

Tesis Doctoral

Regulación del receptor GABA A inducida por su activación en corteza cerebral de rata

Gutiérrez, María Laura

2013-03-22

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:

Gutiérrez, María Laura. (2013-03-22). Regulación del receptor GABA A inducida por su activación en corteza cerebral de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gutiérrez, María Laura. "Regulación del receptor GABA A inducida por su activación en corteza cerebral de rata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-22.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Regulación del receptor GABA_A inducida por su activación en
corteza cerebral de rata**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas por

María Laura Gutiérrez

Director de tesis: Dra. María Clara Gravielle

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Farmacológicas – CONICET –
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2013

Resumen

Regulación del receptor GABA_A inducida por su activación en corteza cerebral de rata

La activación del receptor GABA_A durante un breve período de tiempo (5-10 minutos) por GABA, en neuronas de corteza cerebral de rata, induce horas más tarde una reducción en la interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, llamada desacoplamiento, en ausencia de cambios en el número de receptores. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo molecular del desacoplamiento inducido por GABA.

Nuestros resultados sugieren que el desacoplamiento inducido por GABA está asociado a una reducción en el porcentaje de receptores GABA_A conteniendo la subunidad $\alpha 3$. Por otro lado, los resultados de nuestros experimentos indicarían que el desacoplamiento está también mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor. Por lo tanto, el desacoplamiento sería el resultado de al menos dos mecanismos regulatorios que actuando en forma conjunta producen una alteración adaptativa en la función del receptor GABA_A. Si bien no se conocen las vías de señalización intracelulares activadas, es posible que un aumento en la internalización del receptor GABA_A inducido por GABA represente la señal que desencadenaría los procesos responsables del desacoplamiento.

Palabras claves: receptor GABA_A; GABA; benzodiazepinas; desacoplamiento; endocitosis.

Abstract

Activity-dependent regulation of GABA_A receptor in rat cerebral cortex

GABA_A receptor activation during a brief period of time (5-10 minutes) by GABA, in rat cerebral cortical neurons, induces hours later a reduction in the interaction between GABA and benzodiazepine binding sites, named uncoupling, in the absence of changes in receptor number. The aim of the present work was to study the molecular mechanism of GABA-induced uncoupling.

Our results suggest that GABA-induced uncoupling is associated with a reduction in the percentage of $\alpha 3$ -containing GABA_A receptors. On the other hand, results from our experiments might indicate that uncoupling is also mediated by an enhancement in the phosphorylation degree of $\gamma 2$ receptor subunit. In conclusion, uncoupling would be the result of at least two regulatory mechanisms that act together to produce an adaptive alteration of the GABA_A receptor function. The intracellular signaling pathways are unknown, however, a GABA-induced increase in GABA_A receptor internalization could provide a signal that triggers the processes responsible for uncoupling.

Key words: GABA_A receptors; GABA; benzodiazepines; uncoupling; endocytosis.

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme la beca doctoral que permitió que me dedique exclusivamente a mi formación científica.

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

A María Clara, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo, por facilitarme todos los medios para la realización de la tesis, por compartir su experiencia, por su paciencia, por respetar mis ideas y dejarme intentarlo, por tolerar mi rebeldía y aceptarme como soy. Por haber estado incondicionalmente acompañándome en el proceso de escritura.

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

A todos los becarios con los que compartí estos 5 años: Mercedes Odeón, Yanina Godoy, Celia Larramendy, Mariano Saborido, M Laura Cladouchos, Laura Sifonios, Andrés Varani, Valeria Pedrón, Martín Cassanelli, Georgina Fernandez Macedo, Mariana Raineri, Fernanda Podestá, Ramiro Lorenzo, Martín Codagnone, Celeste Ferreri, Fernanda Filia, Juan Minoia, Stefanía Di Gennaro, y Betina González.

A los investigadores del instituto que enriquecieron estos años: Silvia Wikinski, Stella Celuch, Gabriela Acosta, Analía Reinés, Irene Taravini, Roxana Peroni, Verónica Bisagno, Carolina Ghanem, Graciela Balerio, y Juan Ferrario.

A las secretarias: Poupee!, Graciela Ceccoli, Gabriela Castellani.

A los técnicos: Marina Galli, por su sensibilidad, por sus mimos, por compartir. A Fernanda de Fino, por la locura, por pelear y así querer. A Lidia Caballero y Claudia García Bonelli.

A María Esther, Esther María, Andrea, y Miguel, por mal acostumbrarnos a tener siempre material limpio a disposición, por cuidar las ratas, y ayudar a que los experimentos salgan.

A Fernanda Podestá y Analía Reinés por asesorarme y compartirme sus experiencias con las inmunos.

A Irene Taravini por hacerse huequitos para responder todas mis dudas con la mejor onda.

A Martin Cassa por saber tanto y compartirlo, por darme dos manos con la cuantificación de las inmunos.

A los que me ayudaron en esta última etapa con la edición de la tesis: Teté (vía skype), Maru y Beti, por la gran mano con el Photoshop!

A Georgina, no sólo por escucharme y discutir la planificación de experimentos y los resultados, sino por estar siempre levantándome el ánimo en los momentos de bajón.

A mi compa Celeste, por aguantar mi carácter gruñón y mis obsesiones, que no son pocas. Por la catarsis.

A mis hermanas del alma santafesinas que me dan un apoyo y amor impensado: Cinti, Gata, Gise, Lucre y Sole. Gracias por estar más allá de la distancia y hacerme sentir cerquita.

A Teté, Lour, Caro, Ani y Dani, por escuchar, bancar, y acompañar. Por interesarse en mi proyecto, por preguntar aunque les aburra. Por ser parte tanto de mis momentos malos como de los de diversión y disfrute.

Al grupo de biólogos amigos de la facu: Ada, Beti, Carlot, Caro, Hagi, Lour, y Teté, siempre presentes más allá de los proyectos de cada uno.

A los que siempre están acompañando y escucharon repetidas veces lo que hago: Emma, Vero, Anu, y Tuqui.

A mis hermanos que me acompañaron y compartieron estos años.

A mis papás, porque les debo todo lo que soy. Por haberme enseñado a ser responsable y a enfrentar la vida con seguridad. Por acompañarme siempre incondicionalmente, por apoyarme e incentivar me a hacer lo que me gusta, y por pensar que soy más de lo que verdaderamente soy.

A Toti, por acompañarme durante todos estos años. Por entenderme y apoyarme en cada decisión.

A todos los que forman parte de mi vida.

¡Muchas gracias!

Índice

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Índice	7
Introducción	10
1. La neurotransmisión inhibitoria.....	11
2. La neurotransmisión GABAérgica.....	12
2.1. Síntesis, degradación y transporte de GABA	12
2.2. Receptores GABAérgicos	14
3. Modulación del receptor GABA _A	22
4. Tráfico de los receptores GABA _A	24
4.1. Exocitosis.....	25
4.2. Endocitosis.....	26
4.3. Difusión lateral.....	27
5. Regulación del receptor GABA _A dependiente de su activación	28
5.1. Regulación del número de receptores.....	29
5.1.1. Endocitosis	29
5.1.2. Degradación.....	29
5.1.3. Transcripción	29

5.2. Regulación de la función del receptor	30
5.2.1. Desensibilización	30
5.2.2. Fosforilación.....	31
5.2.3. Desacoplamiento	33
6. Caracterización de cultivos neuronales primarios de corteza cerebral de rata	34
7. Antecedentes de la línea de investigación	35
Objetivos.....	40
Materiales y métodos.....	43
1. Cultivos neuronales primarios	44
2. Tratamientos	45
3. Preparación de soluciones.....	46
4. Ensayo de unión de [³ H]flunitracepam	46
5. Inmunoprecipitación del receptor GABA _A y <i>western blot</i>	47
6. Ensayo de biotilación para estudiar receptores de superficie	50
7. Ensayos para estudiar la internalización de receptores GABA _A	52
7.1. Inmunocitoquímica.....	52
7.2. Ensayo de biotilación para estudiar la internalización receptores.....	53
8. Ensayo de fosforilación de las subunidades $\gamma 2$ y $\beta 2$ del receptor GABA _A	55
9. PCR cuantitativa en tiempo real.....	57
10. Análisis de los datos.....	59
Resultados.....	61

1. Efecto de moduladores alostéricos positivos del receptor GABA _A sobre el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas	62
2. Cambios en la composición de subunidades del receptor GABA _A inducidos por GABA	64
3. Efecto de la exposición breve a GABA sobre la internalización de los receptores GABA _A	69
4. Rol de la activación de las proteínas quinasas PKA y PKC sobre el desarrollo del desacoplamiento inducido por GABA	76
5. Rol de los VGCC de tipo L sobre la regulación de los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA _A inducida por GABA	80
Discusión	83
1. Efecto de moduladores alostéricos positivos sobre el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas	84
2. Cambios en la composición de subunidades del receptor inducidos por GABA.....	86
3. Efecto del GABA sobre la internalización de los receptores GABA _A	87
4. Rol de la activación de proteínas quinasas en el desarrollo del desacoplamiento.....	90
5. Regulación de la expresión de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA _A	92
Conclusiones	94
Bibliografía	96

Introducción

1. La neurotransmisión inhibitoria

La actividad de los circuitos neuronales se encuentra modulada por diferentes mecanismos que regulan el balance entre los niveles de excitación e inhibición. Estos circuitos contienen tanto sistemas de neurotransmisión excitatorios como inhibitorios y la homeostasis se logra mediante conexiones de alimentación (*feedforward*) y de realimentación (*feedback*) (Ferrante, Migliore *et al.* 2009). En las redes corticales, la excitación está controlada por circuitos locales inhibitorios formados por interneuronas inhibitorias especializadas (Figura 1). Una desregulación de la neurotransmisión inhibitoria conduce a una actividad neuronal patológica, como sucede por ejemplo durante un episodio epiléptico (Schnitzler y Gross 2005; Roth y Draguhn 2012).

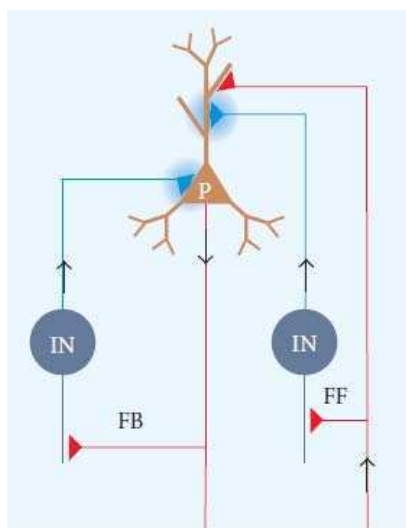


Figura 1: Conexiones inhibitorias en un circuito cortical local. Se representan conexiones excitatorias en rojo e inhibitorias en celeste. Se muestran en marrón una neurona excitatoria piramidal (P) y en azul interneuronas inhibitorias (IN). La IN de la izquierda se encuentra integrada a una vía de realimentación negativa (FB-*feedback inhibition*) mientras que la IN de la derecha a un circuito de alimentación negativa (FF-*feedforward inhibition*). Tomado de Roth y Draguhn 2012.

2. La neurotransmisión GABAérgica

2.1. Síntesis, degradación y transporte de GABA

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. La síntesis de GABA se produce a partir de glutamato, el cual puede ingresar a las interneuronas inhibitorias a través de su transportador (EAAT3). El glutamato es convertido a GABA por alguna de las dos isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa, GAD₆₅ y GAD₆₇, nombradas haciendo referencia a sus pesos moleculares (Esclapez, Tillakaratne *et al.* 1994). La isoforma GAD₆₅ se encuentra directamente asociada a las vesículas presinápticas, de modo que el glutamato que se encuentra en la zona puede ser rápidamente transformado a GABA e incorporado a las vesículas por medio del transportador vesicular VGAT (Jin, Wu *et al.* 2003). La isoforma GAD₆₇ se encuentra en el citosol, tanto en el cuerpo neuronal como en las proyecciones. La presencia de GAD no es exclusiva de neuronas GABAérgicas ya que se encuentra en otros tipos neuronales. Si bien no se conoce el significado funcional, se asocia la presencia de GAD al rol neurodiferenciador que cumple el GABA durante el desarrollo del sistema nervioso central.

La glutamina es una fuente alternativa para la síntesis de GABA. Las células gliales incorporan glutamato por medio del transportador EAAT2 y lo convierten a glutamina por medio de la glutamina sintetasa (Bak, Schousboe *et al.* 2006). La glutamina es liberada por medio del “sistema N” de transporte y, desde el espacio extracelular, las neuronas pueden incorporarla mediante el “sistema A” de transporte (Broer y Brookes 2001). La glutamina es sustrato de la enzima glutaminasa, la cual la transforma en glutamato que es a su vez sustrato de GAD. La glutamina es utilizada como precursor de

GABA principalmente cuando la actividad neuronal se encuentra incrementada y en tejidos inmaduros.

El GABA es degradado por la enzima GABA transaminasa (GABA-T) que se encuentra en la membrana mitocondrial de neuronas y glía. El 90 % del GABA producido es degradado contribuyendo al metabolismo energético en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Jung, Lippert *et al.* 1977). La concentración de GABA en las vesículas sinápticas es el resultado del equilibrio de todos los procesos mencionados anteriormente (Figura 2).

Los transportadores de GABA poseen cuatro isoformas distintas (GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1). Estos transportadores presentan diferente distribución en el sistema nervioso, por ejemplo GAT-1 es predominantemente neuronal mientras que GAT-3 se expresa principalmente en glía. Los transportadores de GABA ingresan el neurotransmisor hacia el interior de la célula, aunque también pueden transportar al neurotransmisor en la dirección contraria, hacia el exterior de la célula, siendo este último mecanismo conocido como liberación no vesicular de GABA (Schousboe y Waagepetersen 2007).

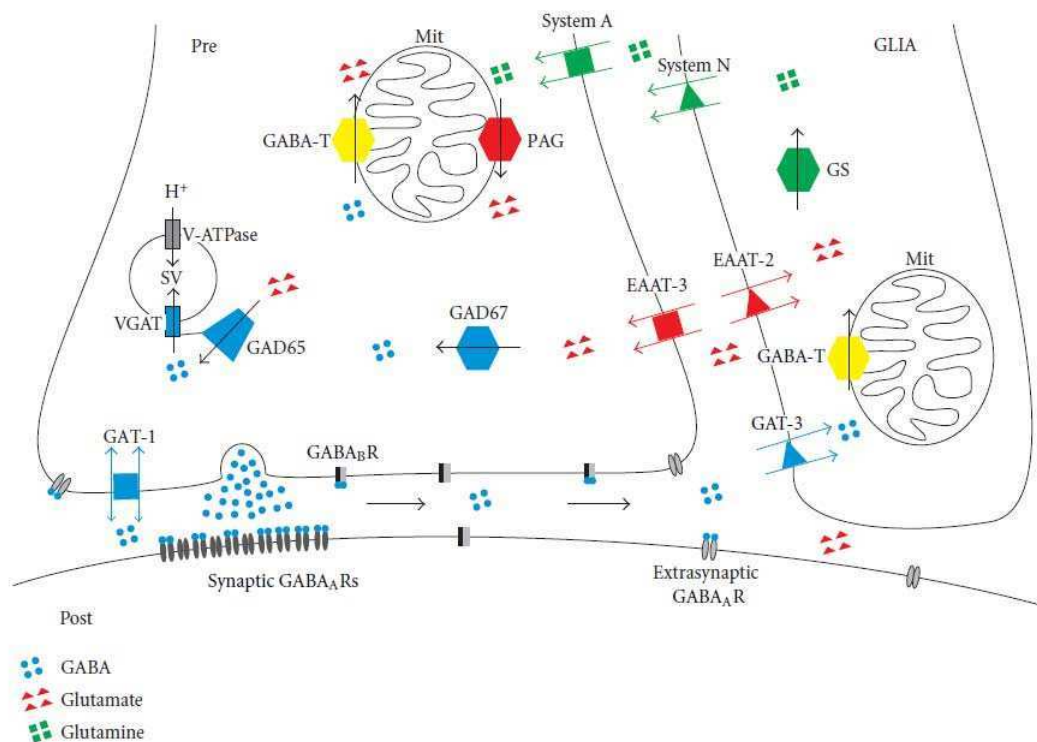


Figura 2: Esquema de la síntesis, transporte, y degradación de GABA. Se representa el terminal de una interneurona inhibitoria (Pre), una célula glial (GLIA) y la membrana postsináptica de una neurona blanco (Post). Las moléculas de GABA se muestran en azul, las de glutamato en rojo, y las de glutamina en verde. GS: glutamina sintetasa, Mit: mitocondria, PAG: glutaminasa activada por fosfato, SV: vesícula sináptica, V-ATPasa: ATPasa vesicular. Tomado de Roth y Draguhn 2012.

2.2. Receptores GABAérgicos

El GABA liberado al espacio sináptico puede ejercer su acción inhibitoria en forma lenta y prolongada mediante la activación del receptor $GABA_B$, o bien en forma rápida mediante la unión al receptor $GABA_A$, en el cerebro, o al receptor $GABA_C$, localizado principalmente en la retina. El receptor $GABA_B$ es metabotrópico y pertenece a la familia de los receptores acoplados a la proteína G. Los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ son receptores ionotrópicos, pertenecientes a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, que incluye también a los receptores de acetilcolina nicotínicos, de glicina y de serotonina 5-HT₃ (Unwin 1989).

Déficits en el funcionamiento del receptor GABA_A están asociados a patologías como epilepsia, trastornos de ansiedad, déficits cognitivos, esquizofrenia, depresión, y abuso de sustancias (Molher 2006). El receptor GABA_A es blanco de muchas drogas con relevancia clínica como lo son los anti-convulsivantes, ansiolíticos, sedativos, e hipnóticos (Berezhnov, Gravielle *et al.* 2007) Específicamente, las benzodiazepinas son los moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, de mayor uso en la clínica, que potencian el influjo de Cl⁻ inducido por GABA.

Los receptores de la familia de canales iónicos activados por ligando poseen estructura pentamérica, formados por subunidades homólogas que comparten la siguiente estructura común (Fig. 3a): un dominio amino terminal extracelular, cuatro dominios de transmembrana (TM), y un gran dominio intracelular ubicado entre los dominios TM3 y TM4. El dominio TM2 forma el poro del canal (Jacob, Moss *et al.* 2008).

Los receptores GABA_A son canales iónicos permeables a los iones cloruro (Cl⁻) y bicarbonato (HCO₃⁻) (Kaila 1994). La unión de un agonista al receptor induce la apertura del canal permitiendo el flujo de estos iones de acuerdo sus gradientes electroquímicos. En el sistema nervioso maduro la activación del receptor GABA_A induce principalmente el influjo de Cl⁻ disminuyendo la probabilidad de generación de un potencial de acción debido a la hiperpolarización y a un aumento en la conductancia (*shunting inhibition*). Sin embargo, el receptor GABA_A puede mediar también respuestas despolarizantes en el adulto en ciertas condiciones fisiológicas y patológicas donde ocurre una activación intensa del receptor (Markwardt y Overstreet-Wadiche 2008; Allain, Le Corrionc *et al.* 2011)

Los receptores GABA_A son heteroméricos, formados por subunidades codificadas por 18 genes diferentes las cuales han sido agrupadas por su homología en siete

subfamilias: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ (1-3), θ , π , (Figura 3b). El *splicing* alternativo de algunos de los genes de las subunidades contribuye a la diversidad de los receptores (Farb, Steiger *et al.* 2007). Si bien la cantidad de combinaciones posibles es inmensa, la presencia de sólo un número finito de receptores ha sido demostrada en el cerebro (Figura 4). La mayor parte de los receptores GABA_A están formados por dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ . Las distintas subunidades del receptor exhiben una distribución diferente a lo largo del sistema nervioso central (Tabla 1) (Uusi-Oukari y Korpi 2010).

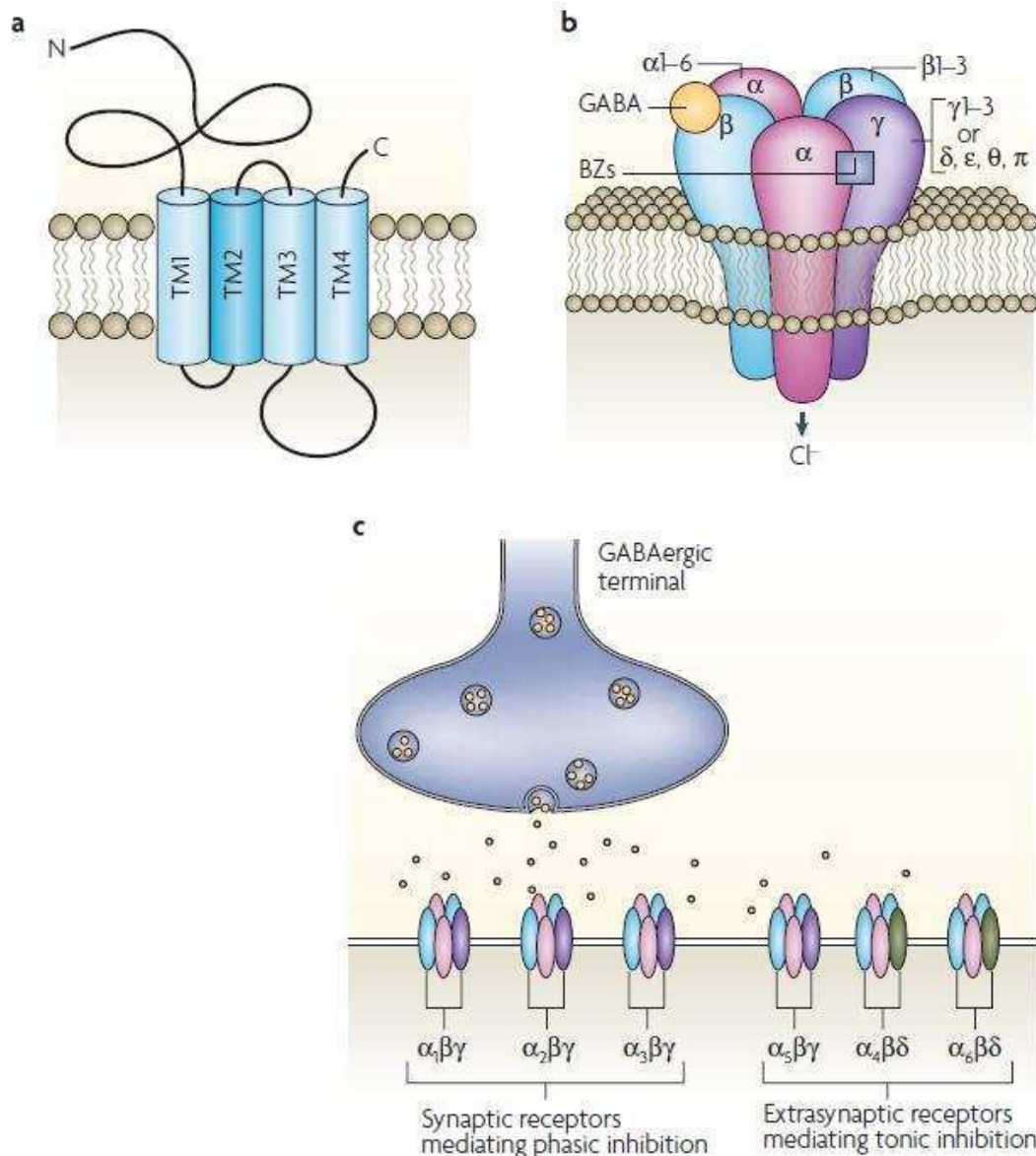


Figura 3: Estructura y localización del receptor GABA_A. a) Las subunidades del receptor GABA_A poseen cuatro pasos de transmembrana (TM1-4). El TM2 forma el poro del canal. El dominio intracelular ubicado entre TM3 y TM4 interacciona con proteínas que modulan la actividad de receptor. b) Cinco subunidades pertenecientes a distintas subfamilias se ensamblan para formar el canal heteropentamérico permeable a Cl⁻. La unión a GABA se produce en la interfase entre las subunidades α y β. La unión a benzodiazepinas se produce en la interfase entre las subunidades α (1, 2, 3 ó 5) y las subunidades γ. c) Los receptores conformados por las subunidades α (1-3) junto con las subunidades β y γ poseen localización principalmente sináptica. Los receptores conteniendo las subunidades α₅βγ son mayoritariamente extrasinápticos. Los receptores formados por α (4, 6) en combinación con β y δ (insensibles a las benzodiazepinas) poseen localización extrasináptica. Tomado de Jacob, Moss *et al.* 2008.

