.05$), (Tabla 9).

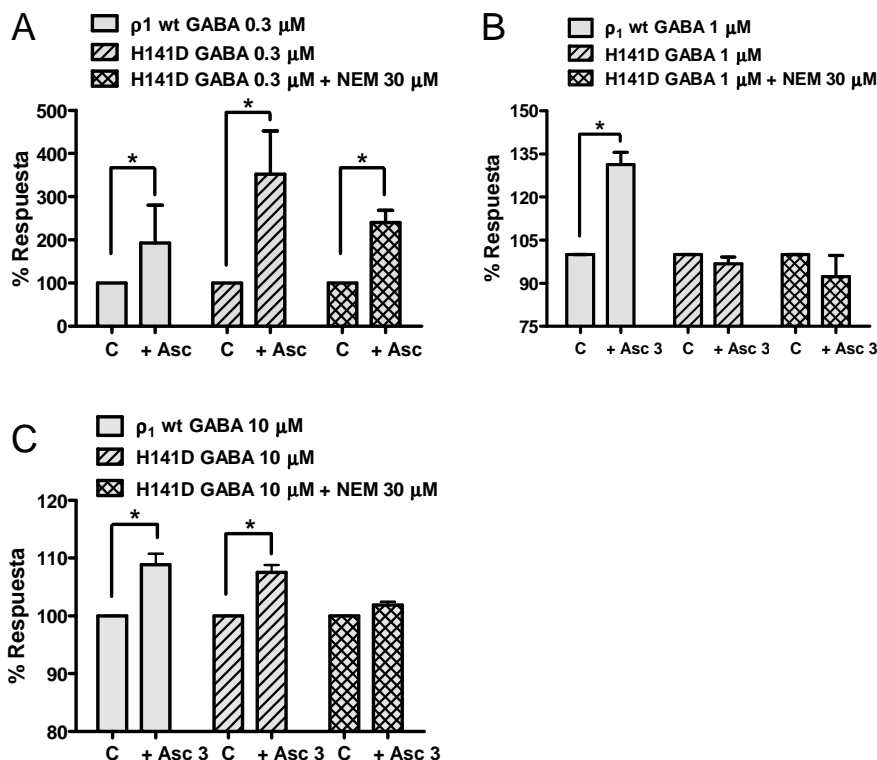


Figura 33: La sustitución H141 cambia significativamente la modulación por ácido ascórbico en los GABA ρ_1 R. A, B y C. Los gráficos de barras resumen los efectos sobre las respuestas evocadas por GABA tras la exposición al ácido ascórbico 3 mM para los receptores *wt* y H^{141D} GABA ρ_1 R antes y después del pretratamiento con NEM 30 μM . Las respuestas se evocaron por tres concentraciones de GABA, 0.3, 1 y 10 μM , en cada caso los resultados se normalizaron a la corriente indicada como control (C). (* $p < 0.05$, (ANOVA 1way, Dunnett's Multiple Test), ($n=3-9$))

No obstante, consecuentemente con los resultado obtenidos en la Figura 33, a concentraciones bajas (0.1 y 0.3 μM) y altas (10 y 30 μM) de GABA la potenciación por el ácido ascórbico no se modificó por la mutación H141D. El recuadro de la Figura 34 ilustra los efectos del antioxidante a bajas concentraciones del agonista.

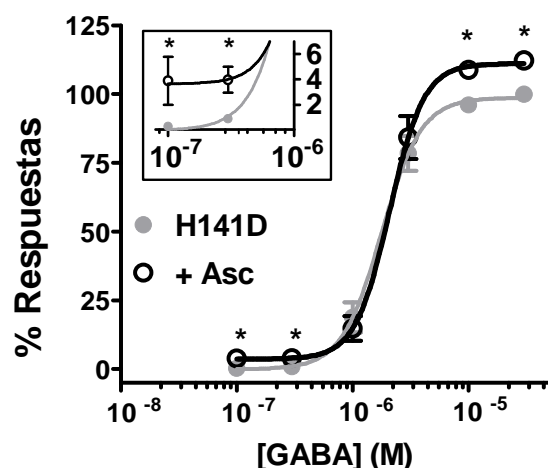


Figura 34. La mutación H141D en la subunidad $\rho 1$ previene parcialmente los efectos potenciadores del ácido ascórbico sobre los receptores. Curva D-R para GABA en ausencia (control, puntos grises) y presencia de ácido ascórbico 3 mM (puntos blancos), ($n = 5 - 10$; $*p > 0.05$). Las corrientes se normalizaron a la corriente evocada por GABA 30 μM luego del pre-tratamiento con NEM. El recuadro en el gráfico muestra una ampliación de los resultados obtenidos para concentraciones bajas del agonista.

Tabla 9. Parámetros de las curvas D-R

	EC_{50} (μM)	n Hill	n
Control	0.76 ± 0.10	2.69 ± 0.21	4
H141D	1.76 ± 0.21	3.41 ± 0.61	10
H141D + Asc 3 mM	2.07 ± 0.32	2.94 ± 0.38	5
H141D + NEM 30 μM	1.40 ± 0.16	3.24 ± 0.16	4
H141D + NEM 30 μM + Asc 3 mM	1.46 ± 0.24	3.48 ± 0.28	4

El porcentaje de las respuestas obtenidas para GABA 10 μM en los receptores que contienen la sustitución H141D en presencia de ácido ascórbico 3 mM es $108.9 \pm 1.7 \%$ y en las mismas condiciones para las respuestas evocadas por GABA 30 μM es $112.3 \pm 2.3 \%$, ($n = 5$). Estos valores de potenciación no son diferentes a los obtenidos en los $\text{GABA}_{\rho 1}\text{R}$ *wt* a las mismas concentraciones de GABA. Consecuentemente con los resultados obtenidos en las Figuras 30 y 33.

En conjunto, los datos permiten proponer que el aumento en la probabilidad de apertura de los receptores estaría mediado por la modificación de las cisteínas 177 y 191, posiblemente por una reducción inducida por el ácido ascórbico en los puentes disulfuro que forman en las subunidad $\rho 1$. Con el fin de examinar ésta hipótesis, se realizaron curvas D-R en presencia de ácido ascórbico, 3 mM antes y después de la preincubación con NEM 30 μM para los $^{\text{H141D}}$ GABA $\rho 1$ R.

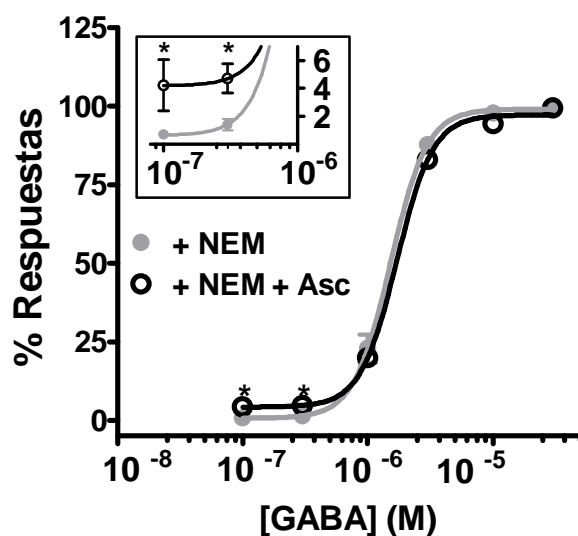


Figura 35. El pre-tratamiento con NEM bloqueó completamente la potenciación inducida por ácido ascórbico sobre las respuesta máximas mediadas por los $^{\text{H141D}}$ GABA $\rho 1$ R. Curvas D-R para GABA luego de la incubación con NEM (2' 30'') en ausencia (+ NEM) o presencia de ácido ascórbico 3 mM (+ NEM + Asc). Las corrientes se normalizaron a la corriente evocada por GABA 30 μM luego del pre-tratamiento con NEM. El recuadro en el gráfico muestra una ampliación de los resultados obtenidos para concentraciones bajas del agonista donde el ácido ascórbico sigue modulando las respuestas.

La Figura 35 ilustra el efecto del alquilante sobre los receptores mutantes. El pre-tratamiento con NEM de los $^{\text{H141D}}$ GABA $\rho 1$ R bloqueó la potenciación inducida por el ácido ascórbico en las respuestas máximas de los GABA $\rho 1$ R. Asimismo, como se observó en la Figura 34, las curvas D-R no presentaron ningún cambio en la afinidad aparente por el receptor. El valor obtenido de EC_{50} para los $^{\text{H141D}}$ GABA $\rho 1$ R en presencia de ácido ascórbico 3

mM, antes y después del pre-tratamiento con NEM fue $EC_{50} \text{ H141D + NEM } 30 \mu\text{M} = 1.40 \pm 0.16 \mu\text{M}$ con un $nHill$ 3.24 ± 0.16 y $EC_{50} \text{ H141D + NEM } 30 \mu\text{M} + \text{Asc } 3 \text{ mM} = 1.46 \pm 0.24$ con un $nHill$ 3.48 ± 0.28 ; ($n = 4$), (Tabla 9). Además, el efecto del antioxidante en los $GABA_{\rho_1}R$ a las concentraciones bajas de GABA no se vio modificado ni por la mutación en la histidina 141, ni por la alquilación de los grupos sulfhidrilos que forman parte de las cisteínas 177 y 191.

