Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Modulación por óxido nítrico de receptores ionotrópicos de GABA

Gasulla, Javier

2014

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:
Gasulla, Javier. (2014). Modulación por óxido nítrico de receptores ionotrópicos de GABA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Gasulla, Javier. "Modulación por óxido nítrico de receptores ionotrópicos de GABA". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Modulación por óxido nítrico de receptores ionotrópicos de GABA

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

Bioq. Javier Gasulla

Director de tesis: Dr. Daniel Juan Calvo
Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2013.

Modulación por Óxido Nítrico de Receptores Ionotrópicos de GABA

Resumen

El NO es una molécula altamente difusible y reactiva producida en el sistema nervioso que actúa como mensajero neuronal y participa en procesos fisiológicos y patológicos. El NO modula la actividad de numerosos receptores de neurotransmisores y canales iónicos. En particular, los $GABA_A$Rs pueden ser modulados por agentes rédox y por NO, aunque los efectos y mecanismos de este último no están claros.

En esta tesis, caracterizamos los efectos del NO sobre GABAρ1Rs expresados de forma heteróloga y estudiamos la actividad de los $GABA_A$Rs fásicos y tónicos de células piramidales en rebanadas de hipocampo con distintos niveles de NO.

Los receptores homoméricos GABAρ1 se expresaron en ovocitos de Xenopus laevis, y las respuestas evocadas por GABA se registraron electrofisiológicamente, en presencia y ausencia de donantes de NO. Las respuestas se potenciaron significativamente por el NO de forma rápida, reversible y dosis-dependiente. El bloqueo químico de las cisteínas mediante reactivos selectivos para sulfhidrilos previno la potenciación por NO, indicando que las cisteínas participan de la modulación. Cada subunidad ρ1 tiene solo tres cisteínas, las dos extracelulares que forman el cys-loop (C177 y C191) y una intracelular (C364). El reemplazo por alanina de la C364 no modificó los efectos del NO sobre el receptor, lo que sugiere que el NO potencia los GABAρ1Rs a través de una interacción con el cys-loop extracelular.

Por otra parte, en rebanadas de hipocampo, se realizaron registros con la técnica de patch-clamp en configuración célula entera, y se estudiaron los efectos del NO sobre los $GABA_A$Rs. Las corrientes fásicas se registraron aplicando puffs de GABA y, las corrientes tónicas se midieron analizando la I_H antes y después de la aplicación de bicuculina (BIM). El nivel de NO se incrementó por la aplicación de donantes de NO y se disminuyó bloqueando la producción de la NOS. El incremento en los niveles de NO no modificó significativamente la actividad de los $GABA_A$Rs. Sin embargo, el bloqueo de la síntesis de NO endógeno potenció la corriente GABAérgica tónica y la evocada por puffs de GABA.

Estos resultados indican que los efectos del NO sobre los $GABA_A$Rs son dependientes de la subunidad y sugieren que las acciones del NO en el hipocampo estarían en parte mediadas por la modulación de la actividad inhibitoria.

Palabras clave: receptores $GABA_A$; receptores GABAρ1; óxido nítrico; S-Nitrosilación; retina; hipocampo

Nitric oxide Modulation of Ionotropic GABA Receptors

Abstract

NO is a highly diffusible and reactive molecule produced in the nervous system that act as a neuronal signal mediating both physiological and pathological mechanisms. NO can modulate the activity of neurotransmitter receptors and ion channels. In particular, $GABA_AR$ can be modulated by several redox agents and by NO, but the effects and mechanisms of this modulation were not clearly determined.

In the present work, we characterized the effects of NO on the GABAρ1R and examined the function of phasic and tonic $GABA_AR$ on pyramidal cells of acute hippocampal slices under different NO levels.

Homomeric GABAρ1Rs were heterologously expressed in Xenopus oocytes and GABA-evoked responses electrophysiologically recorded in the presence or absence of NO donors. Responses were significantly enhanced in a dose-dependent, fast and reversible manner by NO. Chemical protection of cysteines by selective sulfhydryl reagents prevented the NO effects indicating that cysteines are involved in NO actions. The ρ1 subunits contain only three cysteine residues, two extracellular at the cys-loop (C177 and C191) and one intracellular (C364). Mutation of C364 by alanine did not change the effects of NO on GABAρ1R, suggesting that GABAρ1R function can be enhanced by NO acting at the extracellular cys-loop.

On the other hand, in hippocampal slices, whole-cell patch clamp technique was used to study the effects of NO on $GABA_AR$. Phasic currents were evoked by puff application of GABA and tonic currents were determined through monitoring I_H before and after application of bicuculine. NO level was increased by application of NO donors or decreased by blocking the NOS. Exogenously applied NO, had no effects on $GABA_ARs$. Meanwhile, depletion of endogenous level of NO enhanced both types of GABAergic currents.

These results indicate that NO actions on $GABA_ARs$ are extremely subunit dependent and suggest that physiological effects of NO on hippocampus can be in part mediated by modulation of the inhibitory synaptic activity.

Keywords: $GABA_A$ receptor; GABAρ1 receptor; nitric oxide; S-nytrosylation; retina; hippocampus

Agradecimientos

Es un ejercicio arduo recopilar en una página el mundo que forman las personas que de una u otra manera nos ayudaron, nos motivaron o nos enseñaron lo necesario para que al final de más de 6 años de trabajo podamos cerrar una tesis de doctorado. Haciendo estricta justicia, la tarea posiblemente sea imposible. Todos los que ocupando lugares en jefaturas, posiciones burocráticas o como pares nos dificultaron el camino involuntariamente (o no), posiblemente estén entre los principales colaboradores con el resultado final, que en última instancia, celebramos. Además, en un sentido amplio, mi formación académica y laboral comienza bastante antes del comienzo de los experimentos para este doctorado. Tengo que recordar a Vivino y Richiello que en el INTI me enseñaron como se trabaja en un laboratorio y me alentaron a dejar un empleo donde había ganado un lugar (y un salario en blanco) para bifurcarme en nuevas disciplinas y desafíos. Vale la pena recordar aquí a los que me ayudaron a buscar un camino, a Sofi, Pau, Cristian, Ceci, Mer, Diego.

Luego debo agradecerle a Dani Calvo por la libertad y confianza que me dio para hacer más allá de los disensos.

Durante estos años se presentaron muchos desafíos técnicos e inconvenientes lógicos y de los otros. Muchos de ellos pudieron ser superados gracias a la disposición y colaboración de Vivi Dalamon, Caro Wedemeyer, Juan Goutman, Belén Elgoyhen y su grupo de trabajo, Antonia Marin-Burgin y Lucas Mongiat.

En el Complejo Obligado, donde funciona el INGEBI, encontré una de las mayores fortunas esperables de un grupo laboral, como es tener compañeros en el mejor sentido posible. Con algunos de ellos compartí un espacio y una forma de trabajo más generosa y horizontal de la que nos acostumbramos a conocer: Santi Andrich, Caro Wedemeyer, Marcelo Moglie, Andrea Pecile, Andrea Beltrán y Dan Minter.

Con muchos más compartí todo eso otro que no son los experimentos en sí, pero es parte de lo necesario para que los experimentos lleguen a buen puerto, o a algún puerto al menos. De ese no-trabajo, muchos cumpas son ahora amigos y otros merecerían serlo. Voy a nombrar a casi todos: Leandro, Fran, Flor, Milena, Mati, Briardo, Rama, David, Mauro, Claudia, Carla, Franco, Natalia, Facu, Alejandro, Romina, Laura, Rafi, Eli, Sabina, María.

Los que trabajamos en el INGEBI y el IByME cada tanto tuvimos la oportunidad de practicar de alguna de esas otras formas de participación, como ser las asambleas. De allí surgió algo trillado, aunque novedoso para nuestro sistema científico, al menos hasta donde yo conozco: una Comisión Interna formada por becarios, personal de apoyo e investigadores capaz de debatir ideas, ayudar a compañeros o intentar democratizar nuestra actividad sin jerarquías ni

censuras de ningún tipo. Muchas cosas le agradezco a mi experiencia en la Comisión Interna IByME-INGEBI: primero el honor de haber sido elegido por los becarios de Obligado para integrarla; segundo la posibilidad de conocer y charlar con Enrique Segura, un verdadero científico “total”, un jugador de toda la cancha que le puso conceptos a muchas ideas desordenadas que traía colgando; tercero la oportunidad de darle una mano a Guada Suárez quien al ganarle su batalla a las arbitrariedades del CONICET me permitió vivir uno de los momentos de mayor alegría de mi doctorado. También le debo un agradecimiento a Isabel Luthy, quien me ayudó a afilar mi visión del ambiente científico.

Finalmente, para rescatar un porqué y más todavía un cómo inicié una carrera en investigación, es preciso rescatar a aquellos otros que aunque no participen de ningún modo directo de esta tesis, son quienes dan sentido y dirección, a veces sin saberlo, a mi elección de esta actividad como forma y medio de vida. Por ello le agradezco con entusiasmo a Flor y a Lucas, y al resto de mi familia: a mis padres, hermanos, cuñadas y sobrinos, en especial a mi ahijada Camila.

Índice

Abreviaturas 9

Introducción 11

A) Receptores de GABA 12

(i) Clasificación, estructura, localización y farmacología 12

(ii) Rol del receptor GABA ρ1 en la retina. 15

(iii) Receptores fásicos y tónicos 16

(iv) Moduladores de los receptores de GABA. 20

(v) Hipocampo. 22

B) Neurotransmisión nitrérgica. 24

(i) Aspectos generales y mecanismos. 24

(ii) Efectos directos del NO sobre canales y receptores. 27

Evidencias en $GABA_AR$. 29

(iii) NO en la retina. 31

(iv) NO en el hipocampo. 33

(v) Efectos sobre la neurotransmisión GABAérgica. 37

(vi) Introducción a los donantes de NO. 38

Objetivos 41

Materiales y Métodos 43

A) Expresión de receptores GABAρ1 y registro en ovocitos de Xenopus laevis. 44

(i) Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARNc. 44

(i) Obtención de ovocitos de Xenopus e inyección de ARNc. 45

(ii) Registro electrofisiológico de las corrientes mediadas por GABAρ1R por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. 46

(iii) Drogas y soluciones 47

(iv) Análisis de datos 48

B) Registro en células piramidales de hipocampo por patch-clamp. 49

(i) Animales utilizados. Obtención de rebanadas de hipocampo. 49

(ii) Adquisición de datos en configuración de célula entera. 52

(iii) Registro de las respuestas evocadas por puffs de GABA. 54

(iv) Registro de la corriente tónica. 54

(v) Soluciones y drogas. 55

(vi) Análisis de datos. 55

Resultados y Discusión 57

Capítulo 1. Modulación de receptores recombinantes GABAρ1 por NO. 58

A) Estudio del efecto de donantes de NO sobre los receptores ρ1 de GABA expresados en ovocitos de Xenopus laevis. 58

(i) DEA 58

(ii) SNOC 59

(iii) GSNO 60

B) Caracterización de la potenciación de GABAρ1R por DEA. 62

(i) Reversibilidad de la potenciación por DEA. 62

(ii) Curva dosis-respuesta (CDR). 62

(iii) Curva dosis - efecto. 63

(iv) Dependencia de la potenciación con el nivel de GABA. 64

(v) Curva corriente - voltaje (I – V). 64

C) La liberación de NO es necesaria para la potenciación de GABAρ1R por DEA. 66

(i) Control de subproductos de la liberación de NO. 66

(ii) La potenciación por DEA es bloqueada por la aplicación de un scavenger de NO. 68

D) Discusión general del Capítulo 1. 69

Posible relevancia fisiológica de la modulación de GABAρ1R por NO 70

Capítulo 2. Estudio del sitio de acción del NO sobre los GABAρ1R. 73

A) Modificación química de los residuos de cisteína. 73

(i) MTSEA 73

(ii) NEM 75

B) Reemplazo de la cisteína intracelular (C364) del GABAρ1R por alanina. 77

C) Influencia de la presión parcial de oxígeno (pO_2) sobre la sensibilidad al NO de los GABAρ1Rs. 78
D) Discusión general del Capítulo 2. 81
Capítulo 3. Estudio de la modulación por NO de los receptores GABAérgicos de células piramidales del área CA1 de hipocampo. 85
A) Modulación de la actividad de los $GABA_ARs$ fásicos por NO. 85
i) Efecto del NO exógeno. 85
ii) Efecto del bloqueo de la síntesis de NO endógeno. 87
B) Modulación de la corriente inhibitoria tónica por NO. 89
i) Efecto del NO exógeno. 90
ii) Efecto del bloqueo de la síntesis de NO endógeno. 91
C) Discusión general del Capítulo 3. 93
Efectos presinápticos del NO 96
Origen del NO endógeno 96
Rol de la modulación de los $GABA_ARs$ por NO en la fisiología sináptica 97
Conclusiones 99
Referencias 101
Índice de Figuras 115

Abreviaturas

ACSF: Solución de líquido cefalorraquídeo artificial. Solución extracelular de registro de patch-clamp.

BD: Solución buffer de disección.

BIM: Metil-yoduro de bicuculina.

CDR: Curva dosis respuesta.

CE_{50}: Concentración efectiva 50%.

CPI: Capa plexiforme interna.

CPTIO: 2-(4-carboxifenyl)-4,5-dihidro-4,4,5,5-tetrametil-1H-imidazol-lyl-1-oxi-3-óxido. Scavenger de NO.

DEA: DEA/NONOato; dietilamino NO aducto.

DETA: DETA/NONOato; dietilentriamino NO aducto.

DSI: Supresión de la inhibición inducida por despolarización

DTNB: Ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico.

DTT: Ditiotreitol.

E_{Cl}: Potencial de reversión para el anión cloruro.

EDRF: Factor relajante derivado del endotelio.

E_m: Potencial de membrana.

GABA: Ácido γ-amino butírico.

$GABA_AR$: Receptores ionotrópicos de GABA.

$GABA\rho1_{C364A}R$: Receptor de GABA ρ1 com la mutación Cys 364 reemplazada por Ala.

GABAρ1R: Receptor de GABA ρ1 homomérico.

GC: Guanilato ciclasa.

GMP_C: Guanosina monofosfato cíclico.

GSH: Glutatión.

GSNO : S-Nitrosoglutatión.

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico.

I – V: Curva corriente – voltaje.

I_H: Corriente de mantenimiento (holding).

Abreviaturas

$I_{tónica}$: Corriente tónica GABAérgica.

L-NAME: N_{ω}-nitro-L-arginina-metil-éster clorhidrato.

LTD: Depresión de largo término.

LTP: Potenciación de largo término.

mIPSC: Corriente inhibitoria postsináptica miniatura.

MTSEA: (2-aminoetil)-metanotiosulfonato.

NEM: N-etilmaleimida.

nH: n de Hill.

NMDAR: Receptor de NMDA (glutamatérgico).

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

NPV: Núcleo paraventricular.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PKG: Protein kinasa G.

pO_2: Presión parcial de oxígeno.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

SD: desviación estándar

SEM: Error estándar de la media.

SNC: Sistema nervioso central.

SNOC: S-Nitrosociteína.

SOD: Superóxido dismutasa.

V_{clamp}: Potencial al que se fija el voltaje.

Vm: Potencial de membrana.

Introducción

A) Receptores de GABA

(i) Clasificación, estructura, localización y farmacología

El ácido γ-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. Actúa a través de dos grandes grupos de receptores: ionotrópicos ($GABA_A$Rs) y metabotrópicos ($GABA_B$R). Los $GABA_B$R son activados por GABA y por el agonista selectivo baclofén, pero son insensibles a los ligandos característicos de $GABA_A$Rs como el antagonista bicuculina y el agonista muscimol. Los $GABA_B$R son receptores acoplados a proteína G y sus efectores varían de acuerdo al tipo de proteína G asociada, como la activación de canales rectificadores de potasio (K^+) o la inhibición de canales de calcio (Ca^{2+}) voltaje-dependientes (Marshall et al., 1999).

Los $GABA_A$Rs son los principales receptores inhibitorios del sistema nervioso central (SNC). Son canales aniónicos que principalmente tiene permeabilidad al cloruro (Cl^-) y en menor medida a bicarbonato (HCO_3^-). Los $GABA_A$Rs están ampliamente distribuidos por el SNC de mamíferos, por lo cual cumplen un rol destacado en virtualmente todas las funciones fisiológicas cerebrales y sirven de blanco a numerosas clases de drogas, usadas tanto en clínica como en investigación básica (Johnston, 2005). Su activación produce un aumento de la permeabilidad al Cl^-, lo que habitualmente reduce la excitabilidad neuronal, es decir, produce inhibición. Sin embargo, si el Cl^- intracelular fuese mayor al encontrado en una neurona de un animal adulto en condiciones normales, el potencial de reversión para el Cl^- (E_{cl}) podría ser más negativo que el potencial de membrana (E_m). En estas condiciones, la activación de $GABA_A$Rs produciría la despolarización neuronal. Esta situación ocurre en algunas condiciones fisiológicas, especialmente durante el desarrollo temprano (Ben-Ari et al., 2012).

Los $GABA_A$Rs forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando y dentro de ésta, a la familia de receptores con lazo de cisteína (cys-loop). Esta familia incluye a receptores nicotínicos, de glicina, serotoninérgicos ionotrópicos y un canal iónico activado por zinc (Olsen & Sieghart, 2008). Todos ellos se organizan como proteínas de membrana pentaméricas, con un poro central que forma el canal iónico. Cada subunidad consta de un gran dominio amino terminal extracelular que contiene el sitio de unión al agonista, sitios de glicosilación y el característico lazo de 15 residuos cerrado por un puente disulfuro que se propone como un determinante conformacional importante para la interacción con el ligando correspondiente (Lu, 1997), aun cuando no forma parte del sitio de unión del agonista (Sedelnikova et al., 2005). Luego del dominio N-terminal siguen 4 segmentos transmembrana (M1-M4) con estructura de α-hélice y con un loop intracelular entre M3 y M4 que presenta sitios de fosforilación para PKA, PKC y tirosin quinasas (Zhang et al., 2001). La estructura se

completa con un dominio c-terminal extracelular corto. El segmento M2 de cada subunidad conforma el canal iónico central (Baenziger & Corringer, 2011) (**Figura I - 1**).

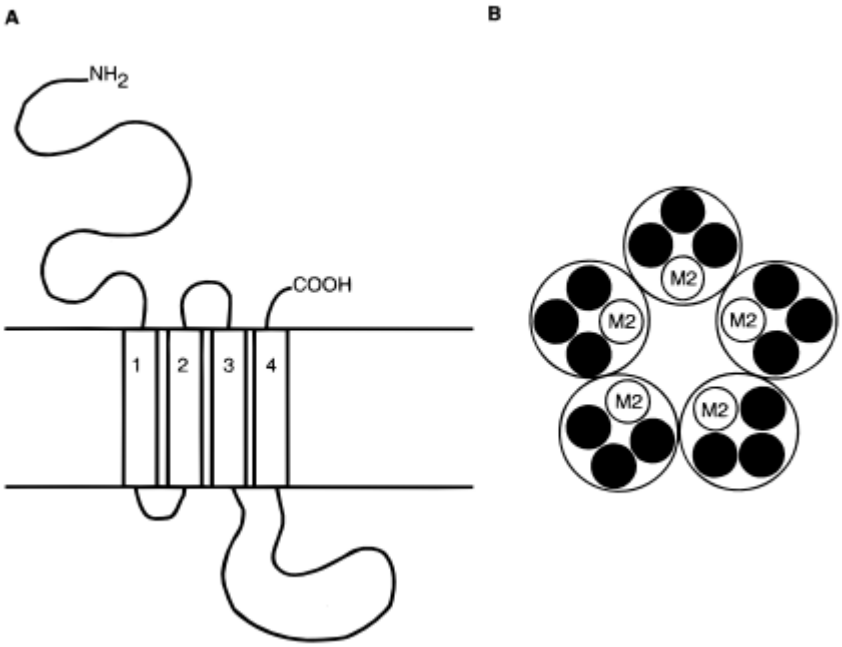

Figura I - 1. Esquema de la estructura de los receptores ionotrópicos de GABA.
A. Estructura general de una de las cinco subunidades donde se observan los 4 segmentos transmembrana (M1-M4). **B**. Arreglo espacial del pentámero, el segmento M2 forma el canal iónico central. Tomado de Chebib & Johnston (2000).

Existen 19 genes que codifican para subunidades de $GABA_A$Rs en el humano. Estos incluyen 16 subunidades que conforman la familia $GABA_A$ clásica (α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, θ y π), y 3 subunidades ρ, que forman lo que se denominaba receptores $GABA_C$. De todas las combinaciones posibles, la mayoría de los $GABA_A$Rs están formados por dos copias de una única subunidad α, dos copias de una única subunidad β y una copia de otra subunidad, como γ, δ o ε. Actualmente se considera que solo 11 subtipos de $GABA_A$R están identificados concluyentemente y agregando los que muy posiblemente se expresen de forma nativa suman 26 subtipos (Olsen & Sieghart, 2008). Aproximadamente 75 a 80 % de los $GABA_A$Rs del CNS contienen una subunidad γ_2. La subunidad α_1 es la más abundante de las α y mayormente colocaliza con β_2 y γ_2, con una estequiometría $(\alpha_1)_2(\beta 2)_2(\gamma_2)_1$. La subunidad α_5 tendría una expresión más restringida, constituyendo aproximadamente un 20% de la población de $GABA_A$R en el hipocampo. A su vez, la expresión de la subunidad α_6 se encuentra casi exclusivamente confinada a las células granulares del cerebelo, e íntimamente relacionada con la expresión de la subunidad δ. Por su parte, δ se coexpresa con α_4 en giro dentado y cuerpo estriado (Sieghart & Sperk, 2002).

Los "receptores $GABA_C$" fueron descriptos en base a su particular farmacología antes de ser clonados. Sus respuestas a GABA no encajan en el perfil "$GABA_A$" ya que no son bloqueadas por bicuculina, ni tampoco "$GABA_B$" ya que no son activados por baclofen (Olsen

& Sieghart, 2008). Estas respuestas no “A”- no “B” se encontraron en diversas áreas del SNC como retina e hipocampo (Boue-Grabot et al., 1998; Strata & Cherubini, 1994). El ADN_c capaz de expresar este tipo de respuestas evocadas por GABA fue aislado finalmente de retina (Polenzani et al., 1991). El clonado de subunidades ρ y de otras familias $GABA_A$ clásicas demostró que las ρ están relacionadas en secuencia, estructura y función de forma suficiente como para determinar que el Comité Nomenclador de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) recomendara en 2008 no utilizar la denominación “$GABA_C$” para los receptores formados por subunidades ρ, y que se los considere como un subtipo de $GABA_AR$ (Olsen & Sieghart, 2008), lo que ya está ampliamente aceptado (Collingridge et al., 2009), aunque genera algunas resistencias (Johnston, 2013).

Las tres subunidades ρ forman receptores homoméricos (GABAρRs) y pseudoheteroméricos (formados por ρ_1 y ρ_2) (Johnston, 2005), aunque existe controversia sobre la posibilidad de que haya receptores nativos formados por subunidades ρ coensamblados con γ_2 (Olsen & Sieghart, 2008). Los GABAρRs comparten propiedades farmacológicas con el resto de los $GABA_ARs$: son sensibles al bloqueo por picrotoxina y activables por muscimol (Chebib & Johnston, 2000). Pero difieren en muchas otras propiedades farmacológicas: su afinidad por GABA (1-4 μM para GABAρR vs 10-100 μM para $GABA_ARs$ clásicos); los GABAρRs son activables por al análogo de GABA ácido cis-aminocrotónico (CACA) y se bloquean por el antagonista específico ácido (1,2,5,6- tetrahidropiridin-4-il)-metilfosfínico (TPMPA). También son insensibles a bicuculina y a moduladores como benzodiazepinas (a bajas concentraciones) y ácido barbitúrico (Chebib, 2004). Sin embargo, otros subtipos de $GABA_ARs$ también difieren en su farmacología con los $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (ej.: la sensibilidad relativa a benzodiazepinas), por lo que la clasificación de los GABAρRs como un grupo separado de los $GABA_A$ en base a su farmacología diferente también fue cuestionado.

Las respuestas farmacológicamente características de los GABAρRs fueron observadas en retina como se detallará en la próxima sección y en otras áreas del cerebro durante el desarrollo embrionario y postnatal (Denter et al., 2010). Los trabajos realizados por Strata, Martina y Didelon, y sus colaboradores indican que los GABAρRs se expresan en neuronas del hipocampo de rata sólo durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal (Alakuijala et al., 2005; Didelon et al., 2002; Martina et al., 1994, 1995; Strata & Cherubini, 1994), aunque otros trabajos reportaron la existencia de respuestas GABAρ en hipocampo maduro y otras zonas del cerebro (Alakuijala et al., 2006; Rosas-Arellano et al., 2011). También se han encontrado receptores con farmacología mixta (Semyanov & Kullmann, 2002), aunque persisten dudas sobre si estos hallazgos no son en parte atribuibles a que las drogas disponibles no tienen la especificidad suficiente para una discriminación fina de receptores débilmente expresados (Semyanov & Kullmann 2002; Cherubini E. comunicación personal).

(ii) Rol del receptor GABA ρ1 en la retina.

La sinapsis inhibitoria amácrina-bipolar, ubicada en la capa plexiforme interna (CPI) de la retina (**Figura I - 2**), participa de dos tipos de inhibición en la fisiología de la visión. Por un lado la inhibición recíproca, que ocurre cuando la liberación de glutamato desde la célula bipolar produce la retroalimentación negativa a través de botones presinápticos de células amácrinas locales (Vigh & von Gersdorff, 2005). Este mecanismo inhibitorio controla la duración e intensidad de la liberación de glutamato desde la célula bipolar. Y en segundo lugar, la inhibición lateral, producida cuando una célula bipolar lateral activa la liberación de GABA desde una célula amácrina, lo que moldea la activación lateral frente a un estímulo lumínico (Chávez et al., 2010).

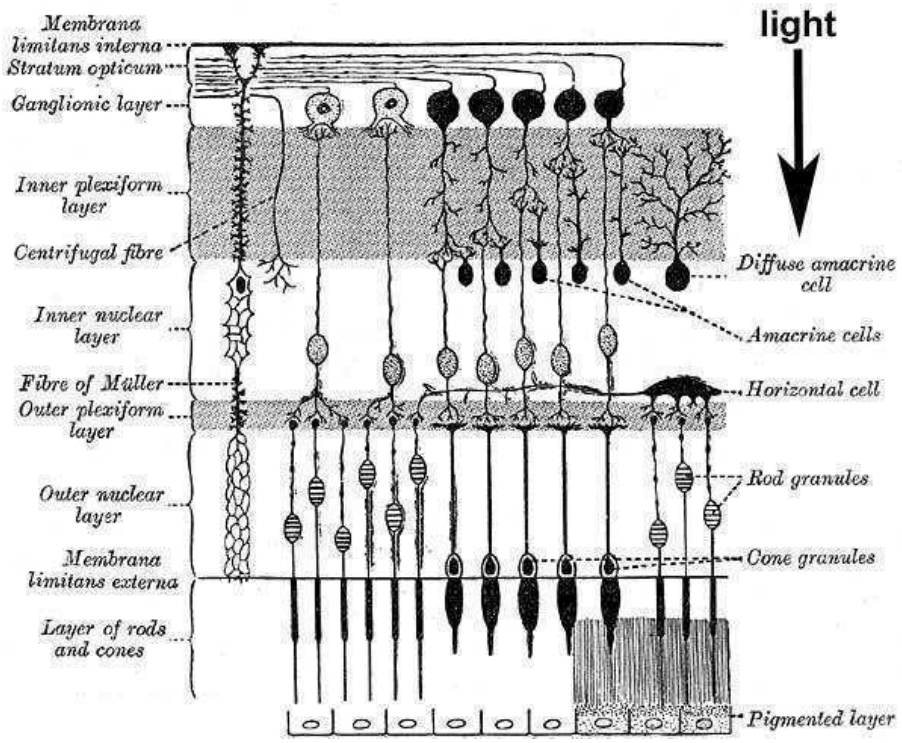

Figura I - 2. Diagrama de las capas de la retina.
Los GABAρRs están fuertemente expresados en las células bipolares, donde participan en las sinápsis bipolar-ganglionar y amácrina-bipolar. Tomado y modificado de (Ramón y Cajal, 1989).

Los GABAρRs están fuertemente expresados en las células bipolares de retina (McCall et al., 2002) donde participan de ambos tipos de inhibición en el control de la excitabilidad del terminal bipolar a través de las sinapsis con las células amácrinas (Dong & Werblin, 1998). Las corrientes iónicas evocadas por GABA con las características similares a las observadas para GABAρR recombinantes fueron halladas en la retina de distintas especies animales. Por un lado, en las células bipolares de la retina de rata y salamandra tigre se reportaron corrientes iónicas evocadas por GABA insensibles a bicuculina y baclofen (Lukasiewicz & Werblin, 1994). Para éstas células se postuló un rol inhibitorio presináptico producto de la activación de

los GABAρRs (Lukasiewicz & Werblin, 1994). Por otra parte, la transmisión GABAérgica de las células amácrinas hacia las terminales de las células bipolares forma además un lazo de realimentación negativo ya que una parte de la información que las células bipolares envían a las células amácrinas vuelve a su terminal (Lukasiewicz & Werblin, 1994). De esta manera, la sinapsis amácrina-bipolar funcionaría como un sitio de control de la ganancia para la sinapsis bipolar-ganglionar (Lukasiewicz et al., 2004). Por otra parte, la participación de los GABAρ1Rs en la sinapsis bipolar-ganglionar se estudió extensamente. Se demostró que en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para la subunidad ρ1, las respuestas "tipo $GABA_C$" están completamente ausentes (McCall et al., 2002), y el procesamiento visual resulta alterado.

Los GABAρRs expresados por las células bipolares, también median una corriente inhibitoria tónica activada por el nivel extracelular basal de GABA, controlado localmente por el transportador GAT-1 (Hull et al., 2006; Jones & Palmer, 2009). Esta corriente, se postula que previene la liberación vesicular en ausencia de estímulos de alta frecuencia (Hull et al., 2006).

(iii) Receptores fásicos y tónicos

Los $GABA_A$Rs pueden clasificarse de acuerdo a su modo de activación. El primero de ellos, la activación fásica, tiene lugar en las sinapsis GABAérgicas. Con la llegada de un potencial de acción se produce una entrada de calcio local que desencadena la fusión de las vesículas sinápticas en la membrana presináptica y la liberación de cientos de moléculas de GABA al espacio sináptico, generando un pico de concentración de GABA en el rango milimolar. Los receptores postsinápticos, localizados en grupos o clusters en la membrana postsináptica, son activados por la unión del agonista (Farrant & Nusser, 2005).

La actividad fásica es fundamental para la transmisión de información en el cerebro. Esta forma de transmisión se caracteriza por la corta duración del transitorio de GABA al que los receptores son expuestos. Su curso temporal es influido por el tamaño de las vesículas sinápticas, su contenido, la geometría de la sinapsis, y el número y arreglo espacial de los transportadores de GABA y los receptores postsinápticos. La cinética de las corrientes espontáneas inhibitorias miniatura (mIPSCs), generados por la liberación de una única vesícula de GABA, permite estimar la proximidad de los receptores al sitio de liberación y el fenómeno del rápido cierre de los canales conocido como deactivación (Burkat et al., 2001). La expresión de diferentes subunidades ha sido propuesta como parcialmente responsable de las diferencias en la cinética de los mIPSCs observados en diferentes tipos celulares y durante el desarrollo (Ramadan et al., 2003) (**Figura I - 3.A**).

Luego de su liberación vesicular, el GABA podría difundir y activar receptores adyacentes (perisnápticos), otras densidades postsinápticas o incluso receptores extrasinápticos más distantes. Sin embargo, las corrientes resultantes de la difusión de GABA del sitio de liberación sináptica (fenómeno llamado spillover) todavía conservarían la relación temporal con

el evento sináptico, por lo que puede ser considerado actividad fásica (Farrant & Nusser, 2005) (**Figura I - 3.B**).

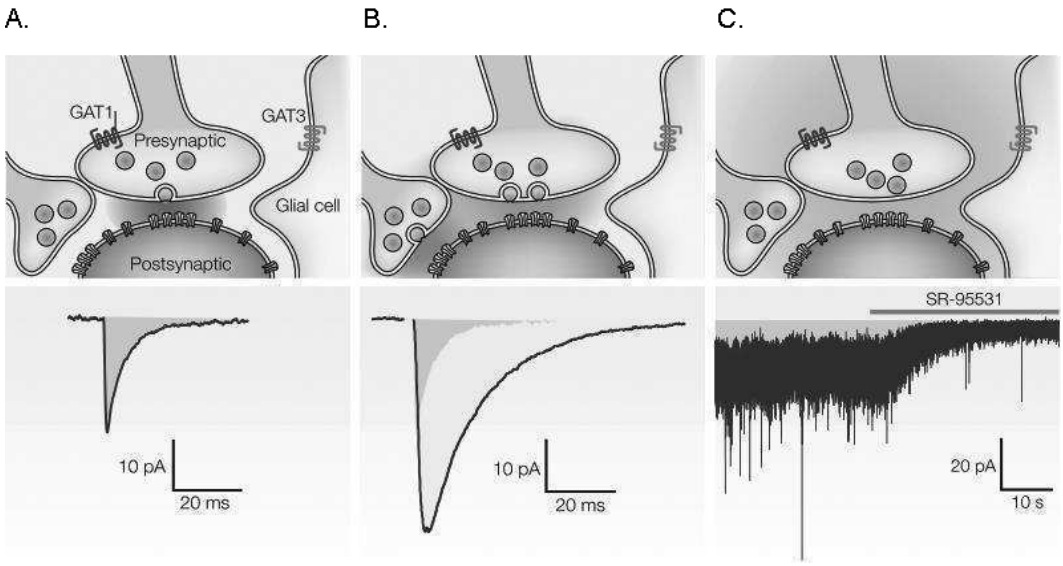

Figura I - 3. Modos de activación de los receptores de GABA.
A. La liberación de una vesícula única de GABA desde una presinápsis activa solamente los receptores agrupados en la membrana postsináptica opuesta. El sombreado indica la difusión del GABA. La corriente mostrada abajo represente un mIPSC promedio registrado en presencia de tetrodotoxina. (GAT1 y GAT3) son los transportadores de GABA). **B**. La liberación de múltiples vesículas por un potencial de acción promueve el spillover de GABA, y activa receptores sinápticos, peri y extrasinápticos, asi como receptores de sinápsis vecinas. La corriente registrada es mucho mayor, asi como el IPSC es más lento, el área del mIPSC está indicado en gris oscuro. **C**. Una baja concentración de GABA, que permanece pese a la actividad de los transportadores activa receptores extrasinápticos de alta afinidad. El trazo inferior muestra la corriente tónica producida. Se observa el ruido producto de la apertura estocástica de estos receptores. Este ruido disminuye al aplicar el antagonista SR-95531 (gabazina), que bloquea la corriente tónica y fásica. El bloqueo de la corriente tónica se observa en el cambio en la I_H. Los registros provienen de células granulares de cerebelo. Tomado y modificado de Farrant & Nusser (2005).

La activación de los $GABA_AR$ puede ocurrir también de una forma menos delimitada en tiempo y espacio. La presencia ubicua de receptores en soma, dendritas y axones posibilita una actividad parácrina donde los receptores son activados por el nivel lentamente variable de GABA presente en el medio extracelular. La actividad GABAérgica tónica fue identificada en primer lugar en células granulares de cerebelo de rata registradas en modo de fijación de voltaje (voltage-clamp), Kaneda y col. mostraron que los antagonistas selectivos bicuculina y gabazina, no solo bloquean los IPSCs espontáneos, sino que también disminuyen la corriente de mantenimiento (holding; I_H) requerida para fijar el voltaje de la célula a un potencial determinado (Kaneda et al., 1995) (**Figura I - 3.C**). Esta disminución está asociada a una reducción de la varianza de la corriente, consistente con un menor número de $GABA_AR$ abiertos. Más adelante, se encontraron conductancias GABAérgicas tónicas en giro dentado, neuronas tálamo-corticales, neuronas de la capa V de corteza somatosensorial, amígdala y

células piramidales e interneuronas de la región CA1 de hipocampo (Belelli et al., 2009; Bright & Brickley, 2008; Keros & Hablitz, 2005; Marowsky et al.; Vardya et al., 2008).