Tabla 1: Distribución cuantitativa estimada de las subunidades del receptor GABA_A. El perfil de expresión de cada subunidad se representa en números: 3 máxima expresión, 2 alta expresión, 1 baja expresión, campo vacío: expresión muy baja o indetectable. Tomado de Uusi-Oukari y Korpi 2010.

Área cerebral	Expresión de ARNm y proteína de las subunidades del receptor GABA _A													
	α1	α2	α3	α4	α5	α6	β1	β2	β3	γ1	γ2	γ3	δ	
Áreas olfatorias														
Capa plexiforme del bulbo olfatorio	3	1	1		1		2	3	3		3	1		
Capa glomerular	3	1	1				1	3	3		3		1	
Capa interna granular		3	3	1	2								1	
Tubérculo olfatorio		2		2			1	1	3		1	1	1	
Islas de Calleja	3							3				1		
Corteza olfatoria primaria	3	3	3	2			1	3	3	1	3	1	1	
Corteza cerebral														
Capas 1-4	2	2	1	2	1		2	2	3		2	1	2	
Capas 5-6	3	1	3	1	2		3	2	3		2	1	1	
Corteza cingulada anterior	2	3	1	1			2	1	3		2			
Regiones límbicas, hipocampo, amígdala														
Corteza entorrinal	2	2	1	1	1		2	2	2		2	1	1	
Subiculum	2	2	1	1	1		2	2	2		2	1	1	
Hipocampo CA1	2	3		2	3		3	1	3		3			
Hipocampo CA3	1	3		1	3		3	1	3		3			
Hipocampo giro dentado	1	3		2	1		2	2	3		3		1	
Núcleo del lecho de la estría terminal medial	1	3	2	1	1		2	1	2	3	1	1	1	
Núcleo horizontal de la banda diagonal	3		1		1			3	1		2	1	1	
Núcleo septohipocampal/taenia tecta	1	3	2	2	1		2		3		1			
Núcleo septal lateral	1	3	2	1			2	1	1	3	2	1		
Núcleo septal triangular	1	2						1	1		1			
Núcleo del lecho de la comisura anterior	1	3	1	1						1				
Área amigdaloides anterior	1	1	1		1		1	2	1	1	2	1		
Amígdala	1	3	1	1				1	2	2	3	1	1	
Núcleo amigdaloides cortical posteromedial	1	3	1		1		1	2	2		1	1	1	
Ganglios basales/estriado														
Núcleo accumbens	1	3	1	2	1		1	1	3		1	1	2	
Caudado/putamen	1	3	1	2	1		1	1	3		1	1	2	
Globo pálido	3	1			1			3		3	1	1	1	
Claustro	2	2	3	1	1		1	2	2		1	1	1	
Pálido ventral/sustancia innominada	3		1	1	1		1	3		3	1	1		
Tálamo, epitálamo														
Núcleo talámico paraventricular	1	2	1	3			2	2	2		2		1	
Núcleo talámico paraventricular	3			3				3	1		1		3	
Núcleo talámico centrolateral/medial	2	1	1	2			1	3	1	2	1		1	
Núcleo talámico intermediodorsal	2			3				3					1	
Núcleo talámico lateral posterior/laterodorsal	2			3				3					3	
Núcleo talámico ventroposterior	1			3				3					2	
Zona incerta/núcleo subtalámico	2		1					2			1		1	
Núcleo habenuar medial		2							2		2	1		

Área cerebral	Expresión de ARNm y proteína de las subunidades del receptor GABA _A												
	α1	α2	α3	α4	α5	α6	β1	β2	β3	γ1	γ2	γ3	δ
Núcleo geniculado medial	2			3				3			1	1	3
Hipotálamo													
Núcleo periventricular/área preóptica medial	1	3	1		1		1		2	2	1		1
Área preóptica lateral	1	1	1					1			1	1	
Área hipotalámica lateral	1						1	1	1		1		1
Área hipotalámica anterior	1						3	1	1		2		1
Núcleo hipotalámico paraventricular	1	1					2	1	2		1		1
Núcleo hipotalámico ventromedial	1	2	1		1		3		2	1	2		1
Mesencéfalo, pons, médula													
Sustancia negra, parte reticular	3		1				1	2		1	1	1	
Sustancia negra, parte compacta			2	1			1				1	1	1
Área tegmental ventral	1	1	1				2				2	1	1
Núcleo interpeduncular	2	1		2	1				2		1	1	1
Núcleo rojo	3						2				2	1	1
Colículo superior, capa gris superior	2	2		1	2			2	2	1	1		
Colículo superior, capa gris intermedia	2						1	1	2		1	1	
Gris central	3	1	1				2	1	2		1	1	2
Colículo inferior	3	1						2	1		1	1	1
Núcleos del rafe	2	1	2		1		1	2	2		2	1	1
Locus coeruleus			2										
Cerebelo													
Capa de células granulares	3					3	1	3	3		1		3
Capa molecular	3	1			1		2	1			2		

Los receptores con diferente composición de subunidades poseen propiedades fisiológicas y farmacológicas diferentes, y distinta localización subcelular (Figura 3c). Los receptores compuestos por las subunidades α1, α2, α3, o α5 junto con las subunidades β y γ, son sensibles a la modulación por benzodiazepinas y, exceptuando a los que contienen la subunidad α5, poseen una localización principalmente sináptica mediando la inhibición fásica en el cerebro. Los receptores conteniendo las subunidades α5βγ están situados principalmente en regiones extrasinápticas y median la inhibición tónica. Los receptores compuestos por las subunidades α4 y α6 junto con las subunidades β y δ, son insensibles a la modulación por benzodiazepinas, poseen ubicación extrasináptica y median la inhibición tónica (Jacob, Moss *et al.* 2008).

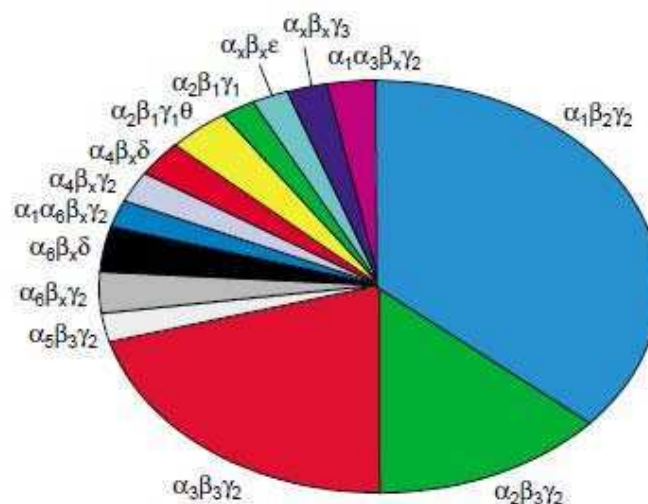


Figura 4: Representación aproximada de la abundancia de los subtipos de receptores GABA_A en cerebro de rata. El subíndice x indica que el subtipo de subunidad no es conocido. Tomado de Whiting 2003.

Diversas evidencias parecen indicar que las distintas acciones de las benzodiazepinas y el etanol, otro modulador alostérico positivo del receptor GABA_A, están mediadas por receptores GABA_A conteniendo diferentes subtipos de subunidades α (Tabla 2) (Fritschy y Brunig 2003; Michels y Moss 2007).

Tabla 2: Localización y propiedades farmacológicas de los receptores GABA_A conteniendo los diferentes subtipos de subunidades α . Modificado de Fritschy y Brunig 2003 y Michels y Moss 2007.

Subunidad	PM (KDa)	Conformación predominante	Localización	Farmacología
$\alpha 1$	50-51	$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	Corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, amígdala, tálamo, bulbo olfatorio, sustancia negra, globo pálido	Efecto sedativo, amnésico y anticonvulsivante de las benzodiazepinas
$\alpha 2$	52-53	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	Corteza cerebral, hipocampo, amígdala, estriado, bulbo olfatorio, hipotálamo, núcleos motores	Efecto ansiolítico y miorelajante de las benzodiazepinas

$\alpha 3$	58-61	$\alpha 3\beta\gamma 2$	Corteza cerebral, amígdala, tálamo, bulbo olfatorio, médula espinal, locus coeruleus	Efecto ansiolítico y miorrelajante de las benzodiazepinas
$\alpha 4$	56-67	$\alpha 4\beta\delta$	Giro dentado (hipocampo), tálamo	Sensibilidad al etanol
$\alpha 5$	53-55	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$	Corteza cerebral profunda, hipocampo, amígdala, bulbo olfatorio, hipotálamo, médula espinal	Efecto amnésico y miorrelajante de las benzodiazepinas.
$\alpha 6$	57-58	$\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 6\beta 2/3\delta$	Cerebelo, núcleo coclear dorsal	Sensibilidad al etanol

El rol del sistema GABAérgico durante el período embrionario y perinatal, es sustancialmente diferente al de los animales adultos. Si bien hay investigaciones controvertidas, en hipocampo, cerebelo y corteza cerebral inmaduros se ha observado que la activación del canal del receptor GABA_A conduce a la despolarización de la membrana (Cherubini, Gaiarsa *et al.* 1991). Esto es debido a la concentración intracelular de Cl⁻ incrementada que ocurre antes de la expresión del co-transportador de K⁺/Cl⁻ de tipo 2, KCC2 (Rivera, Voipio *et al.* 2005). A su vez está ampliamente descrita la acción neurotrófica del GABA durante el desarrollo, promoviendo el crecimiento, la diferenciación neuronal y la formación de sinapsis (Schousboe y Redburn 1995). Por otro lado, las propiedades farmacológicas del receptor también son diferentes a las del adulto debido a los cambios en la expresión de subunidades del receptor a lo largo del desarrollo (Laurie, Wisden *et al.* 1992). En la figura 5 puede observarse como varían los niveles de expresión en la corteza cerebral, de las diferentes subunidades del receptor en diferentes estadios del desarrollo y en el cerebro adulto.

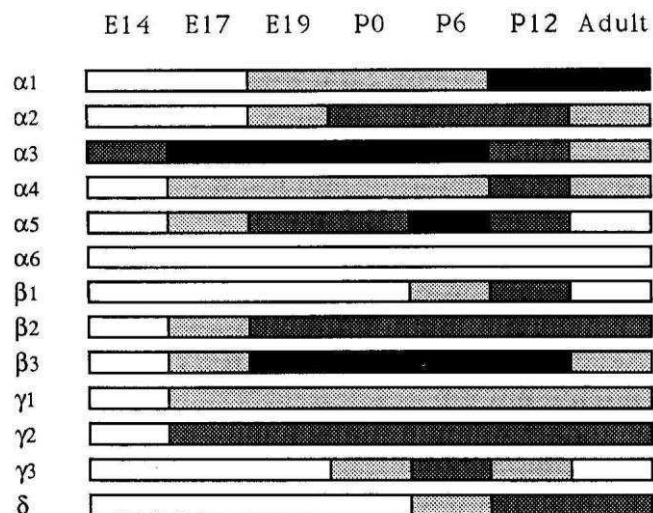


Figura 5: Representación esquemática de la expresión de ARNm de las diferentes subunidades del receptor GABA_A en la corteza cerebral de rata en estadios embrionarios (E) y posnatales (P). Negro, señal muy fuerte; gris oscuro, señal moderada; gris claro, señal débil; blanco, señal muy débil o no detectable. Tomado de Laurie, Widsen *et al.* 1992.

3. Modulación del receptor GABA_A

El receptor GABA_A es modulado por diferentes compuestos tales como: neuroesteroides, barbitúricos y benzodiazepinas. La acción de los neuroesteroides sobre el receptor GABA_A puede producir cambios en el estado de ánimo y en el comportamiento. Los esteroides exógenos, por otro lado, se utilizan como anestésicos, anticonvulsivantes, y neuroprotectores. Los neuroesteroides pueden actuar como potenciadores de la función del receptor GABA_A o como antagonistas. Entre los neuroesteroides más potentes con acción potenciadora se encuentran la alopregnanolona o (3α, 5α)-3-hidroxipregnano-20-ona, la pregnanolona o (3α, 5β)-3-hidroxipregnan-20-ona, y el THDOC o (3α, 5α)-3,21-dihidroxipregnan-20-ona. Como moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, estos neuroesteroides aumentan la respuesta producida por GABA. Por otro lado, altas concentraciones producen la apertura del canal en

ausencia de GABA. La acción moduladora parecería estar mediada por un sitio de unión al receptor diferente del que media la apertura directa del canal. En la subunidad α se encontraría el sitio de unión a los neuroesteroides con acción moduladora, mientras que en la subunidad β el sitio responsable del efecto agonista de los neuroesteroides (Akk, Covey *et al.* 2007). Si bien todos los receptores GABA_A responden a los neuroesteroides, en los receptores conteniendo la subunidad δ el efecto máximo producido es mayor (Akk, Covey *et al.* 2007; Michels y Moss 2007).

Los barbitúricos también potencian el efecto del GABA cuando se encuentran en baja concentración, mientras que en altas concentraciones activan al receptor directamente en ausencia de GABA. Del mismo modo que los neuroesteroides, estos dos efectos son producidos a través de la unión de la droga a dos sitios diferentes del receptor. Su acción potenciadora se manifiesta prolongando el tiempo de apertura del canal de Cl⁻ (Olsen y Sieghart 2009).

Las benzodiazepinas son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A que potencian el influjo de Cl⁻ inducido por GABA aumentando la probabilidad de apertura del canal (Figura 6).

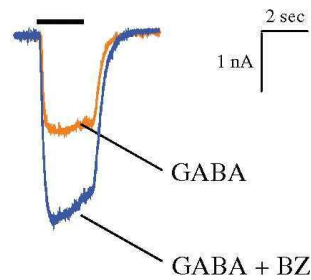


Figura 6: Efecto de las benzodiazepinas sobre las corrientes evocadas por GABA. Experimento de *whole cell patch-clamp* donde se muestra una corriente hiperpolarizante provocada por GABA 5 μM (GABA, rojo) sólo y en presencia de fluracepam 100 nM (GABA+BZ, azul). Tomado de Michels y Moss 2007.

El sitio de unión a las benzodiazepinas se encuentra en la interfase de los dominos amino terminal, ubicados entre la subunidad α y la subunidad γ . Los receptores GABA_A exhiben diferente sensibilidad a las benzodiazepinas dependiendo del subtipo de subunidad α presente. Las benzodiazepinas producen numerosas acciones tales como ansiolisis, sedación, relajación muscular, y efectos amnésico y anticonvulsivante (Olsen y Sieghart 2009).

4. Tráfico de los receptores GABA_A

El número de receptores postsinápticos que se encuentran en la superficie celular es uno de los puntos de regulación de la transmisión inhibitoria. Los receptores GABA_A se encuentran en continuo recambio (*turnover*) migrando desde la membrana (endocitosis) y hacia la membrana plasmática (exocitosis). Esta modificación en el número de receptores en superficie produce un cambio de la amplitud de la corriente postsináptica inhibitoria (Kittler, Thomas *et al.* 2004).

El recambio continuo del receptor comprende los siguientes pasos: síntesis, ensamblado, transporte hacia la membrana, internalización, reciclado, y degradación. El 80% de los receptores GABA_A están localizados en la superficie y el 20% se encuentra dentro de la célula (Czajkowski y Farb 1986). La población de receptores intracelulares está constituida por un 4% de receptores que son transportados hacia la membrana plasmática mientras que el 16% restante representa un grupo que finalmente será degradado (Czajkowski y Farb 1989). Se ha observado que el 25% de los receptores de la superficie son endocitados en un período de 30 minutos, y que el 70% de estos receptores son reciclados nuevamente hacia la membrana plasmática en el transcurso de 1 hora. La degradación lisosomal presenta una escala de tiempo más lenta ya que se observó que el 30% de los receptores pasan a formar parte de endosomas tardíos luego de 6 horas (Kittler, Thomas *et al.* 2004). El tráfico intracelular de los receptores GABA_A está regulado por numerosas proteínas que se asocian al receptor (Figura 7).

4.1. Exocitosis

Los receptores GABA_A se sintetizan y se ensamblan en el retículo endoplasmático. Plic-1 es una proteína de tipo ubiquitina localizada en compartimentos intracelulares que interacciona con las subunidades α y β del receptor inhibiendo su degradación por vía proteosomal.

Los receptores son luego transportados hacia la membrana plasmática a través del aparato de Golgi, como se representa en la figura 7. Dentro de las vesículas del Golgi, la proteína asociada al receptor, GABARAP (*GABA_A Receptor Associated Protein*), interacciona con la subunidad γ del receptor, los microtúbulos y la proteína NSF (*N-ethylmaleimide Sensitive Factor*). La proteína NSF interacciona además con la subunidad β del receptor y está involucrada en los eventos de fusión de vesículas intracelulares. La

acción conjunta de GABARAP y NSF promueve el tráfico del receptor desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. Las proteínas relacionadas a la fosfolipasa C catalíticamente inactivas (PRIPs) se unen a GABARAP y a las subunidades β y $\gamma 2$ del receptor GABA_A regulando también el tráfico del receptor hacia la membrana plasmática. Los receptores se insertan en la membrana plasmática en la zona extrasináptica y luego pueden difundir hacia el área sináptica donde se agrupan interactuando con la proteína de andamiaje gefirina (Farb, Steiger *et al.* 2007).

4.2. Endocitosis

La endocitosis mediada por clatrina es el principal mecanismo de internalización de los receptores GABA_A y ha sido demostrado que ocurre en forma constitutiva (Kittler, Delmas *et al.* 2000). Los bucles intracelulares de las subunidades β y $\gamma 2$ del receptor interactúan con una proteína adaptadora de clatrina, AP2, la cual promueve el ensamblaje de clatrina y, como consecuencia, la formación de la vesícula endocítica. La interacción de AP2, tanto con las subunidades $\beta 1-3$ como con la subunidad $\gamma 2$, ocurre en un motivo ubicado en el bucle mayor intracelular que contiene aminoácidos conservados susceptibles a ser fosforilados por diferentes proteínas quinasas de serina/treonina y de tirosina. La fosforilación de estos residuos regula negativamente la interacción de AP2 con las subunidades del receptor (Kittler, Chen *et al.* 2005). Durante la internalización, los receptores son transportados en endosomas tempranos, los cuales pueden ser endosomas de reciclaje, si el destino es reinsertarse en la membrana plasmática, o transformarse en endosomas tardíos que finalmente serán degradados por vía lisosomal. La interacción de la proteína asociada Huntingtina 1 (HAP1) con las subunidades β del receptor aumenta la reinsertión de los receptores en la membrana estimulando el reciclado o inhibiendo la degradación lisosomal.