Los resultados obtenidos permiten proponer parte de los mecanismos involucrados en la potenciación por ácido ascórbico de las respuestas mediadas por los $GABA_{\rho_1}R$. En conjunto los datos muestran que la modificación de las cisteínas que forman el *cys-loop* y la sustitución de histidina 141 dan como producto $GABA_{\rho_1}R$ casi completamente insensibles al ácido ascórbico y a otros compuestos redox. Sugiriendo que la potenciación de los receptores estaría mediada al menos por dos mecanismos. En primer lugar, la modificación redox generada por el ácido ascórbico sobre las cisteínas induciría un cambio conformacional que daría lugar a un aumento de la probabilidad de apertura de los $GABA_{\rho_1}R$. Asimismo un segundo mecanismo alostérico mediado, directa o indirectamente, por la histidina 141 desencadenaría un aumento de la afinidad aparente de los receptores por el GABA.

CAPÍTULO 3

I. EL ÁCIDO ASCÓRBICO PREVIENE EL EFECTO MODULATORIO DEL FLAVONOIDE QUERCETINA SOBRE LOS GABA_ρ1R.

INTRODUCCIÓN.

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular que, como se mencionó en la introducción, exhiben un amplio rango de actividades biológicas, que incluyen acciones modulatorias sobre el metabolismo oxidativo neuronal (Sutherland et al., 2005).

En la literatura se encuentran numerosos trabajos que demuestran la interacción de varios flavonoides con receptores sinápticos, canales iónicos y otras proteínas de membrana. Particularmente, las repuestas mediadas por los GABA_ρ1R pueden ser modulada por diversos flavonoides, como, por ejemplo, quercetina (Que), (Goutman and Calvo, 2004), (Figura 36A).

Por lo tanto, dado que la mayoría de los flavonoides exhiben propiedades redox (Robaszkiewicz et al., 2007), y que, como se mostró en el capítulo 1, los GABA_ρ1R son sensibles a la acción de agentes oxidantes y reductores (Calero and Calvo, 2008), nos preguntamos si algunas de las acciones reportadas para los flavonoides sobre estos receptores podría estar mediada por mecanismos de óxido-reducción.

Con el fin de testear la hipótesis, analizamos el efecto modulatorio del flavonoide quercetina en presencia y ausencia de agentes redox, sobre los GABA_ρ1R expresados en ovocitos de *X. laevis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el capítulo 2 se determinó que el ácido ascórbico era capaz de potenciar las respuestas mediadas por los GABA_ρ1R, Figura 36B. Entonces, dado que el ácido ascórbico y la quercetina no interactúan en solución (Ajay et al., 2006), se estudió el efecto de la co-aplicación de ambos sobre las

respuestas mediadas por los GABA_A1R. Es importante mencionar que la concentración de GABA (3 μ M) se eligió para obtener una inhibición por quercetina (~ 40%) significativamente mayor a la potenciación inducida por ácido ascórbico (~ 10%). Con esto se buscó generar efectos contrapuestos sobre la respuesta evocada por GABA en los GABA_A1R, los cuales al ser inducidos al mismo tiempo el resultado final no pudiera ser explicado simplemente porque son dos fenómenos que se cancelan mutuamente. La Figura 36A y 36B ilustran el efecto descrito para cada uno de los compuestos cuando se aplican por separado sobre respuestas evocadas por GABA 3 μ M. Al igual que los datos encontrados por Goutman y colaboradores, la aplicación de quercetina 8 μ M inhibió significativamente las respuestas del agonista. Contrariamente, la aplicación de ácido ascórbico generó una potenciación leve pero significativa.

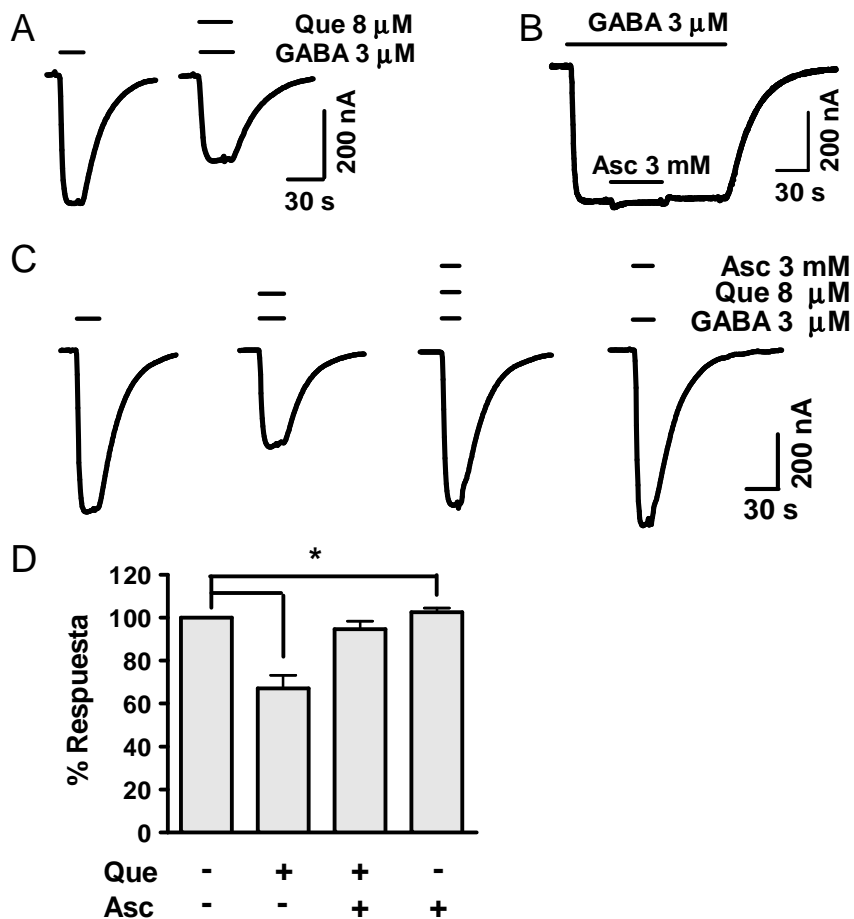


Figura 36: El ácido ascórbico previene la inhibición inducida por quercetina en los GABA_A1R expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. Trazos representativos de las corrientes (Cl⁻) evocadas por GABA 3 μ M (la aplicación se

encuentra indicada por barras) **(A)** en ausencia (control) y presencia de quercetina (8 μM) o **(B)** tras la co-aplicación de GABA 3 μM y ácido ascórbico 3 mM. El ácido ascórbico se aplicó en el plateau de la respuesta de GABA. **(C)** en ausencia (control) y en presencia de quercetina 8 μM y/o ácido ascórbico 3 mM. Las aplicaciones se separaron por lavados de 2-3 minutos. **(D)** El gráfico de barras resume los resultados obtenidos en los experimentos ilustrados en (C) ($n=6$; $*p < 0.05$), los datos se analizaron por One-way anova y se realizó un post test de Dunnett's Multiple Comparison. Las respuestas se normalizaron a la corriente control.

Los resultados ilustrados en la Figura 36C muestran que la inhibición inducida por quercetina sobre las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ puede ser prevenida por ácido ascórbico. Los porcentajes de las respuestas que se muestran en la Figura 36D se listan a continuación, Que (8 μM) = $67.2 \pm 6.0^* \%$, Que (8 μM) + Asc (3 mM) = $94.6 \pm 3.7 \%$, Asc (3 mM) = $108.9 \pm 1.9^* \%$, (control GABA 3 μM , ($n = 6$, $*p < 0.05$)).

El ácido ascórbico y la quercetina no interactúan entre ellos en solución (Ajay et al., 2006). Por lo tanto, la pérdida de la inhibición de la quercetina sobre las respuestas mediadas por los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$, cuando se co-aplican ambos compuestos, no se debería a una interacción entre el ácido ascórbico y dicho agente. Por consiguiente, el efecto observado sobre los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ podría deberse a una consecuencia directa de la modulación ejercida por el ácido ascórbico sobre los receptores.

II. EFECTOS DE DISTINTOS AGENTES REDUCTORES EN LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR QUERCETINA SOBRE LOS $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$.

Con el objetivo de determinar si la reducción de los $\text{GABA}_{\rho_1}\text{R}$ induce una modificación suficiente para eliminar la capacidad de la quercetina de inhibir las respuestas evocadas por GABA, se realizaron experimentos

similares a los ilustrados en la Figura 36C, pero con los agentes reductores glutatión (GSH) y dithiothreitol (DTT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el GSH (endógeno) y el DTT (exógeno) se encuentran ilustrados en las Figuras 37 y 38. La inhibición inducida por quercetina sobre las respuestas mediadas por los GABA_A1R tanto en presencia de GSH o DTT no se modificó significativamente de la generada en ausencia de los moduladores redox.