Se estima que la concentración ambiental de GABA varía en el rango de decenas de nanomolar a micromolar. Esta concentración sería un reflejo de la actividad sináptica GABAérgica, de la acción de los transportadores de GABA neuronales y de la liberación y recaptación de GABA mediada por astrocitos (Brickley & Mody, 2012).

La neurotransmisión inhibitoria fásica es clave para el funcionamiento de diversos procesos neurofisiológicos, entre ellos se pueden mencionar: la generación de actividad rítmica en redes neuronales (Somogyi & Klausberger, 2005), la regeneración de la actividad eléctrica en dendritas (Klausberger, 2009) y la integración sináptica (Pouille et al., 2009). Por su parte, la inhibición tónica produce un incremento constante de la conductancia celular, lo cual afecta la magnitud y duración del cambio de potencial de membrana ante la inyección de una corriente, y aumenta la caída de voltaje con la distancia. Por lo tanto, la ventana temporal y espacial para la integración sináptica será más estrecha, haciendo menos probable el disparo de potenciales de acción. En otras palabras, la modulación de la transmisión tónica, afecta la excitabilidad neuronal de una región y su integración en un circuito (Glykys & Mody, 2007a). La generación de la actividad rítmica también es afectada por la inhibición tónica en el hipocampo (Semyanov et al., 2004).

La detección de bajos y persistentes niveles extracelulares de GABA requieren de receptores con alta afinidad, nula desensibilización y baja conductancia unitaria. El receptor homomérico ρ1 cumple con todos estos requisitos y se ha demostrado su participación en la neurotransmisión inhibitoria tónica de las células bipolares de retina (Hull et al., 2006). Por otra parte, se han identificado distintos subtipos de $GABA_A$Rs que participan de la inhibición tónica en diferentes poblaciones neuronales en animales adultos y durante el desarrollo (Brickley & Mody, 2012; Caraiscos et al., 2004; Kilb et al., 2013; Lu et al., 2013) (**Tabla I. 1**).

Las acciones directas o indirectas de los receptores tónicos de GABA se han asociado con diversos trastornos y patologías del CNS. La alteración en el sueño que subyace a muchas patologías neurológicas, es atribuida a un trastorno en la dinámica del ritmo tálamo-córtico-estriatal. Se ha postulado la participación de $GABA_A$R extrasinápticos en este trastorno . En este sentido, el gaboxodol, un fármaco selectivo para $GABA_A$R que contienen la subunidad δ, tiene efectos hipnóticos y promueve el sueño (Houston et al., 2012).

Los desórdenes asociados con estados hormonales alterados como el embarazo o la pubertad, también fueron relacionados con $GABA_A$R tónicos, debido a que estos son los blancos principales de los neuroesteroides derivados de las hormonas ováricas (Brickley & Mody, 2012; Smith, 2013). Del mismo modo, la acción alterada de estos neuroesteroides está asociada a patologías psiquiátricas.

En varias formas de epilepsia se han implicado alteraciones en la actividad de $GABA_A$Rs sinápticos y extrasinápticos incluyendo mutaciones puntuales (Brickley & Mody, 2012). Más aún, diversos fármacos que actualmente se utilizan como antiepilépticos modulan la inhibición tónica modificando el nivel de GABA en el medio. Por ejemplo la vigabatrina, que bloquea el catabolismo de GABA; la tiagabina que bloquea el transportador de GABA GAT-1; la pregabalina y la gabapentina, que aumenta la síntesis de GABA o la ganaxolona, modulador alostérico con mayor selectividad por receptores que expresan la subunidad δ.

Receptor	Zona de expresión
α5βγ2	Células piramidales de hipocampo; células piramidales de neocorteza
α1βδ	Interneuronas de hipocampo; interneuronas de neocorteza
α6βδ	Células granulares de cerebelo
α4βδ	Neuronas de relevo talámico; neuronas medium spiny del estriado; células granulares de giro dentado de hipocampo; células piramidales de neocorteza

Tabla I. 1. Subtipos de receptores GABAérgicos que median corrientes tónicas. Tomado de Brickley y col (2012).

Los receptores que contienen la subunidad α5 (que se expresan en el área CA1 del hipocampo), y las corrientes tónicas que median, tienen un impacto negativo sobre la memoria y el aprendizaje de acuerdo a diversos estudios realizados con ratones mutantes para los $GABA_A$α5Rs o tratados con moduladores alostéricos negativos selectivos (Brickley & Mody, 2012; McEown & Treit, 2013).

Por último, en diversos sistemas in vitro, se observó que la potenciación de la inhibición tónica, tiene un efecto neuroprotector agudo. Por ejemplo, en el estriado, la citotoxicidad mediada por ácido quinolínico es disminuida, potenciando la inhibición tónica. A su vez, en modelos de stroke cortical, el bloqueo de la corriente tónica aumenta el tamaño del área lesionada (Brickley & Mody, 2012). Estos hallazgos abren la puerta a estrategias farmacológicas para el tratamiento de la recuperación post stroke, basadas en la modulación de los receptores de GABA tónicos.

(iv) Moduladores de los receptores de GABA.

Se entiende como moduladores aquellas sustancias que modifican la actividad de los receptores al ser activados por un agonista, pero no son capaces de activar los mismos per se. Existe una gran diversidad de moduladores de la actividad de los $GABA_ARs$ en general, y de los GABAρ1R en particular, que incluye a neuroesteroides (Johnston, 2005), flavonoides (Goutman et al., 2003; Hanrahan et al., 2011), pH (Hugel et al., 2012), cationes como el zinc (Calvo et al., 1994; Hosie et al., 2003) y lantánidos (Goutman et al., 2005). En todos los casos, las subunidades participantes determinaron la sensibilidad por un grupo de moduladores o una sustancia en particular dentro de una familia.

La familia más ampliamente estudiada de moduladores de los $GABA_ARs$ son las benzodiazepinas, potenciadores alostéricos selectivos para $GABA_ARs$. Las benzodiazepinas se unen a la subunidad α de los $GABA_ARs$ (Boileau et al., 1999). Sin embargo la presencia de la subunidad γ2 les confiere a estos receptores una alta sensibilidad a benzodiazepinas (Johnston, 2005; Walters et al., 2000). Otros moduladores alostéricos de importancia farmacológica, son los barbitúricos (moduladores positivos) y las β-carbolinas (moduladores negativos) (Hanson & Czajkowski, 2008).

Otro modulador clásico cuya potencia es muy dependiente de las subunidades presentes en el receptor es el etanol, un potenciador relativamente inespecífico a altas concentraciones (~ 50 mM), mientras que los subtipos tónicos de $GABA_AR$ α4β3δ y α6β3δ son potenciados por etanol a muy bajas concentraciones (3 mM), niveles alcanzables con un consumo moderado de bebidas alcohólicas (Johnston, 2005).

Un clase de modulación de especial interés para nuestro trabajo es la ejercida por agentes rédox. La modulación por sustancias reductoras u oxidantes ha sido ampliamente documentada en un gran número de canales activados por voltaje y receptores ionotrópicos, incluyendo receptores de la familia cys-loop (Aizenman et al., 1989; Annunziato et al., 2002; Belevych et al., 2009; Bouzat et al., 1991; Campanucci et al., 2008; Cho & Askwith, 2007; Coddou et al., 2009; Pan et al., 1995; Susankova et al., 2006). La modulación rédox fue extensamente estudiada para receptores neuronales de NMDA y GABA (Amato et al., 1999; Calero & Calvo, 2008; Calero et al., 2011; Pan et al., 2000; Sullivan et al., 1994; Tang & Aizenman, 1993). Los agentes reductores, como el ditiotreitol (DTT), el cual es capaz de reducir enlaces disulfuro, potencian la actividad de los NMDAR y $GABA_AR$, mientras que agentes oxidantes, tales como el ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), disminuyen la actividad de estos receptores. Esta modulación de las respuestas se describió tanto para receptores endógenos (Calero et al., 2011; Tang & Aizenman, 1993), como también en receptores expresados en sistemas de expresión heteróloga (Amato et al., 1999; Sullivan et al., 1994). Para ambos casos, los compuestos reductores y oxidantes presentaron efectos reversibles y

concentración dependiente. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida permitieron determinar las cisteínas participantes de la modulación rédox en NMDAR, que resultaron las mismas que son modificadas por el NO y que también median la modulación por Zn (Lipton et al., 2002).

La sensibilidad de los $GABA_A$Rs frente a los agentes rédox también es dependiente de la composición de los mismos. Las respuestas evocadas por GABA en receptores que contienen la subunidad γ2 son menos sensibles a la modulación por compuestos rédox (**Figura I - 4. A y B)** (Pan et al., 2000). Experimentos realizados en GABAρ1R expresados en ovocitos de Xenopus demostraron que los agentes rédox actúan sobre el receptor, al menos parcialmente, modificando el estado de las cisteínas (**Figura I - 4**. **C)** (Calero & Calvo, 2008).

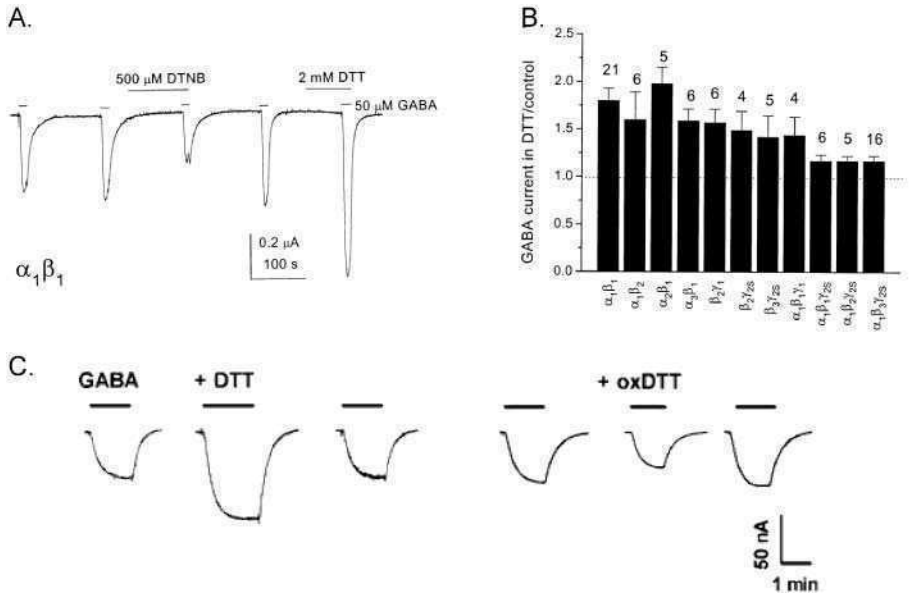

Figura I - 4. Modulación de GABAARs por agentes rédox.
A. Trazo representativo de la inhibición por un oxidante (DTNB) y la potenciación por acción de un reductor (DTT) de las respuestas mediadas por receptores $GABA_A$α1β1 expresados en ovocitos de Xenopus. **B**. Resumen de los experimentos de modulación por DTT sobre las respuestas evocadas por GABA en receptores con diferente composición. Nótese que los receptores que contiene la subunidad γ2s son menos sensibles a la modulación rédox. **C.** Los GABAρ1Rs también son sensibles a la modulación por DTT. Tomado y modificado de (Calero & Calvo, 2008; Pan et al., 2000)

La modificación de tioles proteicos por agentes rédox, NO o especies reactivas del oxígeno (ROS), lejos de ser simplemente parte de las consecuencias de estados celulares patológicos, son actualmente aceptados como formas de señalización celular que participan en procesos fisiológicos tales como plasticidad sináptica y memoria, ritmo circadiano y proliferación y diferenciación celular (Biswas et al., 2006; Knapp & Klann, 2002; Smythies, 1999; Wang et al., 2012b). En el mismo sentido, las ROS son consideradas actualmente como mensajeros celulares fisiológicas en el CNS, además de participar en procesos patológicos (Dröge, 2002). En particular, la exposición a H_2O_2 potencia la actividad de los $GABA_A$Rs en rebanadas de hipocampo (Sah et al., 2002) y aumenta la liberación presináptica de GABA (Takahashi et al., 2007a). Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que el H_2O_2

también potencia la actividad de los GABAρ1Rs expresados heterólogamente (Beltrán González et al.).

(v) Hipocampo.

El hipocampo juega un papel clave en muchos aspectos de la memoria y el aprendizaje (Brown & Zador, 1990). Aunque la naturaleza exacta de la función mnemónica desarrollada por el circuito hipocampal todavía no está clara, esta región del lóbulo temporal es esencial para la memoria declarativa en humanos.

El hipocampo es una estructura cilíndrica, cuyo eje longitudinal forma un semicírculo alrededor del tálamo. El hipocampo propiamente dicho puede ser dividido en 4 regiones desganadas CA1-CA4 (del latín cornu Ammon o cuerno de Amón, por su parecido morfológico con la representación del dios egipcio). El giro dentado, el subiculum y la corteza entorrinal están incluidos en la más general Formación hipocampal o Región hipocampal. Tanto el hipocampo como el giro dentado son cortezas de 3 capas o estratos. Una capa polimórfica (stratum oriens), una capa piramidal (stratum piramidale) y una capa molecular (stratum radiatum y lacunosum moleculare) (**Figura I - 5**).

Las principales aferencias al hipocampo y al giro dentado provienen de la corteza entorrinal (a través de las fibras de la vía perforante), la región septal y el hipocampo contralateral. También existen aferencias desde diversas zonas del cerebro incluido el tallo encefálico, el hipotálamo, el tálamo y la amígdala.

Las principales neuronas del hipocampo son las células piramidales. Estas células son similares a las células piramidales de otras cortezas, aunque ligeramente más pequeñas. Se ubican en el estrato piramidal y forman una hoja curva de 2 o 3 células de espesor. Cada cuerpo celular es cónico (piramidal), de 20-40 µm de base y 40-60 µm de altura, con una dendrita apical de 5-10 µm de diámetro que pasa a través del stratum radiatum hacia el stratum lacunosum moleculare. Las dendritas basales arborizan formando el stratum oriens (Brown & Zador, 1990).

El hipocampo tiene diversas vías eferentes. La principal se desarrolla a través de la fimbria, compuesta de axones de las células piramidales y células del subiculum que se unen para formar el fornix, que cruza la línea media cerebral.

La organización funcional del hipocampo se describió tradicionalmente como un circuito trisináptico, aunque en la actualidad el conocimiento del circuito se ha complejizado considerablemente, incluyendo loops sinápticos alrededor de la Región hipocampal e interacciones entre cada región de un loop, además del control neuromodulatorio extrínseco. La secuencia trisináptica se describió de la siguiente manera: las fibras de la vía perforante contactan células granulares del giro dentado; estas células granulares proyectan axones tipo

fibras musgosas[1] a la región CA3 donde tienen contactos sinápticos con las células piramidales; estas células piramidales proyectan a través de las colaterales de Schaffer a la región CA1, donde forman sinapsis con sus células piramidales. Las fibras de la vía perforante provienen de células piramidales y estrelladas de las capas II y III de la corteza entorrinal. El circuito se cierra formando un loop, la región CA1 proyecta principalmente a las cortezas entorrinal y el complejo subicular, que a su vez también proyecta a la corteza entorrinal (Brown & Zador, 1990).

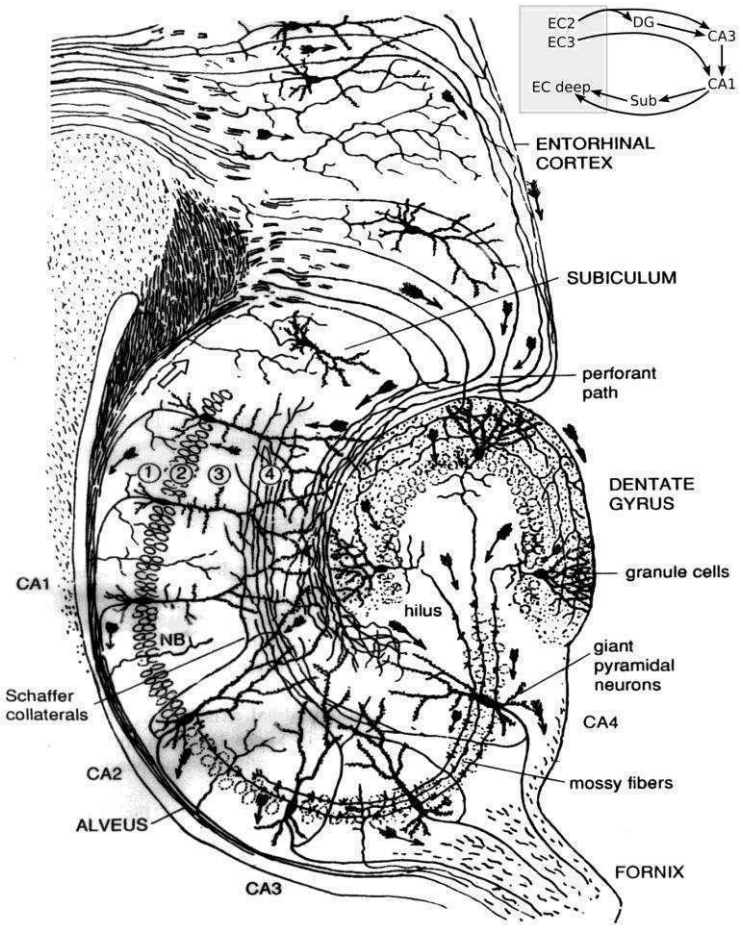

Figura I - 5. Elementos de la Formación hipoacampal.
El dibujo esquematiza las áreas que conforman la Formación hipocampal. El hipocampo propiamente dicho está dividido en 4 capas identificadas: 1) stratum oriens, 2) stratum pyramidale, 3) stratum radiatum (capa celular), 4) stratum lacunosum-moleculare. Las células piramidales de CA3 proyectan a CA1 a través de las colaterales de Schaffer (Schaffer collaterals). Las células granulares del giro dentado envía fibras mossy a las células piramidales de CA3. El recuadro en el sector superior derecho de la figura ilustra las conexiones que forman el circuito hipocampal (EC: corteza entorrinal, DG: Giro dentado). Tomado y modificado de (Brown & Zador, 1990).

[1] Del inglés mossy fibers

B) Neurotransmisión nitrérgica.

(i) Aspectos generales y mecanismos.

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, muy difusible y reactiva, con una vida media corta, que es generada por la óxido nítrico sintasa (NOS) a través de la conversión de L-arginina a L-citrulina (Boehning & Snyder, 2003) (**Figura I - 6**). El sustrato, L-arginina entra en las células por difusión facilitada a través de transportadores específicos para aminoácidos catiónicos (Zhou et al., 2010). Se conocen tres variantes genéticas de la NOS con distintas propiedades y localizaciones llamadas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La eNOS y la nNOS son dependientes de calcio/cadmodulina para su activación. La nNOS en particular, se encuentra acoplada a los receptores de NMDA (NMDAR) que permean cationes, entre ellos Ca^{2+}. Los NMDAR se localizan en las densidades postsinápticas anclados por la proteína PSD-95 (en el caso de las sinapsis excitatorias) a través dominios pdz (Choi et al., 2000). También se localiza en las densidades postsinápticas inhibitorias como se detallará en secciones siguientes (Jinno & Kosaka, 2002). La activación de la eNOS y la nNOS produce concentraciones nanomolares de NO, que por difusión desencadena múltiples efectos y señalizaciones río abajo. Dependiendo de la concentración alcanzada los efectos pueden ser disímiles y hasta opuestos. Generalizando, bajas concentraciones de NO median efectos fisiológicos (ej. neurotransmisión y vasodilatación) que son neuroprotectores; mientras que concentraciones mayores median respuestas inmunes e inflamatorias (principalmente vía la activación de la iNOS), y resultan neurotóxicos (Thomas et al., 2008).

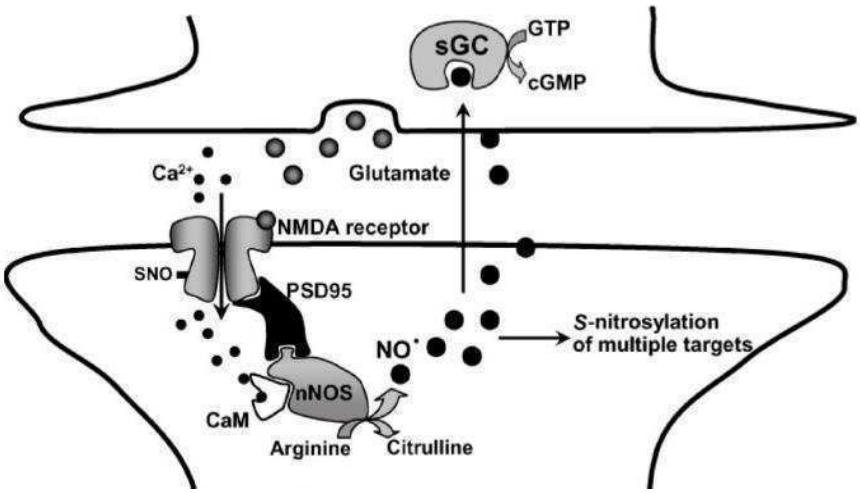

Figura I - 6. Regulación de la síntesis de NO.
En la postsinápsis glutamatérgica, la nNOS se encuentra asociada a la densidad postsináptica del NMDAR mediante la proteína adaptadora PSD95. La entrada de calcio a través de los NMDAR activa la nNOS por un mecanismo dependiente de calcio/cadmodulina. El NO producido puede difundir a células cercanas y activar la guanilato ciclasa soluble o modificar residuos de cisteínas de proteínas blanco (S-Nitrosilación). Tomado y modificado de (Boehning & Snyder, 2003)

Dada su movilidad no restringida por las membranas celulares, el NO puede actuar como un transmisor volumétrico (Steinert et al., 2008). Tanto en el sistema vascular como en el CNS, la difusión del NO fue estimada en 60-100 µm (Hopper & Garthwaite, 2006; Ledo et al., 2005; Steinert et al., 2008). Sus acciones son limitadas por la propia inactivación, ya sea por scavengers celulares como el glutatión, o por degradación por reacción con oxígeno (Garthwaite, 2008). Se postuló que el NO actúa como mensajero retrógrado en las sinapsis, mediando en la señalización desde la neurona post a la presináptica, regulando de esta manera la plasticidad sináptica (Garthwaite, 2008). Pero las mismas propiedades también posibilitan que el NO alcance cualquier sitio cercano, incluso células que no tienen actividad sináptica o expresión de NOS (Steinert et al., 2011a).

El NO actúa a través de dos vías efectoras principales: por un lado, produce la activación de la guanilato ciclasa soluble (GC) que media la producción de GMPc a partir de GTP (Derbyshire & Marletta, 2012). El GMPc es un activador de la protein kinasa G (PKG), además de activar a canales iónicos activables por nucleótidos cíclicos. Por su parte, la PKG tiene numerosos blancos que incluyen canales iónicos, factores de transcripción y enzimas como la propia nNOS (Steinert et al., 2011a). A su vez, las fosfodiesterasas degradan el GMPc dando fin a la señal. 11 genes de la familia de las fosfodiesterasas se expresan en el SNC (Steinert et al., 2011a).

La segunda vía efectora del NO consiste en la adición de un radical NO al –SH de una cisteína, en una reacción llamada S-Nitrosilación o S-Nitrosación según el autor. En esta tesis adoptaremos el término S-Nitrosilación. Dicha modificación postraduccional se ha encontrado en gran cantidad de proteínas (Jaffrey et al., 2001). Durante muchos años, estuvo en debate si la S-Nitrosilación ocurría únicamente en condiciones patológicas, donde el NO alcanza niveles de uno o dos órdenes de magnitud superiores a las normales (Garthwaite, 2008). Sin embargo, las evidencias que muestran a la S-Nitrosilación como una vía de modulación de enzimas y receptores en condiciones celulares fisiológicas fueron en aumento (Hess et al., 2005; Stamler et al., 2001). Tres mecanismos han sido propuestos para la formación de S-nitrosotioles a partir de estudios in vitro (**Figura I -** 7). El primero (vía 1 de la figura), involucra la formación de un intermediario a partir de NO y O_2 (N_2O_3) que actuaría como agente nitrosilante. El segundo (vía 2), la formación de un radical tiilo (S·) a partir de una forma oxidada de NO (·NO_2), que reaccionaría con otra molécula de NO. El tercero (vía 3), postula la formación de un radical (RSNOH) a partir de una reacción directa entre el NO y el tiol. Los dos primeros resultarían los más frecuentes para algunos autores (Keszler et al., 2010), mientras que otros sostienen la relevancia fisiológica del tercero (Kolesnik et al., 2013), pero los 3 involucran un equilibrio entre el NO, el O_2 y la reactividad del tiol. A su vez, estos factores dependen de la hidrofobicidad del entorno, el pH local, el estado rédox general y el entorno aminoacídico del

tiol (Smith & Marletta, 2012); estas circunstancias determinan la enorme especificidad de la reacción sobre una cisteína en particular dentro de una proteína con múltiples sitios blanco (Eu et al., 2000; Hess et al., 2005).

Es interesante que estas dos vías no son necesariamente independientes, en la activación de la GC por ejemplo, funcionan de forma interrelacionada y en equilibrio con el nivel de NO y el estado rédox celular. La GC es una hemoproteína que clásicamente se sabe que forma con el NO un complejo NO-hemo que induce un cambio conformacional y la consecuente activación de la enzima (Moncada & Bolanos, 2006), sin embargo un elegante estudio de Fernhoff y col. (Fernhoff et al., 2009), demostró que la GC a su vez está regulada también por la modificación de tioles. La unión del NO al grupo hemo de la GC, la activa 10 veces, mientras que la unión a las cisteínas β1C122 y α1C243 produce una potenciación de 200 veces. Además, resulta especialmente interesante destacar que la oxidación de estas cisteínas, impide la modificación por NO e inhibe la enzima, y también que la modulación por NO sobre las cisteínas es reversible en ausencia de reductores (Fernhoff et al., 2009).

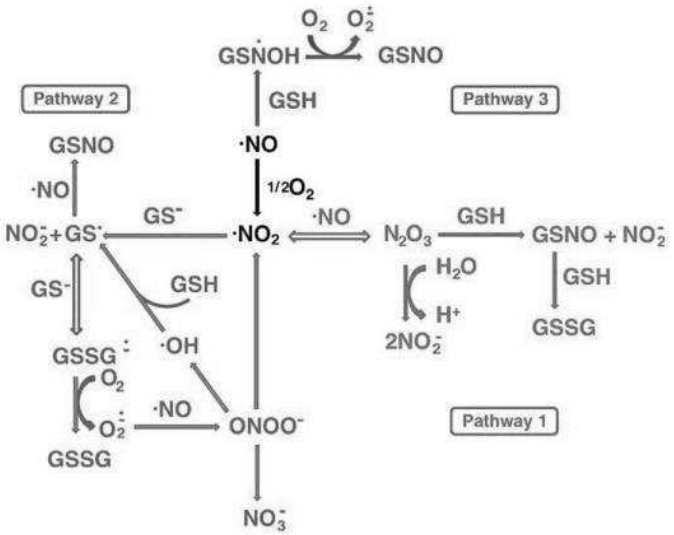

Figura I - 7. Mecanismos propuestos para la formaciónde S-Nitrosotioles.
Los tres mecanismos (vías) se ejemplifican con la reacción entre el NO, el O_2 y el GSNO (tomado de Keszler et al., 2010).

La remoción del grupo –NO o de-Nitrosilación, puede ocurrir espontáneamente dada la labilidad del enlace formado. También puede ser catalizada por metales como cobre o mercurio (Gaston et al., 2003). Por otra parte, diversas enzimas como la tioredoxina oxidasa, superóxido dismutasa (SOD) o glutatión peroxidasa mostraron actividad catalítica frente a moléculas pequeñas S-Nitrosiladas como el GSNO (Benhar et al., 2008; Hess et al., 2005). A su vez, Liu y col., demostraron que la aldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (GS-FDH), una enzima de expresión ubicua, tiene mayor actividad en la de-Nitrosilación de GSNO que frente a cualquier otro sustrato, por lo que esta es postulada como una de sus funciones principales, y

está conservada desde bacterias hasta humanos (Liu et al., 2001). Esta actividad mostró ser fundamental para la función cardiovascular (Beigi et al., 2012). Otro mecanismo de importancia, que se acopla al anterior, es la trans-Nitrosilación, en el cual los grupos S-Nitrosilados pueden transferir el NO a tioles cercanos de modo que el glutatión puede remover el NO de una proteína y luego ser de-Nitrosilado por la GS-FDH. Recientemente, se ha postulado también que la trans-nitrosilación entre proteínas es un mecanismo de señalización celular conservado y de relevancia fisiológica (Nakamura & Lipton, 2013).

La señalización por NO en el cerebro modula una gran cantidad y diversidad de procesos fisiológicos: varias formas de plasticidad (potenciación o depresión de largo término: LTP y LTD), actividad de ritmos (circadiano y respiratorio), oscilaciones tálamo-corticales y desarrollo neuronal (Zhang et al., 2010). El NO está involucrado en aprendizaje y memoria en el cerebelo, LTP en hipocampo y neocorteza y en LTD en el cerebelo (Garthwaite, 2008; Steinert et al., 2011a). Los blancos de las vías de señalización nitrérgica son diversos y en muchos casos no están resueltos. Existen evidencias de que el NO modula o participa en la liberación presináptica de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios (Li et al., 2002; Wang et al., 2007b; Yang & Cox, 2007), el clustering y traficking de receptores postsinápticos de AMPA (Huang et al., 2005; Selvakumar et al., 2009; Wang et al., 2012a) y la fosforilación del factor de transcripción CREB (Garthwaite, 2008).

(ii) Efectos directos del NO sobre canales y receptores.

En esta sección detallaremos un resumen de los reportes de efectos del NO sobre la actividad de canales o receptores por mecanismos independientes de la activación de la GC/GMP_C. Como se mencionó en la sección anterior, la S-Nitrosilación de una cisteína proteica es uno de los mecanismos principales para la modulación por NO, pero no necesariamente el único posible. En muchos estudios, no se demostró de manera concluyente la S-Nitrosilación de la proteína, sin embargo, se determinó el residuo o residuos sensibles a la acción del NO, o bien la independencia de la vía de la GC/GMP_C.

La modificación de residuos de cisteína por NO es extremadamente específica, y refleja la accesibilidad, el entorno químico y la conformación de la proteína blanco. Incluso, se propuso la existencia de una secuencia consenso para la S-Nitrosilación (Stamler et al., 1997), sin embargo, el arreglo espacial de los residuos propuestos para catalizar la reactividad de la cisteína no siempre es determinable, o bien no está presente en todos los casos (Hess et al., 2005).

Por otra parte, bajo condiciones de estrés oxidativo, ya sea por elevada producción de NO o de ROS, puede desencadenarse la producción de peroxinitrito. Esta especie produce reacciones de nitración de tirosinas, metioninas, cisteínas y lípidos; de carácter inespecífico y

citotóxico (Rubbo & Radi, 2008). Sin embargo, los efectos de estudios bajo estas condiciones escapan a los objetivos de esta tesis y no los incluiremos en este resumen.

El primer reporte concluyente de una interacción directa de NO sobre un canal iónico capaz de modular su actividad, se reportó en músculo liso vascular de ratas, donde se encontró que el NO activa un canal de potasio calcio-dependiente de forma directa e independiente de GMP_C, y por este mecanismo induce la relajación del músculo (Bolotina et al., 1994). Posteriormente, se reportó que en la hipófisis posterior de ratas, el NO inhibe la secreción mediante la activación por S-Nitrosilación de una canal de potasio calcio-dependiente (BK) (Ahern et al., 1999). La modulación de estos canales también se reportó en células ciliadas de la vía auditiva (Lv et al., 2010). En neuronas sensoriales del ganglio de la espina dorsal de ratas, la aplicación de donantes de NO activa un canal de potasio activado por ATP, mediante la S-Nitrosilación de una cisteína específica de la subunidad SUR1 (Kawano et al., 2009). Incluso en plantas, se reportó la S-Nitrosilación de un canal rectificador de potasio, que produce su bloqueo (Sokolovski & Blatt, 2004).

Probablemente, la inhibición del NMDAR sea la acción del NO más estudiada sobre una proteína de membrana (Lipton et al., 2002). Los NMDARs están presentes en asociación a la nNOS en la densidad postsináptica excitatoria y su activación produce un influjo de calcio que, entre otros efectos, activa la producción de NO. El NO producido tiene un feedback negativo sobre la propia nNOS y también inhibe la actividad del NMDAR (Hess et al., 2005). El efecto fue observado aplicando NO exógeno (Vidwans et al., 1999) o modificando el nivel producido de forma endógena (Choi et al., 2000) y fue reproducido en células corticales en cultivo (Hoyt et al., 1992; Lipton et al., 1993), células granulares del cerebelo (Fagni et al., 1995) y en sistemas de expresión heteróloga (Aizenman & Potthoff, 1999; Kim et al., 1999). Los estudios in vitro permitieron identificar una única cisteína (C399) de la subunidad NR2A responsable del efecto (Choi et al., 2000). Esta cisteína es S-Nitrosilada y produce una cambio conformacional que inhibe al receptor, al tiempo que disminuye su afinidad por Zn, otro modulador del receptor (Choi et al., 2001). Este mecanismo fue propuesto como una forma de neuroprotección frente a la excitotoxicidad provocada por una estimulación masiva de NMDARs (Klyachko et al., 2002). Posteriormente, se identificó otro par de cisteínas capaces de ser S-Nitrosiladas (C744 - C798 de la subunidad NR1), la S-Nitrosilación de estas cisteínas produce un cambio conformacional que favorece la S-Nitrosilación de la C399, lo cual produce la inhibición del receptor. Pero para que esto sea posible, el puente disulfuro C744-C798 debe estar reducido (Takahashi et al., 2007b). Esto ocurre únicamente en condiciones de baja presión parcial de oxígeno (pO_2) como los presentes durante un episodio de hipoxia. Por lo que el par C744-C798 funcionaría como un sensor de oxígeno que aumenta considerablemente la sensibilidad del NO cuando baja la pO_2. El mecanismo descripto funcionaría como un sistema

de protección del daño neuronal frente a la hipoxia (Takahashi et al., 2007b). Cabe destacar que tanto para esta modulación como para la encontrada en otros receptores, las cisteínas sensibles al NO también modulan la función del receptor al ser oxidadas o reducidas, por lo que el estado conformacional de la proteína es determinado, en última instancia por el estado rédox del tiol (Lipton et al., 1996).

Otros receptores y canales iónicos sensibles a la modulación directa por NO incluyen: canales de calcio tipo L, receptores de rianodina musculares RyR1 (Eu et al., 2000; Sun et al., 2003), canales de sodio de neuronas tipo C del ganglio de la raíz dorsal (Renganathan et al., 2002), canales TRP (Yoshida et al., 2006), receptores purinérgicos de la vía olfatoria (Broillet, 2000) y transportadores de aminoácidos (Zhou et al., 2010).

Evidencias en $GABA_AR$.

Desde hace 15 años, se realizaron varios estudios sobre los efectos del NO sobre $GABA_ARs$. Sin embargo, la caracterización permanece incompleta. El primer reporte data del año 1996 (Robello et al., 1996), en microsacos de corteza cerebral de rata, dos donantes de NO produjeron una disminución de la actividad de $GABA_ARs$ (11-26 %) medida como acumulación de $^{36}Cl^-$ de forma independiente a la activación de la vía del GMP_C. Posteriormente, trabajando con células amácrinas de retina en cultivo, Wexler y col. (1998) encontraron que un donante de NO modula negativamente las corrientes evocadas por GABA a través de 3 mecanismos aditivos distintos: la activación de la PKG, la disminución de la actividad de la PKA (vía activación de una fosfodiesterasa estimulada por GMP_C) y un tercer mecanismo independiente de los dos anteriores, presumiblemente un efecto directo sobre los receptores (Wexler et al., 1998).

El mismo año, Fukami y col, publicaron un trabajo con receptores expresados en ovocitos de Xenopus. Las corrientes evocadas por GABA en receptores α1β2ρ2s se redujeron en presencia del donante de NO NOC-18, mientras que se potenciaron en receptores α1β2, mostrando una menor sensibilidad por el NO (**Figura I - 8.A**.) (Fukami et al., 1998). Los efectos se previnieron con el scavenger de NO PTIO, y la inyección de un análogo de GMP_C no reprodujo los efectos, lo cual indicaría una acción directa del NO sobre los receptores. Sin embargo, lamentablemente en este trabajo no se puso a prueba la participación de las cisteínas por mutagénesis o modificación química, ni se demostró la S-Nitrosilación. Tampoco se mencionan resultados acerca de la reversibilidad de los efectos. Pero al igual que lo visto con los moduladores rédox, la presencia de la subunidad γ es crítica para definir la amplitud y hasta el sentido de la modulación.