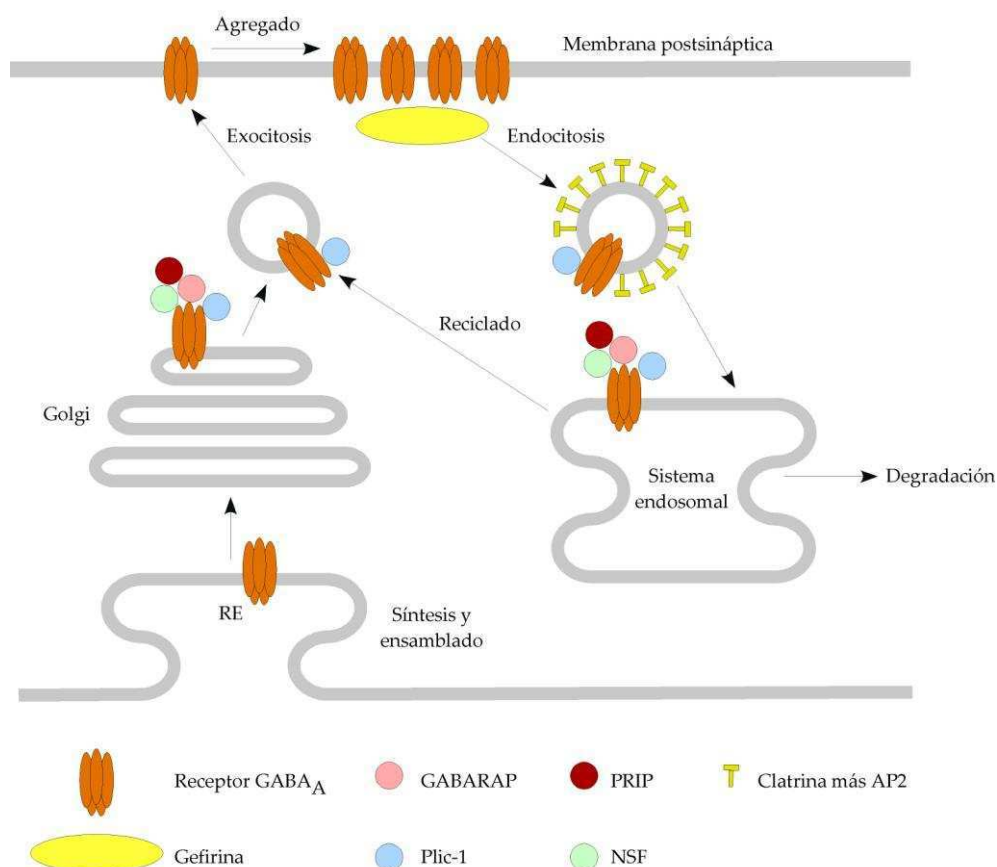


Figura 7: Representación esquemática del tráfico del receptor GABA_A. Los receptores son ensamblados en el retículo endoplasmático (RE) y transportados a través del aparato de Golgi. La interacción con diversas proteínas regula la inserción a la membrana plasmática en el proceso de exocitosis. La proteína NSF está involucrada en la fusión de la vesícula a la membrana. Plic-1 interacciona con las subunidades α y β de receptor aumentando la estabilidad de los receptores intracelulares. La proteína asociada al receptor (GABARAP) se asocia a microtúbulos y a la subunidad γ del receptor facilitando su transporte. Los receptores se anclan a la membrana por medio de gefirina, una proteína de andamiaje. La endocitosis del receptor está mediada por clatrina. La proteína adaptadora de clatrina AP2 se une a las subunidades β y γ del receptor a internalizarse. La vesícula endocitada podrá ingresar a la vía de reciclado o a la de degradación. Tomado de Farb, Steiger *et al.* 2007.

4.3. Difusión lateral

Como se mencionó anteriormente, el número de receptores presentes en la postsinapsis está directamente relacionado con la eficacia sináptica. Uno de los

mecanismos descritos de regulación es la difusión lateral dentro de la membrana plasmática, desde regiones extrasinápticas o perisinápticas a regiones sinápticas y viceversa.

La difusión lateral está regulada por una serie de proteínas que son las responsables de la localización sináptica del receptor. La proteína de andamiaje gefirina interacciona con proteínas asociadas a membrana y proteínas asociadas al citoesqueleto. La regulación del ensamblado de este complejo controla la formación de agregados de receptores en la zona sináptica o extrasináptica. Los agregados de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 1/2/3$, $\beta 2/3$, $\gamma 2$ interaccionan con gefirina y dicha interacción está regulada por la fosforilación tanto de gefirina como de la subunidad $\gamma 2$ del receptor. Los receptores conteniendo las subunidades $\alpha 5\beta\gamma 2$ se agregan en la zona extrasináptica mediante la interacción con radixina, una proteína de andamiaje que también es regulada por fosforilación (Jacob, Bogdanov *et al.* 2005).

Si bien las proteínas de andamiaje regulan la difusión lateral del receptor, la composición de la membrana plasmática también podría influir en la movilidad, ya que se ha visto que los receptores GABA_A colocalizan con zonas de mayor fluidez (*lipid rafts*) (Dalskov, Immerdal *et al.* 2005).

5. Regulación del receptor GABA_A dependiente de su activación

Diversas líneas de investigación indican que la activación prolongada de los receptores GABA_A puede regular el número, la distribución intracelular y la función de los mismos.

5.1. Regulación del número de receptores

5.1.1. Endocitosis

Diferentes evidencias sugieren que la exposición prolongada a moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A produce un aumento en la internalización de los receptores. En ratones tratados con benzodiazepinas se observó un aumento en la unión máxima de benzodiazepinas en una fracción de vesículas revestidas con clatrina (Barnes 1996). Por otro lado, experimentos realizados en una línea celular de insectos sugieren que la exposición prolongada a benzodiazepinas induce un aumento en la internalización de los receptores GABA_A (Ali y Olsen 2001). Ha sido hipotetizado (Barnes 2000) que el aumento en la endocitosis de los receptores GABA_A inducida por moduladores alostéricos positivos constituye una primera señal intracelular que conduce finalmente a cambios en los niveles de la subunidades del receptor.

5.1.2. Degradación

Estudios realizados en cultivos neuronales de corteza cerebral indican que la exposición a GABA induce secuencialmente un aumento en la internalización de receptores seguido por un incremento en la degradación de los mismos (Calkin y Barnes 1994). Ha sido recientemente demostrado que el tratamiento de neuronas hipocampales durante 24 horas con fluracepam reduce la cantidad de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 2$ en superficie, por un aumento en la degradación por vía lisosomal de estos receptores luego de la endocitosis (Jacob, Michels *et al.* 2012).

5.1.3. Transcripción

Diversos trabajos demuestran que la exposición a agonistas o moduladores alostéricos del receptor GABA_A induce cambios en el nivel de expresión de las

subunidades del receptor. El tratamiento de cultivos corticales con alopregnanolona, por ejemplo, produce cambios en la expresión de genes de algunas de las subunidades del receptor GABA_A (Poulter, Ohannesian *et al.* 1997). Una exposición aguda de cultivos de células granulares de cerebelo a flunitracepam produce una disminución en los niveles de ARNm de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2/3$ (Johnston, Price *et al.* 1998). La administración crónica de fluracepam produce tolerancia y conjuntamente se han observado cambios en los niveles, tanto de proteína como de ARNm, de ciertas subunidades del receptor GABA_A, en determinadas áreas del cerebro (Chen, Huang *et al.* 1999; Tietz, Huang *et al.* 1999). La relación entre la tolerancia a benzodiazepinas y los cambios en los niveles de expresión de las subunidades del receptor aún no ha sido dilucidada.

Ha sido demostrado que la exposición crónica de cultivos neuronales a GABA induce una reducción en el número de receptores GABA_A que es el resultado de la represión transcripcional de los genes de las subunidades del receptor (Lyons, Gibbs *et al.* 2000; Russek, Bandyopadhyay *et al.* 2000; Lyons, Land *et al.* 2001). Este proceso es mediado por la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VGCC) de tipo L (Lyons, Land *et al.* 2001).

5.2. Regulación de la función del receptor

5.2.1. Desensibilización

La desensibilización es una propiedad común de los receptores de neurotransmisores. Comienza rápidamente con la aplicación de GABA pero también revierte rápidamente al retirar el neurotransmisor. Es un fenómeno identificado como el decaimiento de las corrientes del receptor GABA_A inducidas por una exposición a GABA. La cinética de este decaimiento es bifásica y el mecanismo por el cual se produce parece

estar más asociado a una disminución en la frecuencia de apertura del canal que con una disminución del intervalo de tiempo en estado abierto (Hamill, Bormann *et al.* 1983). La probabilidad de re-apertura del canal durante el proceso de desensibilización se mantiene alta mientras que el GABA permanezca asociado a su receptor (Jones y Westbrook 1995). Los mecanismos moleculares por los cuales se produce la desensibilización del receptor GABA_A aún no se conocen.

5.2.2. Fosforilación

La fosforilación y defosforilación son mecanismos ampliamente descritos de regulación de la actividad de los canales iónicos. El dominio intracelular mayor (ubicado entre las regiones TM3 y TM4) de algunas de las subunidades del receptor GABA_A posee sitios de fosforilación tanto para serina/treonina como para tirosina quinasas (Moss y Smart 1996). Ha sido principalmente estudiada la fosforilación de las subunidades β y $\gamma 2$ del receptor. Las subunidades $\beta 1-3$ poseen sitios de fosforilación en treonina y serina, mientras que la subunidad $\gamma 2$, puede ser fosforilada tanto en residuos treonina y serina como en residuos tirosina (Moss, Doherty *et al.* 1992; Moss, Smart *et al.* 1992; Jurd, Tretter *et al.* 2010). En la tabla 3 se muestran las subunidades susceptibles a ser fosforiladas, los sitios de fosforilación, y una serie de quinasas que se ha demostrado que fosforilan al receptor *in vitro*.

Tabla 3: Subunidades, residuos fosforilables y quinasas involucradas en la fosforilación del receptor GABA_A. PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc; PKC: proteína quinasa dependiente de calcio; PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc; CaMKII: proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina; Src: proteína quinasa de sarcoma; Fyn: proteína quinasa Fyn.

Subunidad	Residuo	Quinasa
β1	Serina 409	PKA, PKC, PKG, CaMKII
β2	Serina 410	PKA, PKC, PKG, CaMKII
β3	Serina 409	PKA, PKC, PKG, CaMKII
γ2S	Serina 327	PKC, CaMKII
γ2L	Serina 327 y 343 Tirosina 365 y 367	PKC, CaMKII, Src, Fyn

Numerosos estudios han descripto que la fosforilación del receptor GABA_A induce alteraciones en las constantes cinéticas del canal (tiempo de apertura del canal y tasa de desensibilización) y sensibilidad a agentes farmacológicos (Poisbeau, Cheney *et al.* 1999; Brandon, Delmas *et al.* 2000; Brandon, Jovanovic *et al.* 2002; Houston, Hosie *et al.* 2008). La fosforilación del receptor GABA_A puede aumentar o disminuir la actividad del receptor dependiendo del área cerebral, la composición de subunidades del receptor, la quinasa involucrada, y del residuo fosforilado (Houston, Lee *et al.* 2007; Houston, He *et al.* 2009). Por otro lado, cambios en el estado de fosforilación del receptor pueden producir diferentes efectos en el tráfico del receptor desde y hacia la membrana plasmática (Brandon, Jovanovic *et al.* 2002; Kittler y Moss 2003).

Las vías de señalización que controlan la fosforilación del receptor GABA_A no se conocen completamente. Existen evidencias indicando que la activación de receptores de acetilcolina muscarínicos, de serotonina tipo 4 y la activación por BDNF de receptores

con actividad de quinasa de tirosina de tipo B (TrKB) modulan la función de los receptores GABA_A a través de mecanismos de fosforilación (Kittler y Moss 2003).

Ciertos estudios indican que tratamientos crónicos con benzodiazepinas inducen cambios en el estado de fosforilación del receptor GABA_A. Experimentos de exposición crónica a diazepam en líneas celulares expresando receptores recombinantes sugieren que la fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) regula la función del receptor GABA_A (Ali y Olsen 2001). Por otro lado, estudios realizados en cultivos de cerebelo indican que la activación de la proteína quinasa C (PKC) está involucrada en la regulación de los niveles de las subunidades del receptor GABA_A inducida por la exposición a flurazepam (Johnston, Price *et al.* 1998).

5.2.3. Desacoplamiento

Exposiciones prolongadas de cultivos corticales a GABA y moduladores alostéricos positivos, tales como benzodiazepinas, neuroesteroides, barbitúricos y etanol, inducen una disminución de la interacción alostérica entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas, fenómeno llamado desacoplamiento (Roca, Rozenberg *et al.* 1990; Roca, Schiller *et al.* 1990; Lyons, Gibbs *et al.* 2000). Por otro lado, se ha observado que tratamientos prolongados con benzodiazepinas en roedores *in vivo* producen tolerancia a sus efectos farmacológicos junto con desacoplamiento de las interacciones alostéricas del receptor. Si bien se ha sugerido que el desacoplamiento es uno de los posibles mecanismos responsables del desarrollo de la tolerancia a las benzodiazepinas, no ha sido aún demostrado. Las bases moleculares del desacoplamiento aún se desconocen.

6. Caracterización de cultivos neuronales primarios de corteza cerebral de rata

Los cultivos neuronales primarios constituyen un modelo experimental adecuado para estudiar los mecanismos moleculares de la regulación del receptor GABA_A. En un cultivo celular primario, las neuronas son removidas de su ambiente natural para que se desarrollen en un sistema bidimensional bajo condiciones controladas. Ha sido demostrado que diferentes tipos neuronales con determinadas características *in vivo* mantienen y/o desarrollan las mismas características morfológicas en un medio ambiente artificial, como lo es un cultivo de células en monocapa (Kriegstein y Dichter 1983). Estudios de microscopía electrónica indican que la ultraestructura de las neuronas en cultivo es muy similar a la de las neuronas *in vivo*. Además, ha sido demostrada la formación de múltiples tipos de sinapsis en los cultivos (Robert, Cloix *et al.* 2012).

La clasificación clásica de las neuronas corticales propone dos grandes grupos: las neuronas piramidales y las neuronas no piramidales o estrelladas (Sholl 1953). A su vez, las células no piramidales pueden clasificarse, teniendo en cuenta el patrón que adoptan sus ramificaciones dendríticas, en 2 subgrupos: multipolares y fusiformes. Las características morfológicas de cada uno de los grupos mencionados (Figura 8) se describen a continuación:

a) *Neuronas de tipo piramidales*: Poseen soma de forma triangular, una dendrita apical prominente, varias dendritas menores, y muchas espinas a lo largo de las dendritas (Figura 8 A y B).

b) *Neuronas fusiformes*: Los procesos dendríticos emergen en polos opuestos del soma y éste es de forma circular. Dependiendo si el proceso consta de una sola dendrita o

son múltiples dendritas pueden diferenciarse en bipolar o de doble penacho (Figura 8 C y D). Las neuronas bipolares poseen menor cantidad de espinas que las neuronas de doble penacho.

c) *Neuronas multipolares*: Poseen múltiples procesos salientes del soma, todos de largo similar y poseen variable cantidad de espinas dendríticas (Figura 8 E y F).

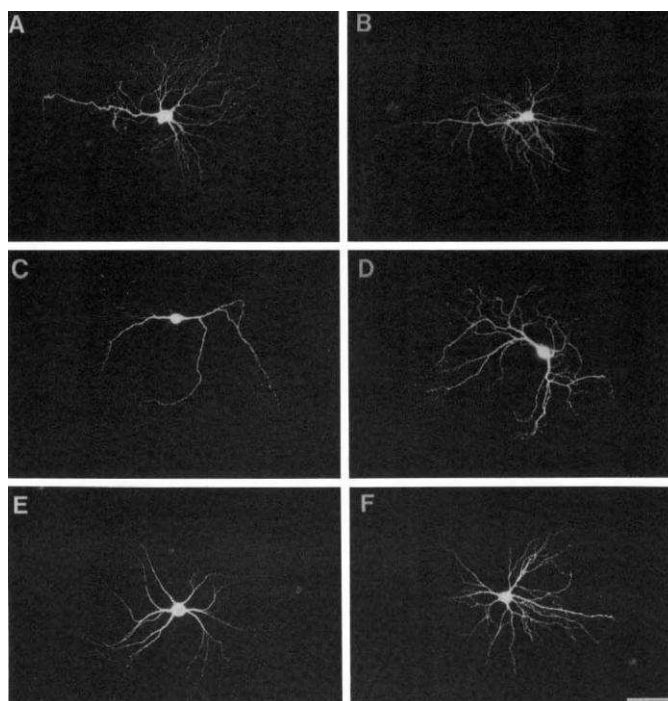


Figura 8: Morfología de neuronas de corteza cerebral de rata en cultivo. A y B) células piramidales. C) célula bipolar. D) célula fusiforme. E y F) células multipolares. Tomada de Kriegstein y Dichter 1983.

7. Antecedentes de la línea de investigación

La exposición crónica de cultivos neuronales a GABA durante 48 horas induce una reducción en el número de receptores GABA_A y desacoplamiento entre los sitios alostéricos de unión a GABA y a benzodiazepinas, con constantes de tiempo de 24-25 horas (Roca, Rozenberg *et al.* 1990). Se ha demostrado que la regulación del número de

receptores está acompañada por una reducción de la transcripción de las subunidades del receptor por medio de un mecanismo dependiente de la activación de VGCC de tipo L (Lyons, Gibbs *et al.* 2000; Lyons, Land *et al.* 2001).

Por otro lado, ha sido demostrado que la exposición crónica de cultivos neuronales a moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A durante 48 horas induce desacoplamiento, pero a diferencia del tratamiento crónico con GABA, este proceso ocurre en ausencia de variaciones en el número de receptores (Roca, Schiller *et al.* 1990; Friedman, Gibbs *et al.* 1996).

Existen evidencias que indican que los receptores GABA_A pueden ser activados persistentemente por altas concentraciones de GABA bajo condiciones fisiológicas. Como resultado de un solo potencial de acción, el GABA liberado puede alcanzar concentraciones de entre 1-5 mM en la brecha sináptica que luego decaen de manera bifásica con constantes de tiempo de 100 μ s y 2 ms (Clements 1996). Además, las neuronas GABAérgicas de la corteza y del cerebelo son neuronas de disparo rápido (*fast spiking neuron*) las cuales poseen una tasa basal de disparo de 5-50 Hz (equivalente a un potencial de acción cada 200 ms y 20 ms respectivamente) la cual puede mantenerse durante varios minutos (Mountcastle, Talbot *et al.* 1969; Ranck 1973; Hajos, Palhalmi *et al.* 2004). Por otro lado, la activación de receptores GABA_A postsinápticos persiste aún después de la eliminación del GABA de la brecha sináptica ya que el neurotransmisor es “atrapado” en el receptor (Bianchi y Macdonald 2001). La respuesta del GABA decae en forma bifásica con constantes de tiempo de aproximadamente 50 y 171 ms (Jones y Westbrook 1995; Bianchi y Macdonald 2001). Con las evidencias antes mencionadas, la alta tasa de disparo de las neuronas GABAérgicas y el decaimiento lento de la respuesta,

se demuestra que la activación de los receptores GABA_A puede perdurar durante varios minutos.

Con el fin de investigar si la regulación del receptor depende de su continua activación, nuestro grupo de investigación estudió el efecto de exposiciones breves de cultivos primarios de corteza cerebral de rata a GABA (0-20 minutos) seguidos por períodos de incubación en ausencia del neurotransmisor de 0 a 96 horas (Gravielle, Faris *et al.* 2005) (Figura 9). Los resultados indican que una aplicación de 5-10 minutos ($t_{1/2} = 3$ minutos) de GABA es suficiente para iniciar un proceso que produce desacoplamiento horas más tarde ($t_{1/2} = 12$ horas) en ausencia de cambios en el número de receptores. El desacoplamiento es un proceso reversible ya que no es detectado luego de 72 horas de incubación en ausencia de GABA. Estas observaciones indican que la regulación del número de receptores y el desacoplamiento ocurren a través de diferentes mecanismos y pueden ser separados temporalmente utilizando este paradigma.

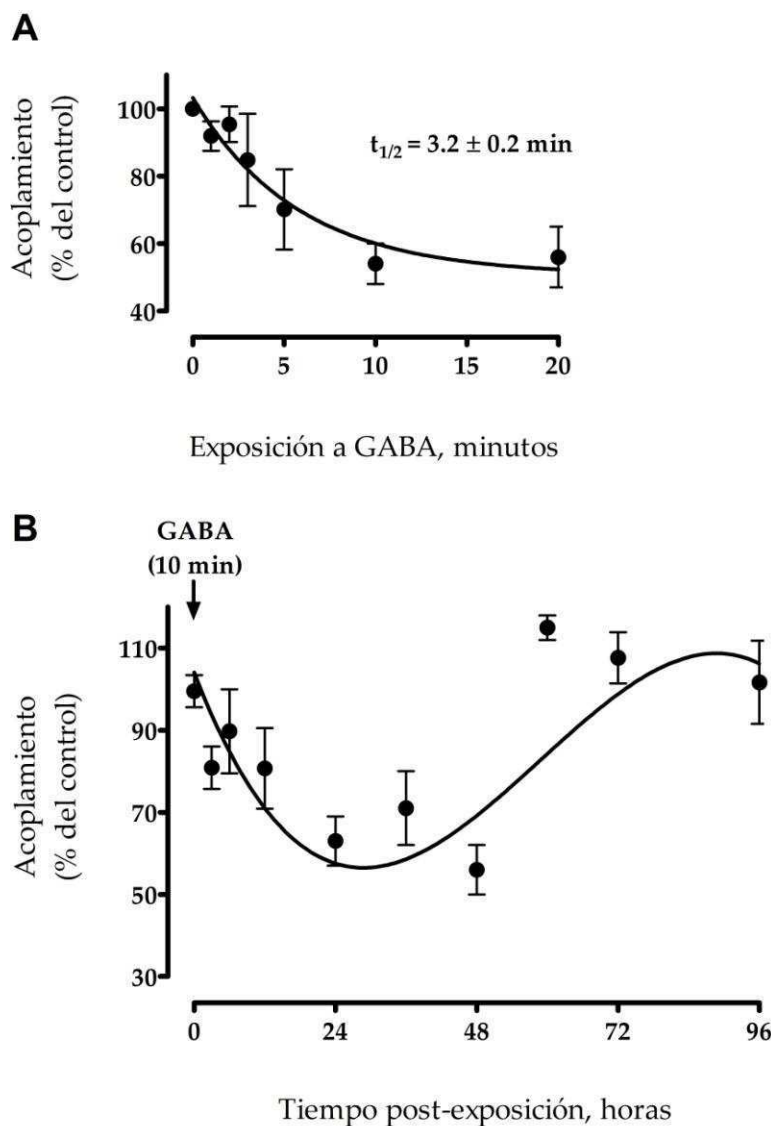


Figura 9: Curso temporal del desacoplamiento entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas inducido por una breve exposición a GABA. A) Cultivos neuronales incubados con GABA 1 mM durante los tiempos indicados y cosechados 48 horas más tarde. B) Cultivos incubados con GABA 1 mM durante 10 minutos y luego cosechados a los tiempos indicados. Tomado de Gravielle, Faris *et al.* 2005.

El mecanismo de desacoplamiento depende de la activación del receptor ya que es inhibido mediante la co-incubación con picrotoxina, un bloqueante del canal de cloruro. El desacoplamiento es inducido en forma dependiente de la concentración, con una concentración efectiva media de 460 μM . Además, involucra un proceso transcripcional pues el desacoplamiento es prevenido en presencia de un inhibidor de la transcripción

(α -amanitina) (Gravielle, Faris *et al.* 2005). Por otro lado, se observó que la breve activación del receptor GABA_A induce una disminución selectiva en los niveles de ARNm y proteína de las subunidades α 1, α 3 y β 1-3 sin cambios en las subunidades α 2, α 4, α 5 y γ 2.