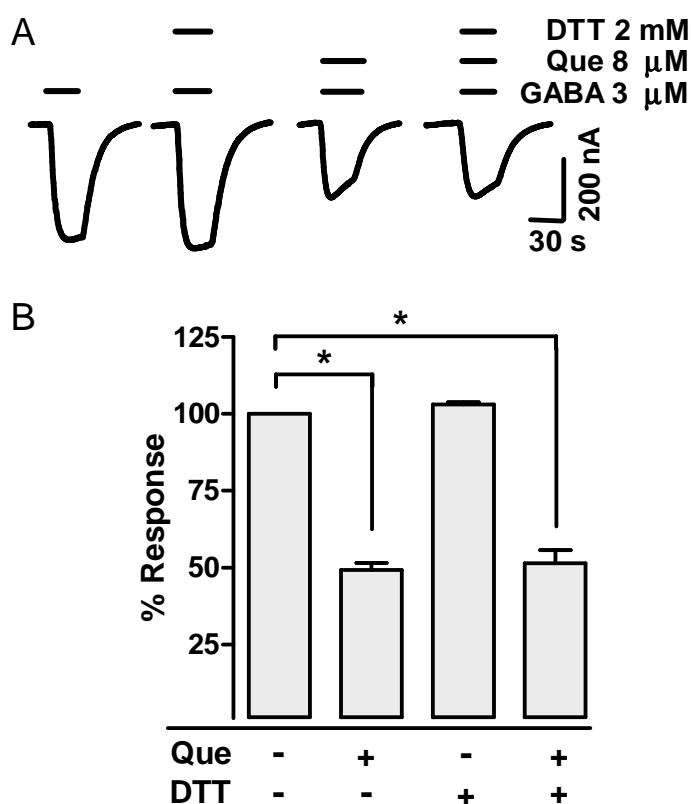


Figura 37: El DTT no previene la inhibición de la quercetina sobre las respuestas mediadas por los GABA_A1R. (A) Corrientes Cl⁻ evocadas por GABA 3 μM (control) y con quercetina 8 μM en presencia o ausencia de DTT 2 mM. Las aplicaciones se indican por barras y se encontraron espaciadas por lavados de 2-3 minutos con ringer rana normal. **(B)** El gráfico de barras resume los resultados obtenidos en cuatro réplicas del experimento ilustrado en (A), (p < 0.05, One-way Anova, Dunnett's Multiple Comparison Test). El porcentaje de las respuestas se expresa como fracción de las corrientes control

Los porcentajes de las respuestas graficados en la Figura 37B se listan a continuación; Que (8 μ M) = $49.3 \pm 2.2^*$ %, Que (8 μ M) + DTT (2 mM) = $51.4 \pm 4.4^*$ %, DTT (2 mM) = 103.1 ± 3.8 %, (n = 4, *p < 0.05).

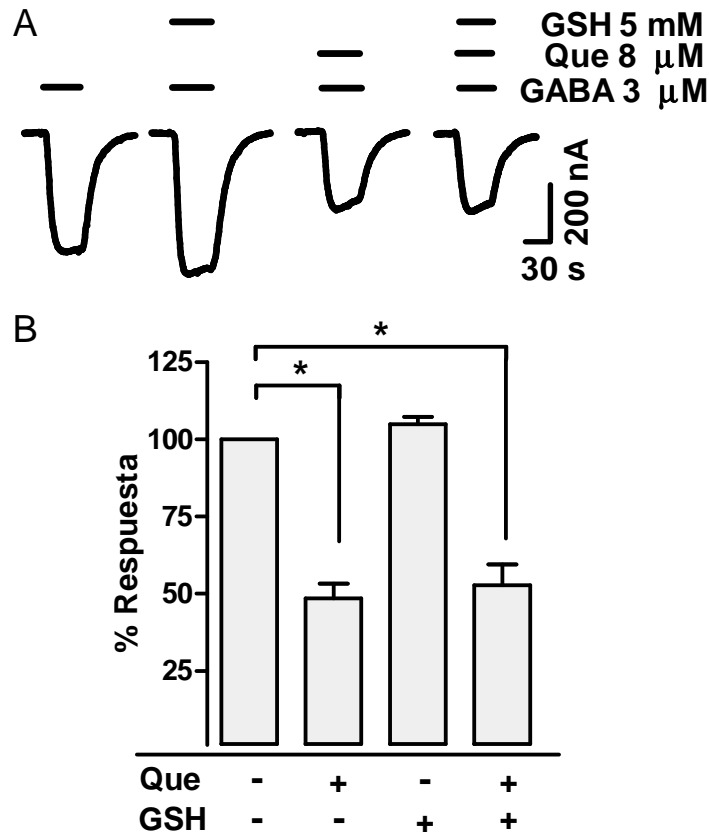


Figura 38: El agente endógeno reductor GSH no previene la inhibición inducida por quercetina en las respuestas mediadas por los GABA ρ 1R. (A) Los trazos representativos ilustran los efectos de la quercetina (8 μ M) en presencia y ausencia de GSH (5 mM) sobre las respuestas evocadas en los GABA ρ 1R. Las aplicaciones se indican por barras y estuvieron espaciadas por lavados de 2-3 minutos. **(B)** El gráfico de barras resume cuatro experimentos similares a los ilustrados en (A), (p < 0.05, One-way Anova, Dunnett's Multiple Comparison Test). El porcentaje de las respuestas se expresa como fracción de las corrientes control.

La Figura 38B muestra los porcentajes de las respuestas en los experimentos realizados con GSH. Los valores encontrados se listan a continuación; Que (8 μ M) = $48.4 \pm 4.8^*$ %, Que (8 μ M) + GSH (5 mM) = $52.7 \pm 6.8^*$ %, GSH (5 mM) = 104.9 ± 2.3 %, (n=4, *p < 0.05).

Ninguno de los compuestos reductores estudiados previno la inhibición inducida por quercetina sobre las respuestas mediadas por los GABA_ρ1R. Este resultado sugiere que la reducción inducida por el ácido ascórbico sobre los receptores no tendría la misma naturaleza que la del DTT o del GSH.

III. EFECTOS DE LA INCORPORACIÓN DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR QUERCETINA EN LAS RESPUESTAS DE GABA_ρ1R.

La capacidad reductora del DTT y del GSH no es suficiente para reproducir los efectos protectores generados por el ácido ascórbico sobre la inhibición inducida por quercetina en las respuestas mediadas por los GABA_ρ1R. Los resultados obtenidos en las dos secciones anteriores indican, entonces, que dicha prevención estaría mediada por una modificación específica que sólo es capaz de producir el ácido ascórbico.

Por otro lado, los receptores neuronales de ácido ascórbico, los SVCT2, son sensibles al bloqueo por quercetina, (Song et al., 2002; Biondi et al., 2007; Caprile et al., 2009). En particular, Song y colaboradores propusieron que el efecto del bloqueo inducido por la quercetina se debía a las similitudes estructurales con el ácido ascórbico. En su trabajo remarcan la presencia de la doble ligadura entre los carbonos C2-C3 y de la cetona del C4, como regiones estructurales de ambas moléculas que actuarían directamente sobre los co-transportadores.

Entonces, con el fin de estudiar la naturaleza de la prevención de la inhibición de quercetina ejercida por ácido ascórbico se evaluó el efecto de la quercetina (8 μM) en las respuestas mediadas por los GABA_ρ1R (3 μM) en presencia de doce concentraciones diferentes de ácido ascórbico; 0.01, 0.02, 0.025, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 1.0, 2.0, 2.3, 2.7 y 3.0 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La Figura 39 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos en presencia de cada una de las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas; 106.0 ± 3.3 , 104.0 ± 9.4 , 81.9 ± 4.2 , 72.4 ± 4.9 , 73.5 ± 2.4 , 56.7 ± 11.4 , 49.5 ± 7.7 , 57.5 ± 9.4 , 51.6 ± 12.6 , 37.5 ± 10.3 , 7.4 ± 1.8 y 3.1 ± 3.0 %, respectivamente (círculos negros).

En el mismo gráfico se encuentran representados los porcentajes de potenciación sobre las respuestas a GABA $3 \mu\text{M}$ inducidos por cada una de las concentraciones crecientes de ácido ascórbico, (círculos blancos).