Posteriormente, dos trabajos realizados en melanotrofos de glándula pituitaria de rana, demostraron que los $GABA_ARs$ nativos son potenciados por el NO a través de un mecanismo directo, independiente de la vía GMP_C/PKG (Castel & Vaudry, 2001; Castel et al., 2000). En el

primer trabajo reportaron que el NO inhibe los receptores a través de la vía del GMP_C y los potencia por un mecanismo directo (**Figura I - 8.B**.), siendo este último rápido y reversible, lo que produce un efecto global bifásico donde prevalece la inhibición. En el trabajo siguiente, abordaron el mecanismo del efecto directo potenciador y encuentraron que diversos donantes de NO (DEA y nitroprusiato de sodio) y agentes rédox oxidantes de cisteínas (H_2O_2 y DTNB) producen un efecto similar, lo que implica la participación de cisteínas sensibles. La potenciación producida por el DEA fue rápida (1 min) y revirtió en poco tiempo (2-4 min). Proponen la S-Nitrosilación de una cisteína intracelular, sin embargo, los experimentos en los que sustentan esta afirmación no son concluyentes con respecto al lado de la membrana que media el mecanismo, por lo que los efectos también podrían ser mediados por residuos extracelulares (Castel & Vaudry, 2001). También se reportó una leve potenciación de los $GABA_ARs$ mediada por NO en células amácrinas en cultivo, aunque los autores no indagaron si los efectos fueron producto de acciones directas o indirectas sobre los receptores (Hoffpauir et al., 2006).

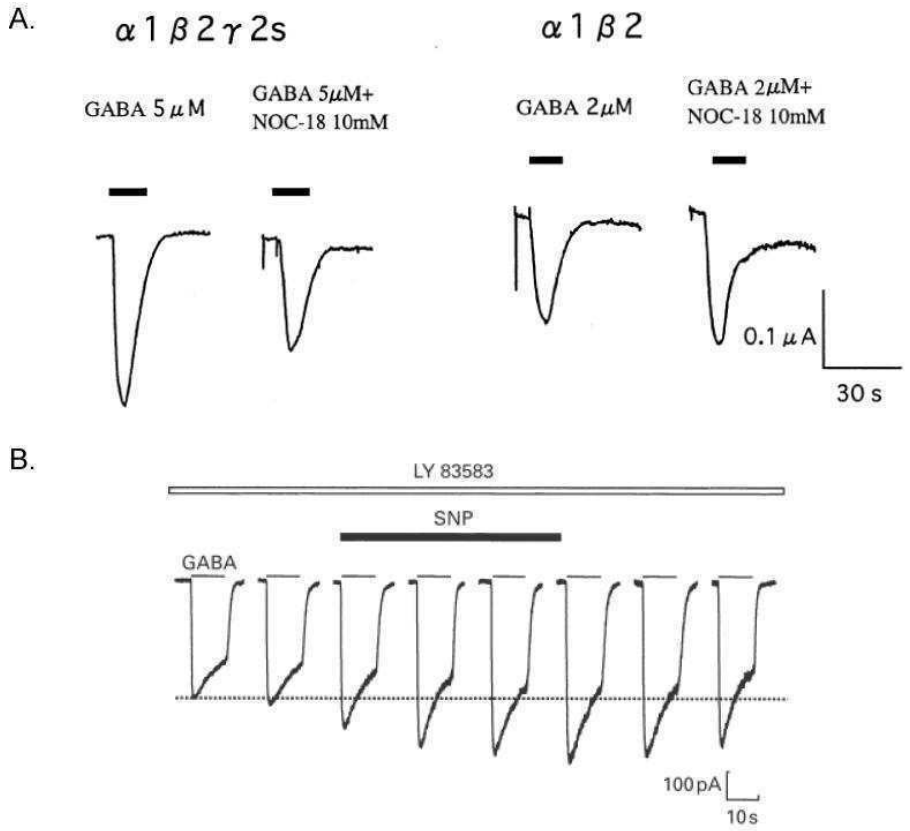

Figura I - 8. Efectos directos reportados del NO sobre $GABA_AR$.
A. Efectos del donante de NO NOC-18 sobre receptores expresados heterólogamente. El NO inhibió las respuestas en los receptores α1β2γ2s y potenció los receptores α1β2. Tomado de (Fukami et al., 1998). **B.** Efecto potenciador del donante de NO nitroprusiato de sodio sobre los $GABA_ARs$ nativos de melanotrofos de rana. LY 83583 es un inhibidor de la GC, lo cual evidencia que las acciones son independientes de esta vía. Tomado de (Castel & Vaudry, 2001).

Ya hemos mencionado estudios de los efectos del NO sobre los $GABA_A$Rs mediados por la estimulación de la síntesis de GMP_C, a saber la inhibición encontrada en melanotrofos (Castel et al., 2000) y células amácrinas de retina (Wexler et al., 1998). Debemos agregar un reporte realizado en receptores α1β2γ2L expresados en ovocitos, en el cual se muestra que la inyección de un análogo del GMP_C produce la potenciación de las respuestas evocadas por GABA (Leidenheimer, 1996). Estos trabajos indican que la sensibilidad de los receptores a este mecanismo modulatorio también es muy variable de acuerdo a la subunidad expresada, pudiendo resultar en potenciación o inhibición.

Como resumen de esta sección de la introducción, vale la pena remarcar que: 1) existen evidencias de la modulación de $GABA_A$Rs por la acción directa de NO y por la vía de la GC/GMP_C/PKG; 2) esta modulación es fuertemente dependiente de las subunidades que componen el receptor y, muy probablemente, de la célula donde estos se expresan (proteínas accesorias, estado rédox intra y extracelular, presencia de enzimas de la vía del GMP_C, etc.); 3) la participación de una o más cisteínas particulares de los $GABA_A$Rs no había sido estudiada previamente.

(iii) NO en la retina.

La señalización por NO está presente en todos los tipos celulares de la retina (Blom et al., 2012; Eldred & Blute, 2005). Estudios realizados en tortuga, ratón y salamandra mostraron que la producción de NO en la retina está mediada principalmente por la isoforma neuronal de la NOS activada por el aumento del Ca^{2+} intracelular, y en menor medida por la eNOS (Blom et al., 2012). El mecanismo efector principal es la producción de GMPc (Eldred & Blute, 2005).

El NO juega un papel clave en diversos procesos tanto del procesamiento visual y del desarrollo de la retina (Wu et al., 2001), como de patologías retinianas (Goldstein et al., 1996). Por ejemplo, el NO en la retina está aumentado en un modelo de diabetes en ratones (Blom et al., 2012) y en un modelo de lesión de retina (Groppe et al., 2003).

Como resumen del amplio espectro de trabajos en la fisiología de la retina normal, podemos citar que el NO aumenta la ganancia y el rango de voltaje para la exocitosis en conos (Eldred & Blute, 2005). También modifica la dinámica del calcio en los fotoreceptores, experimentos con donantes de NO e inhibidores de la NOS mostraron que el NO aumenta la entrada de calcio al facilitar la activación de canales de calcio en conos, y disminuye la entrada de calcio en bastones al reducir la conductancia máxima (Kourennyi et al., 2004). También la plasticidad sináptica dependiente de actividad es modulada, aumenta en conos y disminuye en bastones (Kourennyi et al., 2004).

En células bipolares, donantes de NO aumentan la conductancia de membrana y la amplitud de la corriente entrante en respuesta a estímulos brillantes y oscuros. El mecanismo propuesto es el desacople de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos de la células ON

con la cascada de señalización subsiguiente, efecto que estaría mediado por la PKG (Eldred & Blute, 2005). Por otro lado, en células horizontales de tortuga, la inyección de L-arginina produce un aumento de la respuesta celular a la luz, aumenta la resistencia de entrada, disminuye las respuestas al entorno y aumenta la repuesta a la estimulación del centro de su campo receptivo (Eldred & Blute, 2005). Posteriormente, se determinó que el NO es el mediador de la adaptación que sufren las células horizontales ante un incremento en la intensidad lumínica ambiental (reducen el campo receptivo) (Daniels & Baldridge, 2011).

Diversos trabajos mostraron la modulación de la transmisión GABAérgica (mediada por $GABA_A$Rs clásicos y GABAρRs) por NO. Yu & Eldred (2005) reportaron que los receptores de GABA y glici na interactúan en el control de la señalización por NO: la activación de receptores de glicina inhibe la producción de NO mientras que los $GABA_A$Rs actúan a nivel de la producción de GMPc, aunque a su vez el NO inhibe la liberación de glicina y estimula la liberación de GABA (Eldred & Blute, 2005). En células amácrinas, como ya se ha citado anteriormente, el NO inhibe la función de los $GABA_A$Rs a través de la vía del GMPc/PKG (Wexler et al., 1998). Sin embargo, Hoffpauir y col. (2006), reportaron que concentraciones moderadas de NO producidas a través de donantes (~100 nM de NO), potencian las respuestas mediadas por $GABA_A$Rs actuando sobre los receptores (aunque no estudiaron si por un mecanismo directo o a través de la vía del GMPc/PKG), mientras que concentraciones mayores de NO (cientos de nM a algunos µM), producen una marcada potenciación de los $GABA_A$Rs pero a través de un cambio en el E_{Cl}. Posteriormente determinaron que este cambio en el potencial de reversión se produce por un aumento del Cl^- intracelular, que se libera de reservorios intracelulares que se abren debido a una disminución del pH del citosol desencadenado por el NO (McMains & Gleason, 2011). Una vez más, en la retina corroboramos que el efecto neto del NO sobre la neurotransmisión GABAérgica es altamente dependiente del tipo celular y hasta de las condiciones de registro.

Por otra parte, la liberación de GABA también es modificada por el nivel de NO. Un estudio en retina de pollo intacta de Maggesissi y col. (2009), mostró que el NO basal producido de forma endógena o ligeramente aumentado con 100 µM de L-arginina, disminuye la liberación basal de GABA desde las células amácrinas y ganglionares. Sin embargo, el aumento del nivel de NO por aplicación de 1mM de L-arginina o NMDA, incrementa la liberación de GABA pero solo desde las células ganglionares. Por lo que en este tipo celular el NO tendría un efecto bifásico sobre la liberación de GABA (Maggesissi et al., 2009).

También en células ganglionares, se reportó que la aplicación de L-arginina o un donante de NO reduce las tasa de disparo, siendo mayor el efecto en las células OFF que en las ON (Wang et al., 2003). En ratones knock out para la nNOS, la falta de esta modulación produce una menor adaptación al aumento de la luminosidad cuando los animales están

adaptados a un ambiente oscuro (Wang et al., 2007b). El mismo resultado se obtuvo inhibiendo la NOS con L-NAME. Esta pérdida de sensibilidad a la luz en condiciones de adaptación a la luminosidad ambiental de las células ganglionares está mediada principalmente por la disminución del estímulo excitatorio (Nemargut & Wang, 2009).

Como era de suponer dada la abundancia de reportes que evidencian el rol del NO en la fisiología de la retina, la NOS está altamente expresada en todas las capas celulares (Eldred & Blute, 2005). Mediante experimentos de imágenes con el fluoróforo específico de NO DAF, se observó que la estimulación con luz produce un incremento del NO especialmente en las capas plexiformes externa e interna (Blom et al., 2012). En esta última se encuentran las sinapsis bipolar-ganglionar y amácrina-bipolar donde la expresión de GABAρ1Rs es máxima.

La determinación de la concentración de NO es sumamente compleja, especialmente con alta resolución temporal y espacial. En retina de rata, se determinó ex vivo una concentración de NO mucho mayor que la habitualmente reportada en el CNS, llegando a valores de 15 µM (Groppe et al., 2003). Recientemente, se reportó la medición de NO in vivo en retina de ratas (Guthrie & Kang-Mieler, 2013). En resumen el NO en todas las capas de la retina fluctúa entre 1 y 2,5 µM, teniendo zonas con mayores niveles de NO en la capa de fotoreceptores y en las capas ocupadas por las células ganglionares y amácrinas, donde la concentración aumenta entre 100 y 400 nM con respecto a las capas circundantes (Guthrie & Kang-Mieler, 2013).

(iv) NO en el hipocampo.

La neurotransmisión nitrérgica está involucrada en procesos fisiológicos del hipocampo como la modulación de la respiración celular (Ledo et al., 2012), la formación y morfología de las dendritas de las células piramidales durante el desarrollo (Morales-Medina et al., 2007); y procesos fisiopatológicos, como la diferencia sexual en la predisposición a desórdenes afectivos (Hu et al., 2012), los efectos en el comportamiento producidos por el estrés crónico (Zhou et al., 2011) y la generación de actividad epileptiforme en el área CA3, por un mecanismo independiente del GMP_C (Kovács et al., 2009).

Sin embargo, el proceso donde la participación del NO fue más extensamente estudiada es en la generación de LTP y LTD en células piramidales (Garthwaite, 2008; Zhang et al., 2006). Los protocolos de generación de LTP producen la activación de los NMDARs con el consiguiente influjo de calcio que activa la nNOS, asociada a los NMDARs en la densidad postsináptica y desencadena un aumento local del nivel de NO (Hopper & Garthwaite, 2006). En este modelo, el NO producido por la nNOS en la postsinapsis excitatoria, es un gran candidato para actuar como mensajero retrógrado, que difunde rápidamente a la presinapsis y modifica la maquinaria de liberación del neurotransmisor. Las acciones presinápticas, si bien no están completamente identificadas, incluirían la formación de clusters para la liberación del

neurotransmisor (Garthwaite, 2008) y la activación de canales hiperpolarizantes activados por nucleótidos (Fragata et al., 2006; Neitz et al., 2011).

Sin embargo, las evidencias muestran un escenario bastante más complejo. Por un lado, el LTP mediado por NO requiere la activación de la GC de tipo 2 (α2β1) presente en la presinapsis, como también la activación de la GC de tipo 1 (α1β1) expresada en la postsinapsis (Szabadits et al., 2007; Taqatqeh et al., 2009). En la postsinapsis, el NO tiene efectos sobre el número de receptores y el subtipo de canales expresados. La subunidad GLUR1 del receptor de AMPA aumenta su expresión postsináptica luego de un protocolo de LTP dependiente de NMDAR. Este aumento requiere la activación de PKG y es reproducible aplicando 8-Br-GMP_c (análogo del GMP_c), en neuronas hipocampales en cultivo (Garthwaite, 2008). En células piramidales de CA3, el NO actúa de forma homeostática, produciendo el reemplazo del subtipo de canales de potasio responsable de la repolarización tras un potencial de acción (se suprimen las corrientes mediadas por canales Kv3 y se aumentan las mediadas por canales tipo Kv2). Este reemplazo produce una repolarización más eficiente de las células y de esta manera, modula la excitabilidad neuronal (Steinert et al., 2011b). A su vez, para que el LTP persista por un tiempo mayor a una hora, es necesaria la fosforilación del factor de transcripción CREB en la postsinapsis (Garthwaite, 2008).

Por otra parte, más allá del atractivo de disponer de un elegante modelo donde el mensajero responsable del LTP es el NO producido por la nNOS luego de la activación de los NMDARs, esta forma de plasticidad no desaparece en ratones donde la nNOS ha sido knockeada, pero sí cuando se muta la forma endotelial de la NOS (eNOS) (Bon & Garthwaite, 2003). Además, la aplicación de un pulso de NO exógeno junto con una estimulación tetánica suave produce el LTP de forma independiente de la activación de NMDAR, pero no se produce en presencia de inhibidores de NOS. Esto sugiere que es necesario un tono basal de NO y un pico de NO facilitador, pareado con la actividad para que se produzca el LTP (Bon & Garthwaite, 2003). Este tono basal de NO es reproducible farmacológicamente y es necesario antes y después de la estimulación tetánica para que se desencadena la plasticidad. La fuente de este tono basal de NO en el hipocampo es la eNOS (Hopper & Garthwaite, 2006) presente únicamente en los capilares del endotelio vascular (Blackshaw et al., 2003). Esta enzima, aunque también es dependiente de calcio, posee sitios de fosforilación que permiten una fuerte activación con niveles de calcio intracelular de reposo. Un mecanismo de fosforilación relevante es a través de la quinasa Akt, que se activa en la cascada de la quinasa PI3 (Hopper & Garthwaite, 2006). Como hemos mencionado anteriormente, el NO es capaz de difundir en un radio de 60-100 µm. Entre los capilares donde se expresa la eNOs y las células gliales o neuronales la distancia no supera los 25 µm. Además los capilares forman una red ideal para aportar un nivel tónico de NO parácrino.

En resumen, existe un nivel basal de NO en las células piramidales producto de la actividad de la eNOS del sistema vascular, y un NO fásico dependiente de actividad, asociado a los NMDARs postsinápticos de las dendritas de las células piramidales (Burette et al., 2002). La expresión de nNOS en células piramidales fue demostrada en ratones, ratas y humanos (Blackshaw et al., 2003), aunque en ratas la expresión es alta durante el desarrollo y disminuye notablemente en animales adultos, a diferencia de lo observado en ratones. Sin embargo, el escenario es aún más complejo. La nNOS se expresa tanto en al menos 50% de las interneuronas que proyectan a la células piramidales (Jinno & Kosaka, 2002), como en las postsinapsis GABAérgicas de los somas de células piramidales (tanto parvalbúmina como colecistoquinina positivas) en rata y ratón (Szabadits et al., 2007). La expresión de nNOS está enriquecida en la membrana postsináptica GABAérgica en comparación con los dominios adyacentes. Además, en la pre y postsinapsis se expresa la GC, aunque tipo 1 en las interneuronas y tipo 2 en las células principales (tanto en sinapsis GABAérgicas como glutamatérgicas (Garthwaite, 2008; Szabadits et al., 2007). Recientemente se ha demostrado la producción de altos niveles de GMP_c en neuronales piramidales como respuesta a la estimulación con NO endógeno y exógeno (Bartus et al., 2013).

El proceso que desencadena la activación de la nNOS en las sinapsis GABAérgicas comparte elementos con el análogo en las sinapsis glutamatérgicas. En las postsinapsis GABAérgicas y otras zonas perisomáticas se expresan NMDARs extrasinápticos con respecto a las sinapsis excitatorias (Szabadits et al., 2011). La activación de estos receptores con NMDA (5 µM) produce la activación de la nNOS presente en las sinapsis GABAérgicas del soma de células piramidales de CA1 y CA3 (no se observaron efectos en giro dentado), que a su vez actúa de forma retrógrada produciendo un aumento del GMP_c en las interneuronas (Szabadits et al., 2011). Experimentos con puffs de NMDA, mostraron que la estimulación de NMDARs postsinápticos producen un aumento de la amplitud y frecuencia de sIPSCs por un mecanismo que involucra al NO como mensajero retrógrado (Xue et al., 2011). Se ha postulado que estos NMDARs podrían ser activados por glutamato o aspartato liberados desde la presinapsis GABAérgica a través de vesículas o transportadores de glumatato, o bien ser liberados por astrocitos. La estimulación repetitiva de las interneuronas perisomáticas produce oleadas de calcio en los astrocitos cercanos por activación de $GABA_BRs$, lo que produce la liberación de glutamato capaz de modificar los IPSCs (Szabadits et al., 2011). También se ha postulado la participación de receptores muscarínicos (M_1), permeables al calcio como desencadenantes de la activación de la nNOS. Macara y colaboradores (2007) reportaron que en neuronas CA1 estimuladas con el agonistas colinérgico carbacol, el NO participa como mensajero retrógrado en la supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI), una forma de depresión de la liberación de GABA de corto término que se produce al despolarizar la postsinapsis y que

está mediado por receptores CB_1. En presencia de carbacol, la inhibición de la NOS con L-NAME produjo una disminución del DSI (evocado con estimulación eléctrica) mientras que la L-arginina lo prolongó (Makara et al., 2007). Es interesante destacar, que al igual que en las sinapsis excitatorias, estos mecanismos de activación de la vía del NO en las sinapsis inhibitorias solo serían eficientes al coincidir temporalmente con la despolarización de la membrana somática, y/o con la actividad de los circuitos de interneuronas.

Existen reportes sobre los efectos del NO sobre la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo. Un estudio de la liberación de GABA en ratas in vivo mediante microdiálisis mostró que el NO tanto endógeno como exógeno tiene efectos bifásicos sobre la liberación de GABA: bajas concentraciones de NO disminuyen el GABA liberado, mientras que altas concentraciones lo aumentan (Getting et al., 1996). En otro estudio, realizado con ratones durante el desarrollo (P5-P8) en rebanadas de hipocampo, donde el GABA es excitatorio, la aplicación de un donante de NO redujo la amplitud de las corrientes GABAérgicas (aisladas farmacológicamente) evocadas por estimulación eléctrica en 7 de 12 células probadas. En las restantes 5 no se observaron efectos. Las corrientes glutamatérgicas también fueron inhibidas por NO. Ambos efectos fueron mediados, al menos parcialmente, por la producción de GMP_C (Cserép et al., 2011). Estos experimentos, no permiten determinar si los efectos son pre o postsinápticos. En estos animales también se registró la modulación de la excitabilidad sincrónica (característica durante el desarrollo) por imágenes de calcio. La inhibición de la NOS, produjo un aumento de la actividad sincrónica, al igual que el bloqueo de la GC; mientras que la aplicación de NO disminuyó la actividad (Cserép et al., 2011). Estos resultados son coherentes con los efectos observados de disminución de las corrientes GABAérgicas y glutamatérgicas e indican la presencia de un nivel de NO basal modulando la excitabilidad neuronal durante el desarrollo. La expresión de NMDARs asociados a las sinapsis GABAérgicas también fue encontrado en ratones con 5-6 días de desarrollo postnatal (Cserép et al., 2012).

Por otra parte, un estudio realizado en neuronas hipocampales en cultivo, evaluó los efectos de concentraciones neurotóxicas de NO (como las producidas en un episodio isquémico en el orden micromolar (Kojima et al., 2001)) sobre la neurotransmisión inhibitoria. La aplicación de NO produjo un incremento de la frecuencia en IPSCs espontáneos y miniatura y una ligera disminución en la amplitud de los mIPSCs (Zanelli et al., 2009).

En definitiva, el NO sería un potente modulador de la neurotransmisión inhibitoria. Sin embargo, la acción del tono basal de NO sobre la actividad de receptores tónicos nunca fue estudiada en el hipocampo.

No existen datos concluyentes sobre la concentración del tono basal de NO que llega al soma de las células piramidales de forma efectiva, sin embargo serían esperables

concentraciones subnanomolar. Existen controversias acerca de los niveles promedio y máximos de NO producidos por estimulación de los NMDARs en condiciones fisiológicas en el hipocampo. Sin embargo, los estudios más recientes concuerdan que la concentración de NO nunca alcanza valores superiores a 1 µM como se pensaba anteriormente y como se ha reportado en otros áreas y tejidos. Los valores observados oscilan entre cientos de pM a cientos de nM para condiciones basales en condiciones fisiológicas, considerando el nivel de pO_2 del tejido (Ledo et al., 2010; Wood et al., 2011).

(v) Efectos sobre la neurotransmisión GABAérgica.

Las acciones presinápticas del NO se estudiaron en detalle en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, importante en la homeostasis autonómica y endócrina. Las espinas de proyección del NPV reciben aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas. El NO (tanto endógeno como exógeno) incrementa la frecuencia de mIPSCs sin modificar la descarga excitatoria, lo que suprime la actividad de estas proyecciones neuronales (Li et al., 2002, 2003). El NO actúa a través de la vía del GMP_C-PKG por un mecanismo que involucra el canal de potasio Kv1.1 (Li et al., 2004; Yang et al., 2007). El aumento en la frecuencia de IPSCs también se reportó en sinapsis inhibitorias del núcleo geniculado dorsal lateral del tálamo y neuronas de la sustancia gris periacueductal (Xing et al., 2008; Yang & Cox, 2007) y en el núcleo del tracto solitario (Wang et al., 2007b). En el mismo sentido, se reportaron efectos potenciadores del NO sobre las sinapsis inhibitorias en células oxitocina y vasopresina positivas del núcleo supraóptico del hipotálamo. En este caso los efectos fueron pre y postsinápticos. Además de un aumento en la frecuencia de mIPSCs, se observó un incremento significativo de su amplitud (Stern & Ludwig, 2001). También, el NO produjo un incremento en la frecuencia de liberación de GABA en el tallo encefálico (Saransaari & Oja, 2006). Al contrario de lo observado en hipotálamo, en el ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal, el NO inhibió las corrientes mediadas por $GABA_A$Rs por un mecanismo dependiente de PKG (Bie & Zhao, 2001).

La cascada de señalización NO-GMP_C-PKG también participa en el LTP de las sinapsis GABAérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral por mecanismos presinápticos. Esta potenciación es bloqueada por morfina, lo que facilitaría el desarrollo de adicción a los opiodes (Nugent et al., 2009).

Mediante microiontoforesis se evaluaron los efectos in vivo del NO sobre las respuestas evocadas por GABA en el globo pálido y el núcleo subtalámico de ratas. En ambos estudios, la aplicación de SNOG inhibió las respuestas al GABA, mientras que el L-NAME las potenció (Carletti et al., 2012; Sardo et al., 2009). Como ya detallamos previamente (B)(ii)), el NO produjo una disminución de la actividad de los $GABA_A$Rs de forma PKG independiente en microsacos de corteza cerebral (Robello et al., 1996), y PKG dependiente en células granulares de cerebelo (Robello et al., 1998). Precisamente en células granulares de cerebelo, se reportó

que el NO basal modula una corriente GABAérgica tónica. El bloqueo de la NOS produjo un aumento de la I_H y de la varianza asociada de forma rápida y reversible en un 50% de las células estudiadas, en el otro 50% no se observaron efectos. Consecuentemente, también produjo una despolarización de la membrana de las células granulares. Los efectos están mediados por la potenciación de los GABAα6Rs tónicos. Llamativamente, en esta preparación el bloqueo del tono endógeno de NO también produjo un aumento de los sIPSCs, posiblemente por despolarización de las células de Golgi (interneuronas de las granulares en el hipocampo) (Wall, 2003). Este es el único estudio de efectos directos del NO sobre receptores de GABA tónicos en el cerebro del que tengamos conocimiento.

(vi) Introducción a los donantes[2] de NO.

Como se ha descripto anteriormente, el NO es producido en el SNC por la NOS a partir de arginina y oxígeno. Para evaluar los efectos del NO sobre un receptor recombinante expresado en ovocitos de Xenopus en primer lugar se debe elegir la fuente de NO exógena.

La síntesis de NO gaseoso en el laboratorio es problemática debido a su alta reactividad y corta vida media. Para obtener NO con la pureza adecuada, es necesario trabajar en ausencia total de oxígeno (Aga & Hughes, 2008), lo cual limita su utilización en un laboratorio biológico. Dada la notable relevancia fisiológica adquirida por el NO en las últimas décadas, se desarrolló una enorme variedad de compuestos capaces de liberar NO en solución para su provisión comercial. Estos compuestos, llamados genéricamente "donantes de NO", liberan NO al medio con una cinética conocida una vez solubilizados en un determinado pH. Los más utilizados para estudios farmacológicos sobre células o tejidos, pertenecen a tres grandes familias: S-Nitrosotioles, complejos nitrosil metal (ej.: nitroprusiato de sodio) y NONOatos.

Los NONOatos son aductos de NO con un nucleófilo (por lo general una amina) (**Figura I - 9**). Su descomposición en medio acuosos sigue una cinética de primer orden y es dependiente del pH, siendo casi instantánea a pH < 5 mientras que las soluciones alcalinas (pH > 11) son estables por horas en hielo y oscuridad (Feelisch, 1998). Existe una enorme variedad de compuestos comerciales que difieren en la vida media de descomposición y por ende, en la velocidad de liberación de NO, en un rango de segundos a horas. Tienen como ventaja que la tasa de liberación no es afectada por la presencia de reactivos biológicos (Feelisch, 1998) En la figura se presenta la estructura de dos de ellos: El DEA (DEA/NONOato; dietilamino NONOato) es de vida media corta ($t_{1/2}$ = 16 min a pH 7,4 y 22ºC) por lo que resulta ideal para evaluar efectos agudos aplicado directamente sobre el posible sitio blanco; y el DETA (DETA/NONOato; dietilentriamo NONOato) es de vida media larga ($t_{1/2}$ = 56 horas a pH 7,4 y

[2] Del inglés *"NO donors"*

22ºC (Aga & Hughes, 2008)) por lo cual resulta útil para estudios de exposición crónica o sostenida de NO sobre células o tejidos.

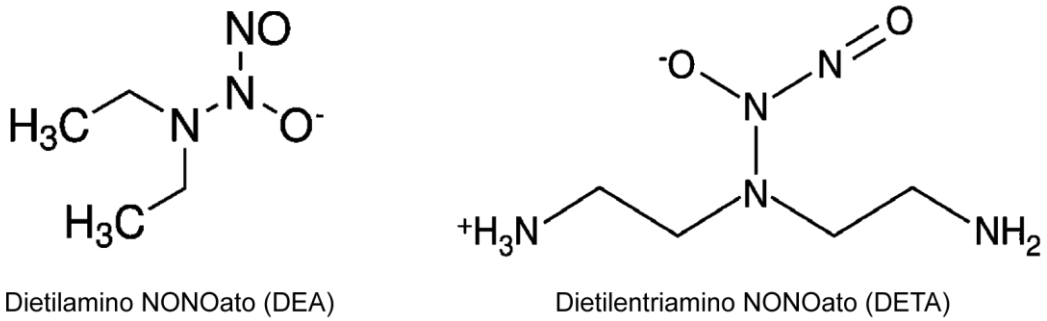

Figura I - 9. Estructura química de donantes de NO de la familia de los NONOatos.

Por el contrario, la acción de los S-Nitrosotioles (**Figura I - 10**) es atribuida principalmente a la capacidad de transnitrosilar, es decir transferir el grupo NO^+ directamente a un grupo –SH sin pasar el intermediario de NO gaseoso (Fernhoff et al., 2009), aunque también son capaces de liberar el gas en solución (Hess et al., 2005). La descomposición de los S-Nitrosotioles en solución por ruptura homolítica genera el NO y el radical RS que luego dimeriza para formar RSSR (Aga & Hughes, 2008). La posibilidad de que una reacción de transnitrosilación de como resultado un S-Nitrosotiol más inestable catalizaría además la descomposición del donante de NO. Los S-Nitrosotioles (junto con la S-Nitrosohemoglobina) han sido propuestos como buffers endógenos de NO, modulando la señalización celular en el tiempo y en el espacio producida por la NOS e incluso determinando los targets del NO (Feelisch, 1998; Hess et al., 2001). En particular, el GSNO se encuentra en equilibrio con las proteínas S-Nitrosiladas, lo que a su vez resulta en un mecanismo de de-nitrosilación, ya que el GSNO es hidrolizado por la formaldehido deshidrogenas dependiente de glutatión o GSNO reductasa y por la SOD (Hess et al., 2005). En particular, el S-Nitrosoglutatión (GSNO) es el principal S-Nitrosotiol presente en células y fluidos periféricos (Hess et al., 2005), aunque su concentración está fuertemente regulada según el tipo celular. La concentración de GSNO se encuentra en el orden de 7 µM en la médula de rata y es indetectable en el tálamo (Gaston et al., 2003). El rol fisiológico del GSNO se evidenció al producir el knock out de la GSNO reductasa en pulmón (Forrester et al., 2009) y en aparato cardiovascular (Beigi et al., 2012) donde se encontraron niveles elevados de proteínas S-Nitrosiladas.

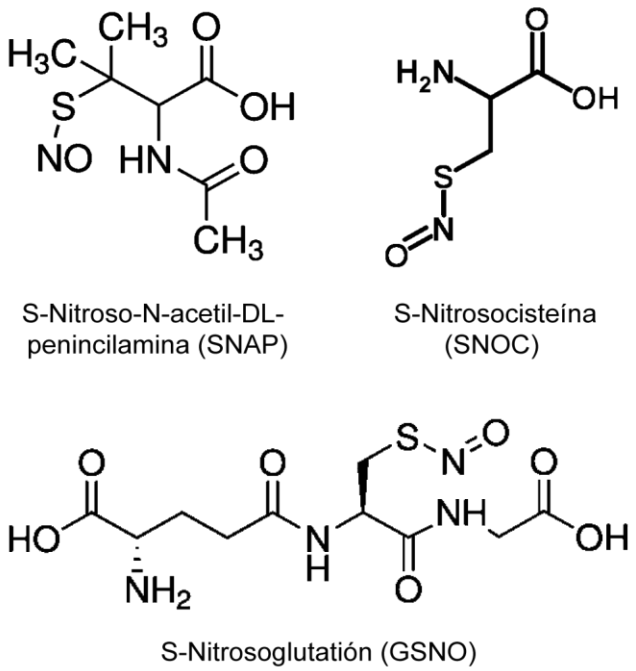

Figura I - 10. Estructura química de S-Nitrosotioles.

Por su parte, la S-Nitrosocisteína (SNOC) fue propuesta como mediadora del efecto vasodilatador del NO, identificada como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Myers et al., 1990), el SNOC actúa sobre diversos receptores en el aparato cardiovascular, pero su efecto no puede ser simplemente atribuible a la liberación de NO, ya que el estereoisómero L-SNOC tiene una potencia significativamente mayor que el D-SNOC a pesar de compartir la tasa de liberación de NO (Davisson et al., 1996). Adicionalmente, elegimos testar el efecto de este donante de NO debido que es fácilmente sintetizable en el laboratorio a bajo costo a partir de L-cisteína y nitrito de sodio (Lei et al., 1992).

Objetivos

- Determinar la sensibilidad de los GABAρ1Rs homoméricos al NO utilizando donantes de distinta naturaleza química.
- Caracterizar los efectos y determinar el sitio blanco de acción del NO sobre los GABAρ1Rs.
- Estudiar el efecto de la modificación del nivel de NO sobre la amplitud de las respuestas GABAérgicas tónicas y fásicas en células piramidales de la región CA1 de hipocampo.

Materiales y Métodos

A) Expresión de receptores GABAρ1 y registro en ovocitos de *Xenopus laevis.*

(i) Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARNc

Para obtener el ARNc que se inyectó en los ovocitos, se utilizó la secuencia completa de ADNc de la subunidad ρ1 de los receptores de GABA subclonada en plásmidos aptos para realizar la reacción de transcripción in vitro. Particularmente, la subunidad ρ1utilizada en este trabajo, se subclonó en el sitio EcoRI del plαsmido pBluescript KS+. Para lograr mayores niveles de expresión de esta subunidad se utilizó el plásmido pGEMHE. Éste plásmido fue diseñado especialmente para aumentar la expresión en ovocitos de Xenopus mediante el aumento de la vida media de los ARNc en citoplasma. El ADNc de ρ1 fue subclonado por la Dra. Mariana del Vas en el pGEMHE donado por la Dra. A. Belén Elgoyhen.

Para la generación del ADNc mutante (C364A), se realizó un protocolo de mutagénesis sitio-dirigida. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos cebadores (primers) específicos (forward y reverse) que incorporan la mutación deseada en la secuencia de ADN.

A continuación se transcriben los primers utilizados con el sitio de que fue modificado:

Primer Forward:

5'-G CGG GAG AAG CTT CCC GCC ACC AGC GGA TTA CC-3'

Primer Reverse:

5'- GG TAA TCC GCT GGT GGC GGG AAG CTT CTC CCG C-3'

Las reacciones de mutagénesis se realizaron utilizando el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), gentilmente donado por la Dra. Viviana Dalamon. Como ADN templado se utilizó ADN plasmídico conteniendo el cDNA codificante para la subunidad ρ1 en el plásmido pGEMHE. El protocolo de amplificación por PCR utilizando un ciclador MJ Research PTC-200 fue el siguiente: 1º 95ºC 30 segundos; 2º 95ºC 50 segundos; 3º 55ºC 1 min; 4º 68ºC 5 min; 5º Ir al paso 2 16 veces; 6º 68ºC 7 min; 7º 15ºC. Los productos de las amplificaciones fueron digeridos con la enzima de restricción DpnI. Esta enzima corta específicamente ADNs etilados, de esta forma, se digieren las cadenas parentales, conservando solamente las portadoras de la mutación. El producto de la digestión se utilizó para transformar bacterias SoloPack Gold Supercompetent Cells (Stratagene) donadas por la Dra. Elgoyhen. Se hicieron cultivos a partir de las colonias obtenidas y se purificó ADN plasmídico utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System (Promega, Madison, WI, USA). Para confirmar la incorporación de la mutación (y chequear la ausencia de errores de la polimerasa en la amplificación) los ADNs plasmídicos fueron secuenciados (Macrogen).