El desacoplamiento inducido por la activación del receptor es, por lo tanto, relevante en condiciones fisiológicas de exposición persistente al neurotransmisor y en condiciones farmacológicas de administración prolongada de benzodiazepinas.

Objetivos

Objetivo general

En trabajos previos se demostró que una activación breve del receptor GABA_A induce un desacoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas sugiriendo que es un proceso regulatorio que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Además, este fenómeno de desacoplamiento ocurre independientemente de la regulación del número de receptores GABA_A.

El objetivo general del presente proyecto es investigar los mecanismos moleculares del desacoplamiento entre los sitios alostéricos del receptor inducido por su activación, utilizando un modelo de cultivos primarios neuronales de corteza cerebral de rata.

Objetivos específicos

1. Determinar si una exposición breve de cultivos neuronales primarios a moduladores alostéricos del receptor GABA_A, tales como benzodiazepinas y neuroesteroides, también induce un desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas.

2. Investigar si el desacoplamiento está mediado por un cambio en la composición de subunidades del receptor, resultando en receptores con menor grado de interacción entre los sitios de unión alostéricos.

3. Experimentos realizados en líneas celulares expresando receptores GABA_A recombinantes sugieren que el mecanismo de desacoplamiento involucra un aumento en la endocitosis de los receptores. En este proyecto se evaluará si un aumento en la internalización de receptores GABA_A forma parte del mecanismo de desacoplamiento observado en neuronas.

4. En trabajos previos se demostró que el desacoplamiento inducido por GABA es bloqueado por inhibidores de las proteínas quinasas PKA y PKC. En este proyecto se investigará el rol de la activación de estas proteínas quinasas como parte del mecanismo de desacoplamiento.

Materiales y métodos

1. Cultivos neuronales primarios

Los cultivos fueron realizados a partir de corteza cerebral de embriones de rata (Sprague-Dawley) de 18 días de gestación (Gravielle, Faris *et al.* 2005). Se removieron los cerebros de los embriones, se colocaron en solución de Hank's (Sigma) estéril, y se disecaron las cortezas bajo lupa, con un aumento de 25X. El tejido fue luego triturado con tijeras y disgregado mecánicamente haciéndolo pasar, 15 veces aproximadamente, a través de una pipeta serológica. El material se centrifugó por 5 minutos a 500 *g* y el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio de siembra (medio Neurobasal™, 10% suero fetal bovino, 100 unidades/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina, y 2 mM glutamina, Invitrogen). Nuevamente se disgregó el material utilizando una pipeta serológica y se lo incorporó al resto del medio de siembra. Se sembraron 10 ml de la suspensión celular a una densidad de $\frac{3}{4}$ cortezas por cada placa de Petri de 100 mm de diámetro (Nunc), pre-tratada con poli-L-lisina (Sigma, 0,1 mg/ml). Para los estudios inmunocitoquímicos, la suspensión fue colocada en placas de Petri de 35 mm de diámetro (Corning) conteniendo cada placa 5 discos de vidrio de 12 mm de diámetro (Marienfeld GmbH), pre-tratados con poli-L-lisina, a una densidad de 12.500 células/cm². Los cultivos fueron incubados a 37°C en 5% CO₂, y luego de 1 hora el medio de siembra fue aspirado y reemplazado por 14 ml medio libre de suero conteniendo suplemento B27 (Invitrogen) en las placas de 100 mm y por 2 ml del mismo medio en las placas de 35 mm.

2. Tratamientos

En el día 7 de desarrollo *in vitro*, se tomaron 7 ml de medio de las placas de 100 mm y se guardaron a 37°C (medio condicionado). Los cultivos fueron luego tratados como sigue:

a) Tratamiento con GABA y moduladores alostéricos del receptor GABA_A (Figuras 13, 14, 15 y 21)

A las placas conteniendo 7 ml de medio se les adicionaron 70 µl de solución concentrada de GABA (Sigma, 1 mM final), diacepam (Roemmers, 50 µM final), alopregnanolona (Sigma, 10 µM final) o de la solución vehículo y se mantuvieron en la incubadora durante 10 minutos. Al finalizar la incubación, se retiró el medio y las placas fueron lavadas dos veces con 5 ml de solución de Hank's a 37°C. Los 7 ml de medio condicionado que se mantuvieron a 37°C fueron adicionados nuevamente a las placas de cultivo y las células se incubaron durante 48 horas hasta su recolección.

b) Tratamientos con GABA y sacarosa (Figura 19)

Se agregaron a los cultivos 70 µl de solución concentrada de GABA (1 mM final), sacarosa (Sigma, 0,5 mM final), GABA más sacarosa o vehículo, y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Los cultivos fueron lavados e incubados con medio condicionado durante 48 horas, como se describió en la sección anterior.

c) Tratamientos con GABA e inhibidores de proteínas quinasas (Figura 20)

Las placas fueron pretratadas durante 10 minutos a 37°C con 70 µl de soluciones concentradas de inhibidores de quinasas: 5 µM final de queleretrina (inhibidor de PKC,

Sigma), 1 μM final de H-89 (inhibidor de PKA, Sigma) o vehículo. Posteriormente se adicionaron a los cultivos 70 μl de soluciones concentradas de GABA (1 mM final) o vehículo y se incubaron durante 10 minutos más a 37°C. Al final de estas incubaciones, las placas fueron lavadas e incubadas en medio condicionado durante 48 horas, como se mencionó anteriormente.

d) Tratamientos con GABA y nifedipina (Figura 22)

Se agregaron a los cultivos 70 μl de soluciones concentradas de GABA (1 mM final), nifedipina (Sigma, 10 μM final), GABA más nifedipina o vehículo, y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas e incubadas con medio condicionado durante 48 horas, como se explicó anteriormente.

Los tratamientos correspondientes a los experimentos de internalización (Figuras 16, 17 y 18) se describen en la sección “Inmunocitoquímica” y en la sección “Ensayo de biotinylación para estudiar la internalización de receptores”.

3. Preparación de soluciones

Las soluciones de GABA y sacarosa fueron preparadas en medio Hank's. Las soluciones de diacepam, alopregnanolona, queleretrina, H-89, y nifedipina fueron preparadas en Me_2SO . En todos los casos la concentración máxima de Me_2SO en el medio de cultivo fue de 0,1%.

4. Ensayo de unión de [^3H]flunitracepam

Luego del tratamiento los cultivos fueron incubados por 48 horas. Posteriormente las células fueron lavadas 2 veces con 5 ml de *buffer* fosfato salino (PBS) frío, colectadas

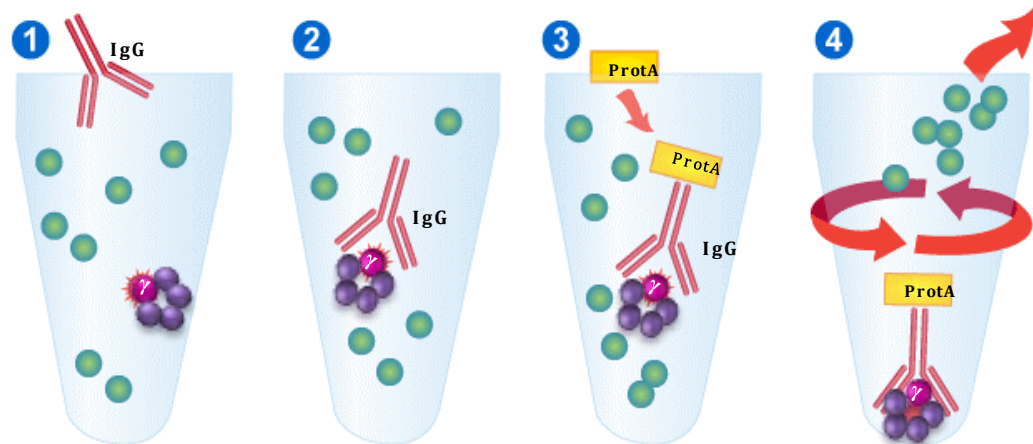
con la ayuda de un rastrillo plástico en 2 ml de PBS y centrifugadas a 500 *g* durante 5 minutos. El sedimento fue homogeneizado en *buffer* conteniendo EDTA 1 mM y PMSF 1 mM en un homogeneizador de vidrio con émbolo de Teflon. Este homogenato fue sometido a diálisis durante toda la noche contra 1,5 l de *buffer* fosfato (4 cambios de *buffer*). La concentración de proteínas en el homogenato fue medida por Bradford. Alícuotas del homogenato, conteniendo aproximadamente 100 µg de proteína, se incubaron en un volumen final de 0,5 ml con 0,5 nM [³H]flunitracepam ([³H]FNZ, PerkinElmer Life Sciences) en presencia o ausencia de GABA 1 mM, a 0°C durante 1 hora. La unión inespecífica fue determinada en presencia de diacepam 100 µM. La reacción se detuvo agregando 3 ml de PBS frío y filtrando inmediatamente la suspensión con vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B). Los filtros se lavaron 2 veces con 3 ml de PBS frío y la radioactividad retenida en los mismos se cuantificó mediante un contador de centelleo líquido en líquido de centelleo Optiphase Hisafe 2 (PerkinElmer Life Sciences). El acoplamiento representa la potenciación de la unión de [³H]FNZ por GABA y se lo calculó como: (% potenciación tratado / % potenciación control) x 100. El desacoplamiento se define como la disminución de la potenciación de la unión de [³H]FNZ por GABA y se estimó como: [1 - (% potenciación tratado / % potenciación control)] x 100 (Gravielle, Faris *et al.* 2005).

5. Inmunoprecipitación del receptor GABA_A y *western blot*

Luego de los tratamientos las neuronas fueron colectadas, como se explicó anteriormente, en 2 ml de PBS y centrifugadas a 500 *g* durante 5 minutos. El sedimento fue homogeneizado en *buffer* deoxicolato conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 8,5, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 0,5%, fosfatidilcolina 0,05%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, incubado por 20 minutos con rotación vertical a 4°C y centrifugado a 27.000 *g* por 30

minutos a 4°C (Jechlinger, Pelz *et al.* 1998). El sedimento obtenido fue descartado. Se midió la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Bradford y se diluyó este lisado hasta obtener una concentración de 1 mg de proteína/ml con el mismo *buffer* deoxicolato descrito anteriormente. Con el objeto de reducir el efecto de la unión inespecífica de la proteína A-agarosa a proteínas del lisado, se realizó un paso de pre-aclaramiento mediante incubación de 500 µl de este lisado durante 40 minutos a 4°C con 20 µl de proteína A-agarosa (Santa Cruz) con agitación. Luego se centrifugó el lisado durante 5 minutos a 2.000 *g* y el sobrenadante fue incubado durante toda la noche a 4 °C con rotación vertical con 2 µg de un anticuerpo de conejo (Alpha Diagnostic) que reconoce la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A (Figura 10). Los inmunocomplejos fueron precipitados adicionando 20 µl de proteína A-agarosa e incubando durante toda la noche a 4°C con rotación vertical. Las esferas de agarosas unidas al inmunocomplejo fueron precipitadas mediante centrifugación (5 minutos a 4°C, 2.000 *g*). Los sedimentos fueron lavados 3 veces con 500 µl de *buffer* deoxicolato mediante resuspensión seguida de centrifugación (Ravindran y Ticku 2006). El sedimento final fue resuspendido en 30 µl de *buffer* de siembra conteniendo 5% de β -mercaptoetanol y calentado por 5 minutos a 95°C para separar al inmunocomplejo de las esferas de agarosa. Las proteínas fueron separadas en un gel de acrilamida 10% (125 mV) desnaturalizante y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (25 mV durante 2 horas). La membrana fue bloqueada durante 2 horas con leche descremada 5% en *buffer* Tris salino 20 mM (TBS) conteniendo 0,1% de Tween-20. Las membranas fueron luego incubadas con anticuerpos de cabra que reconocen las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ del receptor GABA_A (Santa Cruz), diluidos 1:200 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego se incubaron con un anticuerpo anti IgG de cabra (Santa Cruz), diluido 1:2.000 en solución de bloqueo, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano durante 1,5 horas a temperatura ambiente

con agitación. La señal inmunorreactiva fue detectada por quimioluminiscencia (ECL detection kit, Pierce). Luego de un proceso de desnudamiento (*stripping*) ácido con una solución de glicina 1 M y SDS 2%, pH 2,5, la membrana fue incubada con un anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, dilución 1:4.000 en solución de bloqueo) durante 1,5 horas a temperatura ambiente y la señal fue detectada por quimioluminiscencia. Las bandas correspondientes a las diferentes subunidades fueron normalizadas con respecto a la señal del anticuerpo anti $\gamma 2$ utilizado para inmunoprecipitar al receptor. Se realizaron dos experimentos controles (controles negativos) para asegurar la especificidad de la inmunoprecipitación. En el primero se llevó a cabo el ensayo en ausencia del anticuerpo anti subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A utilizado para inmunoprecipitar al receptor, con el fin de descartar una unión inespecífica de proteínas del lisado a la proteína A-agarosa. El segundo experimento control se realizó incubando las membranas de nitrocelulosa sólo con el anticuerpo secundario anti IgG de cabra (omitiendo la incubación con los anticuerpos primarios de cabra anti subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$) con el objetivo de verificar que no reaccione con el anticuerpo de conejo anti subunidad $\gamma 2$ empleado en la inmunoprecipitación.

Co-immunoprecipitación

- 1- Se agregó anticuerpo anti $\gamma 2$ al homogenato.
- 2- Se incubó durante toda una noche.
- 3- Se agregó proteína A-agarosa y se incubó durante toda la noche.
- 4- Se precipitó el inmunocomplejo por centrifugación y se descartó el sobrenadante.

Figura 10: Descripción esquemática de la metodología utilizada para realizar la co-immunoprecipitación de las subunidades que conforman el receptor GABA_A.

6. Ensayo de biotilación para estudiar receptores de superficie

Luego del tratamiento con GABA las células fueron colocadas en hielo y lavadas con 5 ml de PBS frío conteniendo 1,5 mM de $MgCl_2$ y 0,2 mM de $CaCl_2$ (PBS/ Ca^{2+}/Mg^{2+}). A continuación se incubaron en hielo durante 20 minutos con 1 mg/ml de sulfo-NHS-SS-biotina (Thermo Scientific) en PBS/ Ca^{2+}/Mg^{2+} con agitación suave. La solución de biotina fue removida y los cultivos fueron lavados con una solución conteniendo glicina 100 mM en PBS/ Ca^{2+}/Mg^{2+} para bloquear la biotina libre. Luego de 2 lavados con 5 ml de PBS/ Ca^{2+}/Mg^{2+} , las células fueron colectadas con rastrillo en 2 ml de PBS y centrifugadas a 500 g durante 5 minutos. Las células en el sedimento fueron resuspendidas en *buffer* de lisis para ensayos de radio-immunoprecipitación (RIPA) conteniendo inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche). El homogenato fue incubado por 30 minutos a

4°C con rotación y luego centrifugado a 27.000 *g* durante 30 minutos. Luego de la determinación de la concentración de proteínas por Bradford, un volumen de sobrenadante conteniendo 500 µg de proteína fue incubado durante toda la noche a 4°C con 150 µl de neutravidina unida a esferas de agarosa (Thermo Scientific) con rotación vertical. Los complejos de neutravidina/biotina-proteína fueron precipitados por centrifugación a 2.000 *g* durante 5 minutos y lavados 3 veces con *buffer* RIPA conteniendo 500 mM de NaCl por medio de resuspensión seguida por centrifugación (Gabriel, Stevens *et al.* 2009). Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 35 µL de *buffer* de siembra, calentado durante 5 minutos a 95°C y centrifugado por 5 minutos a 2.000 *g*. Las proteínas contenidas tanto en los sobrenadantes resultantes de este paso de centrifugación, como en una fracción de los lisados totales (antes de la incubación con neutravidina) fueron separadas en un gel de acrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa como se describió previamente. Luego del paso de bloqueo, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo (Millipore) que reconoce la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A, utilizado en una dilución 1:200. Las señales fueron detectadas incubando la membrana con agitación, durante 1,5 hs a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo (Santa Cruz, dilución 1:2.000) acoplado a peroxidasa de rábano mediante quimioluminiscencia. La membrana fue sometida a un tratamiento de desnudamiento ácido e incubada, durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo (dilución 1:500) que reconoce a actina (Sigma). Posteriormente, la membrana fue incubada con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1,5 horas a temperatura ambiente, dilución 1:2.000). La señal de actina fue detectada por quimioluminiscencia. La señal inmunorreactiva de $\alpha 3$ fue normalizada con respecto a la señal de actina del lisado total.

La integridad de las membranas plasmáticas durante el experimento fue verificada por la ausencia de señal de actina en las muestras precipitadas con neutravidina.

7. Ensayos para estudiar la internalización de receptores GABA_A

7.1. Inmunocitoquímica

Luego de 7 días de incubación se aspiró el medio condicionado de las placas y se guardó a 37°C. Se marcaron los receptores GABA_A de superficie mediante la incubación de las neuronas vivas en cultivo con un anticuerpo monoclonal de ratón (Millipore) que reconoce una porción extracelular de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ del receptor (dilución 1:25 en medio condicionado) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se aspiró el medio y los cultivos fueron lavados con solución de Hank's. El medio condicionado fue adicionado nuevamente a los cultivos y éstos fueron tratados con GABA 1 mM o vehículo durante 10 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación, se realizaron 2 lavados con solución de Hank's, se agregó nuevamente medio condicionado y las placas fueron retornadas a la incubadora por 20 minutos más, para que ocurra la máxima internalización. En experimentos controles se omitió la incubación a 37°C (T0) para verificar que la internalización de los receptores durante la incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario fuese despreciable. Las células fueron luego fijadas en condiciones no permeabilizantes con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% - sacarosa 4% y lavadas 4 veces con PBS conteniendo glicina 0,2 M. Para bloquear los sitios inespecíficos se realizó una incubación durante 1 hora con albúmina de suero bovino al 10% en PBS. Los receptores conteniendo las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$, unidos al anticuerpo primario, que permanecieron en la superficie celular, fueron detectados mediante incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con Cy5 (Jackson), utilizado en una

concentración saturante (dilución 1:100 en solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y se procedió a permeabilizar la membrana de las células mediante incubación con una solución de Tritón X-100 0,3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para detectar los receptores internalizados unidos al anticuerpo primario, se incubaron las células con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con Alexa488 (Molecular Probes) durante 2 horas a temperatura ambiente en una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Al concluir la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y las placas fueron montadas en Mowiol sobre porta objetos de vidrio (van Rijnsoever, Sidler *et al.* 2005).

7.2. Ensayo de biotilación para estudiar la internalización receptores

Después de 7 días de desarrollo *in vitro*, los cultivos fueron colocados en hielo, se retiró el medio condicionado y se lo guardó a 37°C. Las placas fueron mantenidas en hielo, lavadas con 5 ml de *buffer* PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ e incubadas con 1 mg/ml de sulfo-NHS-SS-biotina en PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ durante 20 minutos con agitación suave (Figura 11). Luego las células fueron lavadas con 5 ml de *buffer* PBS/Ca²⁺/Mg²⁺e incubadas 2 veces durante 15 minutos con agitación con PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ conteniendo glicina 100 mM. Se agregaron nuevamente en las placas 7 ml de medio condicionado mantenido a 37°C y se adicionó GABA 1 mM o vehículo, en presencia de 100 µg/ml de leupeptina, un inhibidor de la degradación lisosomal. Los cultivos se incubaron por 10 minutos a 37°C. Al finalizar esta incubación, se lavaron 2 veces con solución de Hank's y se incubaron durante 20 minutos más a 37 °C con 7 ml de medio condicionado como en el ensayo anterior. Luego, se colocaron las placas en hielo y se incubaron 2 veces durante 15 minutos con agitación con *buffer* conteniendo glutatión 50 mM, NaOH 75 mM, NaCl 75 mM, EDTA 1 mM y albúmina

de suero bovino 1% para romper la unión de la biotina a las proteínas que permanecieron en la superficie celular. Para estimar la cantidad total de receptores GABA_A en superficie iniciales, se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos anteriormente, pero se omitió el paso de internalización y la incubación con el *buffer* conteniendo glutatión. En experimentos controles, para comprobar la eficiencia de la remoción de la biotina de la superficie por el *buffer* conteniendo glutatión, las células fueron mantenidas todo el tiempo en hielo y no fueron tratadas con GABA, para evitar el proceso de internalización de receptores. Finalmente, se realizaron 2 lavados con PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ y las células fueron colectadas con rastrillo en 2 ml de PBS. Luego de una centrifugación a 500 *g* durante 5 minutos, las células en el sedimento fueron resuspendidas en *buffer* RIPA conteniendo inhibidores de proteasas. El homogenato fue incubado por 30 minutos a 4°C con rotación y luego centrifugado a 27.000 *g* durante 30 minutos a 4°C. Las proteínas biotiniladas fueron precipitadas con neutravidina y analizadas por *western blot* como se mencionó anteriormente (Gabriel, Stevens *et al.* 2009). Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas y luego incubadas, durante toda la noche a 4°C, con el anticuerpo monoclonal de ratón utilizado en los experimentos anteriores que reconoce las subunidades β2 y β3 del receptor GABA_A (Millipore), utilizado en una dilución 1:500. La señal fue detectada incubando la membrana con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón (Santa Cruz) acoplado a peroxidasa de rábano con agitación, durante 1,5 hs a temperatura ambiente, mediante quimioluminiscencia. Las membranas fueron sometidas a un tratamiento de desnudamiento ácido e incubadas, durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo de conejo (dilución 1:500) que reconoce a actina. Luego se efectuó una incubación de 1,5 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (dilución 1:2.000) Las señales de las subunidades β2/3 internalizadas y en superficie, fueron

normalizadas con respecto a la señal de $\beta 2/3$ del lisado total. Nuevamente, la integridad de la membrana plasmática durante los experimentos se verificó por la ausencia de señal de actina.