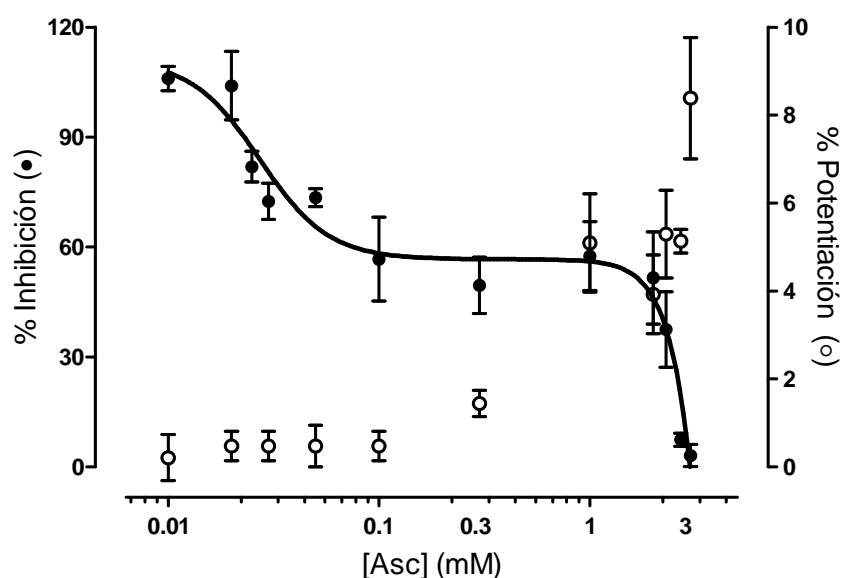


Figura 39: El ácido ascórbico inhibe gradualmente la inhibición inducida por quercetina sobre las respuestas mediadas por los receptores $\text{GABA}_{\rho 1}\text{R}$. El gráfico muestra la inhibición por quercetina $8 \mu\text{M}$ de las respuestas evocadas por GABA $3 \mu\text{M}$ en presencia de las distintas concentraciones de ácido ascórbico, ($\{[\% \text{Inhibición}(\text{Que} + \text{Asc}) / \text{inhibición}(\text{Que})] \times 100\}$, (círculos negros)). Además se representa el porcentaje de potenciación inducido por las concentraciones crecientes de ácido ascórbico de las respuestas evocadas por GABA $3 \mu\text{M}$, (círculos blancos). Nótese el cambio de escala entre el eje y izquierdo y derecho. La abscisa representa la concentración de ácido ascórbico en escala logarítmica.

Los datos presentados indican que el ácido ascórbico previene gradualmente los efectos inhibitorios de la quercetina sobre las respuestas

mediadas por los GABA ρ 1R. Asimismo, a valores menores a 1 mM de ácido ascórbico, donde el antioxidante no es capaz de potenciar las respuestas evocadas por los receptores, es suficiente para prevenir hasta un 50% de la inhibición inducida por la quercetina. Los datos obtenidos en ésta primera zona de las curvas graficadas en la Figura 39 respaldaría la hipótesis de que la eliminación de la inhibición no es producto de una compensación con la potenciación generada por el ácido ascórbico. Sino que como consecuencia de la acción del antioxidante sobre los GABA ρ 1R, en forma de un cambio conformacional y/o de una modificación redox, existiría una alteración en los efectos inhibitorios de la quercetina.

Este resultado sugiere que la similitud estructural entre ambas moléculas podría dar como producto dominios de actividad similares sobre los GABA ρ 1R para la quercetina y el ácido ascórbico. Por lo tanto, el aumento gradual de la concentración presente del antioxidante modificaría a los receptores, cambiando finalmente el sitio de acción del flavonoide. Asimismo, no puede descartarse que los aminoácidos involucrados nos sean compartidos entre ambos compuestos, sino que se encuentren vinculados, por lo cual la modificación de unos afecte directamente a los otros.

IV. EL ÁCIDO ASCÓRBICO NO PREVIENE COMPLETAMENTE LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR QUERCETINA EN LOS ^{H141D}GABA ρ 1R.

La quercetina posee propiedades tanto antioxidantes como oxidantes, dependiendo de las condiciones del medio extracelular donde se la examine y del entorno proteico frente al cual se encuentre. Particularmente, los efectos reportados por Goutman y colaboradores para este flavonoide son similares a los encontrados en el capítulo 1 para los agentes oxidantes. Es decir, posee una naturaleza inhibitoria frente a las respuestas mediadas por los GABA ρ 1R. Además, las acciones de la quercetina se previenen por el ácido ascórbico. Por lo tanto, en base a estos resultados existirían residuos, con o sin capacidad redox, que mediarían una modulación de tipo alostérica de las respuestas de

los GABA_{p1R}. Dichos aminoácidos, estarían involucrados, directa o indirectamente, tanto en la inhibición generada por quercetina, como en la potenciación de las respuestas produjeron del ácido ascórbico.

Para profundizar con el estudio de la naturaleza de las acciones de la quercetina y su relación con el ácido ascórbico, en función de los resultados obtenidos en la sección III del capítulo 2 con los GABA_{p1R} mutantes para la H141, se estudió si este aminoácido se encontraba involucrado en la prevención de la inhibición por quercetina mediada por el ácido ascórbico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En primer lugar se estudió si los ^{H141D}GABA_{p1R} presentaban sensibilidad a la quercetina, ya que no había sido evaluada la acción del flavonoide sobre los mismos previamente.

La curva de inhibición de la Figura 40A muestra el efecto de concentraciones crecientes de quercetina sobre las respuestas evocadas por los GABA_{p1R} *wt* y mutantes. Como puede observarse claramente, en concentraciones equivalentes de EC₅₀, la modulación por el flavonoide es similar para ambos receptores. La Figura 40B ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por los ^{H141D}GABA_{p1R} inducida por la quercetina a concentraciones crecientes del agonista. La cuantificación de las respuestas permitió la construcción de las curvas D-R graficadas en la Figura 40C. Los valores de EC₅₀ obtenidos se listan a continuación, EC₅₀ H141D = 1.57 ± 0.17 μM, (*nHill* H141D = 3.11 ± 0.31) y EC₅₀ H141D + Que = 3.60 ± 0.18 μM, (*nHill* H141D + Que = 2.97 ± 0.65), (n = 6; p<0.05; Tabla 9)

Al igual que en los receptores *wt*, en los mutantes ^{H141D}GABA_{p1R}, la quercetina generó una marcada disminución de la afinidad aparente de los receptores y de las corrientes máximas. (El porcentaje de la respuesta evocada

por GABA 10 μM en los $^{\text{H141D}}$ GABA ρ_1 R es $98.2 \pm 0.6 \%$ y en presencia de quercetina 8 μM este valor se reduce a $80.9 \pm 4.6 \%$, (n = 6)).