La obtención de los ARNc mutantes y nativos de la subunidad ρ1 se sintetizaron usando el kit de transcripción T7 mMessage mMachine (Promega). El ARNc sintetizado se purificó con columnas

específicas para ARN (Rneasy MiniKit, Qiagen, Valencia, CA) y se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización. Para chequear la integridad del ARNc obtenido cada vez se hicieron corridas en geles de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio durante no más de 30 min. La determinación de la cantidad de ARNc sintetizado se realizó mediante la medición de la absorbancia de luz con longitud de onda de 240 nm en espectrofotómetro y por comparación de las bandas en las fotos obtenidas con el transiluminador.

(i) Obtención de ovocitos de Xenopus e inyección de ARNc.

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas de uña africanas de la especie Xenopus laevis (Nasco, Modesto, CA). Las ranas se mantuvieron en un ambiente controlado (18-20°C) con ciclo de 12hs./12hs. luz/oscuridad, en peceras con agua corriente filtrada y declorinada, y se las alimentó una vez por semana con pellets de alimento balanceado para rana toro (GANAVE S.A., Mar del Plata, Buenos Aires).

Los ovocitos se aislaron quirúrgicamente. Para ello, los animales se anestesiaron añadiendo 3-aminobenzoato etil éster al 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al agua de la pecera. A través de una pequeña incisión en el abdomen (1cm. aprox.) se extrajeron varios pedazos de ovario, con cientos de ovocitos cada uno. Estos fragmentos se trataron durante 4 horas con una solución de colagenasa tipo IA (Worthington Biochem Corp. Lakewood, NJ, USA) (200U./ml.) disuelta en una solución salina sin Ca 2+ (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM; pH 7,4) para disgregar y defoliculizar los ovocitos. El tratamiento enzimático se detuvo lavando repetidamente las células con 8 a 10 volúmenes de solución salina sin Ca 2+ . Posteriormente se seleccionaron los ovocitos maduros (estadíos V y VI) por su mayor tamaño relativo y estos fueron separados de a uno y librados de restos de tejido con la ayuda de pinzas de disección bajo lupa (12X). Aún a simple vista, se puede advertir que estas células presentan un patrón de pigmentación muy particular, como se muestra en la **Figura M - 1**. Una mitad ("hemisferio") es blanca o ligeramente amarillenta, y la otra, oscura. La integridad en la separación de los pigmentos se utilizó como criterio de viabilidad de los ovocitos.

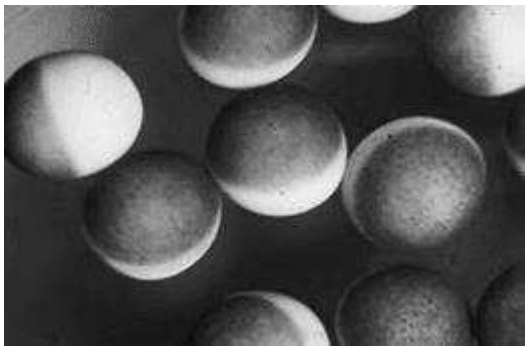

Figura M - 1. Ovocitos de Xenopus laeivs.

Finalmente, los ovocitos fueron mantenidos en cultivo en viales de vidrio a 18°C, en grupos de 20 a 40, en una solución Barth´s con antibiótico (88 mM NaCl; 0,33 mM $Ca(NO_3)_2$; 0,41 mM $CaCl_2$;

1,0 mM KCl; 0,82 mM $MgSO_4$; 2,4 mM $NaHCO_3$; 10 mM HEPES; pH 7,4 ajustado con NaOH, y gentamicina 1,0 mg/ml).

Al día siguiente se inyectó el ARNc dentro de los ovocitos con un microinyector manual (Drummond Scientific Company, Broomall, PA). El microinyector posee un émbolo sobre el cual se montan jeringas de vidrio. Éstas se prepararon con capilares (Drummond) estirados por calor con un estirador de pipetas PB-7 (Narishige Co. Ltd., Tokyo, Japan). Las jeringas se llenaron con aceite mineral (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se cargaron por su punta con la solución del ARNc. Este paso se llevó a cabo colocando una gota de alrededor de 1,5 µl de la solución sobre una trozo de Parafilm, y con la ayuda de un micromanipulador se introdujo la punta de la jeringa en la gota, y se desplazó lentamente el émbolo de carga del microinyector.

Una vez preparado el microinyector los ovocitos se colocaron dentro de una cámara de inyección que constaba de un placa de petri plástica de 35 mm. de diámetro y cuyo fondo posee una membrana de polietileno con pocillos que limitan el movimiento de los ovocitos. La cámara se llena con solución Barth's y los ovocitos se disponen con el ecuador hacia arriba. La inyección se realizó en el citoplasma celular posicionando el microinyector con micromanipuladores, observando estas maniobras bajo la lupa (12 a 40X). Cada ovocito se inyectó con 50 nl. de solución de ARNc de ρ1 nativo o mutante (0,1-1 ng/nL) y luego se mantuvieron en la incubadora a 18°C , reemplazando la solución Barth´s cada 24 hs. Los máximos niveles de expresión de los receptores homoméricos ρ1 se logran aproximadamente en las 72 hs. después de la inyección.

(ii) Registro electrofisiológico de las corrientes mediadas por GABAρ1R por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.

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

La técnica de fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos de Xenopus permite evaluar la corriente iónica a través de los receptores expresados en toda la superficie del ovocito. La célula se coloca en una cámara de registro, hecha a partir de una placa de acrílico en la que se talló una canaleta (volumen: 100 µl) con un orificio para la entrada de la perfusión para la aplicación de soluciones en un extremo y una aguja de punta roma conectada al sistema de succión en el otro.

Los microelectrodos de registro se construyeron con capilares de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, New Haven, CT), estirados con el estirador de capilares de vidrio (puller) PB-7 (Narishige), controlando el diámetro de la punta a través de la medición de la resistencia que oponen al paso de una corriente eléctrica (se inyecta mediante el amplificador de registro una corriente de 50 nA y se obtiene la diferencia de potencial que permite calcular la resistencia asociada). La resistencia de punta debe ser de 0,8 a 1,5 MΩ). El interior de los electrodos se llena con una solución de KCl 3 M y además se les introduce un alambre de plata (Ag) que previamente se cloruró en lavandina comercial (NaClO 55% aprox.) durante 10 min. De esta manera, el alambre se constituye en un electrodo de Ag/AgCl, que permite formar la cupla rédox con la solución de KCl, habilitando la continuidad eléctrica entre el amplificador y el microelectrodo de registro.

Los dos electrodos de registro se montan sobre cabezales (preamplificadores) con ganancias de 0,1 y 1X, y éstos se conectaron a un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Cada cabezal de registro está asociado a un micromanipulador (Newport Co., Irvine, CA) para el posicionamiento de los electrodos. El circuito se cierra con una conexión a tierra compuesta de otros dos electrodos de Ag/AgCl sumergidos en la misma solución salina que los ovocitos, dentro de unos pocillos conectados a la cámara de registro mediante puentes de agar (1,5 %) preparados con KCl 3M. Los ovocitos se colocaron en el interior de la cámara, las puntas de los microelectrodos se apoyaron sobre la célula y mediante una vibración mecánica o eléctrica (generada con la función "buzz" del amplificador) se logró acceder al interior celular.

Los ovocitos se perfundieron continuamente (7-12 ml/min) con solución Ringer´s de rana (115 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM $CaCl_2$; 5 mM HEPES, pH 7). Los valores del potencial de membrana (Vm) normalmente fueron de -20 a -60 mV, el registro de la actividad de los receptores evocada por neurotransmisor se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje, con el amplificador ya mencionado, que permite la fijación del potencial de membrana. El potencial de membrana al que se fijaron los ovocitos (V_{clamp}) fue de –70 mV (con excepción de los experimentos para construir las curvas corriente-voltaje, I-V). Este potencial determina una fuerza electromotriz para el ión Cl^- de alrededor de –55 mV (en los ovocitos, el potencial de equilibrio para el Cl^- (E_{Cl}) es de ≅ -25 mV).

Las señales se adquirieron con un conversor analógico-digital de 12 bits (Labmaster TL-1 DMA, Scientific solutions Inc, Solon, OH, USA) en una computadora (486 DX2) mediante el programa pClamp 5.1 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23 °C). La **Figura M - 2**. muestra un resumen de la metodología para el registro de la actividad de los GABAρ1R.

(iii) Drogas y soluciones

Todas las drogas utilizadas fueron preparadas frescas en el momento previo a cada experimento en solución Ringer´s. Cuando la masa necesaria para realizar un experimento es inferior fue menor a 1 mg y la droga es estable en solución, las soluciones de trabajo se prepararon a partir de

soluciones madres concentradas (0,1 M) en agua y congelados a -20°C. El pH fue siempre verificado y de ser necesario fue ajustado a 7,0 utilizando NaOH o HCl 1 M según el caso. El DEA fue preparado con una variación del procedimiento anterior dado que es estable a pH alcalino y comienza a descomponerse a pH neutro, la solución madre (10 mM) fue preparada en NaOH 0,01 M y conservada en hielo por no más de 2 horas. Las soluciones de GABA fueron preparadas en el momento de ser utilizadas a partir de una solución madre 10 mM fresca, mantenida en hielo durante el día de experimentos.

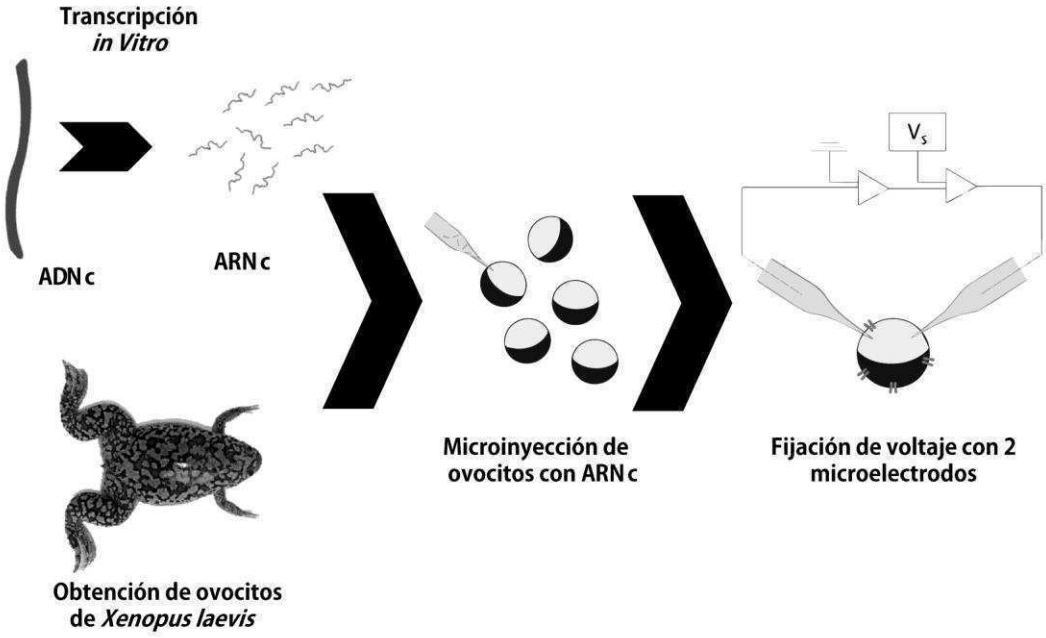

Figura M - 2. Registro electrofisiológico por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.
Los ovocitos son extraidos quirúrgicamente de ranas Xenopus laevis y microinyectados con ARNc obtenido por transcripción in vitro del ADNc. 72 hs después se registraron las corrientes mediadas por los receptores expresados mediante la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos.

Todas las drogas y sales fueron provistas por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), excepto las siguientes: MTSEA provista por Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) y GSNO adquirida en Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA).

(iv) Análisis de datos

Las curvas dosis respuesta (CDR) se obtuvieron normalizando las amplitudes de las respuestas obtenidas en las diferentes concentraciones de GABA a la respuesta máxima al agonista en cada ovocito y en cada tratamiento. Se graficaron las medias y los errores estándar de las medias (S.E.M.) de todos los ovocitos ensayados. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación logística:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{A^{nH}}{(A^{nH} + CE_{50}^{nH})}$$

donde I es la amplitud de la corriente producida por GABA a una concentración A; Imax es la amplitud de la corriente máxima producida por una concentración saturante del agonista; CE_{50} es la concentración de GABA que produce el 50% de la respuesta máxima y nH es el coeficiente de Hill. El cambio en la CE_{50} y en el nH se evaluó mediante test de ANOVA.

La curva dosis – efecto para DEA se ajustó a la misma ecuación logística, pero en este caso I es el porcentaje de potenciación obtenido a una concentración A del donante de NO; Imax es el porcentaje máximo de potenciación alcanzado a una concentración saturante de DEA y CE50 es la concentración de DEA que produce un 50 % de la potenciación máxima.

El protocolo de estimulación para obtener las curvas de corriente en función del potencial (I-V) consistió en una escalera de estimulación desde -120 a +40 mV con escalones de 10 mV, una duración de 2 segundos y partiendo de un potencial de sostén de -70 mV. La corrección de las corrientes de fuga se realizó mediante la sustracción digital del promedio de dos curvas I-Vs obtenidas mediante la aplicación de rampas de voltaje realizadas antes de la aplicación de GABA y después que el ovocito volviera a la línea de base, en la misma solución del registro.

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante el test t de Student a dos colas comparando los grupos control y tratado por cada droga. Siempre que el protocolo de tratamiento permitió evaluar la variable en el mismo ovocito que el control, se realizaron experimentos pareados y se utilizó el test t para datos pareados a dos colas. Cuando experimentalmente no fue posible parear los datos en el mismo ovocito con y sin tratamiento, el grupo tratado se comparó con un grupo control ensayado con los mismos lotes de ovocitos (mismas semanas de obtención) y se realizó un test t no pareado. En todos los casos se informa el error estándar de la media (SEM). En todos los casos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

El análisis de las amplitudes de las corrientes registradas se realizó usando el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Los ajustes de las curvas y los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

B) Registro en células piramidales de hipocampo por *patch-clamp*.

(i) Animales utilizados. Obtención de rebanadas de hipocampo.

Se utilizaron ratones de la cepa exocriada BALB/c de 15 a 20 días de edad. Todos los animales fueron provistos por la colonia de la Dra. Belén Elgoyhen del bioterio del IByME. Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de 100 µL de una solución PBS

conteniendo ketamina 15 mg/mL y xilacina 1,5 mg/mL y sacrificados por decapitación en el momento de la disección. Cada animal tuvo un trato humanitario haciendo todo lo posible para minimizar el stress y el dolor.

Una vez decapitado el ratón, se disecó rápidamente el cerebro entero y se colocó en una placa de Petri con la solución de disección (BD) (en mM: KCl 2,5; $CaCl_2$ 0,5; $MgCl_2$ 7; $NaH_2PO4.H_2O$ 2; $NaHCO_3$ 25; glucosa 20; ascorbato de sodio 7; piruvato de sodio 3,0; colina 110; ácido kinurénico 2,6), a 0°C (en equilibrio sólido-líquido) y equilibrado con carbógeno (CO2 5% / O2 95%) que se burbujea durante todo el procedimiento. Este buffer a diferencia del utilizado para los registros tiene meno r relación Ca/Mg, la mayor parte del sodio es reemplazado por colina y contiene el bloqueante glutamatérgico ácido kinurénico. Estas características previenen la muerte neuronal masiva por hipoxia - exocitotoxicidad. El procedimiento se realizó en menos de 1 min desde el momento del sacrificio para minimizar el daño celular. A continuación se realizó manualmente un corte coronal anterior del cerebro para remover la zona del bulbo olfatorio y del cuarto posterior para remover el cerebelo. Por último se cortó el cerebro por la línea media, separando los dos hemisferios que fueron rebanados secuencialmente.

El hemicerebro se adhirió a la platina de inmersión del vibrátomo (Vibratome 1000 plus, St. Louis, USA) pegándolo por la cara ventral con un pegamento a base de cianocrilato (La Gotita Gel, Poxipol). Inmediatamente se cubrió con BD a 0ºC y se reinició el burbujeo de carbógeno. Se realizaron cortes horizontales de 400 µm, desde que la formación hipocampal es distinguible a ojo desnudo.

Las rebanadas se transfirieron de un recipiente que contenía ACSF normal (en mM: NaCl 125; KCl 2,5; $NaH_2PO4.H_2O$ 2,3; $NaHCO_3$ 25; $CaCl_2$ 2; $MgCl_2$ 1,3; glucosa 10; ascorbato de sodio 1,3; piruvato de sodio 3,1) con burbujeo constante de carbógeno en un baño de agua termostatizado a (32-35°C) y se incubaron en este recipiente por al menos 90min (**Figura M - 3.A.**). Durante este tiempo de recuperación muchas de las células dañadas de forma irreversible mueren y no se ven posteriormente en el microscopio facilitando la identificación de las neuronas saludables. Luego cada rebanada se coloca en la cámara de registro del microscopio (Axioscope FS, Carl Zeiss, Alemania) donde quedan sumergidas en ACSF normal que ingresa por gravedad desde un recipiente con burbujeo constante de carbógeno y recircula por medio de una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson inc., Middleton, USA) a una velocidad de 1-2 ml/min hasta el comienzo del experimento. Para mantener la rebanada fija, se colocó un “arpa” construida con una herradura de platino y 3 o 4 hilos de nylon transversales (**Figura M - 3**. **B.** y **C**).

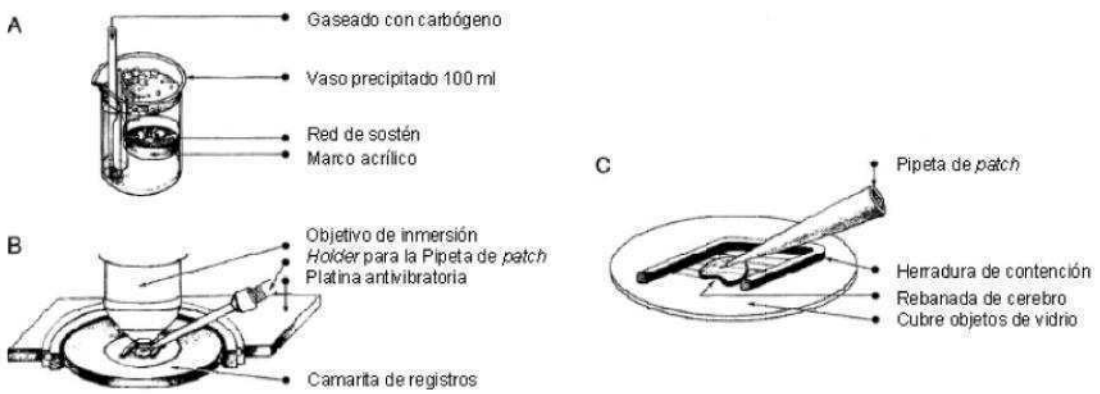

Figura M - 3. Diagrama del dispositivo de incubación y la cámara de registros.
A. Vaso de incubación donde las rebanadas se mantuvieron durante la incubación a 37ºC y hasta el momento del registro. **B. C**ámara de registros montada en un microscopio directo con objetivo de inmersión con la rebanada, arpa y pipeta de patch montadas. **C**. Detalle de la rebanada sostenida con una herradura de platino con hilos de nylon (arpa) y una pipeta de patch. Tomado y modificado de (Sakmann & Stuart, 1995).

El microscopio directo Axioscope FS, está provisto de un objetivo 10x y uno de 40x de inmersión en agua, óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara de video con detección en el espectro infrarrojo (Newvicom, Hamamatsu Photonics, Japan). Este sistema de video-microscopia infrarroja permite tener una buena visualización de los somas neuronales y sus prolongaciones cercanas, lo que facilita la identificación de las neuronas y las maniobras de acercamiento necesarias para establecer los registros **Figura M - 4**.

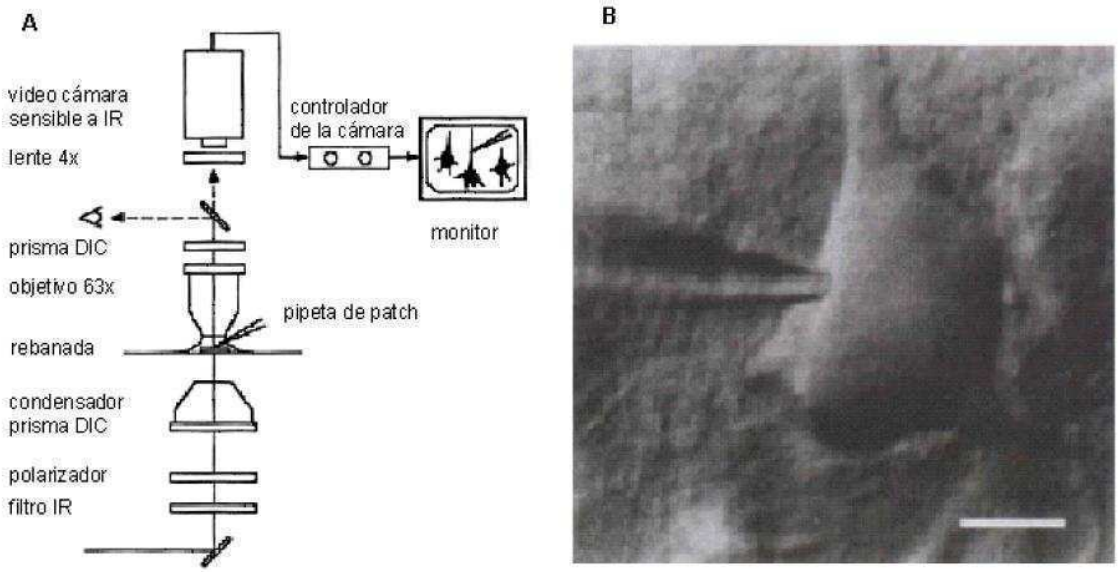

Figura M - 4. Sistema de video-microscopía IR-DIC.
A. Esquema del sistema de video-microscopía infrarroja (IR) con óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC). **B.** Neurona piramidal fotografiada con este sistema (tomado y modificado de Sakmann & Stuart, 1995).

(ii) Adquisición de datos en configuración de célula entera.

Se realizaron registros intracelulares de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, mediante la técnica de patch-clamp somático en su configuración de célula entera. Con esta técnica se midieron los cambios de corriente a través de un solo electrodo o pipeta de patch, en modo de fijación de voltaje (voltage-clamp). La técnica presenta una serie de ventajas y desventajas respecto de los registros con dos microelectrodos. Las dos principales ventajas son que al usar una sola pipeta se pueden registrar células pequeñas, y en forma estable con bajos niveles de ruido. La principal desventaja es que induce errores de medición debidos a la resistencia del electrodo, porque debe censar y controlar las dos variables, corriente y voltaje.

Además esta técnica facilita el registro de células en rebanadas de cerebro. Este abordaje es muy adecuado para el tipo de experimentos a desarrollar, dado que es la aproximación que mejor reproduce el entorno fisiológico de los receptores y, al mismo tiempo permite controlas de forma precisa las concentraciones de las sustancias de interés. Es un sistema intermedio entre los limitados y frágiles registros in vivo, y los realizados en células disociadas o en cultivo, que tienen que ser sometidas a tratamientos mucho más drásticos. Las neuronas conservan su organización y parte de sus neuritas y conexiones intercelulares.

La región CA1 del hipocampo fue localizada por su característica morfología con el objetivo 10x. Luego se pasó al objetivo de mayor aumento y se seleccionó una célula piramidal con buen estado en apariencia. Para aproximarse hasta las neuronas dentro del tejido se utilizó la técnica de blow and seal (soplar y sellar). Esta técnica consiste en atravesar el tejido directamente con la pipeta aplicando una presión positiva que evita que se tape, se baja de a poco con un micromanipulador (MP 125, Sutter Instrument, Novato, USA) hasta alcanzar la célula blanco (**Figura M - 5.A**). Una vez que la pipeta está sobre la membrana celular se libera la presión positiva y se ejerce una suave succión con una jeringa de 1 ml que provoca presión interna negativa mientras se monitorea la formación del sello de alta resistencia (**Figura M - 5.B y C)**. La presión negativa facilita la invaginación de la membrana celular en la punta de la pipeta y la formación del sello debe llegar a ser de al menos 1GΩ. Una vez establecido se aplican uno o más pulsos de succión cortos para romper la membrana que quedó dentro de la pipeta y pasar a la configuración célula entera en la cual se realizaron todos los registros (**Figura M - 5. C y D**). En esta configuración la pipeta tiene continuidad eléctrica y espacial con el interior de la célula lo que permite que en pocos min la solución de la pipeta reemplace al citosol por difusión.

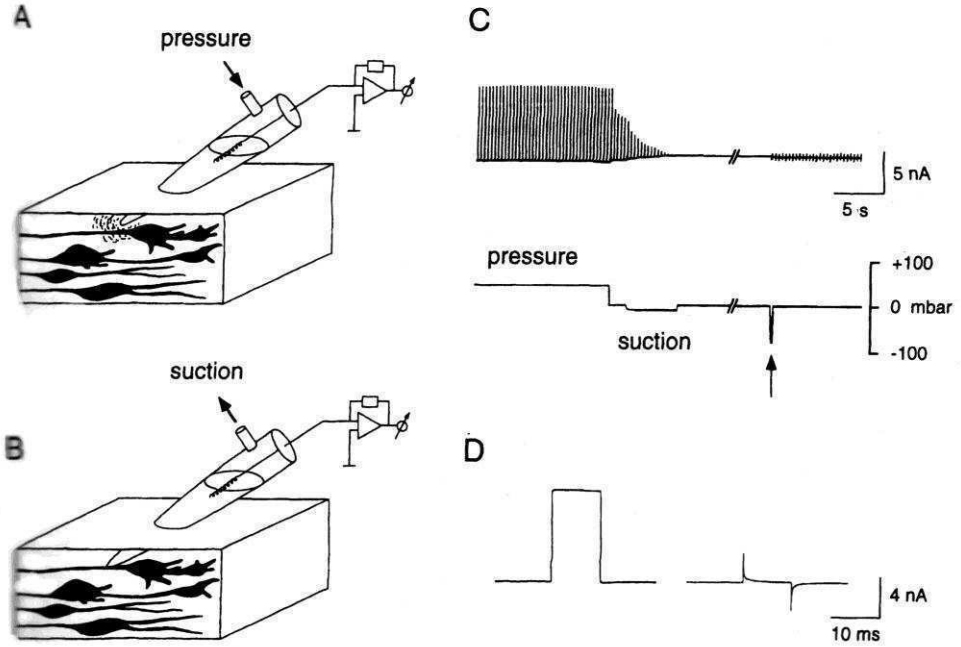

Figura M - 5. Diagrama esquemático del establecimiento de los registros.
A. Esquema donde se muestra la pipeta atravesando el tejido mientras se aplica presión en su interior. **B**. La pipeta alcanza la neurona elegida para registrar, se libera la presión y se aplica una ligera succión hasta obtener un sello de alta resistencia. **C.** En la parte superior se muestra el registro en respuesta a un pulso de monitoro test de 10 mV, en la inferior los cambios de presión en la pipeta durante el ingreso a la rebanada, el contacto con la célula y la formación del sello. La flecha indica la succión corta y fuerte para acceder al interior de la célula (break-in). **D.** Ampliación de pulsos de monitoreo, cuando la pipeta está en la solución (izquierda) y una vez que se accedió a la configuración célula entera (derecha). La amplitud del pulso indica la resistencia y la forma la configuración (Tomado y modificado de Sakmann & Stuart, 1995).

Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de vidrios capilares de borosilicato de 1,65 mm diámetro externo y 1,20 mm diámetro interno (Corning 7056, Warner Instruments, Hamden, USA). Los capilares se estiraron en un estirador de pipetas (Sutter P-30, Novato, USA) en el momento del experimento. Las pipetas utilizadas tuvieron una resistencia medida en el ACSF de entre 3 y 7 MΩ. Antes de establecer cada registro se llevó a cero el potencial de punta (offset). Una vez establecida la configuración célula entera se estimó el valor de resistencia en serie (Rs) que típicamente estuvo entre 12 y 20 MΩ, y se canceló la capacitancia de la célula. La Rs no fue compensada, pero se verificó que no se modificara a lo largo del experimento en más de un 20%. Todos los experimentos fueron realizados a voltaje constante (-70 mV), la Rs fue monitoreada durante los experimentos para que afecte a los controles y tratamientos de igual forma (para ello se aplicó un pulso de 10 mV antes de cada cambio de solución. Los registros en los que Rs cambió más de un 20% respecto del valor inicial no fueron incluidos en el análisis.

La señal analógica fue adquirida mediante un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, USA) a la máxima ganancia posible. Los datos se digitalizaron en línea mediante un conversor A/D (Digidata 1200, Axon Instruments), a 10 KHz. La señal fue filtrada a 2 kHz con el filtro interno pasabajos del amplificador. También se utilizó un filtro digital (eliminador de ruidos Hum Bug, Quest Scientific, Vancouver, Canadá) para filtrar interferencias de 50Hz y sus

armónicos. Los protocolos de adquisición de datos fueron controlados mediante el programa Clampex 8.0 (Axon Instruments).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23ºC). Durante la búsqueda de la célula a registrar, el proceso de obtención del sello y la estabilización de la corriente de leak, se perfundió la rebanada con solución ACSF recirculando y burbujeada con carbógeno constantemente. El flujo se mantuvo en 1 ml/min aproximadamente. Un minuto antes del comienzo de cada experimento, se apagó la recirculación y se conectó a la perfusión a un descarte por gravedad, con un flujo de 2-3 ml/min, estable durante todos los cambios de solución de perfusión necesarios para la aplicación de las drogas en cada experimento.

(iii) Registro de las respuestas evocadas por puffs *de GABA.*

Para la obtención de respuestas evocadas por puffs (soplidos) de GABA se utilizó una picobomba (Pneumatic Picopump PV 820, WPI, Sarasota, USA) con inyección de nitrógeno. Una vez obtenido un registro estable en una célula CA1, se bajó una pipeta de puff. Estas fueron estiradas en el mismo equipo Sutter P-30 que las de patch clamp, utilizando vidrios de borosilicato de 1,5 mm de diámetro externo y 1,12 mm de diámetro interno (WPI, Sarasota, USA). Las pipetas se llenaron con solución de GABA 30 µM en ACSF. La pipeta se localizó a una distancia equivalente a uno dos diámetros del soma celular (~ 30-150 µm) de forma aproximada y se ajustó la presión (entre 4 y 10 psi) y el tiempo de soplido (50 – 100 mesg), con el fin de obtener respuestas reproducibles y estables de entre 300 y 1000 pA, que retornen de forma inmediata a la línea de base original. Con el software de adquisición, se programó la aplicación de un pulso de -80 mV durante 1 segundo, seguido del disparo de un puff de GABA y otro 30 segundos después, completando ciclos de 1 minuto en total. Por lo tanto se aplicó 1 puff cada 30 segundos. Una vez obtenidos dos ciclos con respuestas consistentes (CV <15%), se comenzó la adquisición del registro, monitoreando a través de la cámara de video que no haya movimientos en la posición de la pipeta de aplicación, producto de los cambios en la perfusión de soluciones. Al finalizar cada registro se verificó que el potencial de juntura de la pipeta de patch no se haya modificado en más de 3 mV.

(iv) Registro de la corriente tónica.

La adquisición de la corriente GABAérgica tónica ($I_{tónica}$) fue realizada registrando las células con el voltaje fijado en -70 mV en modo gap free. Una vez que la solución intracelular difundió en la célula y se estabilizó la corriente de sostenimiento o holding (I_H) por un mínimo de 2 min, se inició la adquisición de la misma. El protocolo consistió en 5 min de registro con perfusión de ACSF, seguido de 5 min con la droga a ensayar y por último 3 min de solución de BIM 100 µM para bloquear por completo la corriente tónica GABAérgica y obtener el "cero" o I_H sin corriente tónica. En todos los casos se verificó que el cambio de solución no produzca un cambio en la velocidad de perfusión que

pudiera impactar sobre la línea de base del registro. Los registros en los que se observó una deriva en la línea de base independiente del tratamiento estudiado fueron descartados del análisis.

(v) Soluciones y drogas.

Durante todos los experimentos, disección, corte, mantenimiento y registro, las rebanadas de tejido se mantuvieron en solución (ACSF o SD) saturadas en gas carbógeno. El gaseado con carbógeno asegura la oxigenación del tejido y mantiene el pH a 7,4. La solución ACSF fue preparada semanalmente y su osmolaridad de 290 a 300 mOsm controlada cada vez que se prepara. La SD fue preparada diariamente a partir de una solución base sin ácido kinurénico, colina y ascorbato. Durante los registros electrofisiológicos el ACSF normal tiene adicionados CNQX 20 µM para bloquear la actividad sináptica de receptores de glutamato tipo AMPA/Kainato. Para el registro de las corrientes tónicas se adicionó GABA 5 µM con el fin de obtener mayor amplitud de corriente (Glykys & Mody, 2007b).

La solución de pipeta (o intracelular) tiene la siguiente composición en mM: HEPES 10; CsCl 140; NaCl 5; $MgCl_2$ 2; EGTA 0,1; ATP-Tris 4; GTP-Tris 0,3; fosfocreatina-tris 10. El pH fue ajustado a 7,3 con HCl y CsOH, la osmolaridad fue de 285-295 mOsm controlada cada vez que se preparó. Esta solución se guardó alicuotada a -70°C.

Las drogas y soluciones utilizadas para los experimentos (DEA, BIM, GABA, L-NAME) fueron preparadas frescas en el momento de ser utilizadas en ACSF. Todas las drogas y sales fueron provistas por Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

(vi) Análisis de datos.

Los datos se analizaron luego del experimento con los programas Clampfit 8.0 (Axon Instruments) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Los grupos control y tratados fueron comparados mediante el test t a dos colas de datos pareados salvo en los experimentos que se indica otro análisis estadístico. Los resultados se presentan como el valor promedio ± SEM. En todos los casos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

La amplitud de los puffs fue obtenida con un protocolo automatizado del programa Clampfit. Para el análisis de la evolución temporal de los puffs de GABA, los puntos de la curva control y tratado fueron comparados con un ANOVA de dos vías (tiempo y tratamiento) con un test posterior de Bonferroni. Para el análisis de las corrientes evocadas por puffs de GABA pre y post tratamiento se promediaron los 3 últimos puffs estables obtenidos en cada condición.

Para la obtención de la I_H en cada condición (pre tratamiento, post tratamiento y con BIM), se realizó un histograma de todos los puntos en un intervalo de 30 segundos estable en el último minuto de cada condición. A estos histogramas se les ajustó una función gaussiana de la que se obtuvo el valor medio y el desvío estándar. Cuando las células presentaron gran cantidad de actividad espontánea, el histograma presentó un corrimiento en la cola izquierda, debido a los puntos

correspondientes a los sIPSC. Estos puntos fueron descartados en el ajuste de la función gaussiana (ver **Figura 3. 3**). La corriente tónica control se obtuvo de la diferencia entre la I_H en ACSF (pre tratamiento) menos la I_H luego de la aplicación de BIM. De igual manera se obtuvo la corriente tónica para cada tratamiento.

Resultados y Discusión

Capítulo 1. Modulación de receptores recombinantes GABAρ1 por NO.

A) Estudio del efecto de donantes de NO sobre los receptores ρ1 de GABA expresados en ovocitos de *Xenopus laevis.*

Nuestro primer objetivo fue determinar si el NO es capaz de modular los receptores de GABAρ1. Para ello los GABAρ1Rs se expresaron en ovocitos de Xenopus laevis y se utilizó la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje con dos microelectrodos para registrar las respuestas evocadas por GABA. Como fue detallado en la introducción, existen múltiples razones metodológicas para utilizar donantes de NO en lugar del compuesto gaseoso generado in situ. Exploramos los efectos utilizando tres compuestos distintos pertenecientes a dos familias de donantes: el DEA que forma parte de los NONOatos y los S-Nitrosotioles SNOC y GSNO. Las concentraciones de los donantes fueron elegidas de acuerdo a reportes publicados de experimentos similares.

Con la concentración de Cl^- presente en el Ringer´s de registro el GABA produce una corriente entrante (sale Cl^- del interior del ovocito). El efecto de los donantes fue examinado sobre respuestas evocadas por 0,3 µM GABA que corresponde aproximadamente a la CE_5 de la CDR control. En estas condiciones se obtienen habitualmente corrientes con amplitudes mayores a los 50 nA, que no presentan desensibilización y estables por períodos prolongados de tiempo (ej.: 30 min).