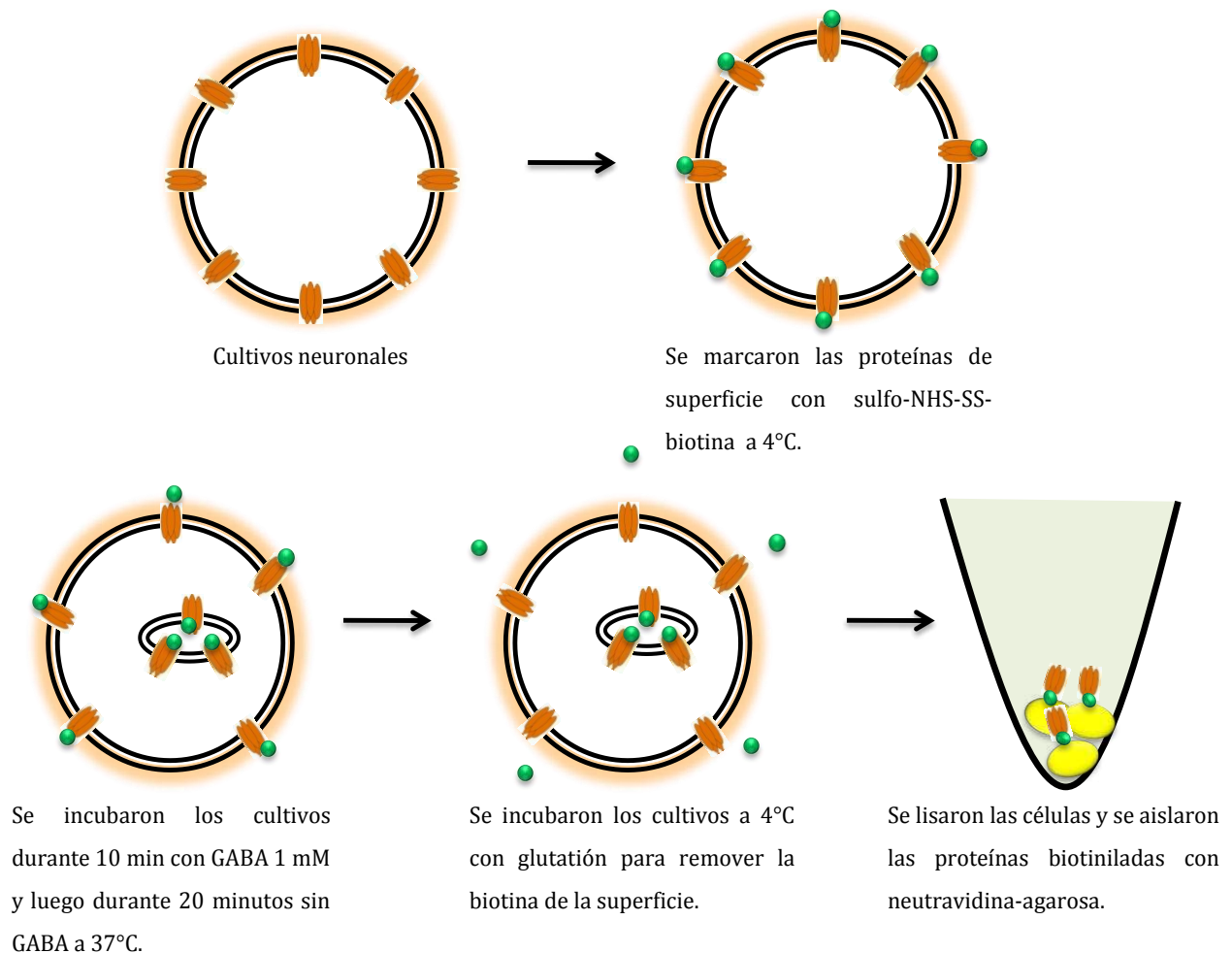


Figura 11: Descripción esquemática de la metodología utilizada en el ensayo de biotinylation para estudiar la internalización de receptores.

8. Ensayo de fosforilación de las subunidades $\gamma 2$ y $\beta 2$ del receptor $GABA_A$

Luego del tratamiento con GABA descrito anteriormente (punto 2a), las células fueron colocadas en hielo, lavadas dos veces con 5 ml de PBS frío, recolectadas con

rastrillo en 2 ml de PBS y centrifugadas a 500 *g* durante 5 minutos. Las células en el sedimento fueron resuspendidas en *buffer* HEPES conteniendo NaCl 0,3 N, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, Triton X-100 0,1%, β-glicerofosfato 0,5 mM, metavanadato de sodio 0,1 mM, 0,8 mM DTT y 1 mM PMSF, incubadas durante 20 minutos con rotación vertical a 4°C, y el lisado centrifugado a 27.000 *g* por 30 minutos a 4°C. Se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford y se diluyó el lisado hasta una concentración de aproximadamente 1 mg proteína/ml con el mismo *buffer* HEPES descrito anteriormente. Se calentó una alícuota de 500 μl de este lisado durante 5 minutos a 95 °C con el fin de separar posibles complejos de subunidades. Luego se le adicionaron 2 μg de anticuerpos de conejo que reconocen las subunidades γ2 o β2 del receptor GABA_A (Alpha Diagnostic y Chemicon, respectivamente). Los inmunocomplejos fueron precipitados utilizando proteína A-agarosa, como se describió anteriormente. El sedimento fue lavado 3 veces con 500 μl de *buffer* HEPES, mediante resuspensión seguida de centrifugación. El sedimento final fue resuspendido en 30 μl de *buffer* de siembra conteniendo 5% de β-mercaptoetanol, calentado durante 5 minutos a 95°C y centrifugado para separar las proteínas de las esferas de agarosa. Las proteínas fueron separadas en un gel de acrilamida desnaturalizante y transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió previamente. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos de ratón que reconocen a los aminoácidos serina o tirosina fosforilados (Millipore, dilución 1:500). Las mismas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo secundario anti IgG de ratón (Santa Cruz, incubación 1,5 horas, dilución 1:2.000) acoplado a peroxidasa de rábano. Las membranas fueron sometidas a un tratamiento de desnudamiento ácido y la señal inmunorreactiva de la IgG de conejo fue cuantificada como se describió anteriormente para normalizar los resultados (Ravindran y Ticku 2006). Se realizaron los dos controles negativos,

descriptos en el punto 5, para determinar la especificidad de la unión de la proteína A-agarosa a los anticuerpos empleados en la inmunoprecipitación de las subunidades $\gamma 2$ y $\beta 2$ del receptor y para verificar que no se produzca una reacción cruzada entre el anticuerpo secundario anti IgG de ratón y los anticuerpos de conejo (anti subunidades $\gamma 2$ y $\beta 2$) utilizados en la inmunoprecipitación.

9. PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total fue extraído utilizando un kit comercial (RNeasy midi kit, Qiagen). Los cebadores (Tecnolab) y la sonda (TaqMan, Applied Biosystem) para la amplificación de la subunidad $\alpha 3$ fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystem). La sonda y los cebadores para amplificar el ARN ribosomal (ARNr) 18S fueron comprados a Applied Biosystem. Las secuencias de los cebadores fueron 5'-CACCATGACCACCTTGAGTATCA-3' y 5'-CCGTCGCGTATGCCACTT-3'. La secuencia de la sonda fue 5'-TGCCAGAAACTCTTTAC-3'. Estas secuencias fueron diseñadas para amplificar la región que codifica para el bucle citoplasmático ubicado entre los dominios TM3 y TM4, un área con una secuencia de aminoácidos diferente entre los distintos tipos de subunidades del receptor. Se realizó un ensayo de PCR cuantitativa de un solo paso utilizando una mezcla enzimática comercial (AgPath ID™ one-step RT PCR kit, Ambion). El equipo empleado para los ensayos fue el modelo 7500 de Applied Biosystem. La curva estándar para la cuantificación relativa se realizó utilizando un rango de concentraciones de 0,1 a 4 ng/ μ l de ARN total aislado de cultivos controles tratados con vehículo (Figura 12). Cada reacción fue realizada por triplicado en un volumen total de 25 μ l conteniendo: la sonda para la subunidad $\alpha 3$ (250 nM), cebadores para la subunidad $\alpha 3$ (900 nM), sonda para el ARNr de 18S (50 mM) y cebadores para el ARNr 18S (50 nM). Las condiciones de incubación fueron: 45°C durante 10 minutos, 95°C durante 10 minutos

seguido por 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 45 segundos. La cantidad relativa del ARN de la subunidad $\alpha 3$ fue normalizada con respecto a la cantidad relativa del ARNr 18S (control interno) (Gravielle, Faris *et al.* 2005).

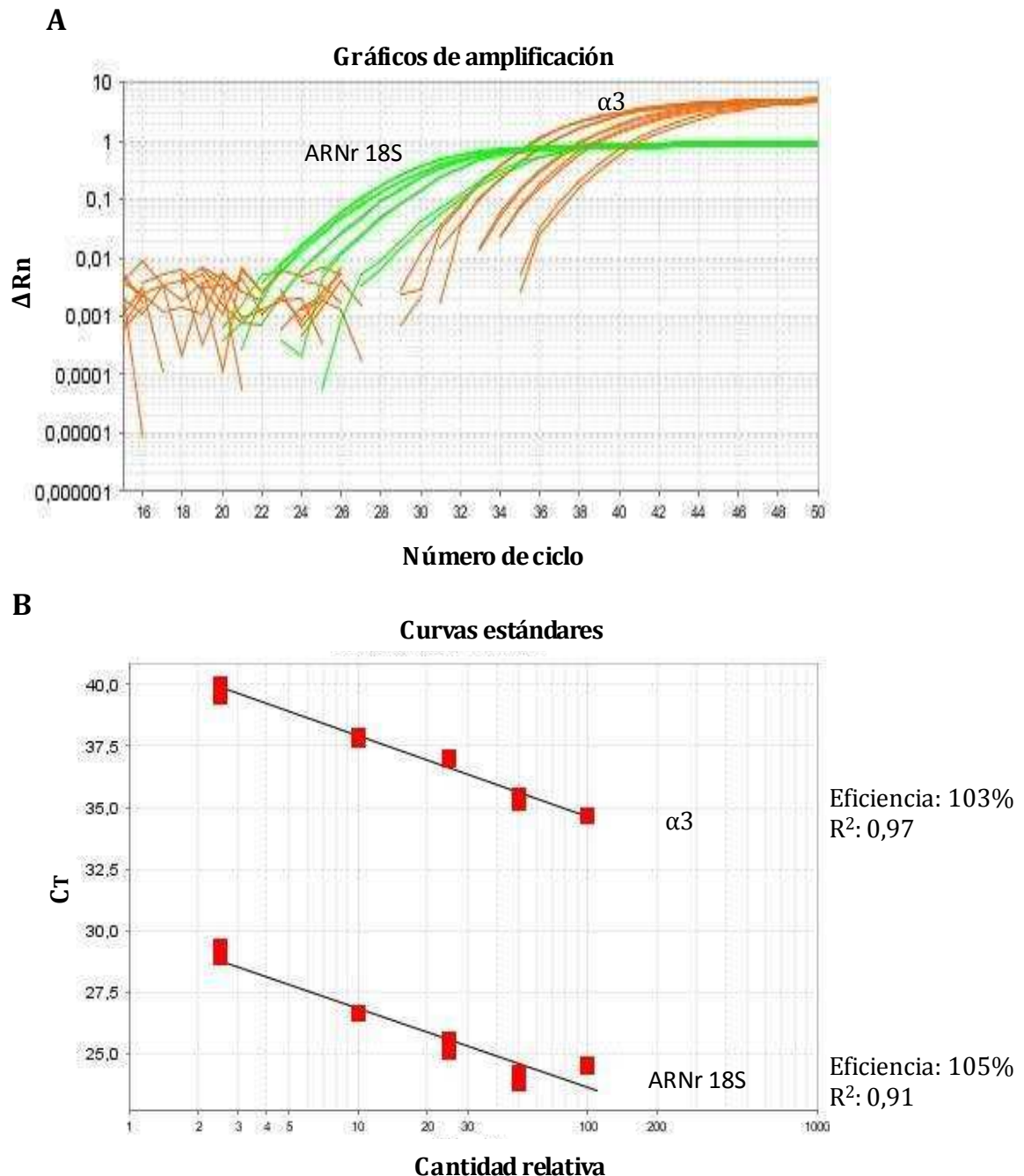


Figura 12: Experimento representativo de PCR cuantitativa en tiempo real. A) Gráficos de amplificación utilizados para generar las curvas estándares. Se representa la magnitud de la fluorescencia normalizada con respecto a la referencia pasiva, en función del

número de ciclo. B) Curva estándar. Se representa el ciclo umbral (CT) en función de la cantidad inicial relativa de ARN total.

10. Análisis de los datos

Western blots

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

Inmunocitoquímica

Las imágenes fueron capturadas por un microscopio confocal de epifluorescencia Olympus (Instituto de Fisiología, Biología molecular y Neurociencias, IFIByNE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA) a un aumento de 60x utilizando un objetivo de inmersión en aceite. Todas las imágenes fueron capturadas manteniendo las mismas condiciones de adquisición. Para cada campo conteniendo entre 1 a 3 neuronas se cuantificó la intensidad de la fluorescencia y el número de agregados de receptores (partículas) utilizando el programa Image J del *National Institute of Health* (NIH). La cuantificación se realizó con imágenes de 8 bits luego de restarles el fondo y ajustarlas a un umbral. Se cuantificó la densidad integrada, tanto para la marca correspondiente a receptores en superficie como para la marca correspondiente a receptores internalizados. El porcentaje de receptores internalizados se calculó estimando la relación entre las densidades integradas de los receptores internalizados y de los receptores totales (receptores internalizados más receptores en superficie). El número de agregados de receptores se calculó utilizando el analizador de partículas, estableciendo una región de

interés de tamaño constante en las neuritas y un rango de tamaño de detección de partículas de 0,05-1 μm^2 (Cuitino, Godoy *et al.* 2010).

Análisis estadístico

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

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

Resultados

1. Efecto de moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A sobre el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha observado que una exposición de 5 a 10 minutos ($t_{1/2}=3,2$ minutos) de cultivos de corteza cerebral de rata a GABA 1 mM, induce desacoplamiento horas más tarde ($t_{1/2}=12$ horas), con un efecto máximo entre las 24 y 48 horas (Gravielle, Faris *et al.* 2005). Esta exposición breve al neurotransmisor, a diferencia de lo que ocurre con exposiciones crónicas de 48 horas, no produce cambios en el número de receptores (Gravielle, Faris *et al.* 2005). Este paradigma nos permitió estudiar las bases moleculares del desacoplamiento en forma independiente al proceso de regulación del número de receptores.

Con el objetivo de determinar si el desacoplamiento del receptor GABA_A también puede ser inducido por medio de exposiciones breves a moduladores alostéricos positivos del receptor, se estudió el efecto de benzodiazepinas y neuroesteroides. Para ello, cultivos neuronales de corteza cerebral fueron tratados durante 10 minutos con GABA, diazepam, alopregnanolona o vehículo. El diazepam es una benzodiazepina clásica, usada ampliamente en la clínica. La alopregnanolona es uno de los neuroesteroides de mayor eficacia como modulador del receptor GABA_A que, en la concentración utilizada (10 μ M), puede activar al receptor GABA_A en ausencia de GABA (Akk, Covey *et al.* 2007). Se recolectaron las células 48 horas más tarde y se midió el grado de acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas como la potenciación de la unión de [³H]FNZ por GABA. Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto a cultivos controles tratados con vehículo.

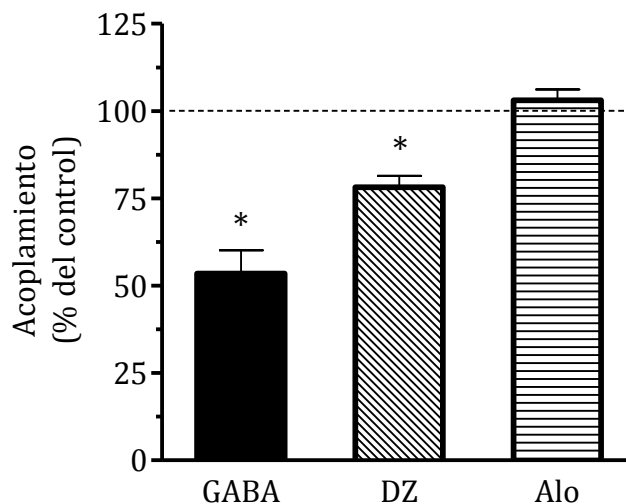


Figura 13: Efecto de moduladores alostéricos positivos del receptor $GABA_A$ sobre el grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas Las células fueron tratadas con 1 mM de GABA (GABA), 50 μ M de diazepam (DZ), 10 μ M de alopregnanolona (Alo) o vehículo (control) durante 10 minutos, lavadas, y luego incubadas durante 48 horas. El grado de acoplamiento se midió como la potenciación de la unión de $[^3H]FNZ$ por GABA y se lo calculó como porcentaje con respecto al control (100%). Se representan las medias \pm SEM de 6-17 determinaciones independientes. Prueba *t* de *Student* de una sola muestra, * significativamente diferente de 100, $p < 0,05$.

Como se observa en la Figura 13, en los cultivos tratados con GABA durante 10 minutos, se obtuvo una disminución significativa ($p < 0,0001$) del $35 \pm 5\%$ en el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas con respecto a su control. Este resultado concuerda con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gravielle, Faris *et al.* 2005). El tratamiento de 10 minutos con diazepam sólo produjo un pequeño pero significativo ($p < 0,01$) desacoplamiento del $22 \pm 3\%$ con respecto a los cultivos tratados con vehículo. En cambio, no se observaron cambios en el grado acoplamiento entre los sitios alostéricos al tratar los cultivos con alopregnanolona. Estos resultados indican que si bien el tratamiento crónico de neuronas en cultivo con

benzodiazepinas produce un desacoplamiento similar al inducido por GABA, la exposición breve a diazepam produjo un efecto mucho menor. Esto podría sugerir que el desacoplamiento producido por los moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A presenta un curso temporal distinto al mediado por el neurotransmisor y es probablemente el resultado de mecanismos diferentes. Por esta razón, se continuó investigando el mecanismo de desacoplamiento inducido por la breve activación del receptor GABA_A utilizando únicamente al neurotransmisor.

2. Cambios en la composición de subunidades del receptor GABA_A inducidos por GABA

Previamente en nuestro laboratorio se realizaron experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real y *western blot* para analizar posibles cambios en los niveles de ARNm y proteína de las diferentes subunidades del receptor GABA_A, como consecuencia de la exposición breve a GABA. Estos estudios mostraron que la breve activación del receptor induce una disminución selectiva en los niveles de ARNm y proteína de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\beta 1-3$, sin cambios en las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\gamma 1-3$ (Gravielle, Russek *et al.* 2003; Gravielle, Faris *et al.* 2005). Por otro lado, se conoce que el grado de acoplamiento alostérico entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas depende del subtipo de subunidad α presente en el receptor GABA_A, con el siguiente orden relativo: $\alpha 3 > \alpha 1/2/5$ (Puia, Vicini *et al.* 1991; Wafford, Whiting *et al.* 1993; Smith, Alder *et al.* 2001). Por lo tanto, el mecanismo de desacoplamiento podría involucrar un cambio en la composición de subunidades del receptor, dando como resultado receptores con menor grado de acoplamiento.

Con el objetivo de investigar si el desacoplamiento está mediado por un cambio en el subtipo de subunidades α que forman parte de los receptores GABA_A, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación seguidos por *western blot*. Para ello, los cultivos fueron tratados durante 10 minutos con GABA o vehículo y se recolectaron las células 48 horas más tarde. Los receptores fueron solubilizados utilizando un detergente que conserva la unión entre las subunidades del receptor. La inmunoprecipitación del receptor se realizó utilizando un anticuerpo contra la subunidad $\gamma 2$, que se encuentra presente en la mayor parte de los receptores y cuyos niveles, conforme a resultados obtenidos en estudios previos, no se modifican con el tratamiento. Se precipitó el inmunocomplejo con proteína A-agarosa y los receptores precipitados fueron analizados mediante experimentos de *western blot* utilizando anticuerpos anti $\alpha 1$, anti $\alpha 3$ y anti $\alpha 5$. La señal correspondiente a cada subunidad fue normalizada con respecto a la señal de la IgG utilizada para la inmunoprecipitación.

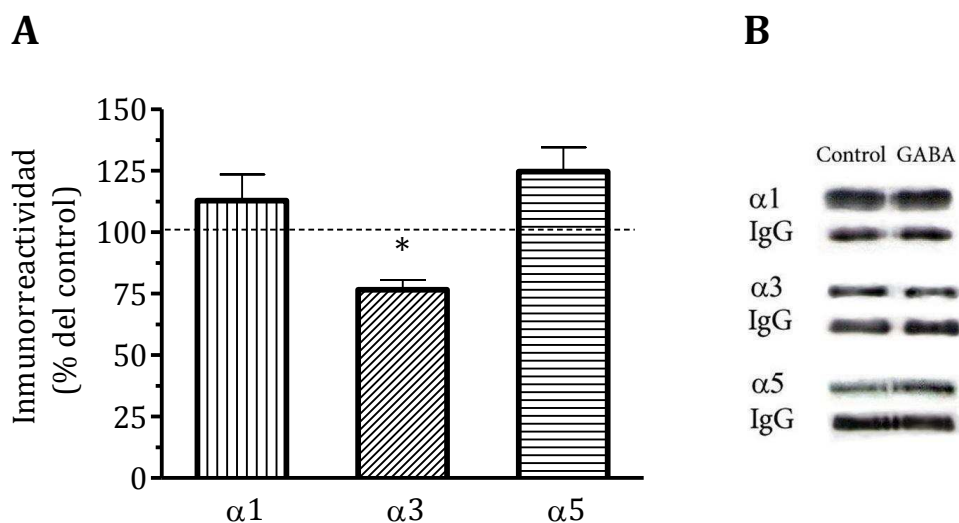


Figura 14: Cambios en la composición de subunidades del receptor GABA_A. Las células fueron tratadas durante 10 minutos con GABA 1mM (GABA) o vehículo (control), lavadas, y recolectadas a las 48 horas. Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo de conejo que reconoce la subunidad $\gamma 2$ del receptor. El material inmunoprecipitado fue analizado por *western blot* utilizando anticuerpos de cabra que reconocen las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$. **A)** Las señales fueron normalizadas con respecto a las señales del anticuerpo IgG de conejo. Los datos se expresan como porcentaje con respecto al control (100%) y representan las medias \pm S.E.M de 5-7 determinaciones independientes. Prueba *t* de *Student* de una sola muestra, * significativamente distinto de 100, $p < 0,05$. **B)** Experimentos representativos de *western blot*.