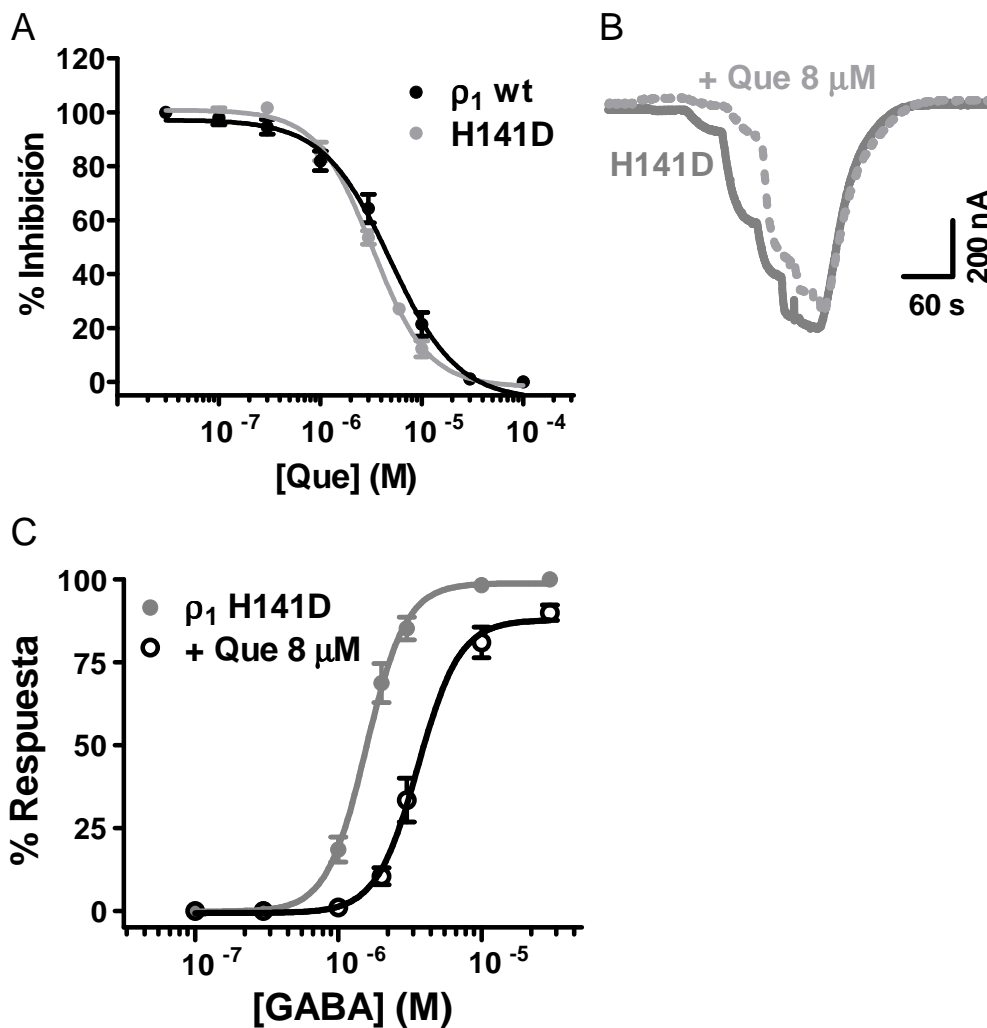


Figura 40. La quercetina inhibió significativamente las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R mutantes. A. Curva de inhibición para los GABA ρ_1 R y los $^{\text{H141D}}$ GABA ρ_1 R para quercetina. Los experimentos mostrados se realizaron con concentraciones de agonista equivalentes en ambos tipos de receptores, correspondientes al EC_{50} (GABA 1 μM y GABA 2 μM , respectivamente). **B.** Trazos representativos evocados por concentraciones crecientes de GABA en los receptores mutantes, en ausencia (puntos grises) y presencia de quercetina. **C.** Curvas D-R para GABA realizadas para los $^{\text{H141D}}$ GABA ρ_1 en ausencia (círculos grises) y presencia de quercetina 8 μM (círculos vacíos). Las amplitudes de las respuestas se expresan normalizadas a la corriente máxima evocada por aplicación de GABA 30 μM para cada uno de los receptores.

Las similitudes encontradas entre los GABA_{ρ1}R *wt* y los ^{H141D}GABA_{ρ1}R permiten sugerir que la H141 no se encontraría involucrada en la inhibición mediada por quercetina sobre las respuestas de ambos receptores.

Entonces, dado que la quercetina ejerce es capaz de inhibir las respuestas mediadas por los ^{H141D}GABA_{ρ1}R, se evaluó el efecto de la sustitución de la H141 en la prevención por ácido ascórbico.

Los receptores mutantes presentaron un perfil de prevención significativamente diferente al los receptores *wt*. Los datos del gráfico de barras de la Figura 41 son los siguientes; Que (8 μM) = 52.6 ± 6.3* %, Que (8 μM) + Asc (3 mM) = 75.9 ± 2.3* %, Asc (3 mM) = 103.2 ± 0.7* %, (Normalizados a la respuesta control, GABA 3 μM; n = 5, *p < 0.05). Los resultados ilustrados en la Figura 41 muestran claramente que en estas condiciones el ácido ascórbico solo previene alrededor de un 50% la inhibición ejercida por quercetina sobre las repuestas a aplicaciones de GABA 3 μM.

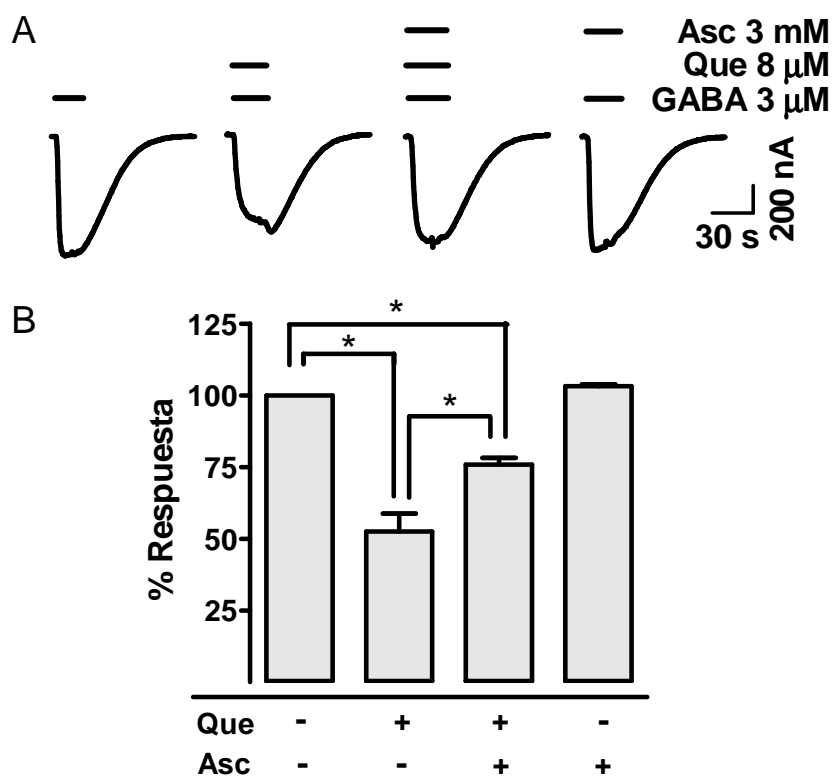


Figura 41. La inhibición generada por quercetina sobre las respuestas evocadas en los ^{H141D}GABA_{ρ1}R es parcialmente revertida por ácido

ascórbico. (A) Trazos representativos de las corrientes (Cl^-) evocadas por GABA 3 μ M (la aplicación se encuentra indicada por barras) en ausencia (control) y presencia de quercetina (8 μ M) y/o tras la co-aplicación ácido ascórbico 3 mM. Las aplicaciones se separaron por lavados de 2-3 minutos. **(B)** El gráfico de barras resume los resultados obtenidos en los experimentos ilustrados en (A) ($n = 5$; $*p < 0.05$). Los datos se analizaron por One-way anova y se realizó un post test de Dunnett's Multiple Comparison. Las respuestas se normalizaron a la corriente control.

La curva D-R de los H141D GABA ρ_1 R, en relación a la observada para los receptores *wt*, se encuentra desplazada hacia derecha (Figura 32). Por lo tanto, las respuestas evocadas por GABA 3 μ M en los receptores mutantes es de menor amplitud a la obtenida en los *wt*, (% respuesta para: H141D GABA ρ_1 R = 78.1 ± 4.4 % y GABA ρ_1 R = 96.0 ± 0.7 %, ($n = 4$)). En consecuencia, las condiciones en las que se realizaron los experimentos que se muestran en la Figura 36 y 41 son levemente diferentes.

Por consiguiente, la prevención parcial de los efectos de la quercetina generada por el ácido ascórbico podría ser producto de un cambio en las condiciones experimentales. Para evaluar ésta posibilidad se utilizó una concentración mayor del agonista, (GABA 10 μ M), para evocar respuestas en los H141D GABA ρ_1 R.

Como se puede observar en la Figura 42 el ácido ascórbico 3 mM en las nuevas condiciones experimentales no previno completamente los efectos de la quercetina. Los resultados de graficados en la Figura 42B son los siguientes; Que (8 μ M) = $76.3 \pm 3.0^*$ %, Que (8 μ M) + Asc (3 mM) = $90.9 \pm 2.4^*$ %, Asc (3 mM) = 101.8 ± 1.2 %, siendo el control GABA 10 μ M, ($n = 3$, $*p < 0.05$).

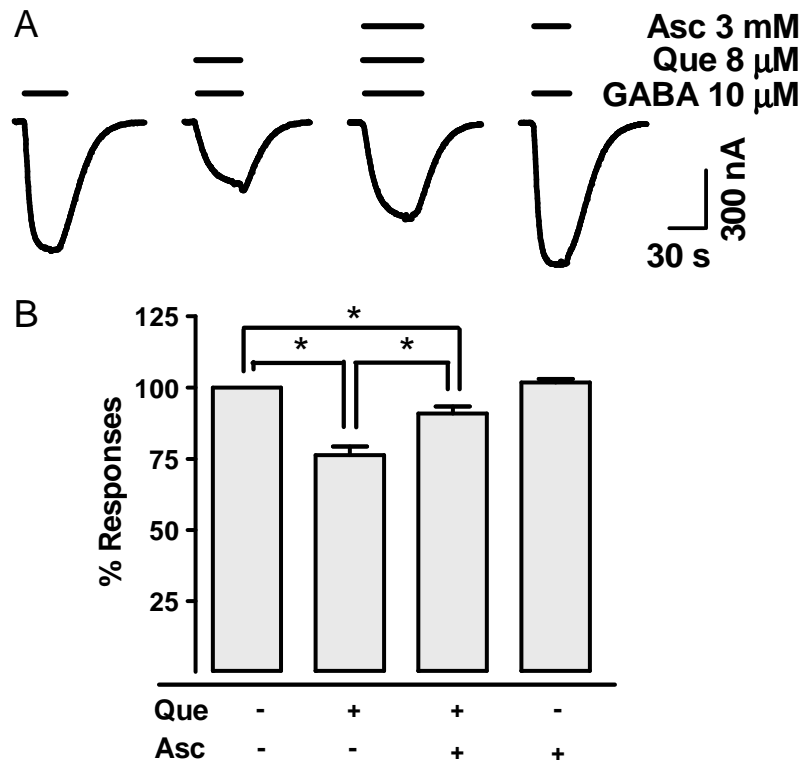


Figura 42. La prevención mediada por ácido ascórbico sobre la inhibición de quercetina en los H^{141D} GABA ρ_1 R continúa siendo parcial en respuestas evocadas por altas concentraciones del agonista. **(A)** Trazos representativos de las corrientes (CI) evocadas por GABA 10 μ M (la aplicación se encuentra indicada por barras) en ausencia (control) y presencia de quercetina (8 μ M) y/o tras la co-aplicación ácido ascórbico 3 mM. Las aplicaciones se separaron por lavados de 2-3 minutos. **(B)** El gráfico de barras resume los resultados obtenidos en los experimentos ilustrados en (A) (n = 3; *p < 0.05). Los datos se analizaron por One-way anova y se realizó un post test de Dunnett's Multiple Comparison. Las respuestas se normalizaron a la corriente control.