(i) DEA

El DEA es un donante de NO de vida media corta (16 min a 22ºC) ampliamente utilizado para evaluar efectos agudos (ej. Li et al., 2003; Lipton et al., 2002; Steinert et al., 2008; Vidwans et al., 1999; Yang et al., 2007).

Para asegurar que la concentración efectiva de NO en cada experimento sea comparable, la droga fue disuelta en NaOH 0,01M y diluida en Ringer´s (pH final 7,3) en el momento de su aplicación, de forma que el tiempo de liberación de NO sea similar (entre 2 y 3 min). En la **Figura 1. 1**. se observa que la aplicación de DEA 100 µM potenció la corriente evocada por GABA 0,3 µM.

En los mismos lotes de ovocitos se probaron dos protocolos de aplicación de las drogas: aplicaciones on top, que consisten en aplicar la droga sobre el pico de la respuesta evocada por

el agonista (**Fig.1.1.A**.); y la aplicación del agonista solo primero seguido de la coaplicación de la droga junto al agonista (**Fig.1.1.B**.). No se observaron diferencias significativas en la magnitud de la potenciación producida por DEA 100 µM (p = 0,67), por lo que en los experimentos siguientes se utilizó el protocolo on top a menos que se aclare lo contrario. En la **Figura 1.1.C**. pueden observarse la media, SEM y dispersión obtenidos en este experimento. La potenciación fue del 45,4 ± 5,8; (n=21; p < 0,001).

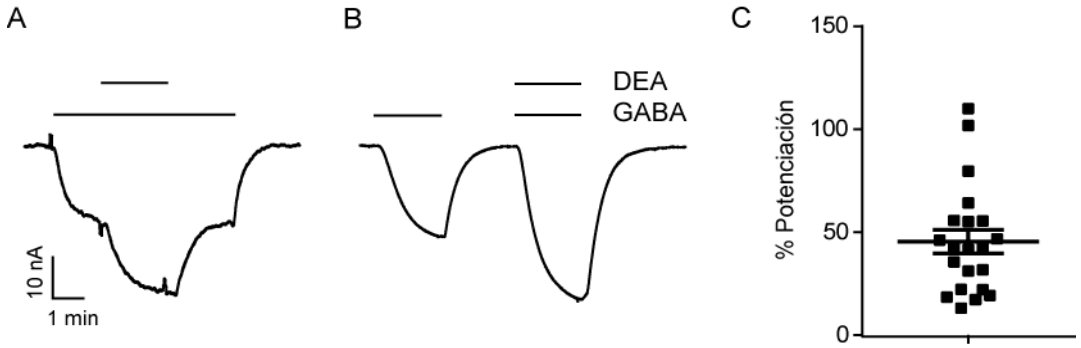

Figura 1. 1. Potenciación de las respuestas de GABAρ1R por DEA.
A. Trazo representativo de la potenciación producida por DEA 100 µM al ser aplicado on top de la respuesta de GABA 0,3 µM. **B**. Trazo representativo de la potenciación producida por DEA 100 µM al ser coaplicado junto con GABA 0,3 µM **C**. Gráfico de dispersión del efecto del DEA sobre las respuestas evocadas por GABA en los dos protocolos utilizados (n=21). Los registros presentados en esta figura y subsiguientes del capítulo 1 y 2 se obtuvieron por fijación de voltaje con dos electrodos a -70 mV y los ejes representan la amplitud de la corriente (eje y) y el tiempo (eje x).

(ii) SNOC

El segundo donante de NO testeado fue el SNOC que fue sintetizado fresco cada día a partir de nitrito de sodio y L-cisteína en medio ácido. A diferencia de lo ocurrido con DEA, la aplicación de SNOC 100 µM produjo efectos variables en cada ovocito, desde una clara potenciación (61,6%), hasta la inhibición parcial de la respuesta (-30,3%) (**Figura 1. 2**.). La media de la potenciación de la respuesta evocada por GABA 0,3 µM fue de 13,8 ± 12,2 % (n=7) y no fue estadísticamente significativa (p = 0,3).

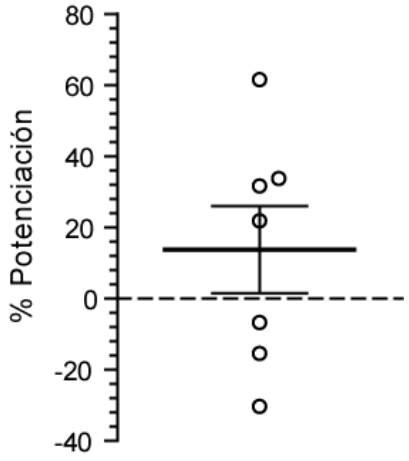

Figura 1. 2. Potenciación de las respuestas de GABAρ1R por SNOC.
Diagrama de dispersión del efecto de la coaplicación de GABA 0,3 µM y SNOC 100 µM sobre las respuestas control evocadas por GABA (n=7). La potenciación no fue estadísticamente significativa.

La variabilidad en los resultados de los experimentos utilizando SNOC como donante de NO podría ser atribuida a que esta sustancia no libere únicamente la molécula que efectivamente sea la responsable de la potenciación de los GABAρ1Rs (ya sea NO·, NO^+, etc.), sino que libere una mezcla heterogénea de radicales libres reactantes con efectos diferentes. Por ejemplo, es posible que en las condiciones en las que fueron realizados los experimentos parte de los GABAρ1Rs sean oxidados por uno de los productos de descomposición del SNOC, lo que redundaría en la inhibición de las corrientes evocadas por GABA (Calero & Calvo, 2008); mientras que otra población de receptores sufran una modificación similar a la producida por DEA, posiblemente la S-Nitrosilación de una cisteína. La relación de estas modificaciones podría variar por condiciones no controladas durante los experimentos o por la presencia de impurezas o subproductos de la reacción de síntesis del SNOC.

Si bien el SNOC sintetizado en el momento de su aplicación fue utilizado en numerosos estudios (ej.: Fagni et al., 1995; Lei et al., 1992; Wang et al., 2006), las condiciones de la preparación o la pureza de los reactivos de partida pudo haber sido diferente. Además, estos reportes no fueron realizados sobre receptores de la familia cys-loop, que pueden tener una sensibilidad diferente frente a los productos finales (por ejemplo la cistina).

La exploración de estas posibilidades requeriría la realización de numerosos experimentos farmacológicos que escapan a los objetivos de esta tesis, por lo tanto decidimos continuar nuestro estudio utilizando otra donante de NO de la familia de las S-Nitrosocisteínas pero disponible comercialmente, el GSNO.

(iii) GSNO

El GSNO es un donante de NO de elección por su importancia fisiológica como buffer y donante de NO endógeno (Hess et al., 2005). Es incapaz de cruzar la membrana plasmática y puede dar tanto reacciones de transnitrosilación como liberar NO por ruptura homolítica (Gaston et al., 2003; Hess et al., 2005).

La aplicación de GSNO 1 mM potenció las respuestas de GABAρ1R al ser coaplicado con GABA 0,3 µM (**Figura 1. 3.A.**). La media obtenida fue de 75,1 ± 24,9 % de potenciación sobre la respuesta control (n = 7; p < 0,03) (**Figura 1. 3.B.**).

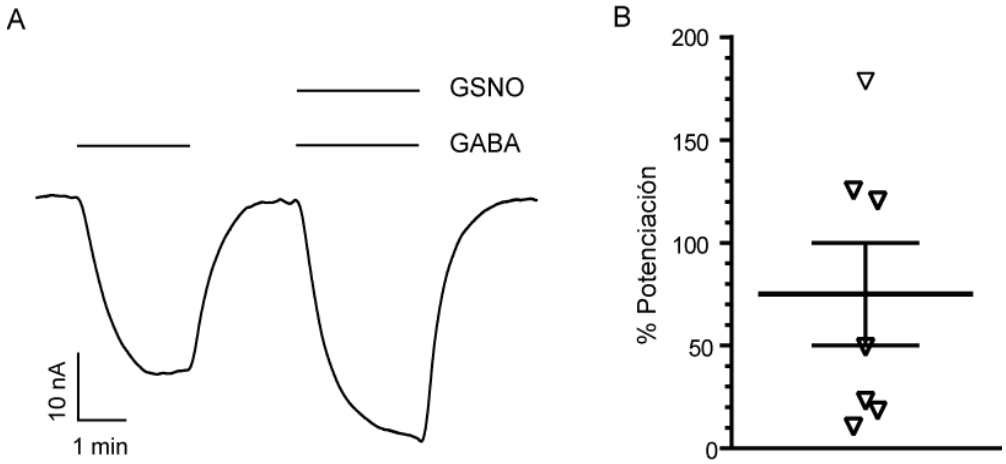

Figura 1. 3. Potenciación de las respuestas de GABAρ1R por GSNO.
A. Trazo representativo de la potenciación observada al coaplicar GSNO 1mM y GABA 0,3 µM. **B**. Diagrama de dispersión de la potenciación de la respuesta de GABA por GSNO 1 mM (n=7; p < 0,03).

Si bien los resultados obtenidos con GSNO muestran una mayor consistencia que los experimentos con SNOC (todos los experimentos dieron potenciación de la respuesta), la dispersión es notablemente mayor que la obtenida con DEA (p < 0,01; test F). Como se discutió para el caso del SNOC, es posible que estás moléculas modifiquen a los GABAρ1Rs por más de un mecanismo con resultados divergentes. También es posible que parte de la variabilidad de los S-Nitrosotioles se deba a una diferencia en el mecanismo de acción del donante (ej. transnitrosilación) frente al cual nuestro receptor podría presentar una menor reactividad, o que esta reactividad sea dependiente del estado de oxidación de partida de las cisteínas de GABAρ1R.

Sin embargo, es importante destacar que dos donantes de naturaleza química distinta, y posiblemente a través de mecanismos o intermediarios de reacción distintos, produjeron resultados equivalentes: la potenciación de los GABAρ1Rs. Además la potenciación obtenida con GSNO tiene la relevancia de ser lograda con un donante de NO endógeno, que posiblemente esté presente en el entorno fisiológico de los receptores.

De los tres donantes probados el DEA es el que presentó la mayor reproducibilidad. Además, cuenta con la ventaja de tener menor costo que el GSNO, por lo que decidimos continuar con la caracterización de los efectos encontrados utilizando este donante de NO.

B) Caracterización de la potenciación de GABAρ1R por DEA.

(i) Reversibilidad de la potenciación por DEA.

La potenciación de los GABAρ1R por DEA es rápida y totalmente reversible (**Figura 1. 4**.**A.).** La reversión de la potenciación comienza de forma inmediata una vez que la solución con DEA que baña al ovocito en la cámara de registro es reemplazada por Ringer´s libre de droga. Aún más, una segunda aplicación de DEA produce una potenciación equivalente (**Figura 1. 4**.**B**.), este resultado indica que el receptor revierte a la condición inicial. Más allá de la naturaleza química de la modificación producida sobre los GABAρ1Rs por el NO (que será discutida más adelante), la reversibilidad y la rapidez de los efectos sugiere que el sitio de acción es extracelular.

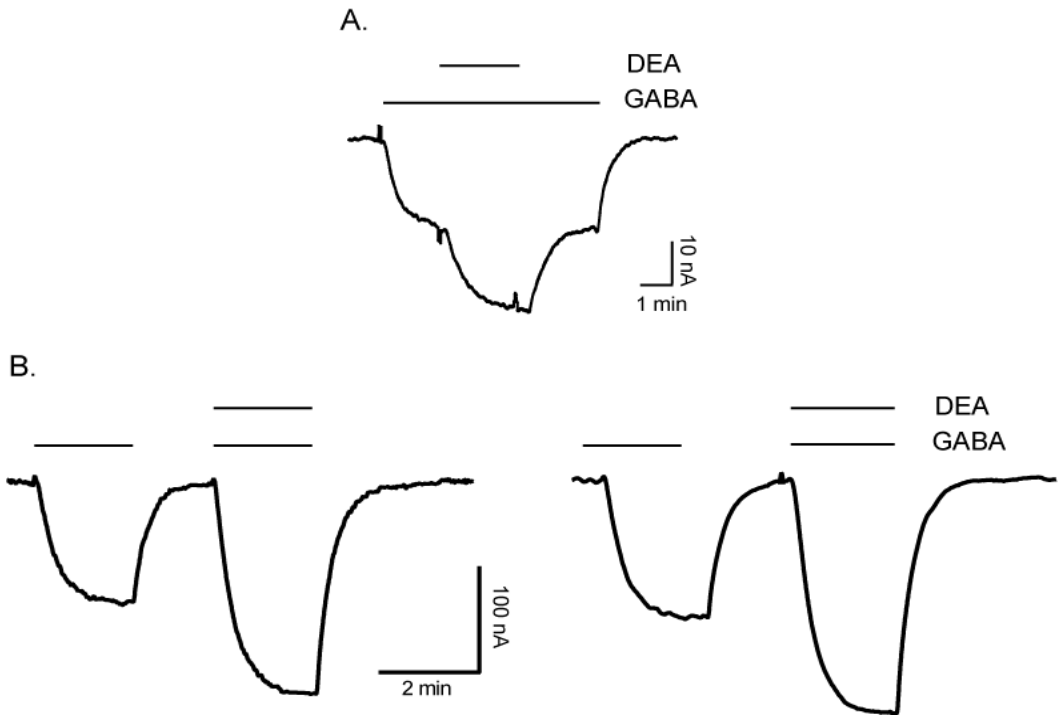

Figura 1. 4. La potenciación de GABAρ1R mediada por DEA es rápida y reversible.
A. Trazo representativo de la aplicación de DEA (100 µM) on top de la respuesta de GABA donde puede observarse la rapidez de la potenciación y la reversión luego del lavado del donante de NO.
B. Dos aplicaciones sucesivas de DEA (100 µM) producen una potenciación equivalente. El tiempo entre aplicaciones fue de 5 minutos. En todos los casos se aplicó GABA 0,3 µM.

(ii) Curva dosis-respuesta (CDR).

El primer paso en la caracterización del efecto potenciador del DEA sobre los GABAρ1Rs fue la construcción de una CDR. El protocolo para la construcción de la curva fue la aplicación de concentraciones de GABA solo o en presencia de DEA 100 µM. Las concentraciones crecientes de GABA fueron aplicados secuencialmente una vez estabilizada una respuesta (estado estacionario), sin lavado del ovocito con Ringer´s, aprovechando la

ventaja que nuestro receptor no presenta una desensibilización importante, especialmente a baja concentración de agonista.

La CDR en presencia de DEA mostró un desplazamiento hacia la izquierda que significó un cambio significativo en la CE_{50} sin modificar considerablemente el n de Hill ($CE_{50\ GABA}$ = 0,74 ± 0,02 mM, nH = 2,9 ± 0,1; $CE_{50\ GABA\ +\ DEA}$ = 0,67 ± 0,03, nH = 2,9 ± 0,2; n = 6 - 14; $p < 0,005$) (**Figura 1. 5**). El corrimiento hacia la izquierda indica que la modificación que produce el NO sobre los GABAρ1R se traduce en un aumento en la afinidad aparente al GABA. La respuesta máxima (GABA 30 µM) mostró una ligera pero significativa potenciación ($p < 0,05$).

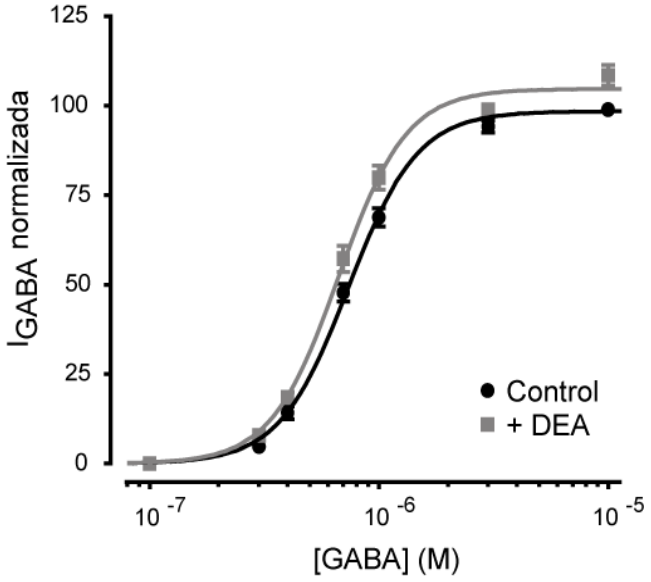

Figura 1. 5. Curva dosis-respuesta para GABA en presencia y ausencia de DEA.
La CE_{50} para GABA disminuyó significativamente en presencia de DEA 100 µM ($CE_{50\ GABA}$ = 0,74 ± 0,02 mM; $CE_{50\ GABA\ +\ DEA}$ = 0,67 ± 0,3; n = 6 - 14; $p < 0,005$).

(iii) Curva dosis - efecto.

Con el fin de determinar el rango efectivo de concentraciones de DEA capaces de potenciar los GABAρ1R, realizamos una coaplicación de GABA 0,3 µM y concentraciones crecientes de DEA (n = 5-10 para cada concentración). La curva dosis-efecto resultante fue ajustada a una ecuación sigmoidea (ver Métodos) (**Figura 1. 6**.). Aunque la máxima concentración utilizada (1 mM) no saturó la curva resultante, el ajuste obtenido permite estimar la CE_{50} en 400 µM. Decidimos no utilizar concentraciones más altas de DEA por el elevado costo de la droga, la dificultad para controlar el pH de las soluciones concentradas y su poca relevancia a nivel fisiológico. La potenciación fue estadísticamente significativa para concentraciones de DEA de 1 µM en adelante (

Tabla 1. 1).

Esta concentración se corresponde con niveles de NO del orden de decenas de nanomolar (Kim et al., 1999; Wang et al., 2007b). La gran sensibilidad de los receptores hacia

el NO nos permite especular con la posibilidad de que en condiciones fisiológicas la potenciación sea de GABAρ1R por NO sea factible.

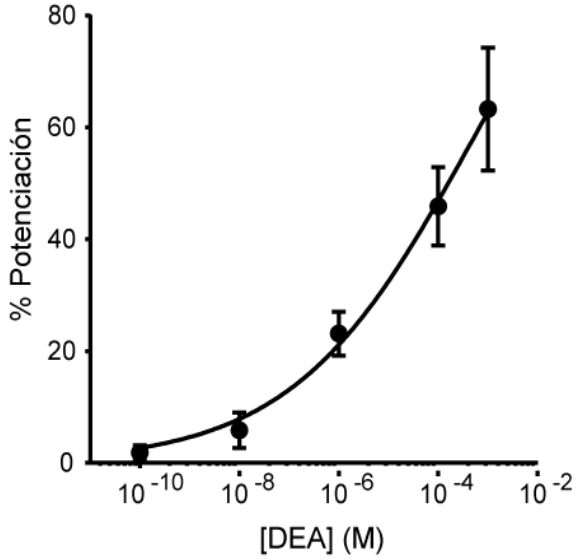

Figura 1. 6. Curva dosis-efecto para el DEA.
Porcentaje de potenciación de las respuestas de GABAρ1R evocada por GABA 0,3 µM producto de coaplicar concentraciones crecientes de DEA. Los puntos fueron ajustados a una ecuación sigmoidea (EC_{50} ~ 400 µM)

(iv) Dependencia de la potenciación con el nivel de GABA.

Otros moduladores estudiados en GABAρ1R presentaron un mayor efecto porcentual a niveles bajos de agonista ([GABA] < CE_{50}) (Calero & Calvo, 2008). De la misma manera, la potenciación relativa de los GABAρ1Rs por NO disminuye a medida que la concentración de GABA aumenta (**Figura 1.** 7). La

Tabla 1. 2. resume el porcentaje de potenciación obtenido a las concentraciones de GABA probadas. La potenciación por DEA 100 µM fue significativa para todo el rango de concentraciones de GABA.

[DEA] (µM)	% Potenciación	n
0,0001	1,9 ns	6
0,001	5,9 ns	5
1	23,1 *	7
100	45,9 **	10
1000	63,2 *	7

Tabla 1. 1. Porcentaje de potenciación de las respuestas evocadas por GABA 0,3µM para concentraciones crecientes de DEA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns no significativo; test t no pareado.

(v) Curva corriente - voltaje (I – V).

Se realizaron curvas corriente – voltaje para GABA (0,3 µM) en presencia y ausencia de DEA. Como se detalló en la sección metodológica las curvas se construyeron con escaleras de voltaje de -120 a +40 mV, con 10 mV de salto por escalón. La potenciación de los GABAρ1Rs

por DEA se evidencia en las curvas I-V en el significativo cambio en la pendiente de las rectas resultantes. El potencial de reversión (correspondiente con el potencial de equilibrio del Cl^-) (E_{Cl^-}), no fue modificado por el DEA 100 µM (-27,9 ± 5,0 mV; n = 6; p = 0,3) (**Figura 1. 8**.). Tampoco se modificó la linealidad de la relación, lo que indica que los efectos del DEA son independientes del voltaje y no se deben a cambios en la concentración intracelular de Cl^-.

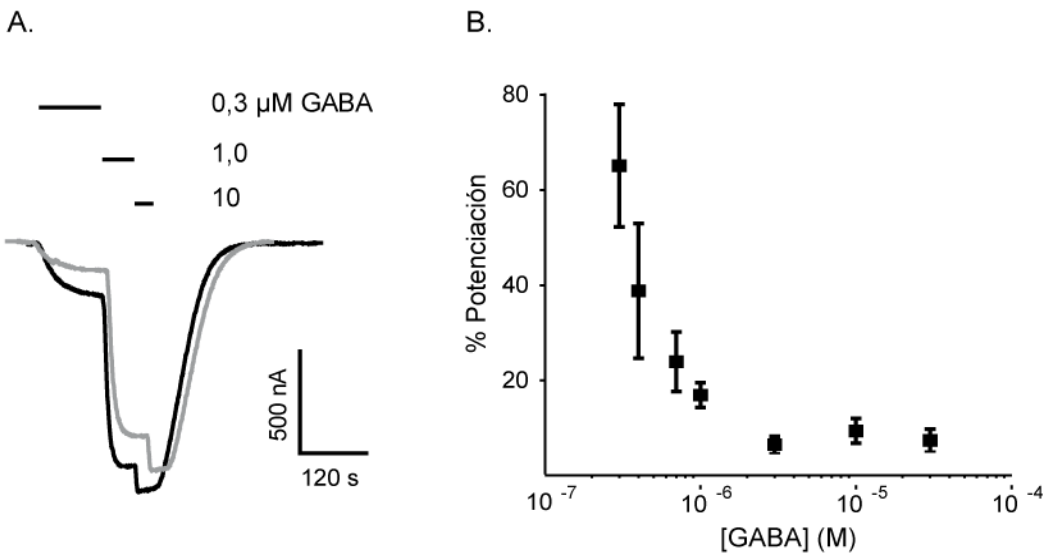

Figura 1. 7. El efecto potenciador del DEA sobre las respuestas a GABA son mayores a bajas concentraciones de agonista.
A. Trazo representativo de la aplicación sucesiva de tres concentraciones crecientes de GABA (0,3; 1,0 y 10 µM) solo (trazo gris) o coaplicado con DEA 100 µM (trazo negro). **B**. Resumen del experimento anterior para todas las concentraciones de GABA evaluadas donde se observa que el porcentaje de potenciación decrece con la concentración de GABA.

[GABA] (µM)	% Potenciación	n
0,3	65,1**	13
0,4	38,8*	8
0,7	23,9*	9
1	16,9**	10
3	6,5*	8
10	9,4*	9
30	7,4*	10

Tabla 1. 2. Porcentaje de potenciación producido por DEA 100 µM para concentraciones crecientes de GABA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; test t no pareado.

Este resultado es una indicación sustancial de que los efectos observados se deben a acciones del NO sobre los GABAρ1Rs de forma directa. Como se detalló en la sección introductoria, se describieron efectos del NO sobre una enorme cantidad de proteínas de distintas familias, incluyendo receptores y transportadores. En particular, los ovocitos expresan un cotransportador K^+/Cl^- sensible a agentes rédox y a la vía NO/GMPc (Adragna et al., 2004).

Un cambio en la actividad de este transportador podría impactar sobre la concentración intracelular de Cl^-, lo que produciría un cambio en la actividad de GABAρ1R al alterar el driving force para el Cl^-. Esta hipótesis fue descartada ya que no se modificó el potencial de reversión en presencia de DEA

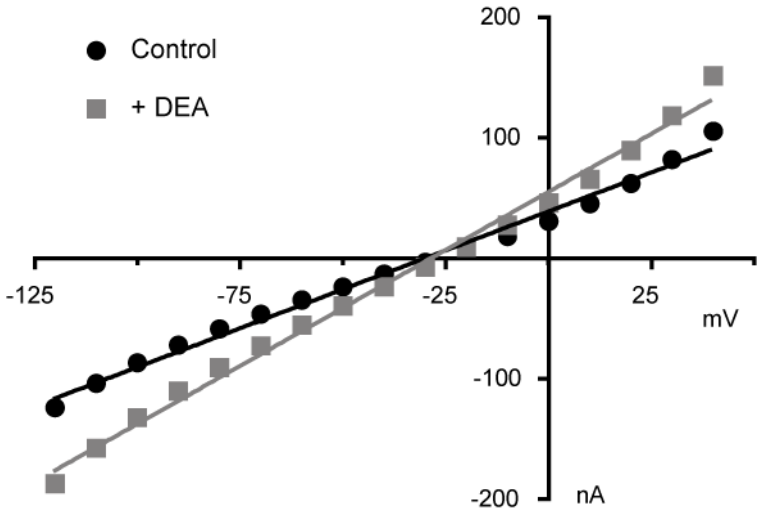

Figura 1. 8. Los efectos del DEA son independientes del voltaje y no son debidos a cambios en la concentración intracelular de Cl^-.
Curva corriente – voltaje representativa para GABA 0,3 µM en presencia (+ DEA) y ausencia (control) de DEA 100 µM. El DEA no modificó el potencial de reversión del GABA (n = 6; p = 0,3).

C) La liberación de NO es necesaria para la potenciación de GABAρ1R por DEA.

(i) Control de subproductos de la liberación de NO.

Dado que se utilizó una molécula que libera NO en lugar de aplicar el NO gaseoso directamente, podría especularse que los efectos observados, o parte de ellos, son debidos a la acción de los subproductos químicos de la descomposición del donante de NO. Por lo tanto es necesario realizar controles de estos subproductos antes de afirmar que los efectos reportados corresponden a acciones ejercidas efectivamente por el NO (Lei et al., 1992).

Como se informó anteriormente, el DEA se hidroliza para liberar NO en pocas horas. Los subproductos de la hidrólisis no son volátiles, por lo que es posible dejar decaer una solución de DEA y luego probar si se reproducen los efectos observados con el reactivo fresco, o produce algún otro efecto sobre los GABAρ1Rs. Para esto se preparó una solución de DEA 100 µM en Ringer´s a pH 7 y se mantuvo 24 hs. a temperatura ambiente para garantizar la completa depleción del NO. Esta solución contiene el subproducto de la molécula de DEA luego de la pérdida del grupo NO· y seguramente parte del NO en forma de nitrito, el producto final de la inactivación del NO en presencia del oxígeno ambiental (Hughes, 2008). La solución

de DEA expirado no produjo ningún efecto sobre las respuestas GABAρ1 (n = 4; p = 0,7; test t pareado) (**Figura 1. 9**). Este control sirve adicionalmente para descartar la posibilidad de que el DEA produzca artefactos en el sistema de expresión usado.

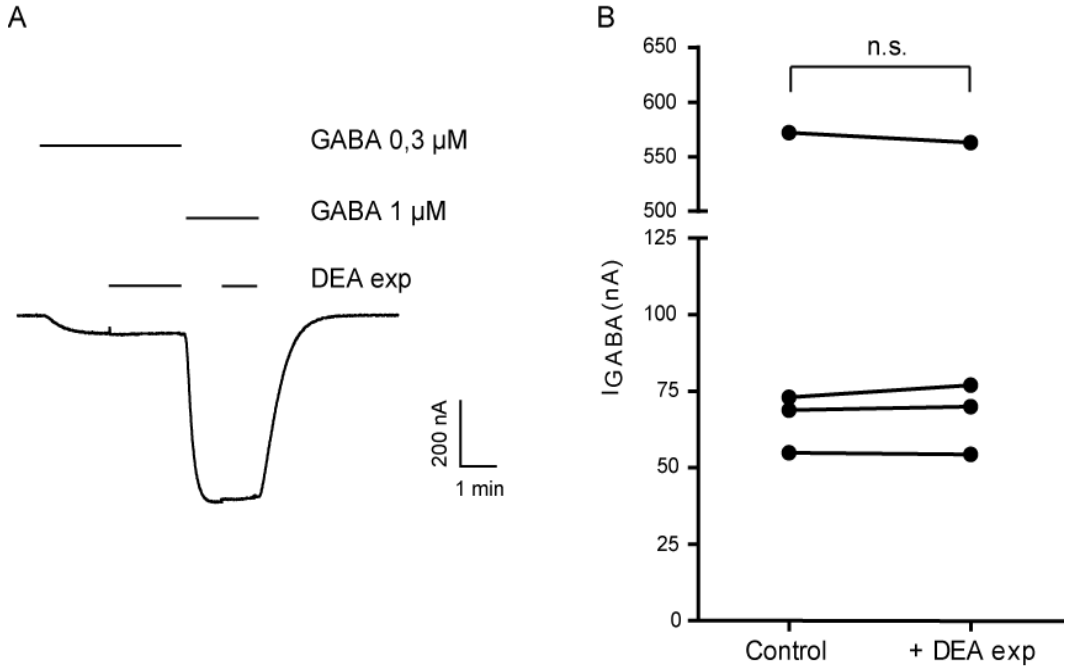

Figura 1. 9. La solución de DEA agotada de NO es inactiva sobre los GABAρ1Rs.
A. Trazo representativo de las aplicaciones on top de DEA expirado (DEA exp) sobre respuestas evocadas por GABA 0,3 y 1 μM. **B**. El DEA depletado no produce efectos significativos en las respuestas evocadas por GABA (I_{GABA}); n=4; ns; test t pareado. El DEA expirado fu preparado en Ringer's y mantenido a pH = 7 por 24 hs.

A continuación realizamos un control con el fin de verificar que el nitrito, producto final de la oxidación del NO, no fuera responsable de la potenciación de los GABAρ1Rs, ni que produjese artefactos que aporten a la variabilidad de los resultados. Con este fin, aplicamos una solución de $NaNO_2$ 1mM on top de las respuestas evocadas por GABA 0,3 μM. El NO_2^- no produjo efectos sobre la amplitud de las corrientes (n = 5; p = 0,9; test t pareado). Con estos resultados tenemos la seguridad de que los efectos observados por DEA no son el resultado de subproductos de descomposición que pudieran permanecer en la solución aplicada.

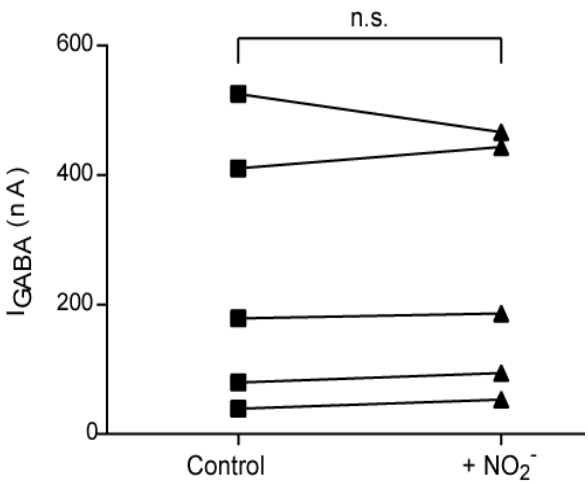

Figura 1. 10. El NO_2^- no produce efectos sobre las respuestas de los GABAρ1Rs.
La aplicación on top de NO_2^- 1mM no modificó significativamente la respuesta evocada por GABA 0,3 µM (n = 5; p = 0,9; test t pareado).

(ii) La potenciación por DEA es bloqueada por la aplicación de un scavenger *de NO.*

Existe también la posibilidad de que la molécula de DEA sin descomponer potencie al receptor. Es decir, que los resultados fueran un artefacto del donante utilizado. Si bien resultaría muy poco esperable, dado que otros donantes fueron capaces de producir efectos similares, pensamos aconsejable realizar un experimento concluyente que responda la siguiente pregunta ¿Es el NO liberado en la solución de DEA el que ejerce la potenciación de los GABAρ1Rs?

El CPTIO (2-(4-carboxifenyl)-4,5-dihidro-4,4,5,5-tetrametil-1H-imidazol- lyl-1-oxi-3-óxido) es un scavenger específico de NO que reacciona rápidamente para oxidar el NO, compitiendo con el oxígeno (Keszler et al., 2010). Cuando coaplicamos el scavenger (CPTIO 500 µM) junto con el donante de NO (DEA 100 µM), vimos una notable reducción de la potenciación de las respuestas en los GABAρ1Rs (% Pot. $_{DEA}$ = 62,8 ± 12,6 %; % Pot. $_{DEA + CPTIO}$ = 10,0 ± 1,4 %; n = 5; p < 0,05; test t). El bloqueo de la potenciación por DEA desaparece rápidamente al lavar el CPTIO (**Figura 1. 11. A**). Sin embargo, el CPTIO a la concentración utilizada no fue capaz de bloquear totalmente la potenciación por DEA, y el 10 % remanente es significativamente distinto de cero (p < 0,005) (**Figura 1. 11.B).** Este efecto residual puede deberse a que la concentración no fue suficiente para atrapar el NO liberado lo suficientemente rápido. El mecanismo de oxidación del NO por CPTIO ocurre en dos etapas y consume dos moléculas de CPTIO por molécula de NO. El NO inicialmente compite con el oxígeno para oxidarse a $NO_2\cdot$, esta especie se ha postulado que reacciona con una molécula adicional de NO· para dar N_2O_3 quien sería capaz de modificar una cisteína para producir su S-Nitrosilación de acuerdo a uno de los mecanismo propuestos (Keszler et al., 2010). Por lo tanto, es posible que aunque el CPTIO reaccione más rápido que el oxígeno en una primera etapa, la concentración requerida para desplazar también esta segunda reacción sea mayor.

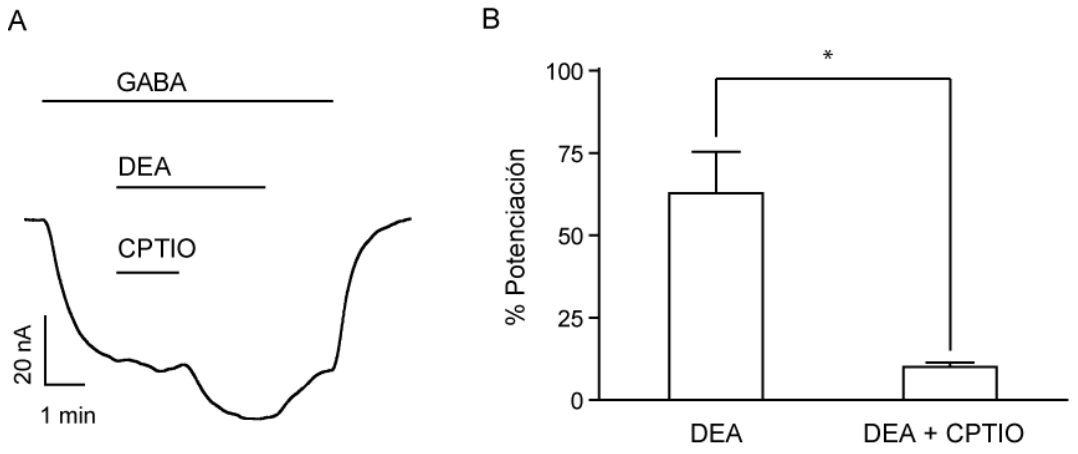

Figura 1. 11. El scavenger específico de NO CPTIO bloquea la acción del DEA sobre los GABAρ1Rs.
A. Trazo representativo del bloqueo de la potenciación del DEA (100 µM) por la aplicación de CPTIO (500 µM). Nótese que una vez removido el CPTIO de la perfusión, la respuesta evocada por GABA (0,3 µM) sufre la potenciación habitual de forma inmediata. **B**. Resumen del bloqueo de la potenciación de las respuestas GABAρ1 por DEA en presencia de CPTIO ($p < 0,05$; $n = 5$; test t).