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 14, no se observaron cambios en el porcentaje de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 1\gamma 2$, pero se detectó una disminución significativa en la cantidad de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 3\gamma 2$ ($23 \pm 4\%$, $p < 0,05$). Si bien se observó un pequeño aumento en la cantidad de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 5\gamma 2$, este efecto no fue estadísticamente significativo. Estos resultados indicarían que el desacoplamiento podría estar mediado por una disminución en la proporción de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 3$.

Con el fin de comprobar si el cambio observado en el número total de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 3$ está asociado a una alteración en los receptores localizados en la membrana plasmática, se realizaron ensayos de biotilación de proteínas de superficie. Para ello, los cultivos neuronales fueron tratados durante 10 minutos con GABA o vehículo y 48 horas más tarde las proteínas de la superficie celular fueron marcadas con biotina. Luego, las células fueron recolectadas, las proteínas biotiladas precipitadas con neutravidina y posteriormente analizadas mediante experimentos de *western blot* utilizando un anticuerpo anti $\alpha 3$. Las señales de la subunidad en la superficie fueron normalizadas con respecto a las señales de actina correspondientes a los homogenatos totales de cada muestra.

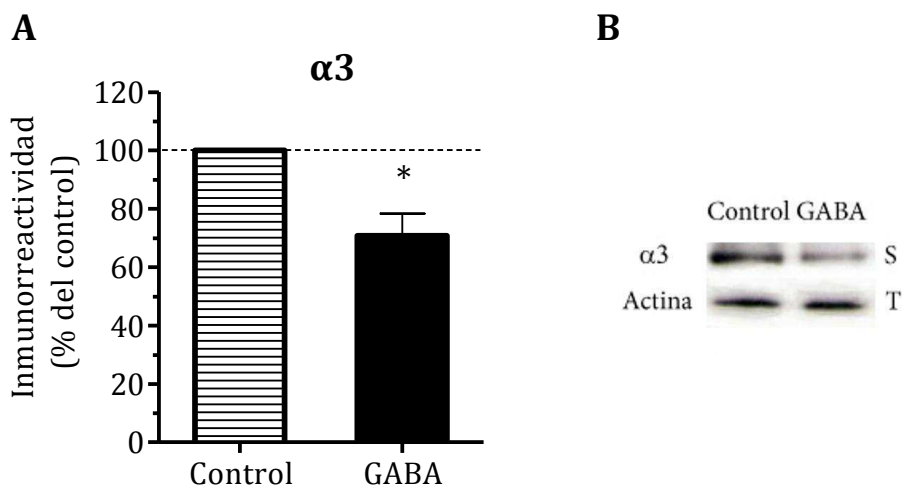


Figura 15: Expresión de la subunidad $\alpha 3$ del receptor $GABA_A$ en la superficie celular. Las células fueron tratadas con GABA 1mM (GABA) o vehículo (control) durante 10 minutos, lavadas e incubadas durante 48 horas. Se biotinilaron las proteínas de superficie con sulfo-NHS-SS-biotina, se recolectaron las células y se precipitaron las proteínas biotiniladas con neutravidina. El precipitado se analizó por *western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce la subunidad $\alpha 3$. **A)** La señal de la subunidad en superficie (S) se normalizó con respecto a la señal de actina de los lisados totales (T). Los datos se expresan como porcentaje con respecto al control (100%) y representan las medias \pm S.E.M. de 4 determinaciones independientes. Prueba *t* de *Student* de una sola muestra, * significativamente diferente de 100, $p < 0,05$. **B)** Experimentos representativos de *western blot*.

Los resultados obtenidos (Figura 15) indicaron que el tratamiento con GABA indujo una reducción en la expresión de la subunidad $\alpha 3$ en la superficie celular. Esto sugiere que la disminución observada en la cantidad de receptores totales conteniendo la subunidad $\alpha 3$ produjo una reducción en el número de receptores en la membrana plasmática conteniendo dicha subunidad ($29 \pm 8\%$, $p < 0,05$).

3. Efecto de la exposición breve a GABA sobre la internalización de los receptores GABA_A

En base a diferentes líneas de investigación, ha sido postulado que la regulación dependiente de la actividad del receptor GABA_A incluye diferentes procesos que ocurren en el siguiente orden temporal: 1) desensibilización, 2) endocitosis del receptor, 3) degradación de subunidades del receptor y 4) represión transcripcional de los genes que codifican las subunidades del receptor (Barnes 1996, Barnes 2000). Hay estudios que sugieren que el desacoplamiento del receptor GABA_A está mediado por un aumento en la internalización del receptor en vesículas intracelulares (Ali y Olsen 2001).

Con el fin de investigar si el proceso de desacoplamiento es iniciado por un aumento en la internalización de los receptores, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica de fluorescencia y biotinylación de proteínas de superficie. Para la realización del ensayo de inmunocitoquímica, primero se marcaron los receptores de superficie con un anticuerpo anti $\beta 2/3$ en los cultivos de células vivas. Este anticuerpo es habitualmente utilizado para ensayos de endocitosis debido a su gran sensibilidad que permite la detección de pequeñas cantidades de receptores GABA_A y además porque estas subunidades están presentes en la mayoría de los receptores (Chen, Kittler *et al.* 2006; Graziane, Yuen *et al.* 2009; Porcher, Hatchett *et al.* 2011). Luego se llevó a cabo el tratamiento de 10 minutos con GABA o vehículo a 37°C y se incubaron las células por otros 20 minutos a 37°C en ausencia del neurotransmisor, ya que se ha reportado que el período de máxima internalización es de 30 minutos (Kittler, Thomas *et al.* 2004). Posteriormente, se diferenciaron a los receptores en superficie de los receptores internalizados utilizando un método de doble marcación. Brevemente, los receptores de superficie fueron marcados luego de la fijación con un anticuerpo secundario

fluorescente y los receptores internalizados fueron detectados luego de la permeabilización de la membrana, utilizando un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo diferente.

Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 16. La marca roja corresponde a los receptores que permanecieron en la superficie celular mientras que la marca verde a los receptores que han sido endocitados. La cuantificación de las imágenes obtenidas muestra que el tratamiento con GABA produjo un aumento significativo ($p < 0,01$) de 3 veces en el número de agregados de receptores internalizados. Se observó además una tendencia de aumento en la intensidad de fluorescencia de la marca correspondiente a la población de receptores internalizados, normalizada con respecto a la intensidad de fluorescencia de la población total de receptores (Figura 17). En experimentos controles las células fueron fijadas inmediatamente después de la incubación con el anticuerpo anti $\beta 2/3$ para verificar que la internalización constitutiva que puede producirse durante el período de incubación con el anticuerpo primario (a temperatura ambiente) fuese despreciable (T0).

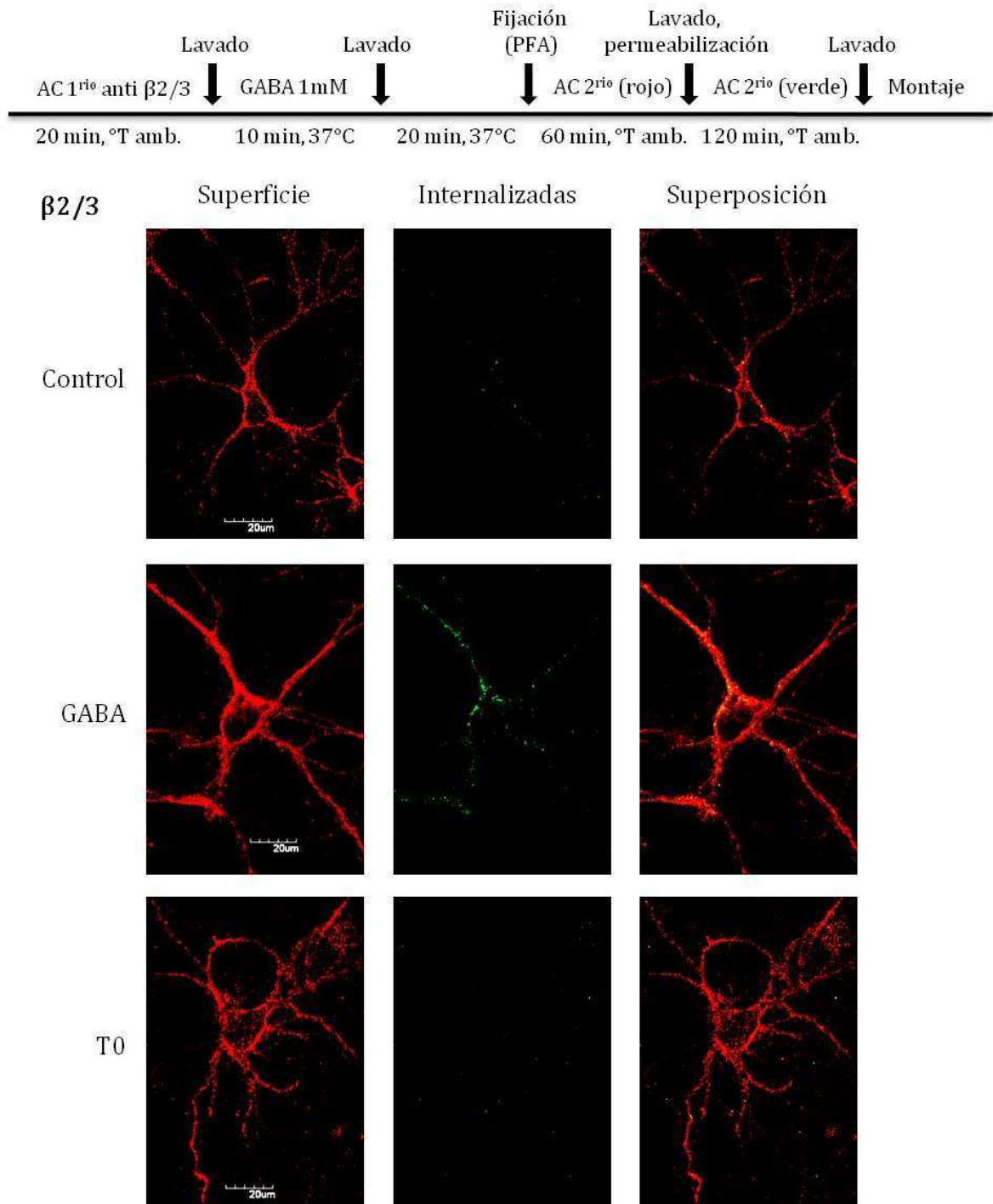


Figura 16: Internalización de receptores GABA_A. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (°T amb.) con un anticuerpo (AC) de ratón que reconoce una región extracelular de las subunidades β 2/3 del receptor, tratados por 10 minutos con GABA 1 mM (GABA) o vehículo (control) a 37 °C, lavados e incubados durante otros 20 minutos más a 37 °C. Se realizaron experimentos controles para evaluar la internalización constitutiva durante la

incubación con el anticuerpo primario (sin incubación a 37 °C, T0). Luego de la fijación se marcaron los receptores de superficie con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a Cy5 (rojo) y luego de la permeabilización los receptores internalizados se marcaron con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a Alexa488 (verde). Se muestra la superposición de ambas marcas. Las fotos fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia confocal Olympus. Magnificación 60x.

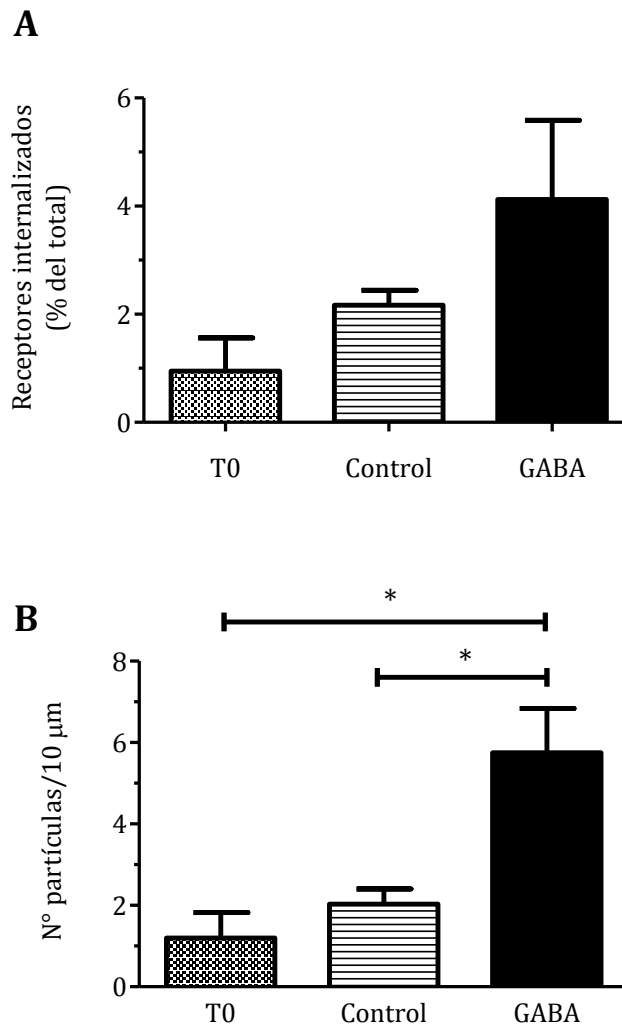


Figura 17: Cuantificación de los resultados de los experimentos inmunocitoquímicos para medir internalización de receptores GABA_A. **A)** Se calculó el porcentaje de receptores internalizados como: (densidad óptica de la marca correspondiente a receptores internalizados/densidad óptica de la marca correspondiente a receptores totales) x 100. **B)** Se calculó el número de partículas inmunorreactivas (agregados de receptores) por cada 10 μm de neurita. Fueron analizados 3 cultivos independientes y 4-6 células por tratamiento. Se

representan las medias \pm S.E.M de 3 determinaciones independientes. ANOVA de una vía, Tukey. * Significativamente diferente $p < 0,05$.

Para el ensayo de biotinilación (Figura 18), se biotinilaron las proteínas de superficie de las neuronas en cultivo a 4 °C. Luego se realizó el tratamiento con GABA o vehículo durante 10 minutos a 37°C y se incubaron las células por otros 20 minutos a 37°C, en ausencia del neurotransmisor, para permitir que se alcance la máxima internalización como se hizo en el ensayo anterior. Finalmente, la biotina de la superficie fue removida de modo que las proteínas biotiniladas remanentes fueron sólo aquellas internalizadas durante el tratamiento. Estas proteínas fueron precipitadas con neutravidina y se analizaron por *western blot* utilizando un anticuerpo contra las subunidades $\beta 2/3$ del receptor $GABA_A$ (el mismo anticuerpo utilizado en el ensayo anterior). La intensidad de las bandas resultantes fue normalizada con respecto a la señal obtenida para las mismas subunidades en el homogenato total sin precipitar con neutravidina (subunidades $\beta 2/3$ totales). En todos los casos se corroboró la integridad de las células durante la biotinilación y el tratamiento posterior con GABA incubando las membranas de nitrocelulosa con anticuerpo anti actina.

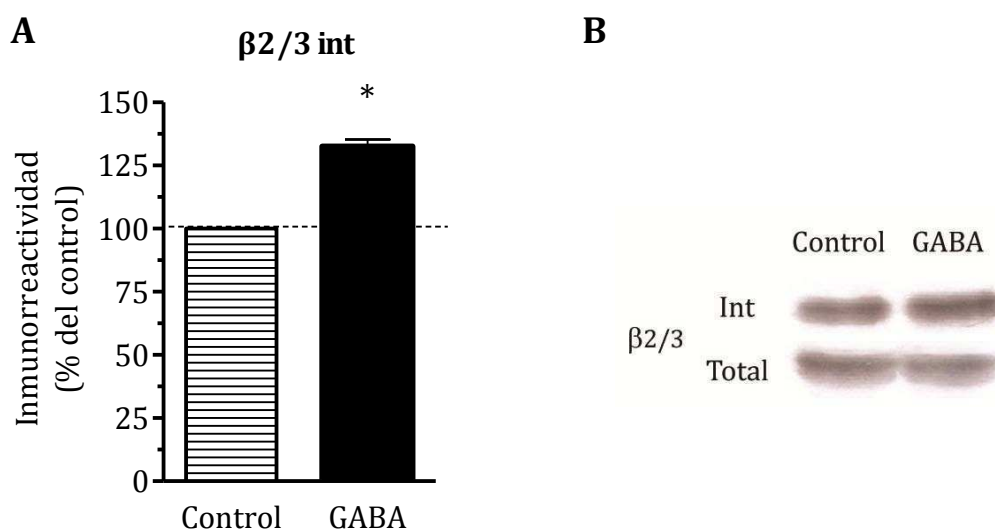


Figura 18: Internalización de receptores GABA_A. Las proteínas de superficie fueron marcadas con sulfo-NHS-SS-biotina, las células fueron incubadas con GABA 1 mM (GABA) o vehículo (control) durante 10 minutos, lavadas, e incubadas por otros 20 minutos más. Luego, se incubaron las células con glutatión para remover la biotina de las proteínas de la superficie. Las células fueron recolectadas y las proteínas internalizadas precipitadas con neutravidina. El precipitado se analizó por *western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce las subunidades $\beta 2/3$ del receptor GABA_A. La señal resultante (Int) fue normalizada con respecto a la señal de $\beta 2/3$ obtenida a partir del homogenato total (Total). **A)** Los datos se expresan como porcentaje con respecto al control (100%) y representan las medias \pm S.E.M de 4 determinaciones independientes. Prueba *t* de *Student* de una sola muestra, * significativamente diferente de 100, $p < 0,05$. **B)** Experimentos representativos de *western blot*.

Los resultados (Figura 18) indican que el tratamiento con GABA indujo un aumento en la internalización del $33 \pm 3\%$ ($p < 0,01$) de los receptores que contienen las subunidades $\beta 2/3$.

Los resultados obtenidos utilizando las dos técnicas sugieren que el tratamiento breve con GABA produjo un aumento en la endocitosis del receptor GABA_A.

Con el objetivo de verificar si el desacoplamiento depende del proceso de internalización observado en los experimentos anteriores, se estudió el efecto de la inhibición de la endocitosis por altas concentraciones de sacarosa (Heuser y Anderson 1989, Kittler, Delmas *et al.* 2000). Para ello, los cultivos celulares fueron incubados durante 10 minutos con GABA o vehículo, en presencia o ausencia de sacarosa en el medio de cultivo. A las 48 horas se midió el acoplamiento alostérico entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas mediante ensayos de unión a [³H]FNZ, tal como se describió anteriormente.

Los resultados obtenidos (Figura 19) muestran que el desacoplamiento inducido por GABA fue parcialmente prevenido por la sacarosa. En presencia de sacarosa la

disminución en el grado de acoplamiento inducida por GABA fue menor que la producida por el GABA solo, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Desafortunadamente, el tratamiento con sacarosa sola produjo una pequeña aunque no significativa disminución en el grado de acoplamiento. El grado de acoplamiento observado luego del tratamiento con GABA más sacarosa no fue significativamente diferente del medido luego del tratamiento con sacarosa sola. Es posible que la utilización de otros inhibidores específicos de la internalización de los receptores permita verificar que el desacoplamiento inducido por GABA depende de un aumento en la endocitosis del receptor.

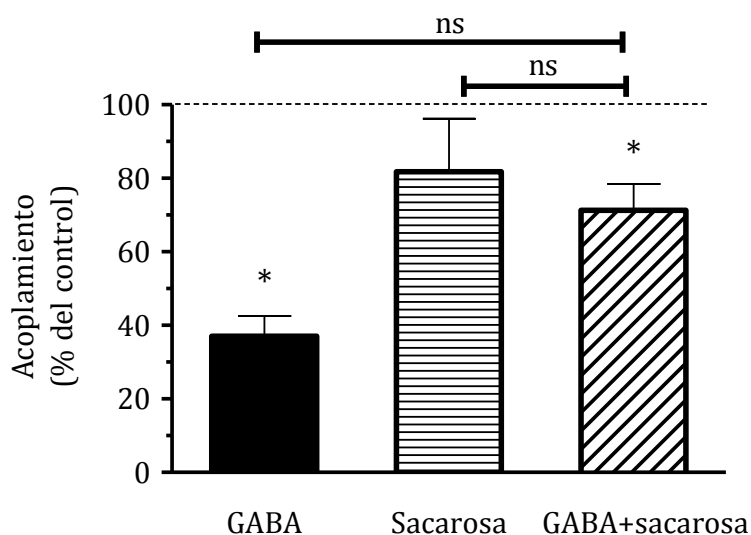


Figura 19: Efecto de la sacarosa sobre el desacoplamiento inducido por GABA. Las células fueron tratadas con GABA 1 mM (GABA), sacarosa 0,5 M (Sacarosa), GABA más sacarosa (GABA + sacarosa) o vehículo (control) durante 10 minutos, lavadas, y recolectadas a las 48 horas. Se midió el grado de acoplamiento como la potenciación de la unión de $[^3\text{H}]\text{FNZ}$ por GABA y se lo calculó como porcentaje con respecto al control (100%). Se representa la media \pm SEM de 5 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 100, $p < 0,05$, prueba *t* de Student de una sola muestra. "ns" estadísticamente no significativo, ANOVA de una vía, Tukey, $p < 0,05$.

4. Rol de la activación de las proteínas quinasas PKA y PKC sobre el desarrollo del desacoplamiento inducido por GABA

Se sabe que la fosforilación del receptor GABA_A regula su función, sin embargo, las vías de señalización que controlan este proceso no se conocen completamente aún. El bucle intracelular principal de la subunidad β del receptor GABA_A puede ser fosforilado en residuos serina, mientras que el mismo bucle correspondiente a la subunidad γ del receptor, puede ser fosforilado tanto en residuos serina como tirosina (Kittler y Moss 2003).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se estudió el efecto de la queleritrina y de H-89, inhibidores de PKC y PKA, respectivamente, sobre el desacoplamiento inducido por la breve exposición a GABA. Los resultados indican que los inhibidores de quinasas estudiados bloquean el desacoplamiento, sugiriendo que la activación de estas vías de fosforilación podría formar parte del mecanismo del desacoplamiento.

A partir de las evidencias mencionadas anteriormente, surgen dos hipótesis en relación al rol de las proteínas quinasas sobre el desacoplamiento: 1) La activación de estas vías de fosforilación induciría cambios en la transcripción de ciertas subunidades del receptor que mediarían el desacoplamiento; 2) El desacoplamiento sería producido por la fosforilación directa del receptor por estas proteínas quinasas.