Los resultados de la Figura 42 sugieren que la H141 podría ser parte, directa o indirectamente, de los aminoácidos que median la protección del ácido ascórbico sobre la quercetina en las respuestas mediadas por los GABA ρ_1 R. A continuación, se evaluó la inhibición por quercetina en los H^{141D} GABA ρ_1 R en presencia de diferentes concentraciones del antioxidante (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mM).

Las curvas de inhibición se realizaron sobre respuestas evocadas por la co-aplicación de GABA 3 μ M y quercetina 8 μ M. Se utilizó ésta concentración

del agonista porque los resultados de las Figuras 41 y 42 demostraron que los efectos parciales eran independientes de la concentración de GABA usada para evocar las respuestas en los $H^{141}D$ GABA ρ_1 R. Además este diseño experimental permitió la comparación con los datos obtenidos en la Figura 39.

La Figura 43 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos en presencia de cada una de las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas; $99.2 \pm 8.9 \%$, $84.0 \pm 2.2 \%$, $90.2 \pm 2.3 \%$, $93.7 \pm 6.9 \%$, $71.8 \pm 8.1 \%$ y $52.7 \pm 4.3 \%$, ($n = 3 - 5$), respectivamente (círculos grises). En la misma se encuentran representados nuevamente los valores de la curva de inhibición de los GABA ρ_1 R *wt*.

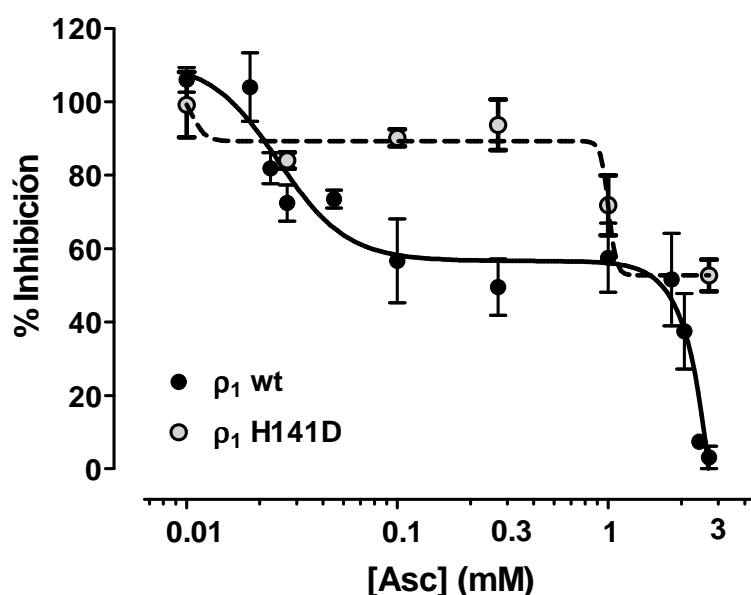


Figura 43. El ácido ascórbico previene solo hasta un 50% la inhibición inducida por quercetina sobre las respuestas mediadas por los receptores $H^{141}D$ GABA ρ_1 R. El gráfico muestra la inhibición por quercetina 8 μ M de las respuestas evocadas por GABA 3 μ M en presencia de las distintas concentraciones de ácido ascórbico para los receptores mutantes, (círculos grises) y los *wt* (círculos negros). La abscisa representa la concentración de ácido ascórbico en escala logarítmica.

Estos resultados sugieren que la sustitución de la histidina 141 en las subunidades ρ_1 imposibilita la prevención total de la inhibición de quercetina inducida por el ácido ascórbico. Esto se observa en la curva de la Figura 43,

donde la inhibición de las respuestas evocadas por GABA 3 μ M se mantiene constante en un 50%, aproximadamente. La prevención incompleta de los efectos de la quercetina respalda la hipótesis de que una o más modificaciones generadas por el ácido ascórbico en los GABA ρ ₁R prevendrían la inhibición y en particular, que parte de ésta prevención podría ser mediada directa o indirectamente por la histidina 141.

Dada las similitudes estructurales entre la quercetina y el ácido ascórbico, (Song et al., 2002) no puede descartarse la posibilidad de que exista un mecanismo competitivo involucrado. Es decir, que la protección esté mediada por un cambio alostérico en los receptores. Aún así, como la inhibición generada por quercetina sobre las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R no se encuentra modificada luego de la mutación de la H41, dicho sitio no se encontraría compartido por ambos compuestos. Es importante mencionar además en éste punto que se evaluó también la participación de las C177 y C191 en la prevención de la inhibición de quercetina mediada por el ácido ascórbico en las respuestas evocadas por GABA. Para ello se realizó un protocolo similar al presentado en la Figura 30, pre-tratando a los GABA ρ ₁R NEM (30 μ M, 2 min 30 seg). La alquilación de las cisteínas que forman el lazo de disulfuro no modificó la prevención generada por el ácido ascórbico sobre las respuestas mediadas por los GABA ρ ₁R. Por lo tanto, de existir sitios comunes entre el antioxidante y el flavonoide estos no encontraron todavía. No obstante, los resultados obtenidos en el capítulo 2 en las Figuras 30 y 33 - 35, donde los efectos del ácido ascórbico a concentraciones bajas del agonista nos pueden ser bloqueados ni a la mutación de la H141 ni por la alquilación de las C177 y C191, sugieren que aún existen sitios de acción por ser determinados.

En conjunto, los resultados presentados en el capítulo 2 y 3 sugieren que el ácido ascórbico sería capaz de generar cambios conformacionales en los GABA ρ ₁R. Mediante esta modulación alostérica el antioxidante no sólo potencia las respuestas evocadas por GABA, sino que también, en condiciones donde no incrementa significativamente las corrientes, es suficiente para prevenir la inhibición inducida por quercetina, (Figura 39). Esto permite

proponer que existirían al menos dos efectos del ácido ascórbico, ambos consistentes con conservar e incluso aumentar las respuestas mediadas por los GABA_{ρ1}R.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Como resultado de la difusión del GABA.luego del procesos de liberación vesicular en la la hendidura sináptica—los niveles alcanzados de “GABA ambiental” son suficientes para activar a GABA_CR localizados en espacios extrasinápticos de la misma terminal o de sinapsis vecinas, Este fenómeno se denomina “*spillover*” o en castellano, derrame. La persistencia de niveles bajos pero significativos del neurotransmisor en el espacio extracelular resultan en una activación constante o “tónica” de los receptores, que presenta un curso temporal completamente diferente del producido durante la activación fásica de receptores de GABA_A. Como resultado de la activación tónica de los GABA_CR se genera un aumento sostenido de la conductancia de las células, (Farrant and Nusser, 2005). Este fenómeno afecta tanto la magnitud como la duración de las respuestas generadas en las terminales donde se encuentran presentes los GABA_CR, (Figura 44).