Más allá de esta discusión mecanística, los resultados muestran con claridad que el CPTIO previene casi totalmente los efectos del DEA, lo que es una prueba concluyente que su acción es ejercida por la liberación de NO y no un artefacto de otra especie que pueda estar presente en solución. Estos resultados no aportan información sobre lo que ocurre con el NO una vez liberado, ni sobre el mecanismo o sitio de acción por el que es capaz de modular los GABAρ1Rs, pero demuestran que, por lo menos para el DEA, el NO debe ser liberado para que la modulación tenga lugar.

D) Discusión general del Capítulo 1.

Como se indicó en la introducción (B)(ii)), existen reportes de la modulación de la actividad de $GABA_A$Rs nativos y recombinantes por NO. Se describieron efectos de potenciación (Castel & Vaudry, 2001; Fukami et al., 1998; Hoffpauir et al., 2006; Leidenheimer, 1996) y de inhibición (Castel et al., 2000; Fukami et al., 1998; Wexler et al., 1998). La variabilidad en los efectos depende del subtipo de receptor involucrado, el tipo neuronal, el mecanismo de acción y la concentración de NO. Los efectos del NO sobre receptores formados por subunidades ρ no habían sido estudiados previamente.

En este capítulo demostramos que el GABAρ1R homomérico se potencia significativamente por NO liberado por donantes de la familia de los S-Nitrosotioles y de los NONOatos. La potenciación fue rápida, reversible, dosis-dependiente y fuertemente dependiente de la concentración de GABA. El NO produjo un corrimiento a la izquierda la CDR para el GABA y un incremento en la corriente máxima. Estos efectos son compatibles con un

cambio conformacional en el receptor que afecta la unión del GABA y la apertura del canal (Chang & Weiss, 2002).

En células amácrinas de retina, se reportó que el NO potencia las respuesta mediadas por $GABA_A$Rs por dos mecanismos diferentes. Produce una ligera potenciación de la actividad de los receptores y modifica el E_{Cl^-} a través de un aumento de la concentración intracelular de Cl^- (Hoffpauir et al., 2006). En nuestro sistema de expresión verificamos que el NO no modifica el E_{Cl^-}, por lo que los efectos observados estarían mediados directamente por una modificación en la actividad del GABAρ1R.

También mostramos que los subproductos de la aplicación de DEA como donante de NO no modifican la potenciación de los GABAρ1Rs, mientras que el scavenger de NO CPTIO, la previno parcialmente. Estos resultados demuestran que los efectos observados son un efecto genuino del NO.

Posible relevancia fisiológica de la modulación de GABAρ1R por NO

La curva dosis efecto realizada para el DEA (**Figura 1. 6**) mostró que una concentración de DEA de tan solo 1 µM es capaz de potenciar significativamente los GABAρ1Rs. Los trabajos en los que se usó DEA y se midió la concentración efectiva de NO en solución, indican que 1 µM de DEA equivale a una concentración de NO en el orden de decenas de nM (Kim et al., 1999; Wang et al., 2007b). Estos valores son, en muchos casos, del mismo orden de magnitud (o incluso menores) a los requeridos para modular otros receptores y canales (Castel & Vaudry, 2001; Choi et al., 2001; Steinert et al., 2008). Teniendo en cuenta que la concentración de NO en la retina fue estimada en 1 – 2,5 µM (aunque este nivel no es constante y depende de la capa de la retina y el nivel de actividad) (Guthrie & Kang-Mieler, 2013), el GABAρ1R tiene la sensibilidad suficiente por el NO para ser modulado por los niveles presentes en la retina de forma fisiológica.

La síntesis de NO depende de la actividad. La estimulación con luz incrementa la producción de NO en la CPI (Eldred & Blute, 2005), donde los GABAρ1Rs están mayormente expresados. Las células bipolares y amácrinas de la retina expresan la maquinaria de señalización nitrérgica y producen NO.

La potenciación del GABAρ1R fue mayor (en términos porcentuales) a bajas concentraciones de GABA. Este hecho tiene una especial importancia teniendo en cuenta que el GABAρ1R tienen una alta afinidad por el GABA y participa en corrientes tónicas en los axones de las células bipolares de retina (Hull et al., 2006), por lo que resulta más probable que la potenciación a baja concentración de GABA coincida con el rango dinámico de la activación de los GABAρ1Rs, y que sean efectivamente modulados por NO. Por lo tanto, la población de receptores modulados dependerá de las concentraciones locales de NO y de GABA. El efecto

sería más potente sobre los receptores extrasinápticos, que probablemente estén expuestos a menores concentraciones de GABA.

Los GABAρ1Rs se expresan en las células bipolares, donde son activados por el GABA proveniente de la sinapsis recíproca amácrina-bipolar. Su activación inhibe la liberación de glutamato por parte de las células bipolares, por lo que participan en un mecanismo de control de la ganancia de la sinapsis bipolar-ganglionar (Lukasiewicz et al., 2004). También median una corriente tónica dependiente del nivel extracelular de GABA que es controlado por el transportador GAT-1 (Hull et al., 2006).

Por su parte, el NO endógeno disminuye la liberación de GABA aunque la estimulación de la NOS produce el efecto contrario (Maggesissi et al., 2009). Además, Hoffpauir y col. (2009) reportaron que concentraciones de NO menores a 100 nM aumentan la inhibición de las células amácrinas, mientras que concentraciones de NO mayores (cientos de nM a μM), despolarizan las células amácrinas (por cambiar el potencial de reversión del GABA), lo que produciría un aumento en la tasa de disparo con la consecuente mayor liberación de GABA e inhibición de las células postsinápticas bipolares o ganglionares.

Estos reportes van en el mismo sentido de nuestros resultados. El aumento del estímulo excitatorio produciría un mayor producción de NO que incrementaría la liberación de GABA desde las células amácrinas. Al mismo tiempo, el NO potenciaría los GABAρ1Rs, inhibiendo las células bipolares y disminuyendo la tasa de liberación de glutamato. De esta forma el NO podría estar involucrado en el control de la ganancia de la sinapsis bipolar-ganglionar.

Por otro lado, este aumento de la actividad de las células amácrinas, produciría un incremento del nivel basal de GABA, aumentando la corriente tónica mediada por GABAρ1R de la célula que posee el contacto recíproco con la amácrina o de las células bipolares vecinas. El NO producido podría funcionar en este sistema como un transmisor volumétrico que potencia la corriente tónica en las células bipolares circundantes a la estimulada (fuente del NO). Esta hipótesis estaría favorecida en caso de coincidir el incremento del nivel de GABA y de NO, que actuarían sinérgicamente para activar la corriente tónica de células cercanas. Este efecto impactaría especialmente en estas células porque el nivel de GABA sería menor, y por lo tanto los GABAρ1Rs estarían en el rango dinámico de acción óptimo para la modulación por NO. Por lo tanto, el NO podría actuar como una señal volumétrica capaz de modular la ganancia de la sinapsis bipolar-ganglionar, y al mismo tiempo silenciar las sinapsis cercanas.

Vale la pena recordar que los trabajos de Wang y col. (Nemargut & Wang, 2009; Wang et al., 2003, 2007a) mostraron que el NO endógeno reduce la tasa de disparo de las células ganglionares actuando de forma más marcada en células ON. El NO disminuye la amplitud de los EPSCs de las células ganglionares. Esto produce una mayor sensibilidad para la adaptación al aumento de la intensidad lumínica. Se propuso que los sitios blancos del NO para este fenómeno estarían localizados en los fotoreceptores (Nemargut & Wang, 2009). Sin embargo, la

potenciación de los GABAρ1Rs de las células bipolares por NO podría estar participando de este efecto en la adaptación visual.

Nuestros resultados, indican que la modulación de GABAρ1Rs por el NO cumpliría un rol en la fisiología de la retina. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser puesta a prueba realizando experimentos en los receptores nativos. En primer lugar para corroborar que la potenciación es reproducible en neuronas con las concentraciones de NO endógenas, y en segundo lugar para evaluar cuáles son los efectos sobre la transmisión de la información visual.

Capítulo 2. Estudio del sitio de acción del NO sobre los GABAρ1R.

A) Modificación química de los residuos de cisteína.

Como se desarrolló en la sección A)(iv) de la introducción, estudios previos del laboratorio con el receptor GABAρ1 mostraron que las cisteínas extracelulares del cys-loop participan en la modulación por agentes rédox como el DTT o el ácido ascórbico (Calero & Calvo, 2008; Calero et al., 2011). Estos trabajos plantearon la hipótesis que el cys-loop del GABAρ1R se encuentra en un equilibrio entre estados de oxidación, y que la perturbación de ese equilibrio por un agente reductor u oxidante modifica la funcionalidad del receptor, por ejemplo, cambia la afinidad por el GABA.

Como se ha referido en la introducción (B)(i)), se postulan dos grandes vías de acción para el NO: la vía de la GC-GMP_C-PKG (indirecta) y la vía de la S-Nitrosilación de cisteínas (directa). El efecto potenciador del NO sobre los GABAρ1Rs es observable de forma casi inmediata una vez que la perfusión inunda el ovocito con la solución portadora del NO (**Figura 1. 4**). Esta rapidez de los efectos parece poco compatible con la difusión del NO al interior celular, la activación de la GC y la fosforilación del receptor o de alguna proteína accesoria. Tampoco sería esperable que los efectos se deban a cambios en la concentración intracelular de Cl^- (**Figura 1. 8**). Por lo que nuestra hipótesis de trabajo al presente punto de la tesis era que el NO potencia nuestro receptor a través de la modificación de las cisteínas del receptor.

En esta sección pondremos a prueba esta hipótesis utilizando reactivos que modifican específicamente cisteínas, mediante alquilación o adición de grupos funcionales al tiol. La lógica de los experimentos es que si las cisteínas están modificadas, quedarán bloqueadas para su reacción con el NO, independientemente del efecto que puedan tener los reactivos modificadores per se.

(i) MTSEA

El MTSEA ((2-aminoetil)-metanotiosulfonato) reacciona con tioles accesibles dejando un grupo disulfuro mixto entre la cisteína proteica y el grupo 2-aminoetilo. Este reactivo pertenece a la familia de los metanotiosulfonatos. Estos sustancias han sido ampliamente utilizadas para estudios de estructura-función de proteínas expresadas en ovocitos de Xenopus

mediante la técnica de SCAM (substituted-cysteine accessibility method) introducida por Karlin y Akabas en la década del 90 (Karlin & Akabas, 1998). El método consiste en sustituir cada aminoácido de la región de interés por cisteínas, expresar los receptores mutantes en ovocitos de Xenopus laevis, introducir grupos funcionales de distinta naturaleza química por reacción con la cisteína agregada y observar el cambio de una propiedad del receptor, como ser la afinidad por un agonista, para identificar los residuos involucrados. La ventaja consiste en que se han sintetizado una gran variedad de compuestos con el grupo metanotiosulfonato, por lo que se puede agregar todo tipo de grupos químicos a la cisteína de interés (ácidos, básicos, pequeños o voluminosos) (Xu & Akabas, 1993).

El MTSEA en particular, tiene la ventaja de ser un grupo pequeño y relativamente neutro por lo que no modificaría significativamente la estructura tridimensional de la proteína. Por esta razón, ha sido utilizado para determinar si el NMDAR es S-Nitrosilado por NO, mediante el bloqueo de las cisteínas del receptor nativo (Choi et al., 2000). Para determinar el sitio de acción del NO sobre nuestro receptor decidimos un abordaje similar. Este reactivo es parcialmente permeable a la membrana plasmática, por lo que no puede descartarse que sean modificadas también cisteínas intracelulares (Holmgren et al., 1996).

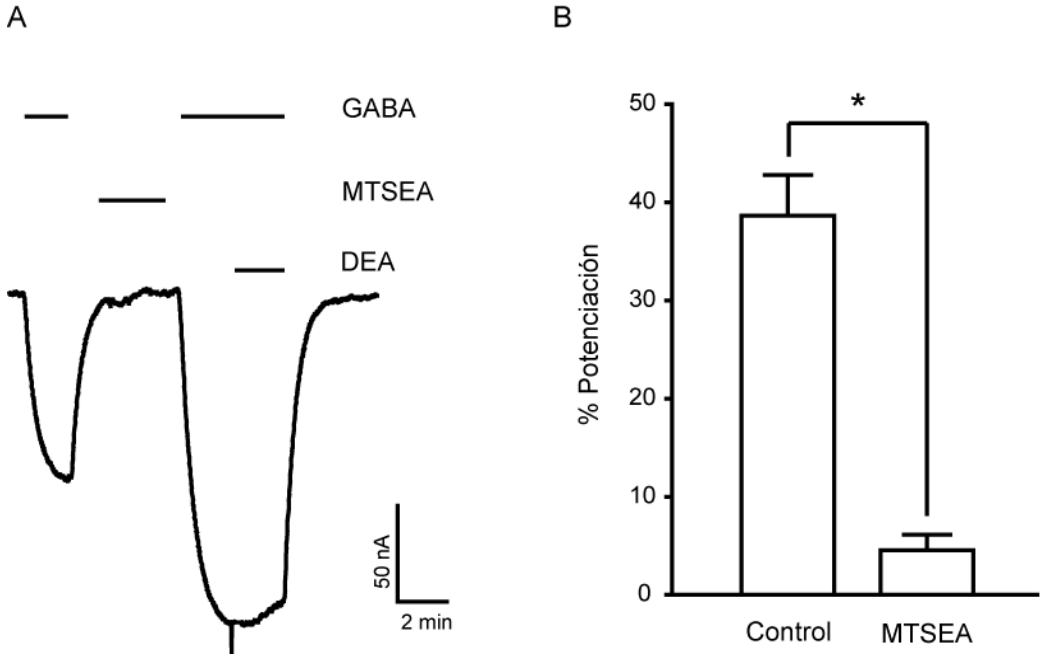

Figura 2. 1. El bloqueo de las cisteínas de los GABAρ1Rs con MTSEA previene la potenciación por NO.
A. Trazo representativo donde se muestra la potenciación de la respuesta evocada por GABA 0,3 µM luego de la incubación con MTSEA 2,5 mM durante 2´30´´. La acción del MTSEA previene la potenciación por DEA 100 µM. **B**. Resumen gráfico de los experimentos de incubación con MTSEA, la potenciación por DEA se bloqueó de manera significativa (n = 8-10; $p < 0,0001$; test t no pareado).

Los ovocitos fueron incubados durante 2’30’’ con MTSEA 2,5 mM. La respuesta evocada por GABA 0,3 µM posterior a esta incubación se vio fuertemente potenciada (48-104

% durante los primeros 5 min) (**Figura 2. 1**.**A**). Sin embargo, esta potenciación fue muy inestable y comenzó a revertirse pasados 2 ó 3 min del lavado del MTSEA, siendo menor al 25 % a los 15 min.

Asumimos que la modificación química que produce el MTSEA sobre las cisteínas del receptor está presente mientras dure este efecto en las respuestas. Por lo tanto, realizamos experimentos aplicando DEA 100 µM on top de las respuestas de GABA evocadas inmediatamente luego del lavado del MTSEA. La potenciación de los GABAρ1Rs por DEA fue casi completamente prevenida. El porcentaje de potenciación en los ovocitos probados pasó del 38,7 ± 4,1 % al 4,6 ± 1,6 % (n = 8-10; $p < 0,0001$; test t no pareado) (**Figura 2. 1**.**B.**). Este resultado sugiere que las cisteínas del receptor están involucradas en la modulación por NO. No obstante, sería posible aunque poco probable que la potenciación observada con MTSEA se deba a la introducción de este grupo funcional particular (2-aminoetil), y que esta potenciación ocluya la mediada por NO. Además, la inestabilidad de la modificación química no es usualmente reportada en este tipo de reacciones, y aunque puede deberse a las características de la cisteína que está siendo modificada, preferimos confirmar estos resultados con un agente alquilante de naturaleza química distinta en lugar de otro reactivo de la familia de los metanotiosulfonatos.

(ii) NEM

El N-etilmaleimida (NEM) es un agente alquilante irreversible que se une covalente y selectivamente a tioles libres a pH = 7 (Means & Feeney, 1971; Susankova et al., 2006). Dada la estabilidad y reproducibilidad de la reacción, el NEM fue extensamente utilizado para caracterizar modulaciones por NO y otros agentes rédox mediadas por cisteínas de receptores de neuronas en cultivo (Fagni et al., 1995; Hoyt et al., 1992; Kim et al., 1999; Lipton et al., 1993; Tang & Aizenman, 1993), retina (Pan et al., 1995) y receptores expresados en sistemas heterólogos (Calero et al., 2011; Chu et al., 2006). En particular, los trabajos de Pan y col. (1995) y Calero y col. (2011) son estudios realizados en receptores de GABA, y aportan evidencias de que el cys-loop está involucrado en la modulación por agentes rédox (ver Introducción, sección A)(iv)).

Estas propiedades nos permitirían concluir sobre la participación de las cisteínas en la modulación por NO de los GABAρ1Rs. La desventaja de este reactivo, según mostraron estudios previos del laboratorio, es que resulta tóxico para los ovocitos, por lo que es más complicado ajustar las condiciones experimentales para garantizar el bloqueo de las cisteínas sin que se desestabilice la corriente de leak debido a la muerte del ovocito. Por esta razón, intentamos mantener la concentración de NEM lo más baja posible con un tiempo de incubación relativamente corto. Realizamos los experimentos con incubaciones a concentraciones crecientes de NEM y tiempo constante.

Los resultados se ilustran en la **Figura 2. 2**, la potenciación producida por DEA 100 µM de las respuestas a GABA (0,3 µM) fue prevenida completamente luego de la preincubación con NEM 300 µM (% $Pot_{control}$ = 36,9 ± 5,0 %; % $Pot_{NEM\ 300\ \mu M}$ = 0,2 ± 4,5%; n = 4; p < 0,01). Este efecto bloqueante del NEM fue dependiente de la dosis utilizada (% $Pot_{NEM\ 60\ \mu M}$ = 13,4 ±1,5 %; n = 5; p < 0,05; % $Pot_{NEM\ 30\ \mu M}$ = 37,6 ± 4,2 %; n = 4; n.s.; test t no pareado). El NEM per se no produjo un cambio significativo en la amplitud de las respuestas a GABA.

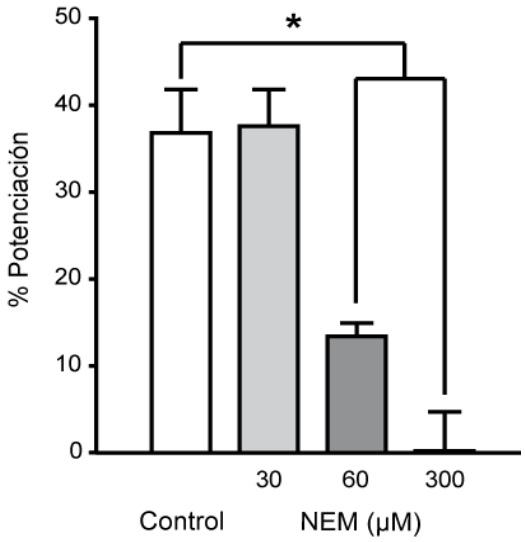

Figura 2. 2. La potenciación de los GABAρ1Rs por NO es prevenida por el bloqueo de las cisteínas con NEM.
El grafico de barras ilustra el porcentaje de potenciación de las respuestas evocadas por GABA 0,3 µM, producto de la aplicación de DEA 100 µM en condición control, y luego de la preincubación con NEM (30, 60 y 300 µM) por 2´30´´. La potenciación fue significativamente menor que el control para los ovocitos tratados con 60 µM de NEM (p < 0,05; n = 5) y 300 µM de NEM (p < 0,01; n = 4), test t no pareado.

Los resultados de esta sección en conjunto, muestran claramente como la modulación por NO de los GABAρ1Rs está mediada de forma total por la interacción con una o más cisteínas accesibles al solvente. De esta manera, confirmamos también que la otra vía efectora de la transmisión nitrérgica, la vía de la GC-GMP_C no está involucrada en el efecto potenciador que describimos, al menos esto es así en el sistema de expresión utilizado.

Por otra parte, el NEM al igual que el MTSEA es capaz de cruzar la membrana plasmática y modificar cisteínas intracelulares (Susankova et al., 2006). Aún más, a priori esta parece la hipótesis más plausible teniendo en cuenta que necesitamos una elevada concentración de NEM para bloquear totalmente el efecto del NO en comparación con otros estudios en el mismo receptor (Calero et al., 2011), y también, el alto grado de inestabilidad mostrado por la potenciación con MTSEA, sugiriendo la remoción por reductores intracelulares (ej.: GSH).

En resumen, los experimentos de modificación química de cisteínas son concluyentes en cuanto a la participación de estos residuos en el mecanismo de acción del NO sobre el receptor, pero no permiten identificar cuál o cuáles son las cisteínas involucradas, ni siquiera su

localización intra o extracelular. Para definir con mayor exactitud el sitio de acción del NO abordaremos el estudio de receptores mutados.

B) Reemplazo de la cisteína intracelular (C364) del GABAρ1R por alanina.

Las subunidades ρ1 tienen solo tres cisteínas en su secuencia aminoacídica. Estas son: las cisteínas 177 y 191, localizadas en el dominio extracelular N-terminal que forman el característico cys-loop de esta familia de receptores; y la cisteína 364 localizada en el linker entre M3 y M4 (Zhang et al., 2001). Esta particularidad convierte al GABAρ1R en un modelo ideal para el estudio de modulaciones en las que intervienen modificaciones de las cisteínas. La mutación de una, o las dos cisteínas extracelulares del GABAρ1R no es posible, debido a que estas mutaciones no producen receptores funcionales (Amin et al., 1994; Sedelnikova et al., 2005). Entonces, decidimos abordar la mutagénesis sitio-dirigida de la C364 intracelular, a la que reemplazamos por alanina, un aminoácido pequeño y neutro, para obtener los receptores mutantes homoméricos GABAρ1$_{C364A}$R que inyectamos en los ovocitos.

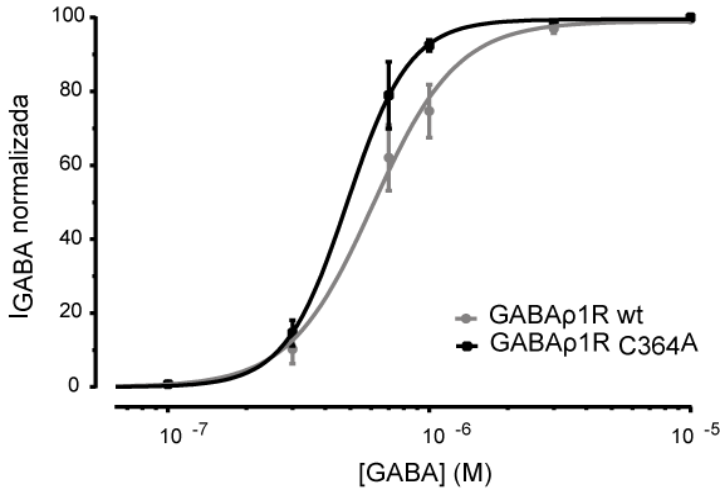

Figura 2. 3. Curva dosis-respuesta para GABAρ1R mutado en la cisteína intracelular.
En la figura se muestra la CDR para el GABAρ1R nativo (gris) y el receptor mutado GABAρ1$_{C364A}$ (negro). El receptor mutado presenta una afinidad por el GABA y un nH mayores (n = 4; p < 0,005).

Los GABAρ1$_{C364A}$Rs expresados en ovocitos de Xenopus producen respuestas al GABA similares a los nativos, aunque presentan una afinidad por el GABA y un nH ligeramente mayores para la misma concentración de ARN$_C$ inyectada (CE$_{50}$ GABAρ1$_{C364A}$ = 0,46 ± 0,05 µM; CE$_{50}$ GABAρ1$_{wt}$ = 0,61 ± 0,07 µM; nH GABAρ1$_{C364A}$ = 3,6 ± 0,4; nH GABAρ1$_{wt}$ = 2,7 ± 0,4; n = 4; p < 0,005) (**Figura 2. 3**.).

La aplicación de DEA 100 µM on top de las respuestas evocadas por GABA 0,3 µM en los receptores mutados produjo una potenciación de las corrientes de iguales características y

magnitud que las observadas en el receptor nativo (% Pot GABAρ1$_{wt}$ = 37,6 ± 3,9 %; % Pot GABAρ1$_{C364A}$ = 46,1 ± 9,2 %; p = 0,21; n = 6; test t no pareado) (**Figura 2. 4**).

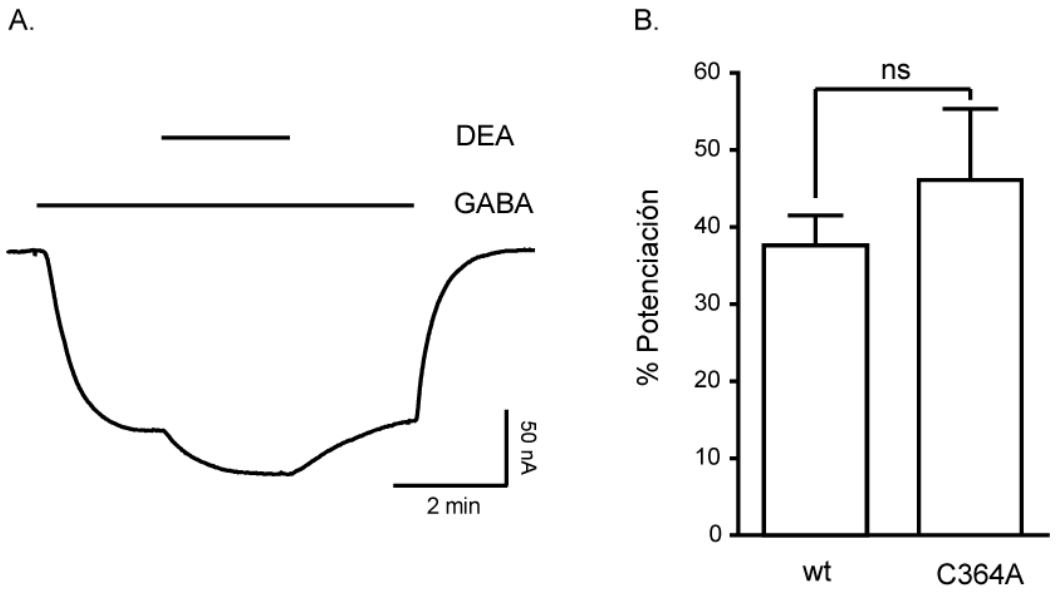

Figura 2. 4. La mutación de la cisteína intracelular C364 no afecta la potenciación por NO. **A**. Trazo representativo de la potenciación por DEA 100 µM aplicado on top de la respuesta evocada por GABA 0,3 µM en los GABAρ1$_{C364A}$Rs. **B**. El porcentaje de potenciación producido por DEA no fue significativamente distinto en los GABAρ1Rs nativos y con la mutación C364A (p = 0,21; n = 6; test t no pareado).

El hecho de que los receptores con la cisteína intracelular mutada por un residuo incapaz de interaccionar con el NO conserven la modulación por el NO, permite descartar que este residuo esté involucrado en los efectos. Por lo tanto, la potenciación solo podría estar mediada por las cisteínas extracelulares. Resulta imposible determinar si una o las dos cisteínas son modificadas simultáneamente. Aún más, el receptor está formado por cinco subunidades, cada una con dos cisteínas extracelulares, podría ser el caso que no todos los cys-loops medien la modulación o que sean modificados secuencialmente de acuerdo al estado previo del receptor y la concentración de NO para producir el cambio conformacional responsable del efecto potenciador de las respuestas al GABA.

C) Influencia de la presión parcial de oxígeno (pO_2) sobre la sensibilidad al NO de los GABAρ1Rs.

Estudios realizados en el receptor de rianodina (Eu et al., 2000) y en el de NMDA (Takahashi et al., 2007b) muestran que la modulación de canales iónicos por S-Nitrosilación puede ser sensible a la pO_2 presente. Sin embargo, la naturaleza de esta modulación es notablemente distinta en ambos trabajos. Como se indicó en la introducción (B)(ii), el trabajo de Takahashi y col. (2007b) estudia la forma diferencial en que el receptor de NMDA es modulado

por NO en condiciones de pO_2 ambiental (150-160 mm Hg) y de baja pO_2 (≈ 5 mm Hg). En este punto es necesario aclarar que la primera situación (la presión de oxígeno atmosférica) difícilmente exista en condiciones fisiológicas en el cerebro, aunque los autores la proponen como comparable a una situación de estrés oxidativo agudo. La pO_2 en el SNC es muy variable con respecto al funcionamiento cardiovascular y aún más, la irrigación es distinta en cada región cerebral, variando en promedio entre los 10 y los 60 mm Hg (Erecinska & Silver, 2001). Por lo tanto, la segunda condición (5 mm Hg) sería análoga a una situación de hipoxia para la mayor parte del cerebro tal como señalan Takahashi y col (2007b).

Recapitulando, se demostró que el NO inhibe las corrientes mediadas por NMDAR a través de la S-Nitrosilación de la cisteína C399 de la subunidad NR2A, mientras que el par de cisteínas de la subunidad NR1 C744 - C798, también son S-Nitrosiladas siempre que el puente disulfuro que forman entre ellas se encuentre reducido, cosa que ocurre en las condiciones de hipoxia. De esta forma el par C744-C798 funcionaría como un sensor de oxígeno que aumenta considerablemente la sensibilidad del NO cuando baja la pO_2. Los autores proponen que el mecanismo descripto funcionaría como un sistema de protección del daño neuronal frente a la hipoxia (Takahashi et al., 2007b).

Por otra parte, Eu y col. (2000) presentan un punto de vista muy distinto. Su trabajo en el receptor de rianodina RyR1 muestra que la pO_2 controla dinámicamente 6 a 8 cisteínas (de 50 presentes en cada subunidad) que pueden estar oxidadas, formando puentes disulfuro o reducidas como tioles libres de acuerdo a si la pO_2 está en condiciones fisiológicas musculares (≈ 10 mm Hg) o ambientales (150 – 160 mm Hg). Los autores encuentran que en condiciones de bajo oxígeno el NO activa el canal por S-Nitrosilación de una única cisteína de forma cadmodulina dependiente. En cambio, en condiciones ambientales de oxígeno, el mismo oxígeno activa al receptor y la S-Nitrosilación no ocurre. Los autores proponen que este último efecto es un artefacto y que la modulación por NO ocurre en condiciones fisiológicas, además sugieren que, por extensión, todos los estudios de modulación de canales por NO deberían realizarse en condiciones de bajo oxígeno, para evitar que la elevada pO_2 produzca artefactos u ocluya los efectos del NO por estar las cisteínas oxidadas (Eu et al., 2000).

Por lo tanto, decidimos explorar si los resultados obtenidos con DEA se modifican al disminuir la pO_2. Para ello se burbujeó durante dos horas la solución Ringer´s de registro con N_2 y se controló la pO_2 con un oxímetro con electrodo de platino (YSI 55, YSI Inc., Ohio, USA). Luego de dos horas de burbujeo con nitrógeno la pO_2 se estabilizó en ≈ 5 – 10 mm Hg. Con esta solución con bajo oxígeno se prepararon las soluciones de GABA y DEA, sin interrumpir el burbujeo de N_2 hasta que la solución fue succionada para entrar en la cámara de registro.

La aplicación de DEA 100 µM en condiciones de bajo oxígeno no produjo un cambio significativo en el porcentaje de potenciación de las respuestas a GABA 0,3 µM ($p = 0,67$; $n = 4$; test t no pareado) (**Figura 2. 5**). Este resultado sugiere que el cys-loop del receptor ρ1 no se

ve afectado por la pO_2 o, al menos, la cisteína involucrada en la modulación por NO no modificaría su disponibilidad para su modificación química en las concentraciones probadas en este experimento.

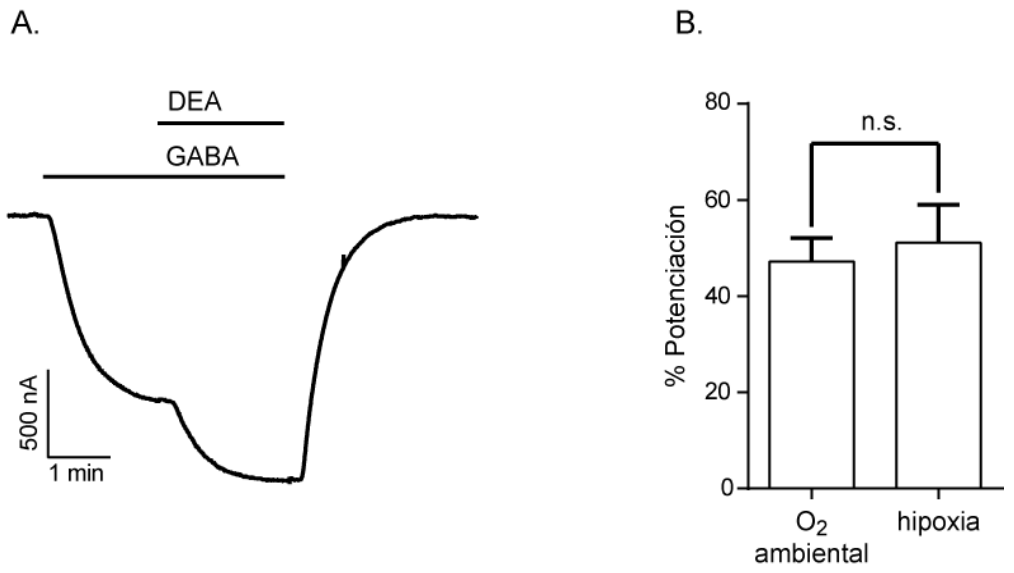

Figura 2. 5. La modulación por NO de los GABAρ1Rs no se ve afectada por la disminución en la pO_2.
A. Trazo representativo de la potenciación del donante de NO (DEA 100 µM) en condiciones de bajo oxígeno (las soluciones fueron burbujeadas con N_2 hasta que la pO_2 se estabilizara en ≈ 5 – 10 mm Hg). **B**. Resumen de los experimentos de potenciación de los GABAρ1Rs en bajo oxígeno. No se observaron diferencias significativas con la condición de oxígeno ambiental (n = 4; test t no pareado).

Por otro lado, el resultado también demostraría que la modulación observada no es debida a un artefacto producto de las condiciones experimentales (oxígeno ambiental). Si bien no podemos conocer cuál es la especie que efectivamente modifica el tiol del receptor, la formación de esa especie (por ej. N_2O_3) podría ser puramente un artefacto de la oxidación del NO debido a un nivel excesivamente alto de O_2. Si este fuera el caso, esperaríamos perder la potenciación por DEA. Por el contrario, si como en el NMDAR existe un puente disulfuro que funciona como un sensor de oxígeno que aumenta la sensibilidad por NO en condiciones de hipoxia, hubiéramos esperado un aumento en el porcentaje de potenciación al disminuir la pO_2. Por lo tanto, concluimos que la modulación del receptor por NO podría ocurrir en condiciones fisiológicas o patológicas de forma independiente a las fluctuaciones en la pO_2 celular.

Una tercera opción, aunque mucho menos probable, es que ambas cosas estén ocurriendo simultáneamente y que los efectos se contrarresten. Es decir, que la especie reactiva que modifica el receptor sea un derivado de la oxidación del NO, y que en consecuencia el menor nivel de O_2 produzca menos especie moduladora; pero que, al mismo tiempo el receptor se haga más sensible por la reducción del puente disulfuro del cys-loop, dejando como resultado final una potenciación idéntica a la observada en condiciones ambientales. Esta hipótesis podría ser descartada midiendo los tioles libres en ambas condiciones, por ejemplo por reacción con un

fluoróforo selectivo para tioles. Para ello o bien hay que obtener vesículas conteniendo el receptor o realizar imaging en el ovocito.

D) Discusión general del Capítulo 2.

Los resultados principales de estos dos capítulos fueron publicados en el año 2012 (Gasulla et al., 2012) y constituyen el primer reporte de la modulación de un miembro de la superfamilia de receptores con lazo de cisteínas por NO a través de la interacción directa con el cys-loop.

El par de cisteínas extracelulares del cys-loop era el principal sitio candidato a ser responsable de la modulación por NO dada su reactividad y localización. El bloqueo de la potenciación de los GABAρ1Rs al ser tratados con NEM y MTSEA demuestra que el NO interactúa con uno o más cisteínas. Finalmente, el reemplazo de la C364 por alanina confirma que los residuos involucrados en la modulación son los extracelulares C177 y C191 del cys-loop, dado que el NO produce efectos similares en los mutantes GABAρ1$_{C364A}$Rs que en los GABAρ1$_{wt}$Rs.