Con el objetivo de poner a prueba la primera hipótesis planteada, se estudió el efecto de la inhibición de las vías de activación de la PKA y la PKC sobre la disminución en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ inducido por GABA. Para tal fin, los cultivos neuronales fueron pre-incubados con queleritrina o H-89, y luego tratados durante 10

minutos con GABA o vehículo, como se mencionó anteriormente, en presencia de los inhibidores de proteínas quinasas. A las 48 horas se recolectaron las células, se realizó la extracción de ARN total y se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real de un solo paso. Los cebadores y la sonda fueron diseñados para amplificar la región que codifica el bucle citoplasmático ubicado entre los dominios TM3 y TM4, un área con una secuencia de aminoácidos diferente entre los distintos tipos de subunidades del receptor. Como control interno, para normalizar los resultados, se utilizaron cebadores y sonda que amplifican la subunidad 18S ribosomal.

Los resultados presentados en la Figura 20 muestran, tal como se obtuvo anteriormente, una reducción significativa ($54 \pm 5\%$, $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ inducida por la exposición a GABA. La co-incubación de los inhibidores de quinasas con el neurotransmisor no previno dicha disminución (GABA más H-89: $52 \pm 5\%$, $p < 0,01$; GABA+queleritrina.: $56 \pm 1\%$, $p < 0,01$). Por lo tanto, los resultados sugieren que la activación de PKA o PKC no estaría mediando cambios en la transcripción y/o estabilidad del ARNm de la subunidad $\alpha 3$ producidos por la exposición a GABA.

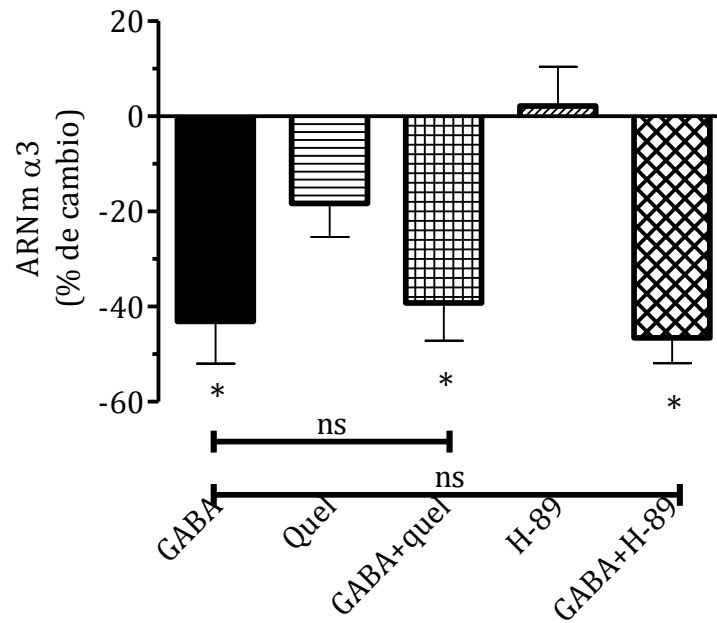


Figura 20: Rol de PKA y PKC sobre la expresión de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor $GABA_A$. Las células fueron tratadas como sigue: 10 minutos con vehículo y luego 10 minutos con GABA 1 mM (GABA), 20 minutos con queleritrina 5 μ M (Quel, inhibidor de PKC), 10 minutos con quel y luego 10 minutos con GABA más quel (GABA + quel), 20 minutos con H-89 1 μ M (H-89, inhibidor de PKA), 10 minutos con H-89 y luego 10 minutos con GABA más H89 (GABA + H-89) o 20 minutos con vehículo (control), lavadas y recolectadas a las 48 horas. Se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real para medir cambios en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$. Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control (0 %) y representan las medias \pm S.E.M de 4 determinaciones independientes. * Significativamente distinto del control, prueba *t* de *Student* de una sola muestra, $p < 0,05$; "ns" estadísticamente no significativo, ANOVA de una vía, Tukey, $p < 0,05$.

Con el fin de comprobar la segunda hipótesis planteada, se estudió el efecto de exposiciones breves a GABA sobre el estado de fosforilación del receptor $GABA_A$. Los cultivos neuronales fueron expuestos a GABA o vehículo durante 10 minutos, como se describió anteriormente. A las 48 horas las células fueron colectadas y se realizó una

inmunoprecipitación de las subunidades $\beta 2$ y $\gamma 2$. Los precipitados se analizaron por *western blot* utilizando anticuerpos anti fosfo-serina y anti fosfo-tirosina.

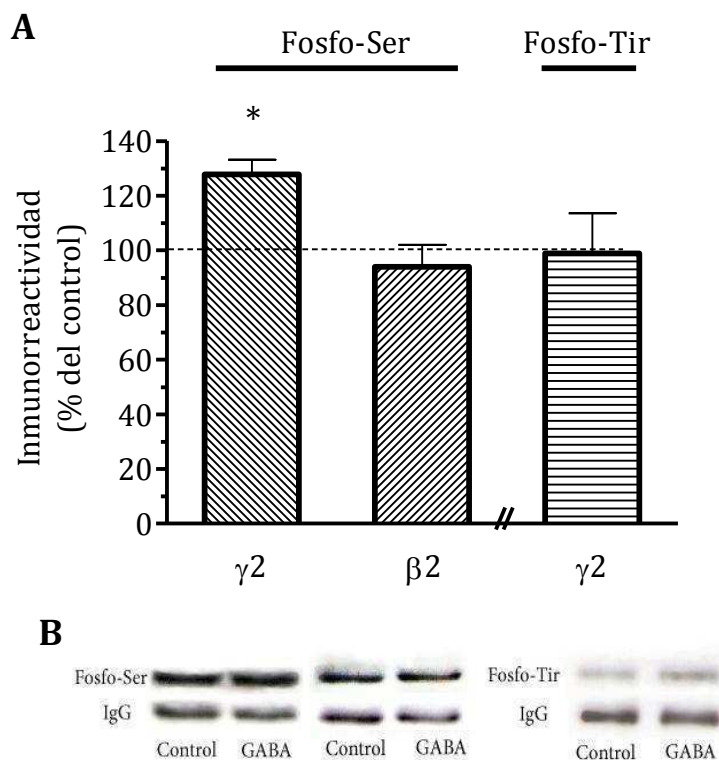


Figura 21: Análisis de posibles cambios en el estado de fosforilación de las subunidades $\beta 2$ y $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$ inducidos por GABA. Las células fueron tratadas durante 10 minutos con GABA 1 mM o vehículo (control), lavadas y colectadas a las 48 horas. Se inmunoprecipitaron las subunidades $\beta 2$ y $\gamma 2$ con un anticuerpo de conejo y el precipitado se analizó por *western blot* utilizando anticuerpos de ratón que reconocen residuos serina o tirosina fosforilados (Fosfo-Ser y Fosfo-Tir). **A)** La señal se normalizó con respecto a la señal del anticuerpo IgG utilizado para la inmunoprecipitación. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control (100 %) y representan las medias \pm S.E.M. de 4-6 determinaciones independientes. * Significativamente diferente de 100, $p < 0,05$, prueba *t* de Student de una sola muestra. **B)** Experimentos representativos de *western blot*.

Como puede observarse en la Figura 21, el tratamiento con GABA indujo un aumento ($28 \pm 5\%$, $p < 0,01$) en el grado de fosforilación de residuos serina de la subunidad $\gamma 2$, pero no se observaron cambios en el grado de fosforilación de residuos tirosina en la misma subunidad. En el caso de la subunidad $\beta 2$, no se observaron variaciones significativas en el grado de fosforilación de residuos serina. Esto podría sugerir que el desacoplamiento está mediado por un aumento en el grado de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$.

5. Rol de los VGCC de tipo L sobre la regulación de los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A inducida por GABA

Estudios previos han demostrado que la presencia de nifedipina, un inhibidor de VGCC de tipo L, previene la reducción en el número de receptores GABA_A inducida por un tratamiento crónico con GABA (Lyons, Land *et al.* 2001). Sin embargo, el desarrollo del desacoplamiento inducido por el tratamiento con GABA tanto crónico como breve, no es bloqueado por el inhibidor, indicando que este fenómeno no depende de la activación de estos canales (Lyons, Land *et al.* 2001; Gravielle, Faris *et al.* 2005).

Con el fin de investigar si la disminución en los niveles estacionarios de ARNm de ciertas subunidades del receptor GABA_A reportada previamente, forma parte del mecanismo de desacoplamiento o es sólo el comienzo de la regulación del número de receptores que necesitaría una exposición al neurotransmisor más prolongada para manifestarse, se estudió el efecto de la nifedipina sobre la reducción en los niveles estacionarios de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ inducida por GABA mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real.

Para tal fin, los cultivos fueron tratados con GABA o vehículo durante 10 minutos, como se describió previamente, en presencia o ausencia de nifedipina, e incubados por 48 horas. Luego se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real de un solo paso a partir de ARN total utilizando la misma sonda y los mismos cebadores que en el experimento descrito anteriormente.

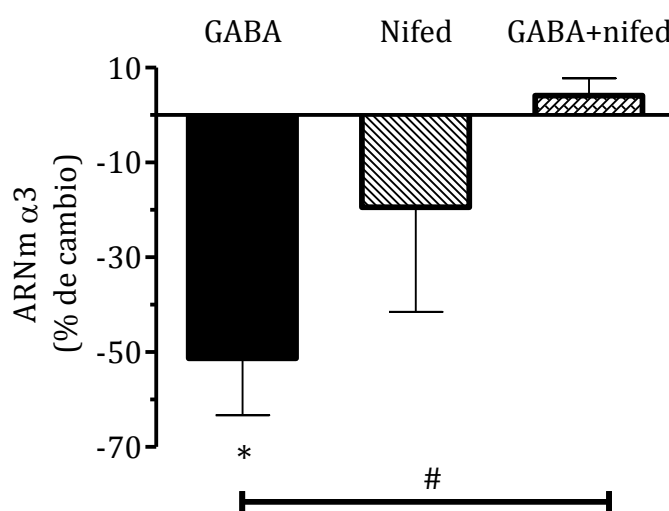


Figura 22: Rol de los VGCC de tipo L sobre la regulación de los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor $GABA_A$. Los cultivos fueron tratados durante 10 minutos con GABA 1 mM (GABA), nifedipina 10 μ M (Nifed), GABA más nifed (GABA + nifed) o vehículo (control), lavados, y las células recolectadas a las 48 horas. Se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real para medir los cambios en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$. Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con respecto al control (0 %) y representan las medias \pm S.E.M. de 4 determinaciones independientes. * Significativamente distinto del control, prueba *t* de Student de una sola muestra, $p < 0,05$; # estadísticamente significativo, ANOVA de una vía, Tukey, $p < 0,05$.

Conforme a los resultados mostrados en la Figura 22, la co-incubación de GABA con nifedipina previno la disminución en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$. Se observa,

además, una reducción en los niveles del ARNm de la subunidad α_3 como consecuencia del tratamiento con nifedipina, pero dicho cambio no fue estadísticamente significativo. Estos resultados sugieren que la disminución en los niveles de ARNm de la subunidad α_3 no contribuye al desarrollo del desacoplamiento y podría estar asociada a la reducción en el número de receptores observada con tratamientos más prolongados.

Discusión

1. Efecto de moduladores alostéricos positivos sobre el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas

La acción prolongada de moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A induce alteraciones adaptativas en la función del receptor. Ha sido demostrado que la exposición crónica de los receptores GABA_A a alopregnanolona endógena durante el ciclo estral y la preñez en roedores produce tolerancia, la cual es acompañada por cambios selectivos en la expresión de las subunidades del receptor (Turkmen, Backstrom *et al.* 2011). La administración prolongada *in vivo* de moduladores alostéricos positivos en roedores induce también modificaciones en la función del receptor. Por ejemplo, el consumo persistente de alcohol altera las propiedades funcionales del receptor GABA_A por medio de cambios en la expresión, localización subcelular y sináptica del receptor y modificaciones post-traduccionales (Kumar, Fleming *et al.* 2004). Por otro lado, la administración crónica de benzodiazepinas induce tolerancia y cambios en los niveles de ciertas subunidades del receptor GABA_A (Bateson 2002).

Estudios realizados en cultivos neuronales también demuestran que la activación prolongada de los receptores GABA_A induce procesos homeostáticos que alteran la estructura y función de los receptores. Aunque la escala de tiempo es mucho menor que en animales, los resultados obtenidos a partir de experimentos en cultivos neuronales parecen reproducir bastante bien los efectos de los tratamientos prolongados *in vivo* con diferentes moduladores alostéricos (Bateson 2002)

El tratamiento crónico de 48 horas con GABA de neuronas en cultivo produce una disminución en el número de receptores GABA_A y desacoplamiento entre los sitios alostéricos de unión a GABA y benzodiazepinas (Roca, Rozenberg *et al.* 1990). En cambio,

el tratamiento de los cultivos durante 48 horas con benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides produce solamente desacoplamiento entre los sitios alostéricos de unión a GABA y benzodiazepinas, sin cambios en el número de receptores (Roca, Schiller *et al.* 1990). Previamente demostramos que un tratamiento breve (5-10 minutos) de neuronas en cultivo con GABA, al igual que el tratamiento prolongado con los moduladores alostéricos, produce desacoplamiento únicamente (Gravielle, Faris *et al.* 2005). El desacoplamiento inducido tanto por el tratamiento prolongado como por el breve con GABA, es inhibido en presencia de picrotoxina, un bloqueante del canal del receptor GABA_A. Sin embargo, el desacoplamiento producido por la exposición crónica a moduladores alostéricos no es prevenido en presencia de picrotoxina y por lo tanto es independiente de la activación del receptor GABA_A, lo cual podría sugerir que ocurre a través de un mecanismo diferente al del desacoplamiento inducido por GABA.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el tratamiento de 10 minutos de cultivos neuronales de corteza cerebral de rata con alopregnanolona no produjo desacoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas. Si bien el tratamiento de 10 minutos con diazepam produjo desacoplamiento, el efecto observado fue mucho menor al obtenido con la exposición de 10 minutos a GABA (Figura 13). Esta diferencia observada entre los tratamientos con los moduladores alostéricos y el neurotransmisor, sugiere que el curso temporal de desarrollo del desacoplamiento es distinto, probablemente involucrando mecanismos diferentes. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió continuar estudiando el mecanismo de desacoplamiento inducido por una exposición breve a GABA.

2. Cambios en la composición de subunidades del receptor inducidos por GABA

Si bien hay estudios previos que han mostrado alteraciones en la expresión de las subunidades del receptor GABA_A inducidos por su activación, éste es el primer trabajo donde se estudiaron los cambios en la composición de subunidades del receptor.

El grado de acoplamiento alostérico entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas depende del subtipo de subunidad α presente en el receptor GABA_A con el siguiente orden: $\alpha 3 > \alpha 1/5$ (Puia, Vicini *et al.* 1991; Wafford, Whiting *et al.* 1993; Smith, Alder *et al.* 2001). Es por esto que una de las hipótesis planteadas fue que el desacoplamiento podría estar mediado por un cambio en el subtipo de subunidad α presente en el receptor.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución en el número receptores conteniendo las subunidades $\alpha 3\gamma 2$ y ningún cambio en los niveles de receptores compuestos por las subunidades $\alpha 1\gamma 2$ y $\alpha 5\gamma 2$ (Figura 14). Estos datos demuestran que la reducción en los niveles de la subunidad $\alpha 3$ (Gravielle, Russek *et al.* 2003; Gravielle, Faris *et al.* 2005) produjeron una disminución en el porcentaje de receptores conteniendo esta subunidad. Sin embargo, aunque fue demostrada previamente una reducción en los niveles de la subunidad $\alpha 1$, no se detectaron alteraciones en el número de receptores conteniendo $\alpha 1$. Ésto podría deberse a la existencia de un exceso de subunidades libres que no se encuentran formando parte del receptor (Baumgartner, Harvey *et al.* 1994; Miranda y Barnes 1997). Este resultado coincide con estudios anteriores donde se demostró que el tratamiento breve con GABA no resulta en cambios en la afinidad del zolpidem, un compuesto que exhibe gran selectividad por receptores conteniendo $\alpha 1$

(Gravielle, Russek *et al.* 2003; Gravielle, Faris *et al.* 2005). Resultados similares han sido anteriormente reportados indicando que la exposición crónica a etanol produce una disminución en el cerebelo y corteza cerebral de rata en los niveles de la subunidad $\alpha 1$ que no está asociada a un cambio en el porcentaje de receptores compuestos por dicha subunidad (Mehta y Ticku 1999).

Con el fin de verificar si los cambios observados en el número de receptores conteniendo las subunidades $\alpha 3\gamma 2$ se acompañan de alteraciones en la composición de subunidades de los receptores de la superficie celular, se midió la expresión de la subunidad $\alpha 3$ en la membrana plasmática. Los resultados obtenidos (Figura 15) mostraron una disminución de los niveles de la subunidad $\alpha 3$ en superficie. De este modo se confirmaría la hipótesis de que un cambio en la composición de subunidades de los receptores GABA_A es inducido por la breve activación del receptor por GABA y está probablemente asociado al desarrollo del desacoplamiento entre los sitios de unión alostéricos.

3. Efecto del GABA sobre la internalización de los receptores GABA_A

Alteraciones en el tráfico intracelular del receptor GABA_A han sido involucradas en diversas patologías neurológicas. Tanto en modelos animales de *status epilepticus* como en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, se han observado cambios en el tráfico del receptor y en la expresión de ciertas subunidades (Goodkin, Joshi *et al.* 2008). En ratas a las que se les indujo experimentalmente el *status epilepticus*, se observó una disminución en el número de receptores GABA_A sinápticos que fue el resultado de un aumento en el proceso de endocitosis de los receptores. Es por esto que se propuso que el desarrollo de la fármaco-resistencia a las benzodiazepinas en pacientes con esta patología, es la

consecuencia de la disminución en el número de receptores en la superficie celular (Goodkin, Sun *et al.* 2007).

Por otro lado, ha sido demostrado que el consumo prolongado de etanol en ratas produce un aumento en la internalización de receptores GABA_A conteniendo la subunidad $\alpha 1$, en corteza cerebral (Kumar, Kralic *et al.* 2003).

Se ha propuesto que la activación de los receptores GABA_A induciría en forma secuencial la internalización de receptores que conduciría su vez a la degradación de ciertas subunidades, y finalmente produciría una reducción en los niveles de las subunidades del receptor GABA_A (Barnes 1996).

Resultados obtenidos en una línea celular de insectos expresando receptores GABA_A recombinantes sugieren que la exposición crónica a benzodiazepinas induce un aumento en la internalización de receptores. El desacoplamiento inducido por este tratamiento sería el resultado de la exposición de los receptores a un ambiente ácido dentro de vesículas intracelulares. (Ali y Olsen 2001). Estos resultados no han podido ser reproducidos por nuestro grupo de investigación en cultivos neuronales de rata expuestos en forma breve a GABA (Gravielle, Faris *et al.* 2005).

En este trabajo se realizaron experimentos para determinar si la exposición breve a GABA es capaz de producir un incremento en la internalización del receptor GABA_A. Los resultados provenientes de los ensayos inmunocitoquímicos indicaron un aumento en el número de agregados de receptores internalizados (Figuras 16 y 17). Si bien la intensidad de la fluorescencia correspondiente a los receptores internalizados mostró sólo una tendencia a aumentar, los experimentos de biotilación (Figura 18) confirmaron que el tratamiento con GABA de 10 minutos produjo un aumento en la internalización de los

receptores conteniendo a las subunidades $\beta 2/3$. Este es el primer trabajo donde se observó un incremento en la internalización del receptor GABA_A inducida por una breve activación por su ligando. Estos resultados parecen contradecir previos trabajos que indican que en hipocampo la expresión de receptores GABA_A en la superficie celular no es regulada por la unión del GABA, sin embargo, en dichos trabajos utilizan una concentración de neurotransmisor 10 veces menor a la de nuestro estudio, lo cual podría explicar las diferencias halladas (Goodkin, Joshi *et al.* 2008). Nuestros resultados sugieren por lo tanto que la estimulación de la internalización del receptor podría ser el primer paso del mecanismo que conduce al desacoplamiento horas más tarde.

Con el fin de corroborar si la internalización inducida por GABA es el primer paso para el desarrollo del desacoplamiento, se estudió el efecto de la inhibición de la endocitosis del receptor sobre el desarrollo del desacoplamiento. Para ello, se realizó el tratamiento con GABA en presencia de concentraciones hiperosmolares de sacarosa que se sabe inhiben la internalización de receptores (Heuser y Anderson 1989). El desacoplamiento inducido por GABA fue parcialmente bloqueado en presencia de sacarosa. Desafortunadamente, la presencia de sacarosa sola indujo un pequeño desacoplamiento aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al control (cultivos tratados con vehículo). El grado de acoplamiento observado luego del tratamiento con GABA más sacarosa no fue estadísticamente diferente del medido luego de la exposición a sacarosa únicamente. Este efecto inespecífico de la sacarosa pudo haber enmascarado su habilidad para bloquear el desacoplamiento inducido por GABA. Ha sido demostrado que un medio hipertónico de sacarosa estimula también la liberación de neurotransmisores por medio de exocitosis (Rosenmund y Stevens 1996). Un aumento

en la concentración de GABA endógeno en el medio de cultivo en presencia de sacarosa pudo haber producido el desacoplamiento observado.

4. Rol de la activación de proteínas quinasas en el desarrollo del desacoplamiento

Ha sido demostrado que la activación de las proteínas quinasas PKA y PKC regula la transcripción de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A (Hu, Lund *et al.* 2008). La estimulación de la vía de señalización de PKC induce la fosforilación del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento que responde a AMPc), el cual forma homodímeros que aumentan la transcripción del gen de la subunidad $\alpha 1$. La activación de la vía de señalización de PKA induce la síntesis del represor de la transcripción ICER (represor inducible que responde a AMPc) y la fosforilación de CREB. Los homodímeros de ICER y los heterodímeros ICER-CREB fosforilado reprimen la transcripción del gen de $\alpha 1$. La señal extracelular que activa estas quinasas no ha sido determinada.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, demostraron que la inhibición de las proteínas quinasas PKA o PKC, previene el desacoplamiento inducido por la breve exposición de neuronas a GABA. A fin de determinar el rol de estas quinasas en la inducción del desacoplamiento, en una primera etapa se investigó si la activación de alguna de las vías de PKA o PKC induce la disminución en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ asociada al desacoplamiento.