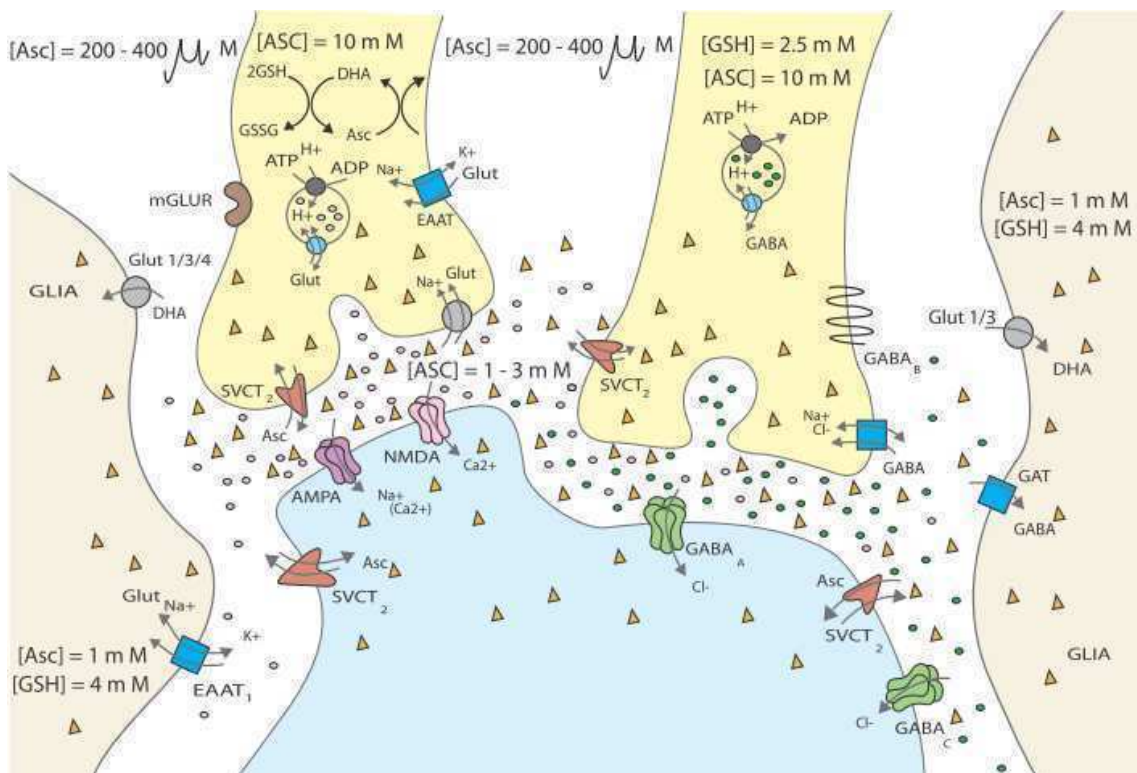


Figura 44: Esquema simplificado de la liberación sináptica GABAérgica y Glutamatérgica. Los círculos rosas representan moléculas de glutamato y los verdes

de GABA y los triángulos naranjas representan moléculas de ácido ascórbico. Figura realizada por M. Paula Lipovsek.

En la presente tesis se demostró la sensibilidad de los GABA ρ ₁R a diferentes agentes oxidantes y reductores. Dado que los compuestos endógenos utilizados, (GSH, GSSG, Nac, etc), se evaluaron a concentraciones similares a las detectadas en neuronas, es interesante saber si una modulación redox fisiológica de las corrientes mediadas por los GABA ρ ₁R constituye un mecanismo de regulación fisiológico. Por ejemplo, durante condiciones patológicas, como ser durante una hipoxia cerebral, la producción de radicales libres es muy alta y se ha reportado que las células podrían neutralizar total o parcialmente los daños que resultan de este tipo de desregulación mediante un incremento significativo en la concentración de antioxidantes endógenos (Berg et al., 2004). El aumento de los agentes reductores en el medio extracelular podría modular positivamente las respuestas evocadas por los GABA ρ ₁R. En consecuencia, dado que los GABA ρ ₁R contribuyen a las corrientes tónicas inhibitorias, se generaría una disminución del potencial de membrana. Aunque la contribución de un cambio en la inhibición basal de las neuronas al reestablecimiento del balance redox neuronal no ha sido establecida, la disminución de la excitabilidad celular podría prevenir la aparición de procesos como la muerte celular.

Por otra parte, la excitotoxicidad por glutamato es un fenómeno patológico en el cual las neuronas son dañadas y/o destruidas por la sobreactivación de receptores de glutamato. Dentro de los eventos que desencadenan este proceso, la existencia de altos niveles de glutamato en el medio extracelular, es uno de los principales determinantes (Michaelis, 1998). Uno de los mecanismos que poseen las células para evitar la excitotoxicidad es la rápida remoción del neurotransmisor de la brecha sináptica mediante co-transportadores específicos (Rothstein et al., 1996). Asociado a la eliminación del glutamato se genera un aumento directo de los niveles basales de ácido ascórbico en el espacio sináptico, (Wilson et al., 2000; Portugal et al., 2009). Es entonces que la concentración del antioxidante en la brecha sináptica puede cambiar drásticamente de 300 μ M a valores de hasta 3 mM. La existencia de

estos altos niveles de ácido ascórbico permite hipotetizar que en estas condiciones existiría una modulación positiva de los GABA_AR. Como consecuencia, al igual que se propuso anteriormente, un aumento en la inhibición tónica basal del sistema podría contrarrestar y prevenir los daños celulares agudos producto de la excitotoxicidad. Además, teniendo en cuenta los resultados de Majewska y colaboradores mencionados en la introducción, la actividad de los propios NMDAR se encontraría disminuída por el ácido ascórbico, (Majewska et al., 1990). De esta manera, ambos procesos podrían ser, en parte, los responsables de mantener a la excitación celular dentro de parámetros no patológicos.

En particular, la inhibición tónica mediada por los GABA_CR provee un lazo de realimentación negativo entre las células bipolares y amácrinas. Este se genera cuando se libera glutamato de las terminales de las células bipolares, disparando la liberación directa de GABA desde los botones presinápticos de las células amácrinas, activando un componente rápido, mediado por GABA_AR y uno lento, mediado por GABA_CR, (Vigh et al., 2005; Vigh and von Gersdorff, 2005). La inhibición recíproca actúa controlando directamente la duración y la intensidad de la liberación de glutamato desde las terminales de las células bipolares.

Como se mencionó en la introducción, las neuronas bipolares de la retina expresan gran cantidad de GABA_CR, particularmente en los botones sinápticos. Asimismo, se han detectado niveles muy elevados de ácido ascórbico, en la retina (Rose and Bode, 1991). En base a éstas observaciones, nos interesó estudiar los efectos del ácido ascórbico sobre la actividad de los GABA_CR en su medio ambiente natural y para ello nuestro grupo ha establecido una colaboración con el laboratorio del Dr. Henrique Von Gersdorff (Vollum Institute, OHSU, EEUU). Evan Vickers, doctorando del citado laboratorio, utilizando una preparación de retina de goldfish (Calero et al., en revisión), observó que la aplicación de concentraciones fisiológicamente relevantes de ácido ascórbico produce un aumento de las corrientes tónicas y las respuestas activadas por aplicaciones locales de GABA mediadas por GABA_CR en las terminales de las neuronas bipolares.

Por lo tanto, aunque el rol fisiológico preciso que el ácido ascórbico tiene en la regulación de la transmisión sináptica GABAérgica aún necesita ser investigado, estos resultados sugieren que este antioxidante actuaría como un importante modulador endógeno de los GABA_CR en la retina y probablemente en otras áreas de SNC.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. Los resultados obtenidos indican que los receptores homoméricos GABA_C ρ_1 (GABA ρ_1 R) pueden ser modulados por agentes redox en condiciones experimentales similares a las encontradas para otros receptores de la superfamilia.
2. Los experimentos presentados demuestran que el agente antioxidante ácido ascórbico, potencia significativamente y de manera dosis-dependiente las respuestas evocadas por GABA.
3. El ácido ascórbico previene los efectos inhibitorios de la quercetina sobre los GABA ρ_1 R. Tanto el DTT como el GSH, no modificaron los efectos de la quercetina sobre los GABA ρ_1 R.
4. La alquilación irreversible de los grupos tioles de las cisteínas 177 y 191, y la mutación sitio dirigida de la histidina 141, todos residuos localizados en el dominio extracelular, eliminaron casi completamente la modulación redox y no redox de los GABA ρ_1 R.
5. Luego del tratamiento con NEM, el DTT no fue capaz de modular las respuestas evocadas por GABA en los receptores, sugiriendo que la potenciación inducida por este agente reductor sobre los GABA ρ_1 R estaría mediada por los residuos C177 y C191 presentes en las subunidades ρ_1 . Por el contrario, la preincubación con NEM no previno los efectos del GSH.
6. Una o más modificaciones generada/s por el ácido ascórbico en los GABA ρ_1 R prevendrían la inhibición que induce la quercetina. Dada las similitudes estructurales entre la quercetina y el ácido ascórbico no se puede descartar la posibilidad de que exista un mecanismo competitivo involucrado.

REFERENCIAS

REFERENCIAS.

- Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27:1129-1138.
- Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2:1257-1263.
- Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, Saarma M, Pasternack M (2005) GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 154:15-23.
- Albrecht BE, Breitenbach U, Stuhmer T, Harvey RJ, Darlison MG (1997) In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the expression of the GABA(C) receptor rho1- and rho2-subunit genes in avian and rat brain. *Eur J Neurosci* 9:2414-2422.
- Alshuaib WB, Mathew MV (2006) Vitamins C and E modulate neuronal potassium currents. *J Membr Biol* 210:193-198.
- Arrigoni O, De Tullio MC (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569:1-9.
- Bensch KG, Koerner O, Lohmann W (1981) On a possible mechanism of action of ascorbic acid: formation of ionic bonds with biological molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 101:312-316.
- Berg D, Youdim MB, Riederer P (2004) Redox imbalance. *Cell Tissue Res* 318:201-213.
- Bernard CL, Hirsch JC, Khazipov R, Ben-Ari Y, Gozlan H (1997) Redox modulation of synaptic responses and plasticity in rat CA1 hippocampal neurons. *Exp Brain Res* 113:343-352.
- Biswas S, Chida AS, Rahman I (2006) Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 71:551-564.
- Boller M, Schmidt M (2001) Postnatal maturation of GABA(A) and GABA(C) receptor function in the mammalian superior colliculus. *Eur J Neurosci* 14:1185-1193.
- Boller M, Schmidt M (2003) GABAC receptors in the rat superior colliculus and pretectum participate in synaptic neurotransmission. *J Neurophysiol* 89:2035-2045.
- Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M (1998) Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem* 70:899-907.
- Calero CI, Calvo DJ (2008) Redox modulation of homomeric rho(1) GABA(c) receptors. *J Neurochem*.
- Calero CI, Vickers E, Moraga Cid G, Aguayo LG, von Gersdorff H and Calvo DJ (2011) Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid. *J Neurosci*. En revision
- Connolly CN, Wafford KA (2004) The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32:529-534.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Didelon F, Sciancalepore M, Savic N, Mladinic M, Bradbury A, Cherubini E (2002) gamma-Aminobutyric acidA rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res* 67:739-744.
- Dirksen RT (2002) Reactive oxygen/nitrogen species and the aged brain: radical impact of ion channel function. *Neurobiol Aging* 23:837-839; discussion 841-832.
- Dyer DL, Kanai Y, Hediger MA, Rubin SA, Said HM (1994) Expression of a rabbit renal ascorbic acid transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* 267:C301-306.
- Enz R, Cutting GR (1999) GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci* 11:41-50.
- Enz R, Brandstatter JH, Hartveit E, Wassle H, Bormann J (1995) Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur J Neurosci* 7:1495-1501.
- Fan SF, Yazulla S (1999) Suppression of voltage-dependent K⁺ currents in retinal bipolar cells by ascorbate. *Vis Neurosci* 16:141-148.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Foster MW, Stamler JS (2004) New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system. *J Biol Chem* 279:25891-25897.

- Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U (1993) Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol Chem* 268:27180-27185.
- Goutman JD, Calvo DJ (2004) Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA rho 1 receptor. *Br J Pharmacol* 141:717-727.
- Goutman JD, Waxemberg MD, Donate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ (2003) Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *Eur J Pharmacol* 461:79-87.
- Grabauskas G, Bradley RM (2001) Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the rostral nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* 85:2203-2212.
- Grunewald RA (1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 18:123-133.
- Harman D (1960) The free radical theory of aging: the effect of age on serum mercaptan levels. *J Gerontol* 15:38-40.
- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP (2005) Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res* 33:4660-4671.
- Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM, Jr., Kirlin WG (2004) Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *Faseb J* 18:1246-1248.
- Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA (2002) Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* 25:474-480.
- Liu B, Hattori N, Jiang B, Nakayama Y, Zhang NY, Wu B, Kitagawa K, Taketo M, Matsuda H, Inagaki C (2004) Single cell RT-PCR demonstrates differential expression of GABAC receptor rho subunits in rat hippocampal pyramidal and granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 123:1-6.
- Lu L (1997) Effect of substituting amino acids in extracellular disulfide loop on GABA rho1 subunit function. *Brain Res* 756:1-8.
- Lukasiewicz PD, Maple BR, Werblin FS (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J Neurosci* 14:1202-1212.
- Majewska MD, Bell JA, London ED (1990) Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. *Brain Res* 537:328-332.
- Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Regeat F, Demigne C, Remesy C (1999) Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 27:1259-1266.
- Martina M, Strata F, Cherubini E (1995) Whole cell and single channel properties of a new GABA receptor transiently expressed in the Hippocampus. *J Neurophysiol* 73:902-906.
- Martina M, Virginio C, Cherubini E (1997) Functionally distinct chloride-mediated GABA responses in rat cerebellar granule cells cultured in a low-potassium medium. *J Neurophysiol* 77:507-510.
- Matalon S, Hardiman KM, Jain L, Eaton DC, Kotlikoff M, Eu JP, Sun J, Meissner G, Stamler JS (2003) Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1184-1189.
- Mejia C, Garcia-Alcocer G, Berumen LC, Rosas-Arellano A, Miledi R, Martinez-Torres A (2008) Expression of GABA rho subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett* 432:1-6.
- Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.
- Miele M, MG Bautelle and M Fillenz (1994) The physiology induced release of ascorbic in rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. *Neuroscience* 62:87-91.
- Nelson MT, Joksovic PM, Su P, Kang HW, Van Deusen A, Baumgart JP, David LS, Snutch TP, Barrett PQ, Lee JH, Zorumski CF, Perez-Reyes E, Todorovic SM (2007) Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *J Neurosci* 27:12577-12583.
- Ogurusu T, Shingai R (1996) Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1305:15-18.
- Ogurusu T, Yanagi K, Watanabe M, Fukaya M, Shingai R (1999) Localization of GABA receptor rho 2 and rho 3 subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric rho 3 receptors and heterooligomeric rho 2 rho 3 receptors. *Receptors Channels* 6:463-475.

- Pan ZH, Zhang X, Lipton SA (2000) Redox modulation of recombinant human GABA(A) receptors. *Neuroscience* 98:333-338.
- Pan ZH, Bähring R, Grantyn R, Lipton SA (1995) Differential modulation by sulfhydryl redox agents and glutathione of GABA- and glycine-evoked currents in rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 15:1384-1391.
- Portugal CC, Miya VS, Calaza Kda C, Santos RA, Paes-de-Carvalho R (2009) Glutamate receptors modulate sodium-dependent and calcium-independent vitamin C bidirectional transport in cultured avian retinal cells. *J Neurochem* 108:507-520.
- Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4003-4008.
- Rebec GaRP (1994) A vitamin as neuromodulator: Asc release into extracellular fluid of the brain regulates DA and Glut transmission. *Progress in Neurobiology* 45:537-565.
- Reiter RJ (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J* 9:526-533.
- Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23:209-216.
- Robaszekiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 31:1245-1250.
- Rose RC, Bode AM (1991) Ocular ascorbate transport and metabolism. *Comp Biochem Physiol A* 100:273-285.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E (2002) Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 15:1747-1758.
- Safiulina VF, Afzalov R, Khiroug L, Cherubini E, Giniatullin R (2006) Reactive oxygen species mediate the potentiating effects of ATP on GABAergic synaptic transmission in the immature hippocampus. *J Biol Chem* 281:23464-23470.
- Schenk JO, Miller E, Gaddis R, Adams RN (1982) Homeostatic control of ascorbate concentration in CNS extracellular fluid. *Brain Res* 253:353-356.
- Schmidt M, Boller M, Ozen G, Hall WC (2001) Disinhibition in rat superior colliculus mediated by GABA_A receptors. *J Neurosci* 21:691-699.
- Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23:861-880.
- Sen CK (1998) Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 55:1747-1758.
- Shih CM, Lin H, Liang YC, Lee WS, Bi WF, Juan SH (2004) Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 496:41-48.
- Shingai R, Yanagi K, Fukushima T, Sakata K, Ogurusu T (1996) Functional expression of GABA rho 3 receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Res* 26:387-390.
- Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M (2002) Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. *J Biol Chem* 277:15252-15260.
- Spencer JP (2008) Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr* 99 E Suppl 1:ES60-77.
- Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ (2003) Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem* 278:34783-34793.
- Strata F, Cherubini E (1994) Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J Physiol* 480 (Pt 3):493-503.
- Vigh J, von Gersdorff H (2005) Prolonged reciprocal signaling via NMDA and GABA receptors at a retinal ribbon synapse. *J Neurosci* 25:11412-11423.
- Vigh J, Li GL, Hull C, von Gersdorff H (2005) Long-term plasticity mediated by mGluR1 at a retinal reciprocal synapse. *Neuron* 46:469-482.
- Wang TL, Hackam A, Guggino WB, Cutting GR (1995) A single histidine residue is essential for zinc inhibition of GABA rho 1 receptors. *J Neurosci* 15:7684-7691.

- Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Reeben M (1998) Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci* 10:350-357.
- Wilkins ME, Smart TG (2002) Redox modulation of GABA(A) receptors obscured by Zn(2+) complexation(1). *Neuropharmacology* 43:938-944.
- Wilson JX (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 25:105-125.
- Wilson JX, Peters CE, Sitar SM, Daoust P, Gelb AW (2000) Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes. *Brain Res* 858:61-66.
- Yu DH, Lee KH, Lee JY, Kim S, Shin DM, Kim JH, Lee YS, Oh SK, Moon SY, Lee SH (2004) Changes of gene expression profiles during neuronal differentiation of central nervous system precursors treated with ascorbic acid. *J Neurosci Res* 78:29-37.
- Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA (2001) Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:121-132.
- Zhu JJ, Lo FS (1999) Three GABA receptor-mediated postsynaptic potentials in interneurons in the rat lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 19:5721-5730.