Las cisteínas son los residuos más sensibles a la modificación por NO y otras especies reactivas del nitrógeno, además de ROS y otros agentes rédox como el glutatión o el ácido ascórbico. El estudio de las acciones de agentes rédox como el DTT, DTNB y glutatión sobre el GABAρ1R recombinante indican que el cys-loop del receptor es capaz de fluctuar entre estados más oxidados o reducidos de forma rápida y con reversión espontánea al estado inicial cuando desaparece la acción del agente (Calero & Calvo, 2008). La modificación del estado de oxidación de los tioles de las C177 y C191 del cys-loop, induciría un cambio conformacional en la estructura del receptor que modificaría la unión del GABA o la apertura del canal (Chang & Weiss, 2002). De la misma manera, el NO podría interactuar con dichas cisteínas, impidiendo la formación de un puente disulfuro entre las C177 y C191 o favoreciendo un estado abierto, de forma similar a las especies reductoras que también potencian las respuestas mediadas por GABAρ1Rs (Calero & Calvo, 2008).

La interrelación entre la señalización por NO y por el entorno rédox se reportó en distintos niveles celulares (Benhar et al., 2008; Burgoyne et al., 2007; Lipton et al., 2002). Es interesante destacar que en otros receptores y canales iónicos, se encontró que las mismas cisteínas que median la modulación por NO, a través de su S-Nitrosilación, también son el blanco de la modulación por agentes rédox. Por ejemplo, en el NMDAR las cisteínas 744 y 798 de la subunidad NR1 participan en la modulación por agentes rédox y además, cuando están reducidas pueden ser S-Nitrosiladas modificando la potencia de la inhibición del NMDAR por NO (Lipton et al., 2002). También la inhibición por NO del canal de K^+ de tipo M es producto de la S-Nitrosilación de tres cisteínas del linker citosólico (C156-158) que conecta los dominios

transmembrana 2 y 3. Estas cisteínas son oxidadas en presencia de ROS lo que produce un efecto opuesto sobre la actividad del canal (Ooi et al., 2013). En el mismo sentido, el canal TRPC5 es activado por la S-nitrosilación de las cisteínas 553 y 558, y por la oxidación de estos residuos por H_2O_2 (Yoshida et al., 2006).

En estos casos, así como en la mayor parte de los reportes de S-Nitrosilación de canales o receptores, la modulación por NO o por agentes rédox no es reversible espontáneamente (ej. Choi et al., 2000) o solo lo hace muy lentamente (ej. Yoshida et al., 2006). La S-Nitrosilación es la unión covalente del átomo de azufre del tiol con el grupo NO^+ para dar RS-NO (Hess et al., 2005). Para romper este enlace y regenerar el RSH, normalmente es necesario agregar un reductor como el DTT o el ascorbato (especialmente si la cisteína modificada es extracelular) (Forrester et al., 2007). No obstante, el transportador de aminoácidos catiónicos de cardiomiocitos es inhibido de forma rápida y reversible por NO a través de la interacción con cisteínas del dominio transportador. Esta modulación tiene la importancia de actuar como una retroalimentación negativa de la síntesis de NO, dado que este transportador es el responsable de la captación de L-arginina, sustrato de la NOS (Zhou et al., 2010). En este sentido, el trabajo de Fernhoff y col. (2009) ya referido en la introducción, demuestra que la GC, enzima responsable de la vía indirecta de efectos del NO, es modulada por la interacción del NO con al menos una cisteína de forma reversible en ausencia de agentes rédox. Los autores proponen un mecanismo: la adición nucleofílica directa de una molécula de NO al tiol que produciría un RS-$NO^{\cdot -}$ (Fernhoff et al., 2009). A diferencia de los S-nitrosotioles que son relativamente estables, esta especie fue propuesta como un intermediario de vida corta en reacciones de producción de disulfuros, ácidos sulfénicos y nitrosotioles. Es posible que las cisteínas del cys-loop del GABAρ1R interactúen con el NO de forma similar.

Además de la reversibilidad espontánea de la potenciación de los GABAρ1Rs, otros resultados abonan esta hipótesis. La S-Nitrosilación ocurre por un mecanismo donde el O_2 es el aceptor electrónico en algún paso (ver **Figura I - 7**). La potenciación del GABAρ1R por NO fue insensible a una dramática disminución en la pO_2 (**Figura 2. 5**). Por lo tanto, la modificación de las cisteínas del GABAρ1R sería independiente del O_2.

Más allá de la discusión mecanística acerca de cuál es la especie resultante de la interacción entre el NO y las cisteínas del GABAρ1R, es interesante señalar que la modulación por agentes rédox reportada en receptores de la familia cys-loop es típicamente reversible (Amato et al., 1999; Calero & Calvo, 2008; Leszkiewicz & Aizenman, 2003; Pan et al., 2000). Mientras que por citar el caso de los NMDAR, tanto la modulación por NO como por agentes rédox, es irreversible de forma espontánea (Lei et al., 1992; Tang & Aizenman, 1993). Lo mismo puede decirse sobre la modificación de las cisteínas con los reactivos de la familia de los metanotiosulfonatos, habitualmente producen modificaciones irreversibles en ausencia de reductores (Xu & Akabas, 1993) (lo que les da utilidad para la técnica de SCAM), pero en

nuestro caso los GABAρ1Rs fueron potenciados reversiblemente por MTSEA (**Figura 2. 1**). Por lo tanto, es posible que sea una condición estructural de los receptores de la familia de cys-loop, la que opone una barrera energética al cambio conformacional que producen estos moduladores al interactuar con las cisteínas extracelulares. Esta "tensión" estructural, podría producir que los receptores retornen al estado inicial rápidamente en ausencia de la interacción cisteína-modulador.

Se encuentra relativamente aceptado, que la prueba concluyente para afirmar que el NO modula la actividad de una determinada proteína a través de la vía directa es el hallazgo de la proteína S-Nitrosilada por la técnica de reemplazo por biotina (biotin-switch technique) (Forrester et al., 2009). En los casos como el nuestro donde la modificación que produce el NO es inestable, sería muy poco probable encontrar una señal positiva de S-Nitrosilación por esta técnica, aunque esta reacción efectivamente ocurra en cierta proporción. Por lo tanto, no consideramos adecuado realizar este ensayo con nuestro receptor.

Los trabajos que estudiaron la modulación sobre otros $GABA_A$Rs por NO encontraron efectos mediados tanto por la vía directa (Castel & Vaudry, 2001; Fukami et al., 1998; Wexler et al., 1998) como por la vía del GMP_C-PKG (Castel et al., 2000; Leidenheimer, 1996; Wexler et al., 1998). Sin embargo, los reportes que proponen la modulación de $GABA_A$Rs por la interacción directa del NO con el receptor, no incluyen experimentos de modificación de cisteínas por alquilantes o mutagénesis (como los realizados en este capítulo), ni experimentos de reemplazo por biotina para encontrar S-Nitrosilación. Solo se limitan a comprobar que son independientes de la producción del GMP_C o de la activación de PKG. El estudio de Castel y col. (2001) da un paso más al proponer que los efectos son mediados por la interacción del NO con cisteínas intracelulares posiblemente de la subunidad γ.

No existe hasta el momento estudios de los efectos del NO realizados en otros receptores tónicos expresados en sistemas recombinantes. Sin embargo, Wall (2003) reportó que el bloqueo de la NOS potencia una corriente tónica mediada por GABAα6Rs en células granulares de cerebelo.

La observación de la estructura primaria de las subunidades que componen los $GABA_A$Rs arroja un panorama abierto a todas las posibilidades. Con la única excepción de la subunidad ρ1 que posee una sola cisteína intracelular además de las dos del cys-loop extracelular, todas las subunidades cuentan con 2 a 12 cisteínas más las del cys-loop (GenBank, NIH, USA). Un análisis general de los alineamientos de las secuencias de las subunidades de GABA (Clustal Omega, EMBL/EBI, Reino Unido) indica que las cisteínas extracelulares están relativamente conservadas entre las subunidades α y entre las β más la δ; y que existe una cisteína intracelular conservada entre todas las familias con excepción de las ρ, donde la cisteína intracelular se localiza en otro lazo entre segmentos transmembrana. Otras subunidades que integran receptores tónicos como la α5 posee 1 cisteína extracelular y 2 intracelulares, lo mismo

ocurre con la α6, la α4 tiene 2 extracelulares y 2 intracelulares y la subunidad δ cuenta con 1 extracelular y 1 intracelular.

Por lo tanto, la variabilidad entre los efectos encontrados en $GABA_A$Rs formados por subunidades diferente podría deberse a que muchas de estas cisteínas son blancos para la modulación por NO. Queda pendiente el estudio de la modulación por NO de otros $GABA_A$Rs recombinantes nativos o con el reemplazo de las cisteínas mutadas.

Capítulo 3. Estudio de la modulación por NO de los receptores GABAérgicos de células piramidales del área CA1 de hipocampo.

A) Modulación de la actividad de los $GABA_A$Rs fásicos por NO.

En este capítulo abordamos el estudio de los efectos del NO sobre los $GABA_A$Rs en una preparación donde el entorno fisiológico de los receptores se encuentra mayormente conservado. A pesar de existir abundantes evidencias de la importancia de la neurotransmisión nitrérgica para la función de las células CA1 del hipocampo, los estudios reportados de los efectos del NO sobre la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo murino (ver introducción (B)(iv)) (Cserép et al., 2011; Zanelli et al., 2009) no permiten conocer acabadamente los efectos del NO sobre la actividad de los $GABA_A$Rs en animales adultos.

Por consiguiente, decidimos utilizar un abordaje experimental que permita el estudio de los $GABA_A$Rs, focalizando únicamente en la postsinapsis. Por lo tanto, obviamos el análisis cuantitativo de la actividad espontánea (sIPSC y mIPSC). Como se indicó en la sección metodológica, la actividad de los receptores de $GABA_A$ fásicos se evaluó midiendo la amplitud de las respuestas evocadas por la aplicación de puffs del agonista (GABA 30 µM). Las aplicaciones se realizaron cada 30 segundos y el registro comenzó una vez estabilizadas las respuestas.

i) Efecto del NO exógeno.

Como donante de NO se utilizó DEA 10 µM. La elección del donante obedece a las razones expuestas anteriormente sumadas a la reproducibilidad que observamos previamente usando este donante.

La aplicación de DEA durante 5 min no modificó significativamente la amplitud de las corrientes evocadas por puffs de GABA (**Figura 3. 1**). Las amplitudes promedio de las corrientes evocadas por un puff de GABA a los 5 min de perfusión con ACSF o con el agregado

de DEA fueron: I_{ctrl} = 925,6 ± 189,8 pA; I_{DEA} = 1093,0 ± 351,7 pA; p < n.s. n = 6; test t pareado (**Figura 3. 1.B.)**.

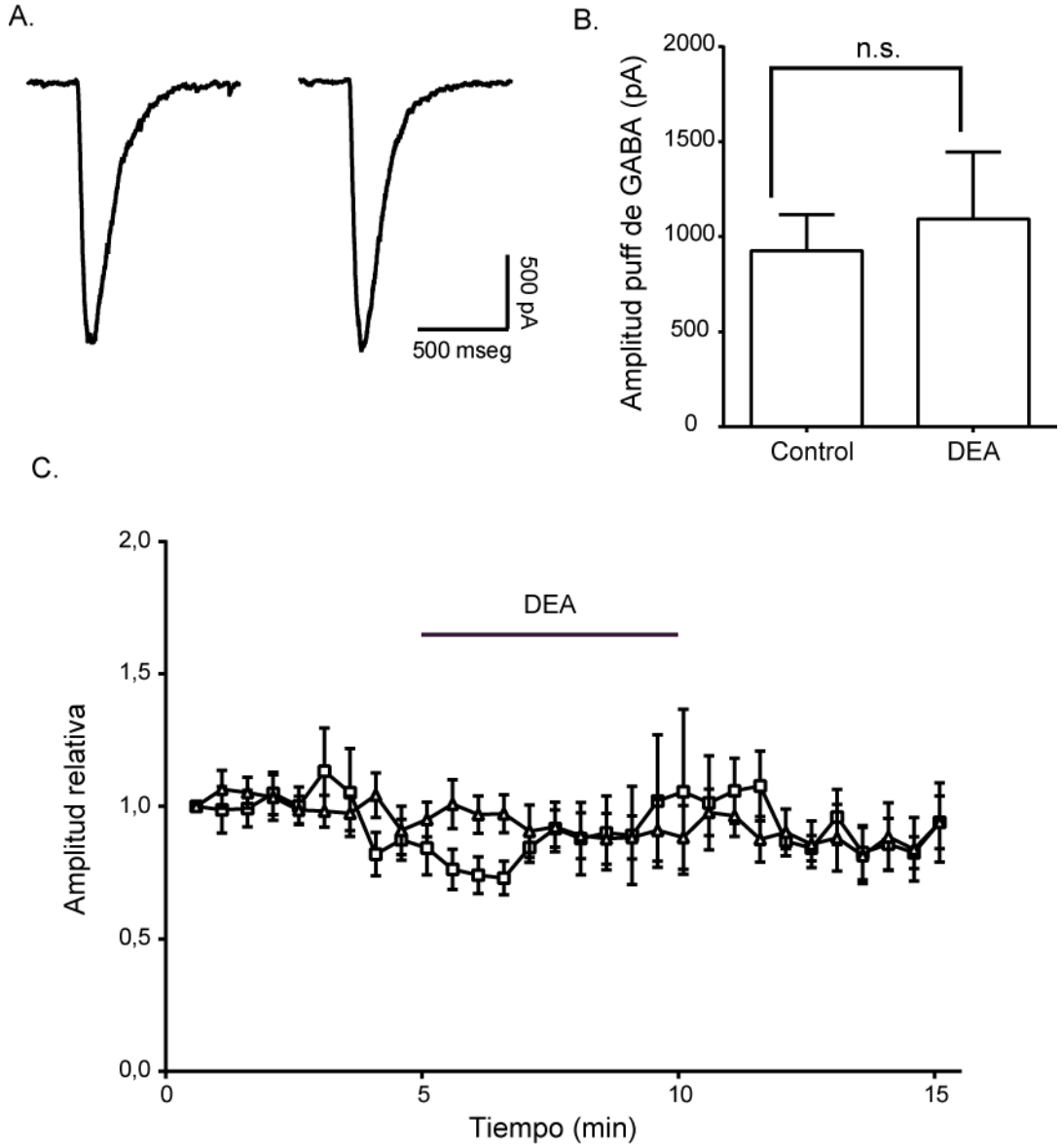

Figura 3. 1. Las corrientes fásicas evocadas por puffs de GABA, no son afectadas por el donante de NO DEA.
A. Trazo representativo de las corrientes evocadas por un puff de GABA (30µM; 100 mseg) en condición control (izq) y luego de la aplicación de DEA (10 µM) durante 5 min (der). **B.** Amplitud promedio de los puffs de GABA luego de 5 min de registro (1 puff cad 30 seg) en condición control (ACSF) y luego de 5 min de perfusión en presencia de DEA (I_{ctrl} = 925,6 ± 189,8 pA; I_{DEA} = 1093,0 ± 351,7 pA; p < n.s. n = 6; test t pareado). **C.** Curso temporal de la amplitud corriente evocada por puffs de GABA relativizados a la amplitud de la primera aplicación. En la condición (□) se aplicó DEA durante 5 min a los 5 min de comenzado el registro, mientras que la condición control (Δ) se continuó la perfusión con ACSF. No se encontraron diferencias significativas a ningún tiempo (ANOVA de dos factores). Todos los registros de este capítulo fueron obtenidos en céluas piramidales de la región CA1 de hipocampo de ratones P18-20.

El análisis del curso temporal, muestra que las corrientes se mantuvieron estables durante los 15 min de registro. Las amplitudes de las corrientes evocadas fueron relativizadas al primer puff. En las células tratadas con DEA, el donante se aplicó durante 5 min tras 5 min de

perfusión con ACSF y otros 5 min posteriores con ACSF. No se observaron cambios en la amplitud relativa de las corrientes (ANOVA de 2 factores) (**Figura 3. 1**.**C.**).

ii) Efecto del bloqueo de la síntesis de NO endógeno.

Como detallamos en la introducción, se ha demostrado la existencia de un nivel basal de NO que desempeña funciones clave en la fisiología celular del hipocampo (Hopper & Garthwaite, 2006). Por lo tanto, a continuación decidimos explorar si el tono basal de NO presente en las rebanadas de hipocampo es capaz de modular la actividad de los $GABA_A$Rs fásicos. Para ello, se inhibió la función de la NOS, lo que impactará solo en las proteínas que están moduladas por NO en condiciones fisiológicas. Para el bloqueo de la NOS utilizamos el N_ω-nitro-L-arginina-metil-éster clorhidrato (L-NAME), un análogo del sustrato L-arginina que bloquea de forma inespecífica y reversible la NOS, impidiendo la producción endógena de NO (Rees et al., 1990).

El bloqueo de la síntesis de NO endógeno produjo un aumento en la amplitud de las corrientes evocadas por puffs de GABA (**Figura 3. 2**.**A.**). La potenciación de la amplitud de las corrientes tras 5 min de aplicación de L-NAME (100 µM) fue del 122% (I_{ctrl} = 494,1 ± 123,5 pA; $I_{L\text{-}NAME}$ = 1157,0 ± 341,4 pA; $p < 0,03$; n = 9; test t pareado) (**Figura 3. 2**.**B.**). El curso temporal de la modulación por L- NAME se observa en la **Figura 3. 2.C.**, las amplitudes de corriente evocadas por cada puff fueron relativizadas al primer puff para permitir la comparación entre células. Luego del lavado del L-NAME las amplitudes relativas de los puffs se redujeron hasta alcanzar valores no diferenciables estadísticamente de los controles a ese tiempo, aunque debemos aclarar que los últimos 3 puntos mostrados fueron logrados en solo 5 células. El análisis estadístico de los puntos de este gráfico (ANOVA de dos factores) mostró que el aumento de la corriente fue significativo a partir de los 8 min y hasta 30 segundo posteriores al comienzo del lavado ($p < 0,05$).

Estos resultados demuestran que en las rebanadas agudas de hipocampo existe un tono basal de producción de NO capaz de modular los $GABA_A$Rs. El uso de un bloqueante inespecífico no permite distinguir el subtipo de NOS responsable de originar este tono basal. Tampoco podemos conocer la localización relativa de la NOS con respecto a la población de receptores modulados.

El NO basal podría ser producido como consecuencia de la activación de la nNOS dependiente de la actividad en las neuritas (donde el voltaje no puede ser fijado) o el soma de células vecinas. También podría ser liberado por la eNOS presente en el tejido vascular o ser la suma de ambas fuentes. Experimentos futuros utilizando bloqueantes selectivos para la nNOS permitiría determinar la fuente.

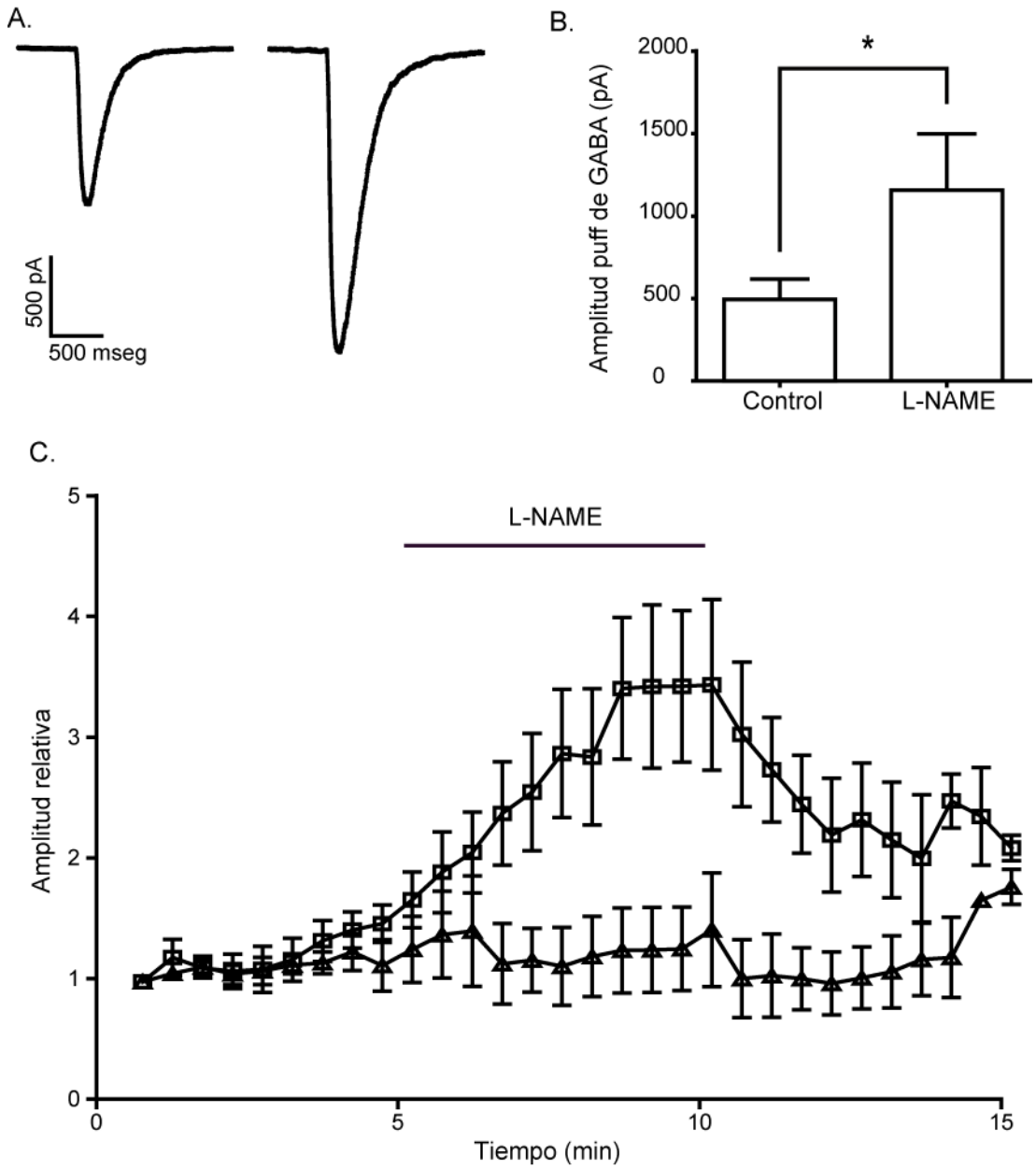

Figura 3. 2. La inhibición de la NOS produce un aumento en las corrientes evocadas por puffs de GABA registrados en células piramidales de hipocampo.
A. Trazo representativo de un puff de GABA (30 µM, 10 mseg) control (izq) y luego de aplicar L-NAME (100 µM) durante 5 min (der). **B**. Amplitud promedio de los puffs de GABA a los 5 min de registro en condición control y luego de 5 min de aplicación de L-NAME (I_{ctrl} = 494,1 ± 123,5 pA; $I_{L\text{-}NAME}$ = 1157,0 ± 341,4 pA; $p < 0,03$; n = 9; test t pareado). **C**. Curso temporal de la amplitud de corrientes evocada por puffs de GABA cada 30 segundos relativizados a la amplitud de la primera aplicación. En la condición (□) se aplicó L-NAME durante 5 min a los 5 min de comenzado el registro, mientras que la condición control (Δ) se continuó la perfusión con ACSF. La diferencia encontrada fue significativa a partir del minuto 8 de registro y hasta el 10 ($p < 0,05$; ANOVA de dos factores).

El mecanismo de acción del NO tampoco es determinable con los experimentos realizados. Para discernir entre un mecanismo dependiente de la vía de GC-GMP_C-PKG deberían repetirse en presencia de un bloqueante de esta vía o estudiar si son reproducibles

aplicando un análogo del GMP_C. Cabe destacar que cualquiera sea el mecanismo por el cual el NO está actuando sobre los $GABA_ARs$, su efecto es rápidamente reversible. La velocidad del aumento en la corriente observada al bloquear la NOS (menor a los 4 min) indica que en cuanto cesa la producción de NO la modulación de los receptores es removida de forma inmediata. En igual sentido, el usar un bloqueante competitivo fácilmente lavable nos permitió ver la reversión de la modulación por el NO endógeno.

Otra forma habitual de estudiar la modulación por NO producido de forma endógena consiste en aplicar L-arginina, el sustrato de la NOS. Sin embargo, el aumento en el nivel de NO es difícil de conocer y de estandarizar. Es posible que este incremento de la activación de la NOS lleve el nivel de NO a valores propios de una situación poco fisiológica o de estrés oxidativo. Con lo cual, los resultados no arrojarían luz sobre la pregunta principal de este experimento, conocer si la modulación se produce en condiciones fisiológicas.

B) Modulación de la corriente inhibitoria tónica por NO.

En segundo lugar, abordamos el estudio de los efectos del NO sobre la corriente GABAérgica tónica ($I_{tónica}$). En células piramidales de CA1 se ha reportado la existencia de una $I_{tónica}$ mediada por $GABA_ARs$ de tipo $\alpha5\beta\gamma2$. Esta corriente es dependiente de la actividad y su amplitud normalmente no supera los 40 pA. Para estudiar con un nivel de confianza mayor la modulación de la $I_{tónica}$ se utilizan frecuentemente alternativas farmacológicas para incrementar su amplitud de forma reproducible. Por ejemplo, se incuban las rebanadas con inhibidores de la recaptación de GABA, con inhibidores de la degradación de GABA, o directamente se agrega una baja concentración de GABA en la solución extracelular (Glykys & Mody, 2007b). La concentración de GABA presente en la rebanada depende principalmente de la velocidad de perfusión, que debe ser lo suficientemente alta para permitir la oxigenación del tejido, pero que si es muy alta, “lava” el GABA presente fisiológicamente, al igual que iones que deben ser agregados al ACSF como el calcio. Por lo tanto, adicionar GABA al ACSF es considerada la metodología que mejor reproduce las condiciones fisiológicas sin alterar la actividad de las enzimas o transportadores presentes (Glykys & Mody, 2007b). Nuestros experimentos se realizaron en presencia de GABA 5 μM.

El análisis de los registros realizado para obtener la $I_{tónica}$ consistió en ajustar una función gaussiana al histograma de todos los puntos del registro de la I_H antes y después de la aplicación de BIM 100μM (**Figura 3. 3**).

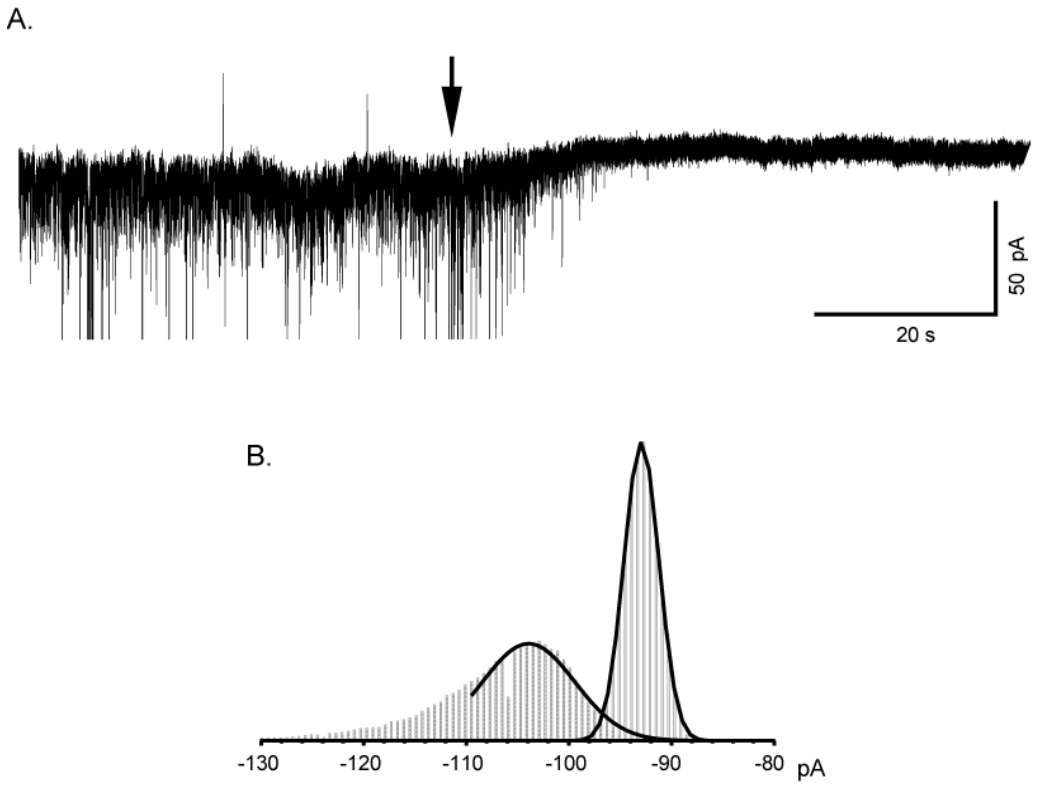

Figura 3. 3. La $I_{tónica}$ GABAérgica puede calcularse a partir de la disminución de la I_H luego de aplicar bicuculina.
A. Registro representativo de la I_H de una célula piramidal perfundida con ACSF + CNQX (20 µM). El voltaje fue fijado en -70 mV. La flecha indica el momento en que se agregó la bicuculina (BIM 100 µM). Puede observarse la caída en la corriente y la desaparición de los sIPSCs. **B**. Histrogramas construidos con todos los puntos de 30 seg del registro mostrado en A. en las condiciones control (izq) y luego de la aplicación de bicuculina (der). Se ajustó una función gaussiana donde el máximo corresponde a la I_H promedio ($I_{H\ control}$ = 154,7 ± 24,1 pA; $I_{H\ BIM}$ = 127,3 ± 24,3 pA). El rango usado para ajustar la gaussiana control fue recortado para obviar los puntos que incluyen los sIPSCs, de esta forma se evita un sesgo hacia la izquierda en la medición de la I_H debido a la actividad espontánea. En los histogramas también se visualiza la disminución en la varianza de la I_H tras la aplicación de BIM.

i) Efecto del NO exógeno.

Una vez conseguidos registros estables durante 5 min de la I_H perfundiendo con ACSF, se aplicó DEA 10 µM para aumentar el nivel de NO. El análisis de la I_H no arrojó una modificación significativa en la $I_{tónica}$ (I_{ctrl} =51,2 ± 10,1 pA; I_{DEA} = 50,7 ± 11,5 pA; n.s.; n = 6; test t pareado) (**Figura 3. 4**). El DEA produjo una disminución de la $I_{tónica}$ en 4 células, pero un aumento en 2 de las 6 células ensayadas (**Figura 3. 4**.**B**).

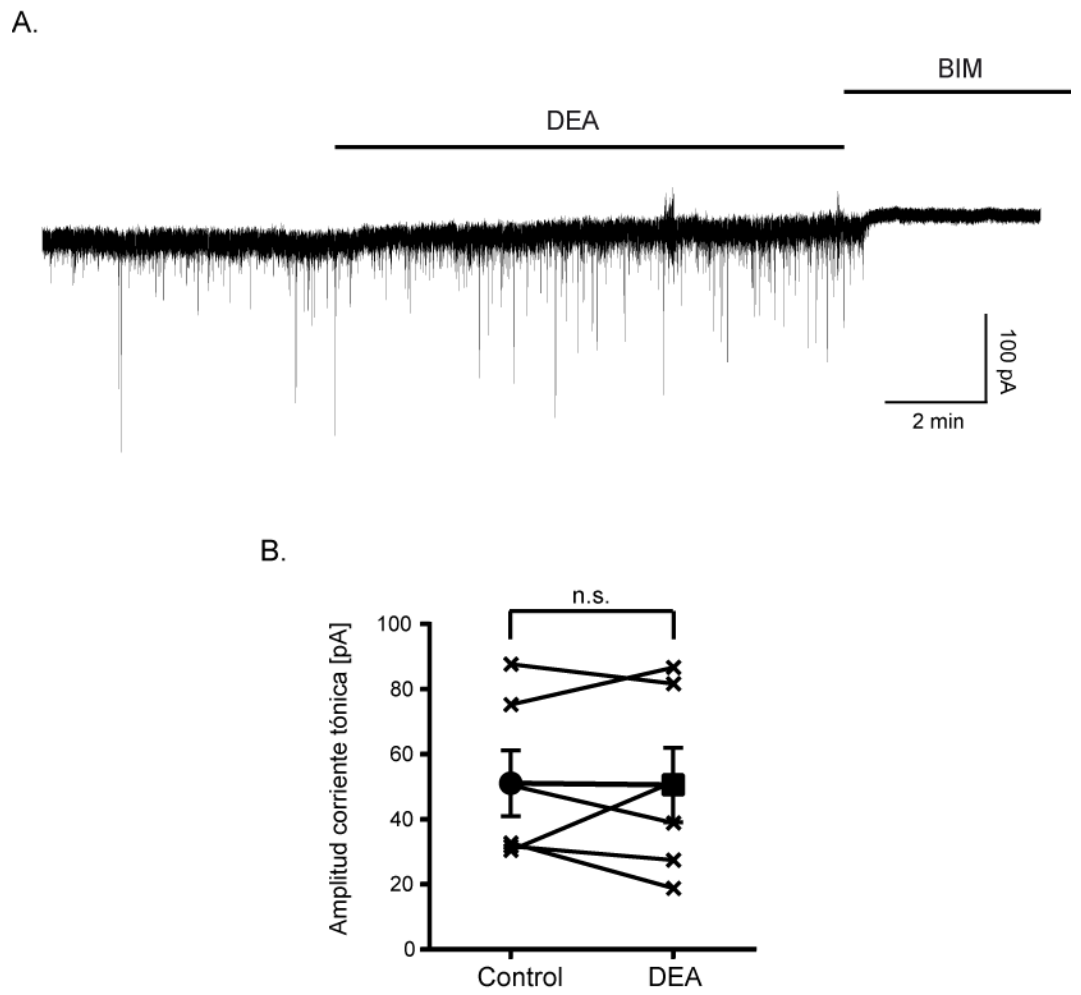

Figura 3. 4. El donante de NO DEA no produce un cambio significativo de la $I_{tónica}$.
A. Trazo representativo del registro de la I_H de una célula piramidal de CA1. El DEA fue aplicado durante 5 min. **B.** Resumen del análisis de la $I_{tónica}$ antes y después de la aplicación del DEA. La línea indica la variación de la amplitud en cada célula. El círculo (control) y cuadrado (DEA) negros indican los promedio de la amplitud de corriente ± SEM. (I_{ctrl} =51,2 ± 10,1 pA; I_{DEA} = 50,7 ± 11,5 pA; n.s.; n = 6; test t pareado).

ii) Efecto del bloqueo de la síntesis de NO endógeno.

Finalmente, analizamos el efecto del bloqueo de la producción endógena de NO sobre la $I_{tónica}$. El protocolo fue similar al detallado previamente para evaluar la modulación por NO exógeno. En lugar de aplicar el donante de NO se aplicó L-NAME 100 μM durante 5 min y luego bicuculina para tener el cero de la $I_{tónica}$. El L-NAME produjo un incremento significativo de la $I_{tónica}$ del 47,8 ± 18,0 % ($p < 0,05$; n = 6; test t pareado). El valor absoluto de la $I_{tónica}$ basal fue de 28, 2 ± 6,9 pA vs 40,5 ± 8,8 pA tras 5 min de aplicación de L-NAME ($p < 0,05$; n = 6; test t pareado) (**Figura 3. 5**). En 5 de las 6 células obtenidas el bloqueo de la NOS potenció la $I_{tónica.}$ (**Figura 3. 5.B.**).