Los resultados obtenidos (Figura 20) indican que los inhibidores tanto de PKA como de PKC no bloquearon la reducción en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ inducida por GABA. Estos datos sugieren que la activación de estas vías de señalización

intracelular no media la regulación de la transcripción del gen y/o estabilidad del mensajero de esta subunidad.

En una segunda etapa se estudió si el desacoplamiento podría estar mediado por la fosforilación directa del receptor. Está ampliamente descrito que la fosforilación de las subunidades β y γ puede modular tanto la actividad como el tráfico intracelular del receptor GABA_A. Los resultados mostraron que el tratamiento con GABA produjo un aumento de la fosforilación de residuos serina de la subunidad γ 2. No se observaron cambios en la fosforilación de los residuos serina de la subunidad β 2 ni en los residuos tirosina de la subunidad γ 2 (Figura 21). Estos resultados sugieren que el desacoplamiento estaría mediado por un aumento en el grado de fosforilación del receptor GABA_A.

El residuo serina 327 de la subunidad γ 2 del receptor GABA_A es sustrato de fosforilación por PKC (Brandon, Jovanovic *et al.* 2002; Kittler y Moss 2003; Song y Messing 2005). El rol de PKC regulando la función del receptor GABA_A es complejo dependiendo de la señal extracelular que active a la quinasa y de la isoenzima activada. Ha sido demostrado en líneas celulares expresando receptores GABA_A recombinantes, que los ésteres de forbol producen una reducción en la amplitud de las corrientes evocadas por GABA mediante un mecanismo que probablemente involucre la fosforilación por PKC de los siguientes residuos β 1 S409, β 2 S410 y γ 2 S327. Este proceso es independiente de cambios en la expresión en la superficie de los receptores (Kellenberger, Malherbe *et al.* 1992). Sin embargo, el tratamiento de neuronas de hipocampo con BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) aumenta transitoriamente las corrientes del receptor GABA_A y este efecto se correlaciona con la fosforilación de la subunidad β 3 (S408/S409) del receptor por PKC (Jovanovic, Thomas *et*

al. 2004). La activación de PKC por ésteres de forbol también puede regular el tráfico intracelular de los receptores GABA_A pero el mecanismo aparentemente es independiente de la fosforilación de las subunidades del receptor (Song y Messing 2005).

La acción de PKC también parece regular la sensibilidad del receptor GABA_A a sus moduladores alostéricos. En particular, ha sido demostrado que la fosforilación del receptor GABA_A por varias isoformas de PKC media los efectos del etanol sobre la función del receptor (Kumar, Porcu *et al.* 2009).

Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que la fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A, probablemente por PKC, es inducida por la breve activación del receptor por GABA y forma parte del mecanismo del desacoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas. El rol de la activación de PKA en el desarrollo del desacoplamiento no ha podido ser esclarecido en este trabajo pero es posible que esta vía de señalización forme parte del mecanismo de regulación de la composición de subunidades del receptor GABA_A.

5. Regulación de la expresión de la subunidad $\alpha 3$ del receptor GABA_A

Estudios previos demostraron que la inhibición de VGCC de tipo L inhibe la disminución en el número de receptores luego de un tratamiento crónico con GABA, pero no previene el desacoplamiento inducido por la exposición crónica y breve al neurotransmisor. Es por eso que se utilizó a la nifedipina (un inhibidor de los VGCC de tipo L) como herramienta para investigar la relación entre la reducción en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ del receptor y el fenómeno de desacoplamiento, en forma independiente al proceso de regulación del número de receptores. Los resultados obtenidos (Figura 22) demostraron que la disminución inducida por la breve exposición a

GABA en los niveles de ARNm de la subunidad $\alpha 3$ es prevenida por la inhibición de los VGCC de tipo L y por lo tanto no contribuiría en forma importante al desarrollo del desacoplamiento. Estos resultados sugieren que esta reducción representa el comienzo del proceso de regulación del número de receptores que requeriría un mayor tiempo de exposición al neurotransmisor para completarse. Por lo tanto, el mecanismo del desacoplamiento podría estar mediado principalmente por un cambio a nivel de la traducción, estabilidad de la proteína y/o ensamblado de la subunidad $\alpha 3$ que no dependería de la activación de los VGCC de tipo L. La importancia de la regulación de la traducción y/o estabilidad de las proteínas ha sido demostrada por evidencias indicando una escasa correlación entre los niveles de ARN mensajero y de proteína para numerosos genes (Gygi, Rochon *et al.* 1999). Nuestros resultados están de acuerdo a los experimentos realizados por Holt, Bateson *et al.* (1999) que demostraron que el desacoplamiento no está correlacionado temporalmente con la regulación de los niveles de ARNm de las subunidades del receptor GABA_A.

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la activación durante varios minutos del receptor GABA_A por GABA en condiciones fisiológicas desencadenaría un proceso regulatorio que se manifiesta horas más tarde como una reducción en el acoplamiento entre los sitios de unión a GABA y benzodiazepinas, sin cambios en el número de receptores. El mecanismo que desencadena el desacoplamiento es complejo y probablemente es el resultado de más de un proceso regulatorio.

El desacoplamiento involucraría un cambio en la combinación de subunidades α del receptor, las cuales son importantes para determinar el grado de interacción entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas. Esta alteración se produciría por una reducción en el porcentaje de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 3$. Por otro lado, el desarrollo del desacoplamiento inducido por GABA estaría también mediado por un aumento en el grado de fosforilación de un residuo serina de la subunidad $\gamma 2$, probablemente a través de la activación de PKC. Es posible, que la contribución de estos dos mecanismos regulatorios actuando en forma concertada produzca el fenómeno de desacoplamiento.

Si bien las vías de señalización intracelulares responsables del mecanismo del desacoplamiento no se conocen aún, nuestros resultados sugieren que este proceso regulatorio es iniciado por un aumento en la internalización de receptores GABA_A que actuaría como una señal para desencadenar los procesos que conducirían finalmente a una alteración en la función de los receptores.

Bibliografía

Akk, G., D. F. Covey, *et al.* (2007). "Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors." Pharmacol Ther **116**(1): 35-57.

Ali, N. J. y R. W. Olsen (2001). "Chronic benzodiazepine treatment of cells expressing recombinant GABA(A) receptors uncouples allosteric binding: studies on possible mechanisms." J Neurochem **79**(5): 1100-1108.

Allain, A. E., H. Le Corrionc, *et al.* (2011). "Maturation of the GABAergic transmission in normal and pathologic motoneurons." Neural Plast **905624**: 20.

Bak, L. K., A. Schousboe, *et al.* (2006). "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer." J Neurochem **98**(3): 641-653.

Barnes, E. M., Jr. (1996). "Use-dependent regulation of GABA_A receptors." Int Rev Neurobiol **39**: 53-76.

Barnes, E. M., Jr. (2000). "Intracellular trafficking of GABA(A) receptors." Life Sci **66**(12): 1063-1070.

Bateson, A. N. (2002). "Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal." Curr Pharm Des **8**(1): 5-21.

Baumgartner, B. J., R. J. Harvey, *et al.* (1994). "Developmental up-regulation and agonist-dependent down-regulation of GABA_A receptor subunit mRNAs in chick cortical neurons." Brain Res Mol Brain Res **26**(1-2): 9-17.

Berezhnov D., M. C. Gravielle *et al.* (2007). Pharmacology of the GABA_A receptor. The Handbook of Contemporary Neuropharmacology. Eds: I. H. David, R. Sibley, M. Kuhar, y P. Skolnick, John Wiley & Sons, Inc.: 465-569.

Bianchi, M. T. y R. L. Macdonald (2001). "Agonist Trapping by GABA_A Receptor Channels." J Neurosci **21**(23): 9083-9091.

Brandon, N., J. Jovanovic, *et al.* (2002). "Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression." Pharmacol Ther **94**(1-2): 113-122.

Brandon, N. J., P. Delmas, *et al.* (2000). "GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway." J Biol Chem **275**(49): 38856-38862.

Brandon, N. J., J. N. Jovanovic, *et al.* (2002). "Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors." J Neurosci **22**(15): 6353-6361.

Broer, S. y N. Brookes (2001). "Transfer of glutamine between astrocytes and neurons." J Neurochem **77**(3): 705-719.

Calkin, P. A. y E. M. Barnes, Jr. (1994). "gamma-Aminobutyric acid-A (GABAA) agonists down-regulate GABAA/benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons." J Biol Chem **269**(2): 1548-1553.

Chen, G., J. T. Kittler, *et al.* (2006). "Dopamine D3 receptors regulate GABAA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens." J Neurosci **26**(9): 2513-2521.

Chen, S., X. Huang, *et al.* (1999). "Benzodiazepine-mediated regulation of alpha1, alpha2, beta1-3 and gamma2 GABA(A) receptor subunit proteins in the rat brain hippocampus and cortex." Neuroscience **93**(1): 33-44.

Cherubini, E., J. L. Gaiarsa, *et al.* (1991). "GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life." Trends Neurosci **14**(12): 515-519.

Clements, J. D. (1996). "Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function." Trends Neurosci **19**(5): 163-171.

Cuitino, L., J. A. Godoy, *et al.* (2010). "Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons." JNeurosci **30**(25): 8411-8420.

Czajkowski, C. y D. H. Farb (1986). "Transmembrane topology and subcellular distribution of the benzodiazepine receptor." JNeurosci **6**(10): 2857-2863.

Czajkowski, C. y D. H. Farb (1989). "Identification of an intracellular pool of gamma-aminobutyric acid A/benzodiazepine receptors in route to the cell surface of brain neurons in culture." Mol. Pharmacol. **35**(2): 183-188.

Dalskov, S. M., L. Immerdal, *et al.* (2005). "Lipid raft localization of GABAA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells." Neurochem. Int. **46**(6): 489-499.

Esclapez, M., N. J. Tillakaratne, *et al.* (1994). "Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms." JNeurosci **14**(3 Pt 2): 1834-1855.

Farb, D. H., J. L. Steiger, *et al.* (2007). Mechanisms of GABA-A and GABA-B Receptor Gene Expression. The GABA receptor. Eds: Enna, S., Mohler, H. y Odom, D., The Humana Press Inc.: 169-237.

Ferrante, M., M. Migliore, *et al.* (2009). "Feed-forward inhibition as a buffer of the neuronal input-output relation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 18004-18009.

Friedman, L. K., T. T. Gibbs, *et al.* (1996). "gamma-aminobutyric acidA receptor regulation: heterologous uncoupling of modulatory site interactions induced by chronic steroid, barbiturate, benzodiazepine, or GABA treatment in culture." Brain Res **707**(1): 100-109.

Fritschy, J. M. y I. Brunig (2003). "Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications." Pharmacol Ther **98**(3): 299-323.

Gabriel, L., Z. Stevens, *et al.* (2009). "Measuring plasma membrane protein endocytic rates by reversible biotinylation." J Vis Exp 23(34).

Goodkin, H. P., S. Joshi, *et al.* (2008). "Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus." J Neurosci **28**(10): 2527-2538.

Goodkin, H. P., C. Sun, *et al.* (2007). "GABA(A) receptor internalization during seizures." Epilepsia **5**: 109-113.

Gravielle, M. C., R. Faris, *et al.* (2005). "GABA induces activity dependent delayed-onset uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions in neocortical neurons." J Biol Chem **280**(22): 20954-20960.

Gravielle, M. C., S. J. Russek, *et al.* (2003). "Brief exposure to GABA induces delayed onset of GABA/benzodiazepine receptor uncoupling without downregulation of receptor number". 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA

Graziane, N. M., E. Y. Yuen, *et al.* (2009). "Dopamine D4 Receptors Regulate GABAA Receptor Trafficking via an Actin/Cofilin/Myosin-dependent Mechanism." J Biol Chem **284**(13): 8329-8336.

Gygi, S. P., Y. Rochon, *et al.* (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Mol Cell Biol **19**(3): 1720-1730.

Hajos, N., J. Palhalmi, *et al.* (2004). "Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro." J Neurosci **24**(41): 9127-9137.

Hamill, O. P., J. Bormann, *et al.* (1983). "Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA." Nature **305**(5937): 805-808.

Heuser, J. E. y R. G. Anderson (1989). "Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation." J Cell Biol **108**(2): 389-400.

Holt, R. A., A. N. Bateson, *et al.* (1999). "Decreased GABA enhancement of benzodiazepine binding after a single dose of diazepam." J Neurochem **72**(5): 2219-2222.

Houston, C. M., Q. He, *et al.* (2009). "CaMKII phosphorylation of the GABA(A) receptor: receptor subtype- and synapse-specific modulation." J Physiol **587**(Pt 10): 2115-2125.

Houston, C. M., A. M. Hosie, *et al.* (2008). "Distinct regulation of beta2 and beta3 subunit-containing cerebellar synaptic GABAA receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." J Neurosci **28**(30): 7574-7584.

Houston, C. M., H. H. Lee, *et al.* (2007). "Identification of the sites for CaMK-II-dependent phosphorylation of GABA(A) receptors." J Biol Chem **282**(24): 17855-17865.

Hu, Y., I. V. Lund, *et al.* (2008). "Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor." J Biol Chem **283**(14): 9328-9340.

Jacob, T. C., Y. D. Bogdanov, *et al.* (2005). "Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors." J Neurosci **25**(45): 10469-10478.

Jacob, T. C., G. Michels, *et al.* (2012). "Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABAA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(45): 18595-18600.

Jacob, T. C., S. J. Moss, *et al.* (2008). "GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." Nat Rev Neurosci **9**(5): 331-343.

Jechlinger, M., R. Pelz, *et al.* (1998). "Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits." J Neurosci **18**(7): 2449-2457.

Jin, H., H. Wu, *et al.* (2003). "Demonstration of functional coupling between gamma - aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4293-4298.

Johnston, J. D., S. A. Price, *et al.* (1998). "Flunitrazepam rapidly reduces GABA(A) receptor subunit protein expression via a protein kinase C-dependent mechanism." Br J Pharmacol **124**(7): 1338-1340.

Jones, M. V. y G. L. Westbrook (1995). "Desensitized states prolong GABAA channel responses to brief agonist pulses." Neuron **15**(1): 181-191.

Jovanovic, J. N., P. Thomas, *et al.* (2004). "Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability." J Neurosci **24**(2): 522-530.

Jung, M. J., B. Lippert, *et al.* (1977). "The effect of 4-amino hex-5-ynoic acid (gamma-acetylenic GABA, gamma-ethynyl GABA) a catalytic inhibitor of GABA transaminase, on brain GABA metabolism in vivo." J Neurochem **28**(4): 717-723.

Jurd, R., V. Tretter, *et al.* (2010). "Fyn kinase contributes to tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma2 subunit." Mol Cell Neurosci **44**(2): 129-134.

Kaila, K. (1994). "Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system." Prog. Neurobiol **42**(4): 489-537.

Kellenberger, S., P. Malherbe, *et al.* (1992). "Function of the alpha 1 beta 2 gamma 2S gamma-aminobutyric acid type A receptor is modulated by protein kinase C via multiple phosphorylation sites." J Biol Chem **267**(36): 25660-25663.

Kittler, J. T., G. Chen, *et al.* (2005). "Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14871-14876.

Kittler, J. T. y S. J. Moss (2003). "Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 341-347.

Kittler, J. T., P. Delmas, *et al.* (2000). "Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons." J. Neurosci **20**(21): 7972-7977.

Kittler, J. T., P. Thomas, *et al.* (2004). "Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12736-12741.

Kriegstein, A. R. y M. A. Dichter (1983). "Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture." J. Neurosci **3**(8): 1634-1647.

Kumar, S., R. L. Fleming, *et al.* (2004). "Ethanol regulation of gamma-aminobutyric acid A receptors: genomic and nongenomic mechanisms." Pharmacol Ther **101**(3): 211-226.

Kumar, S., J. E. Kralic, *et al.* (2003). "Chronic ethanol consumption enhances internalization of alpha1 subunit-containing GABAA receptors in cerebral cortex." J. Neurochem **86**(3): 700-708.

Kumar, S., P. Porcu, *et al.* (2009). "The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress." Psychopharmacology **205**(4): 529-564.

Laurie, D. J., W. Wisden, *et al.* (1992). "The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development." J. Neurosci **12**(11): 4151-4172.

Lyons, H. R., T. T. Gibbs, *et al.* (2000). "Turnover and down-regulation of GABA(A) receptor alpha1, beta2S, and gamma1 subunit mRNAs by neurons in culture." J. Neurochem **74**(3): 1041-1048.

Lyons, H. R., M. B. Land, *et al.* (2001). "Distinct signal transduction pathways for GABA-induced GABA(A) receptor down-regulation and uncoupling in neuronal culture: a role for voltage-gated calcium channels." J Neurochem **78**(5): 1114-1126.

Markwardt, S. y L. Overstreet-Wadiche (2008). "GABAergic signalling to adult-generated neurons." J Physiol **586**(16): 3745-3749.

Mehta, A. K. y M. K. Ticku (1999). "Prevalence of the GABAA receptor assemblies containing alpha1-subunit in the rat cerebellum and cerebral cortex as determined by immunoprecipitation: lack of modulation by chronic ethanol administration." Brain Res Mol Brain Res **67**(1): 194-199.

Michels, G. y S. J. Moss (2007). "GABAA receptors: properties and trafficking." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(1): 3-14.

Miranda, J. D. y E. M. Barnes, Jr. (1997). "Repression of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 polypeptide biosynthesis requires chronic agonist exposure." J Biol Chem **272**(26): 16288-16294.

Mohler, H. (2006). "GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia." J. Recept Signal Transduct Res **26**(5-6): 731-740.

Moss, S. J., C. A. Doherty, *et al.* (1992). "Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor." J Biol Chem **267**(20): 14470-14476.

Moss, S. J. y T. G. Smart (1996). "Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation." Int Rev Neurobiol **39**: 1-52.

Moss, S. J., T. G. Smart, *et al.* (1992). "Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation." Science **257**(5070): 661-665.

Mountcastle, V. B., W. H. Talbot, *et al.* (1969). "Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination." J Neurophysiol **32**(3): 452-484.

Olsen, R. W. y W. Sieghart (2009). "GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology." Neuropharmacology **56**(1): 141-148.

Poisbeau, P., M. C. Cheney, *et al.* (1999). "Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons." J Neurosci **19**(2): 674-683.

Porcher, C., C. Hatchett, *et al.* (2011). "Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons." J Biol Chem **286**(24): 21667-21677.

Poulter, M. O., L. Ohannesian, *et al.* (1997). "Evidence that GABAA receptor subunit mRNA expression during development is regulated by GABAA receptor stimulation." J Neurochem **68**(2): 631-639.

Puia, G., S. Vicini, *et al.* (1991). "Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents." Mol Pharmacol **39**(6): 691-696.

Ranck, J. B., Jr. (1973). "Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires." Exp Neurol **41**(2): 461-531.

Ravindran, C. R. y M. K. Ticku (2006). "Tyrosine kinase phosphorylation of GABA(A) receptor alpha1, beta2 and gamma2 subunits following chronic intermittent ethanol (CIE) exposure of cultured cortical neurons of mice." Neurochem Res **31**(9): 1111-1118.

Rivera, C., J. Voipio, *et al.* (2005). "Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII." J Physiol **562**(Pt 1): 27-36.

Robert, F., J. F. Cloix, *et al.* (2012). "Ultrastructural characterization of rat neurons in primary culture." Neuroscience 200: 248-260.

Roca, D. J., I. Rozenberg, *et al.* (1990). "Chronic agonist exposure induces down-regulation and allosteric uncoupling of the gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex." Mol Pharmacol 37(1): 37-43.

Roca, D. J., G. D. Schiller, *et al.* (1990). "gamma-Aminobutyric acidA receptor regulation in culture: altered allosteric interactions following prolonged exposure to benzodiazepines, barbiturates, and methylxanthines." Mol Pharmacol 37(5): 710-719.

Rosenmund, C. y C. F. Stevens (1996). "Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses." Neuron 16(6): 1197-1207.

Roth, F. C. y A. Draguhn (2012). "GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy." Neural Plast 805830: 23.

Russek, S. J., S. Bandyopadhyay, *et al.* (2000). "An initiator element mediates autologous downregulation of the human type A gamma -aminobutyric acid receptor beta 1 subunit gene." Proc Natl Acad Sci U S A 97(15): 8600-8605.

Schnitzler, A. y J. Gross (2005). "Normal and pathological oscillatory communication in the brain." Nat Rev Neurosci 6(4): 285-296.

Schousboe, A. y D. A. Redburn (1995). "Modulatory actions of gamma aminobutyric acid (GABA) on GABA type A receptor subunit expression and function." J Neurosci Res 41(1): 1-7.

Schousboe, A. y H. S. Waagepetersen (2007). "GABA: homeostatic and pharmacological aspects." Prog Brain Res 160: 9-19.

Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat 87(4): 387-406.

Smith, A. J., L. Alder, *et al.* (2001). "Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using (36)Cl ion flux." Mol Pharmacol **59**(5): 1108-1118.

Song, M. y R. O. Messing (2005). "Protein kinase C regulation of GABAA receptors." Cell Mol Life Sci **62**: 119-127.

Tietz, E. I., X. Huang, *et al.* (1999). "Temporal and regional regulation of alpha1, beta2 and beta3, but not alpha2, alpha4, alpha5, alpha6, beta1 or gamma2 GABA(A) receptor subunit messenger RNAs following one-week oral flurazepam administration." Neuroscience **91**(1): 327-341.

Turkmen, S., T. Backstrom, *et al.* (2011). "Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor." Br J Pharmacol **162**(2): 311-327.

Unwin, N. (1989). "The structure of ion channels in membranes of excitable cells." Neuron **3**(6): 665-676.

Uusi-Oukari, M. y E. R. Korpi (2010). "Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents." Pharmacol Rev **62**(1): 97-135.

van Rijnsoever, C., C. Sidler, *et al.* (2005). "Internalized GABA-receptor subunits are transferred to an intracellular pool associated with the postsynaptic density." Eur J Neurosci **21**(2): 327-338.

Wafford, K. A., P. J. Whiting, *et al.* (1993). "Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes." Mol Pharmacol **43**(2): 240-244.

Whiting, P. J. (2003). "GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?". Drug Discov Today **8**(10): 445-450.