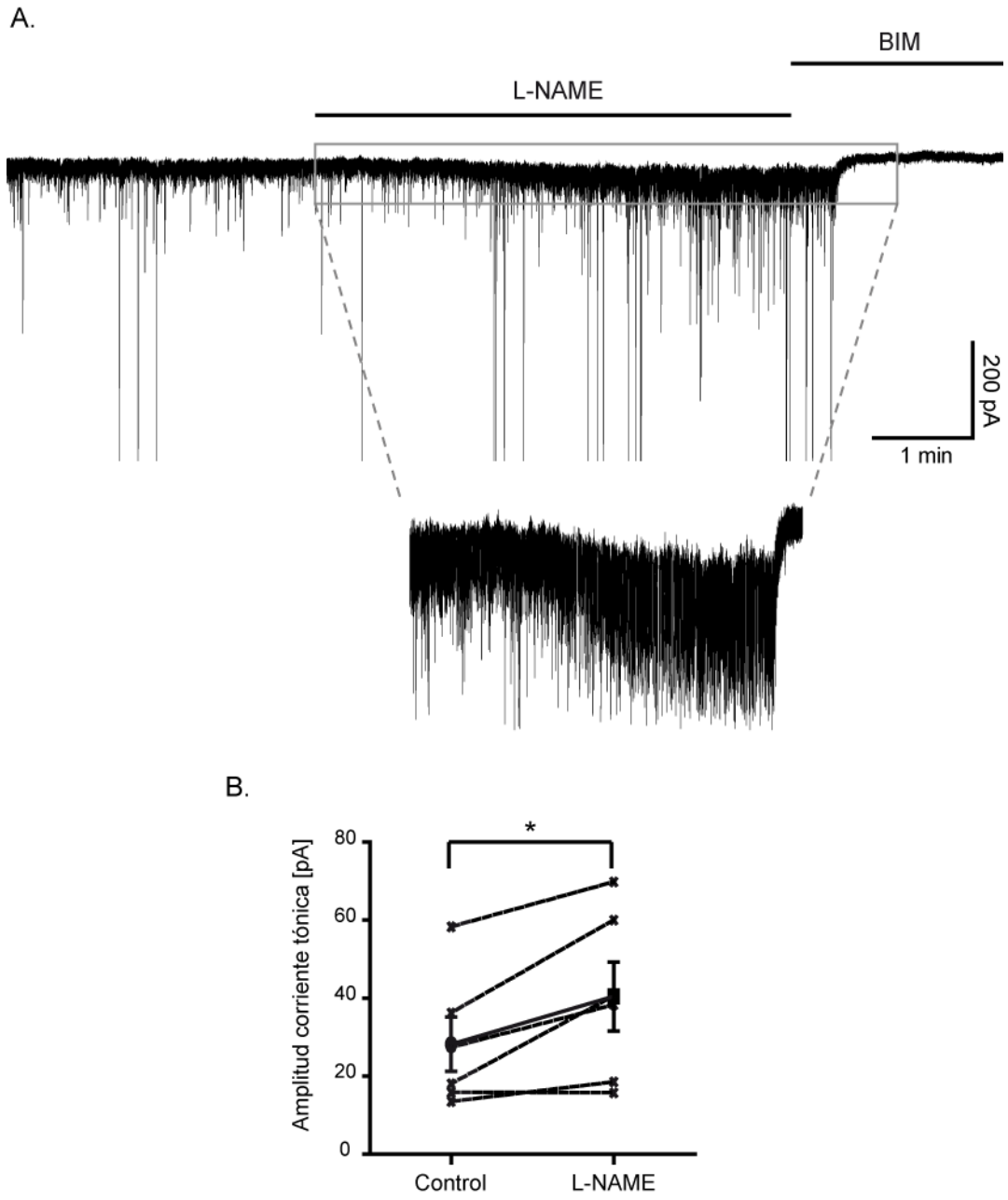

Figura 3. 5. Efecto de la inhibición de la NOS sobre la corriente $I_{tónica}$.
A. Registro representativo de la I_H de una célula piramidal de CA1. La aplicación de L-NAME (100 µM) durante 5 min produjo un aumento de la I_H debido la potenciación de la $I_{tónica}$ GABAérgica que se revela por el bloqueo total de esta corriente tras la aplicación del antagonista $GABA_A$ bicuculina (BIM 100 µM). El recuadro muestra en la parte inferior un recorte ampliado del aumento de la corriente tónica. **B.** Amplitud de la corriente tónica (medida como la diferencia de la I_H pre y post bicuculina) antes y después de la aplicación de L-NAME. El círculo y cuadrado negros representan la media y SEM en cada caso (I_{ctrl} =28,2 ± 6,9 pA; $I_{L\text{-}NAME}$ = 40,5 ± 8,8 pA; $p < 0,05$; n = 6; test t pareado).

Si bien el análisis de la amplitud de la $I_{tónica}$ a partir del cambio de la varianza de la I_H está desaconsejado (Glykys & Mody, 2007b), nuestros análisis de la I_H obtenida a partir de ajustar una campana de Gauss a los histogramas de todos los puntos del registro muestran una concordancia con el cambio en la desviación estándar (SD) obtenida del σ de la función

gaussiana ajustada. La SD de la I_H con L-NAME fue mayor que en la condición control, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Sí fue significativa la diferencia entre la SD de ambas condiciones con respecto a la SD de la I_H luego de la aplicación de BIM ($\alpha = 0,05$; ANOVA, post test de Tukey) (

Tabla 3. 1). Este resultado también sirve como control, indica que el cambio en la I_H se debe a una modificación en los receptores y no a la deriva de la corriente debido al cambio de solución u otra variable.

control	L-NAME	BIM
6,4 ± 1,0	8,1 ± 1,0	2,8 ± 0,3

Tabla 3. 1. Desvío estándar de la I_H calculada en ACSF normal o bajo el tratamiento indicado.

El mecanismo más probable para este efecto es la modulación de los $GABA_A$Rs tónicos expresados en las células piramidales de CA1. No podemos descartar una acción sobre la expresión o la localización de estos receptores.

En estos experimentos, tal como lo señalamos para los $GABA_A$Rs fásicos, no se evaluó la vía efectora por el cual el NO endógeno modula la $I_{tónica}$. Podría tratarse de una acción directa del NO sobre las cisteínas de los receptores, similar a la encontrada en GABAρ1R (otro receptor tónico) o que los efectos sean dependiente de la vía del GMP_C-PKG, o incluso una mezcla de ambas vías.

C) Discusión general del Capítulo 3.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que la señalización nitrérgica, es capaz de modificar la actividad de los $GABA_A$Rs de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratones. Los reportes publicados hasta el momento dieron cuenta de la modulación de la neurotransmisión GABAérgica por NO durante el desarrollo (Cserép et al., 2011) o con concentraciones neurotóxicas de NO (Zanelli et al., 2009). También son conocidos los efectos retrógrados sobre la maquinaria de liberación de GABA en la presinapsis (Getting et al., 1996; Makara et al., 2007; Xue et al., 2011). La relevancia de nuestro estudio radica en que demuestra la modulación del NO endógeno, sobre los $GABA_A$Rs expresados en las neuronas piramidales de animales adultos.

Por su parte, la modulación de $GABA_A$Rs tónicos por el tono endógeno de NO se reportó únicamente en células granulares del cerebelo, con resultados en el mismo sentido que los aquí presentados (Wall, 2003). Este es el primer reporte de la modulación de los receptores de GABA tónicos en el hipocampo por NO.

El hecho de que el bloqueo de la NOS produzca la potenciación de los $GABA_A$Rs, pero que no se observen efectos al aplicar NO exógeno, puede ser explicado de varias maneras. Es

posible que el tono basal de NO varíe de célula a célula, lo que produce la saturación de uno o más de los mecanismos efectores en algunas de las células. Otra posibilidad es que existan dos poblaciones con distinta sensibilidad por el NO, debido a distintas maquinarias de procesamiento o expresión diferencial de los sitios blanco de la modulación. Por ejemplo, distintos subtipos de receptores podrían estar expresados en distinta proporción.

Como se mencionó en la introducción, los $GABA_A$Rs fásicos son sensibles a la modulación por NO, aunque los efectos difieren en función de las subunidades que los componen y el entorno celular en que se estudien. Se han reportado efectos de potenciación (Castel & Vaudry, 2001; Fukami et al., 1998; Leidenheimer, 1996) e inhibición (Fukami et al., 1998; Robello et al., 1996; Wexler et al., 1998). A su vez, los efectos del NO sobre los $GABA_A$Rs fásicos pueden estudiarse a través de los cambios en la amplitud de los mIPSCs. Con este abordaje se realizaron experimentos que mostraron que el NO disminuye la amplitud de los mIPSCs en células del hipocampo en cultivo (Zanelli et al., 2009), potencia en el núcleo supraóptico (Stern & Ludwig, 2001), o donde no modifica la amplitud en el NPV (Li et al., 2002). Estas diferencias pueden deberse a múltiples motivos: a que distintas regiones expresan distintos subtipos de receptores, que éstos están asociados a diferentes proteínas, a diferencias en las condiciones de registro o niveles de NO utilizados, o incluso a diferencias en el entorno rédox celular.

En nuestro estudio, utilizamos puffs de GABA para evocar las respuestas fásicas. De esta manera evitamos ver los cambios en la maquinaria presináptica y nos concentramos en la postsinapsis. Los resultados indican de forma consistente que el bloqueo de la NOS potencia las respuestas, mientras que la aplicación de NO exógeno no las modifica. En este caso, la hipótesis más plausible es que el tono basal de NO satura el mecanismo de modulación, al menos con niveles de NO cercanos a los fisiológicos. Es posible que una mayor concentración de DEA permita obtener una disminución de las respuestas evocadas por puffs de GABA, sin embargo el objetivo de estos experimentos estuvo centrado en reproducir lo mejor posible las condiciones fisiológicas, por lo que no intentamos aumentar la concentración del donante.

Si bien no medimos cual es la concentración de NO basal que está presente en las células de CA1 y es capaz de modular los $GABA_A$Rs, como se dijo previamente, existe una profusa bibliografía sobre las dificultades técnicas de estas mediciones y los niveles fisiológicos de NO aún son materia de debate (Ledo et al., 2010; Wood et al., 2011). Lo concreto es que cualquiera sea este valor, la bibliografía indicaría que es menor o igual a 1 µM. Por lo tanto, tal como concluimos con los resultados en GABAρ1R, los receptores fásicos y tónicos de $GABA_A$ expresados en las células piramidales de hipocampo tienen la sensibilidad por el NO suficiente para ser fuertemente modulados por el tono basal presente, independientemente de que niveles mayores puedan desencadenar efectos adicionales a los observados.

En este sentido, el estudio de Zanelli y col. (2009) en células hipocampales en cultivo, abordó el efecto de concentraciones altas de NO aplicado a través del donante DETA-NONOato (250 µM por 10 min) que produce una concentración aproximada de 4,5 µM de NO. Este estudio mostró que en estas condiciones se produce solo una ligera disminución en la amplitud de los mIPSCs (~15%). Este resultado va en el mismo sentido que los nuestros y abona la hipótesis de un sistema saturado. Para poner a prueba esta hipótesis, el siguiente experimento a realizar en esta línea de trabajo consiste en verificar si la potenciación obtenida al bloquear la NOS es revertida por el DEA.

Es interesante señalar que durante el desarrollo (P5-P8) las corrientes GABAérgicas evocadas, fueron inhibidas por el donante de NO SNP solo en 12 de 19 células ensayadas, mientras que en las 7 restantes no se observaron efectos (Cserép et al., 2011). Es posible que la existencia de dos poblaciones neuronales, refleje una transición que se da durante el desarrollo en la expresión de los sitios blancos de la modulación por NO.

En cuanto a la modulación de la $I_{tónica}$, los resultados son similares en términos generales. La modulación por NO parece estar saturada con el nivel basal presente en nuestro sistema, aunque con el número de células analizadas no podemos descartar la existencia de dos poblaciones con sensibilidad diferencial por el NO.

En las células piramidales de CA1 el principal receptor responsable de la $I_{tónica}$ GABAérgica es el formado por las subunidades α5β2/3γ2 (Glykys et al., 2008). Su bloqueo disminuye la $I_{tónica}$ en un 73%. Por lo tanto, este receptor es el principal candidato a ser responsable de la modulación por NO, de forma directa o mediante la vía del GMP_C-PKG. Sin embargo, quedaron pendientes los estudios para poner a prueba esta afirmación. Un experimento farmacológico para evaluar la participación de este receptor, es el bloqueo selectivo de los GABAα5Rs con la benzodiazepina L-655,708 y la posterior evaluación del efecto de la perfusión con L-NAME. Incluso, sería posible evaluar los efectos del NO sobre ratones knock-out para la subunidad α5.

Tanto para las corrientes fásicas como para las tónicas, también quedó pendiente la realización de estudios para identificar las vías de acción del NO endógeno. Existen herramientas farmacológicas para bloquear la GC, o análogos del GMP_C que reproducen sus efectos. Podría evaluarse si los efectos del bloqueo de la NOS, son revertidos por la aplicación del análogo del GMP_C, 8-Br-cGMP.

En el estudio de las acciones del NO sobre los GABAρ1Rs (Capítulo 2), hicimos mucho énfasis en la importancia de la rápida reversión de la potenciación en relación al posible mecanismo de acción. En los experimentos en células del hipocampo los efectos observados también fueron reversibles espontáneamente (**Figura 3. 2. C.)**. En este caso, aunque un estudio detallado de los mecanismos de acción determinase que al menos parte del efecto es mediado por la vía directa, independiente del GMP_C, no se podría extrapolar la cinética de los efectos en

nuestro sistema in vitro a lo que pueda ocurrir in vivo. Los experimentos en rebanadas son realizados con una solución extracelular fuertemente reductora (véase la concentración de ascorbato presente), además del pool reductor propio del tejido (enzimático y no enzimático) que podrían estar afectados (saturados o exacerbados) en las condiciones de registro in vitro.

Efectos presinápticos del NO

Como se dijo previamente, los objetivos de este capítulo se centraron en los efectos postsinápticos del NO, sobre los $GABA_A$Rs. Sin embargo, en los trazos en presencia de DEA y L-NAME (**Figura 3. 4** y **Figura 3. 5**), se observa que ambas drogas producen un incremento en la frecuencia de sIPSCs. En células granulares del cerebelo, también se observó un incremento de la frecuencia de sIPSCs al bloquear la NOS (Wall, 2003). Sin embargo, como se detalló en la introducción, el NO aumenta la frecuencia de eventos espontáneos inhibitorios en diversas áreas del SNC, incluso en el hipocampo. No obstante, el reporte de Makara y col. (2007) va en sentido contrario, al igual que nuestra observación. Una explicación para esta contradicción aparente es que el NO tenga efectos bifásicos en sus efectos presinápticos como fue propuesto por Getting y col. (1996). También en retina, el NO mostró un efecto bifásico dependiendo de la concentración sobre la liberación de GABA desde las células ganglionares (Maggesissi et al., 2009).

Cabe recordar también, que los estudios en melanotrofos de rana de Castel y col (2000; 2001) mostraron una modulación bifásica de los $GABA_A$Rs: una inhibición rápida dependiente de GMP_C y una potenciación lenta por acción directa del NO sobre los receptores. Más aún, en neuronas en cultivo del caracol Helisoma trivolvis, Artinian y col (2010) estudiaron los efectos de la señalización nitrérgica sobre la tasa de disparo neuronal y encontraron que la activación persistente de la nNOS primero aumenta la tasa de disparo y luego silencia las neuronas (Artinian et al., 2010). Sería esperable, teniendo en cuenta la diversidad de blancos y vías efectoras del NO, que los efectos bi o multifásicos en el tiempo o el espacio, ocurran con frecuencia en la fisiología de la señalización nitrérgica.

Un aumento en la liberación de GABA desde la presinapsis podría aumentar la concentración de GABA local, potenciando la $I_{tónica}$. Este no parece ser el caso en nuestros experimentos. Si bien tanto el DEA como el L-NAME parecen incrementar la frecuencia de sIPSCs, la modulación de la $I_{tónica}$ solo se observó con L-NAME.

Origen del NO endógeno

La utilización de un bloqueante inespecífico de la NOS no permite determinar si el tono basal de NO proviene de la eNOS del endotelio vascular, o de la nNOS dependiente de la actividad de los NMDARs. Esta incógnita podría ser develada utilizando un bloqueante de alta afinidad para la nNOS como el 7-nitroindazol.

La nNOS se localiza en las postsinapsis tanto glutamatérgicas como GABAérgicas (Burette et al., 2002; Szabadits et al., 2007). Su activación posiblemente contribuya al tono local de NO, que por su proximidad resultaría fundamental para la modulación rápida de los receptores sinápticos. Por lo tanto, la nNOS es la principal candidata a mediar la modulación de los receptores fásicos.

Por otro lado, el estudio del LTP dependiente de NO mostró que para que el fenómeno se produzca, además de la activación sinapsis específica de la nNOS, es necesaria la presencia de un tono basal de NO producido por la eNOS (Hopper & Garthwaite, 2006). Esta isoforma también es dependiente de calcio/calmodulina para su activación, pero no se conocen que condiciones modulan su actividad en el cerebro. Se ha postulado que el NO producido de forma parácrina por la eNOS desde el endotelio vascular participaría en funciones del citoesqueleto, como en la estabilización de dendritas y axones (Hopper & Garthwaite, 2006). Sería esperable que este NO de origen endotelial medie efectos lentos y con menor especificidad espacial, por lo que no resultaría sorprendente su participación en la modulación de la actividad de los $GABA_A$Rs tónicos o de otras proteínas expresadas en sitios extrasinápticos.

Rol de la modulación de los $GABA_A$Rs por NO en la fisiología sináptica

Es posible especular que ante la estimulación intensa de un circuito del hipocampo la activación de NMDARs localizados en sinapsis glutamatérgicas o GABAérgicas (reclutadas por inhibición tipo feedback y feedfoward), aumente el tono local de NO. Este aumento, produciría la disminución de la resistencia de entrada (el shunt de GABA mediado por $GABA_A$Rs tónicos) y de la amplitud de la inhibición fásica, lo cual podría proveer un mecanismo de ajuste fino en el número de neuronas reclutadas por el estímulo y posiblemente la duración del efecto excitatorio. En este sentido, se postuló que la difusión volumétrica de NO participaría en el aumento de la sincronía de neuronas piramidales adyacentes (Kovács et al., 2009).

En esta dirección también pueden interpretarse otros estudios de los efectos del NO en el hipocampo, por ejemplo en presencia de activación colinérgica y un estímulo excitatorio prolongado el aumento de la excitabilidad postsináptica, podría coincidir temporalmente con la prolongación del DSI (Makara et al., 2007). Sin embargo, el escenario donde estas afirmaciones son válidas puede ser limitado a un pequeño rango de concentración de NO. Xue y col. (2011), contrariamente observaron que la estimulación intensa de los NMDARs produce un incremento de los sIPSCs mediado por NO, como consecuencia del aumento en la frecuencia de liberación de GABA, corroborado por otros estudios (Zanelli et al., 2009).

En resumen, la depresión de la actividad GABAérgica tendría profundos efectos sobre la excitabilidad de las células piramidales. De esta manera, la modulación GABAérgica descripta podría participar en la producción de LTP dependiente de NO en las células CA1 del

hipocampo (Hopper & Garthwaite, 2006) y en última instancia, jugar un rol en los efectos de la neurotransmisión nitrérgica en procesos como memoria y aprendizaje (Steinert et al., 2011a)

Sin embargo, los efectos globales del aumento del tono de NO en una sinapsis determinada son muy difíciles de predecir dada la gran cantidad de proteínas sensibles a esta modulación y la interrelación entre las distintas vías de señalización activadas y su duración temporal diferencial. Solo para recordar algunos efectos a nivel sináptico, el NO simultáneamente modificaría la actividad de los NMDARs (Choi et al., 2000), la activación de canales hiperpolarizantes activados por nucleótidos (Neitz et al., 2013), la actividad de canales de K^+ responsables de la repolarización (Steinert et al., 2011b) y la expresión en membrana de receptores de AMPA (Huang et al., 2005).

Conclusiones

1) Los GABAρ1Rs expresados en ovocitos de Xenopus laevis son potenciados por NO aplicado a través de donantes de las familias de los NONOatos y de los Nitrosotioles.
2) Esta potenciación es rápida, reversible, independiente del voltaje y dosis dependiente. El efecto del NO es mayor a bajas concentraciones de GABA.
3) El NO actúa de forma directa sobre las cisteínas extracelulares del cys-loop de los GABAρ1Rs. No se habían reportado previamente efectos por un mecanismo directo del NO directos sobre el cys-loop de los receptores de esta superfamilia.
4) El bloqueo del tono endógeno de NO presente en células piramidales de la región CA1 de hipocampo de ratones potencia las corrientes GABAérgicas fásicas evocadas por puffs de GABA.
5) El bloqueo del tono endógeno de NO también potencia la corriente tónica GABAérgica presente en las células piramidales de CA1. Este es el primer reporte de la modulación de una corriente tónica en el hipocampo por NO.
6) La modulación de los receptores GABAérgicos por NO impactaría fuertemente en la excitabilidad de las neuronas piramidales de la región CA1 y la actividad de los circuitos del hipocampo.

Referencias

Adragna, N.C., Di Fulvio, M., & Lauf, P.K. (2004). Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. J. Membr. Biol. 201, 109–137.

Aga, R.G., & Hughes, M.N. (2008). The preparation and purification of NO gas and the use of NO releasers: the application of NO donors and other agents of nitrosative stress in biological systems. Methods Enzym. 436, 35–48.

Ahern, G.P., Hsu, S.F., & Jackson, M.B. (1999). Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial K+ channels. J. Physiol. 520 Pt 1, 165–176.

Aizenman, E., & Potthoff, W.K. (1999). Lack of interaction between nitric oxide and the redox modulatory site of the NMDA receptor. Br J Pharmacol 126, 296–300.

Aizenman, E., Lipton, S.A., & Loring, R.H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. Neuron 2, 1257–1263.

Alakuijala, A., Palgi, M., Wegelius, K., Schmidt, M., Enz, R., Paulin, L., Saarma, M., & Pasternack, M. (2005). GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. Brain Res Dev Brain Res 154, 15–23.

Alakuijala, A., Alakuijala, J., & Pasternack, M. (2006). Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. Eur. J. Neurosci. 23, 514–520.

Amato, A., Connolly, C.N., Moss, S.J., & Smart, T.G. (1999). Modulation of neuronal and recombinant GABAA receptors by redox reagents. J. Physiol. 517 (Pt 1, 35–50.

Amin, J., Dickerson, I.M., & Weiss, D.S. (1994). The agonist binding site of the gamma-aminobutyric acid type A channel is not formed by the extracellular cysteine loop. Mol Pharmacol 45, 317–323.

Annunziato, L., Pannaccione, A., Cataldi, M., Secondo, A., Castaldo, P., Di Renzo, G., & Taglialatela, M. (2002). Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? Neurobiol Aging 23, 819–834.

Artinian, L., Tornieri, K., Zhong, L., Baro, D., & Rehder, V. (2010). Nitric oxide acts as a volume transmitter to modulate electrical properties of spontaneously firing neurons via apamin-sensitive potassium channels. J. Neurosci. 30, 1699–1711.

Baenziger, J.E., & Corringer, P.-J. (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. Neuropharmacology 60, 116–125.

Bartus, K., Pigott, B., & Garthwaite, J. (2013). Cellular targets of nitric oxide in the hippocampus. PLoS One 8, e57292.

Beigi, F., Gonzalez, D.R., Minhas, K.M., Sun, Q.A., Foster, M.W., Khan, S.A., Treuer, A. V, Dulce, R.A., Harrison, R.W., Saraiva, R.M., et al. (2012). Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 4314–4319.

Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., & Cope, D.W. (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. J. Neurosci. 29, 12757–12763.

Belevych, A.E., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., Wilson, L.D., Cardounel, A.J., Laurita, K.R., Carnes, C. a, et al. (2009). Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death. Cardiovasc. Res. 84, 387–395.

Beltrán González, A.N., Gasulla, J., & Calvo, D.J. An intracellular redox sensor for reactive oxygen species at the M3-M4 linker of GABAAρ1 receptors. Br. J. Pharmacol.

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., & Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. Neuroscientist 18, 467–486.

Benhar, M., Forrester, M.T., Hess, D.T., & Stamler, J.S. (2008). Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. Science (80-.). 320, 1050–1054.

Bie, B.H., & Zhao, Z.Q. (2001). Nitric oxide inhibits GABA-evoked current in dorsal root ganglion neuron via PKG-dependent pathway. Brain Res. Bull. 55, 335–339.

Biswas, S., Chida, A.S., & Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. Biochem Pharmacol 71, 551–564.

Blackshaw, S., Eliasson, M.J.., Sawa, a, Watkins, C.., Krug, D., Gupta, a, Arai, T., Ferrante, R.., & Snyder, S.. (2003). Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. Neuroscience 119, 979–990.

Blom, J., Giove, T., Deshpande, M., & Eldred, W.D. (2012). Characterization of nitric oxide signaling pathways in the mouse retina. J. Comp. Neurol. 520, 4204–4217.

Boehning, D., & Snyder, S.H. (2003). Novel neural modulators. Annu Rev Neurosci 26, 105–131.

Boileau, A.J., Evers, A.R., Davis, A.F., & Czajkowski, C. (1999). Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. J Neurosci 19, 4847–4854.

Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., & Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. Nature 368, 850–853.

Bon, C.L.M., & Garthwaite, J. (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. J. Neurosci. 23, 1941–1948.

Boue-Grabot, E., Roudbaraki, M., Bascles, L., Tramu, G., Bloch, B., & Garret, M. (1998). Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. J. Neurochem. 70, 899–907.

Bouzat, C., Barrantes, F.J., & Sigworth, F.J. (1991). Changes in channel properties of acetylcholine receptors during the time course of thiol chemical modifications. Pflugers Arch. 418, 51–61.

Brickley, S.G., & Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. Neuron 73, 23–34.

Bright, D.P., & Brickley, S.G. (2008). Acting locally but sensing globally: impact of GABAergic synaptic plasticity on phasic and tonic inhibition in the thalamus. J. Physiol. 586, 5091–5099.

Broillet, M.C. (2000). A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO. J. Biol. Chem. 275, 15135–15141.

Brown, T.H., & Zador, A.M. (1990). Hippocampus. In The Synaptic Organization of the Brain., (Oxford University Press),.

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R.J., Schmidt, H.H.H.W., & Valtschanoff, J.G. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. J. Neurosci. 22, 8961–8970.

Burgoyne, J.R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R.L., Brennan, J.P., Schröder, E., Browning, D.D., & Eaton, P. (2007). Cysteine redox sensor in PKGIa enables oxidant-induced activation. Science 317, 1393–1397.

Burkat, P.M., Yang, J., & Gingrich, K.J. (2001). Dominant gating governing transient GABA(A) receptor activity: a first latency and Po/o analysis. J. Neurosci. 21, 7026–7036.

Calero, C.I., & Calvo, D.J. (2008). Redox modulation of homomeric rho1 GABA receptors. J. Neurochem. 105, 2367–2374.

Calero, C.I.C., Vickers, E., Cid, G.M., Aguayo, L.G., von Gersdorff, H., Calvo, D.J., & Moraga Cid, G. (2011). Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid. J Neurosci 31, 9672–9682.

Calvo, D.J., Vazquez, A.E., & Miledi, R. (1994). Cationic modulation of rho 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in Xenopus oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 12725–12729.

Campanucci, V. a, Krishnaswamy, A., & Cooper, E. (2008). Mitochondrial reactive oxygen species inactivate neuronal nicotinic acetylcholine receptors and induce long-term depression of fast nicotinic synaptic transmission. J. Neurosci. 28, 1733–1744.

Caraiscos, V.B., Elliott, E.M., You-Ten, K.E., Cheng, V.Y., Belelli, D., Newell, J.G., Jackson, M.F., Lambert, J.J., Rosahl, T.W., Wafford, K.A., et al. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3662–3667.

Carletti, F., Ferraro, G., Rizzo, V., Friscia, S., & Sardo, P. (2012). Modulation of in vivo GABA-evoked responses by nitric oxide-active compounds in the globus pallidus of rat. J. Neural Transm. 119, 911–921.

Castel, H., & Vaudry, H. (2001). Nitric oxide directly activates GABA(A) receptor function through a cGMP/protein kinase-independent pathway in frog pituitary melanotrophs. J. Neuroendocrinol. 13, 695–705.

Castel, H., Jégou, S., Tonon, M.C., & Vaudry, H. (2000). Regulation of the GABA(A) receptor by nitric oxide in frog pituitary melanotrophs. Endocrinology 141, 3451–3460.

Chang, Y., & Weiss, D.S. (2002). Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes with GABA receptor activation and antagonism. Nat Neurosci 5, 1163–1168.

Chávez, A.E., Grimes, W.N., & Diamond, J.S. (2010). Mechanisms underlying lateral GABAergic feedback onto rod bipolar cells in rat retina. J. Neurosci. 30, 2330–2339.

Chebib, M. (2004). GABAC receptor ion channels. Clin. Exp. Pharmacol. … 31, 800–804.

Chebib, M., & Johnston, G. (2000). GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. J. Med. Chem. 43.

Cho, J.-H.H., & Askwith, C.C. (2007). Potentiation of acid-sensing ion channels by sulfhydryl compounds. Am J Physiol Cell Physiol 292, C2161–74.

Choi, Y., Chen, H. V, & Lipton, S.A. (2001). Three pairs of cysteine residues mediate both redox and zn2+ modulation of the nmda receptor. J Neurosci 21, 392–400.

Choi, Y.B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.S., & Lipton, S.A. (2000). Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. Nat Neurosci 3, 15–21.

Chu, X.-P.P., Close, N., Saugstad, J.A., & Xiong, Z.-G.G. (2006). ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. J. Neurosci. 26, 5329–5339.

Coddou, C., Codocedo, J.F., Li, S., Lillo, J.G., Acuña-Castillo, C., Bull, P., Stojilkovic, S.S., & Huidobro-Toro, J.P. (2009). Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. J. Neurosci. 29, 12284–12291.

Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. Neuropharmacology 56, 2–5.

Cserép, C., Szonyi, A., Veres, J.M., Németh, B., Szabadits, E., de Vente, J., Hájos, N., Freund, T.F., Nyiri, G., Cserep, C., et al. (2011). Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. Cereb. Cortex 21, 2065–2074.

Cserép, C., Szabadits, E., Szőnyi, A., Watanabe, M., Freund, T.F., & Nyiri, G. (2012). NMDA receptors in GABAergic synapses during postnatal development. PLoS One 7, e37753.

Daniels, B.A., & Baldridge, W.H. (2011). The light-induced reduction of horizontal cell receptive field size in the goldfish retina involves nitric oxide. Vis. Neurosci. 28, 137–144.

Davisson, R.L., Travis, M.D., Bates, J.N., & Lewis, S.J. (1996). Hemodynamic effects of L- and D-S-nitrosocysteine in the rat. Stereoselective S-nitrosothiol recognition sites. Circ Res 79, 256–262.

Denter, D.G., Heck, N., Riedemann, T., White, R., Kilb, W., & Luhmann, H.J. (2010). GABAC receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. Neuroscience 167, 124–134.

Derbyshire, E.R., & Marletta, M.A. (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. Annu. Rev. Biochem. 81, 533–559.

Didelon, F., Sciancalepore, M., Savic, N., Mladinic, M., Bradbury, A., & Cherubini, E. (2002). gamma-Aminobutyric acidA rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. J Neurosci Res 67, 739–744.

Dong, C.J., & Werblin, F.S. (1998). Temporal contrast enhancement via GABAC feedback at bipolar terminals in the tiger salamander retina. J. Neurophysiol. 79, 2171–2180.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47–95.

Eldred, W.D., & Blute, T. a (2005). Imaging of nitric oxide in the retina. Vision Res. 45, 3469–3486.

Erecinska, M., & Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. Respir Physiol 128, 263–276.

Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., & Meissner, G. (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O2 sensor and NO signaling functions. Cell 102, 499–509.

Fagni, L., Olivier, M., Lafon-Cazal, M., & Bockaert, J. (1995). Involvement of divalent ions in the nitric oxide-induced blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. Mol Pharmacol 47, 1239–1247.

Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat. Rev. Neurosci. 6, 215–229.

Feelisch, M. (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 358, 113–122.

Fernhoff, N.B., Derbyshire, E.R., & Marletta, M.A. (2009). A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 21602–21607.

Forrester, M.T., Foster, M.W., & Stamler, J.S. (2007). Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein S-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress. J Biol Chem 282, 13977–13983.

Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M., & Stamler, J.S. (2009). Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. Free Radic. Biol. Med. 46, 119–126.

Fragata, I.R., Ribeiro, J.A., & Sebastião, A.M. (2006). Nitric oxide mediates interactions between GABAA receptors and adenosine A1 receptors in the rat hippocampus. Eur. J. Pharmacol. 543, 32–39.

Fukami, S., Uchida, I., Mashimo, T., Takenoshita, M., & Yoshiya, I. (1998). Gamma subunit dependent modulation by nitric oxide (NO) in recombinant GABAA receptor. Neuroreport 9, 1089–1092.

Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. Eur. J. Neurosci. 27, 2783–2802.

Gaston, B.M., Carver, J., Doctor, A., & Palmer, L.A. (2003). S-nitrosylation signaling in cell biology. Mol Interv 3, 253–263.

Gasulla, J., Beltrán González, A.N., & Calvo, D.J. (2012). Nitric oxide potentiation of the homomeric ρ1 GABA(C) receptor function. Br. J. Pharmacol. 167, 1369–1377.

Getting, S.J., Segieth, J., Ahmad, S., Biggs, C.S., & Whitton, P.S. (1996). Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. Brain Res. 717, 196–199.

Glykys, J., & Mody, I. (2007a). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. J. Physiol. 582, 1163–1178.

Glykys, J., & Mody, I. (2007b). Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. Neuron 56, 763–770.

Glykys, J., Mann, E.O., & Mody, I. (2008). Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? J. Neurosci. 28, 1421–1426.

Goldstein, I.M., Ostwald, P., & Roth, S. (1996). Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. Vis. Res 36, 2979–2994.

Goutman, J.D., Waxemberg, M.D., Donate-Oliver, F., Pomata, P.E., & Calvo, D.J. (2003). Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. Eur J Pharmacol 461, 79–87.

Goutman, J.D., Escobar, A.L., & Calvo, D.J. (2005). Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABArho1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating. Br. J. Pharmacol. 146, 1000–1009.

Groppe, M., Thanos, S., Schuhmann, W., & Heiduschka, P. (2003). Measurement of nitric oxide production by the lesioned rat retina with a sensitive nitric oxide electrode. Anal Bioanal Chem 376, 797–807.

Guthrie, M., & Kang-Mieler, J. (2013). Dual electroretinogram/nitric oxide carbon fiber microelectrode for direct measurement of nitric oxide in the in vivo retina. IEEE Trans. Biomed. Eng.

Hanrahan, J.R., Chebib, M., & Johnston, G. a R. (2011). Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. Br. J. Pharmacol. 163, 234–245.

Hanson, S.M., & Czajkowski, C. (2008). Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. J Neurosci 28, 3490–3499.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Nudelman, R., & Stamler, J.S. (2001). S-nitrosylation: spectrum and specificity. Nat Cell Biol 3, E46–9.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., & Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 150–166.

Hoffpauir, B., McMains, E., & Gleason, E. (2006). Nitric oxide transiently converts synaptic inhibition to excitation in retinal amacrine cells. J Neurophysiol 95, 2866–2877.

Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y., & Yellen, G. (1996). On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. Neuropharmacology 35, 797–804.

Hopper, R. a, & Garthwaite, J. (2006). Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. J. Neurosci. 26, 11513–11521.

Hosie, A.M., Dunne, E.L., Harvey, R.J., & Smart, T.G. (2003). Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. Nat Neurosci 6, 362–369.

Houston, C.M., McGee, T.P., Mackenzie, G., Troyano-Cuturi, K., Rodriguez, P.M., Kutsarova, E., Diamanti, E., Hosie, A.M., Franks, N.P., & Brickley, S.G. (2012). Are extrasynaptic GABAA receptors important targets for sedative/hypnotic drugs? J. Neurosci. 32, 3887–3897.

Hoyt, K.R., Tang, L.H., Aizenman, E., & Reynolds, I.J. (1992). Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca2+ in cultured rat forebrain neurons. Brain Res 592, 310–316.

Hu, Y., Wu, D., Luo, C., & Zhu, L. (2012). Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 14224–14229.

Huang, Y., Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., Han, Y., Juluri, K., Luo, H., Cheah, J., Lowenstein, C., Huganir, R.L., & Snyder, S.H. (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. Neuron 46, 533–540.

Hugel, S., Kadiri, N., Rodeau, J.L., Gaillard, S., & Schlichter, R. (2012). pH-dependent inhibition of native GABA(A) receptors by HEPES. Br. J. Pharmacol. 166, 2402–2416.

Hughes, M.N. (2008). Chemistry of nitric oxide and related species. Methods Enzym. 436, 3–19.

Hull, C., Li, G.L., & von Gersdorff, H. (2006). GABA transporters regulate a standing GABAC receptor-mediated current at a retinal presynaptic terminal. J Neurosci 26, 6979–6984.

Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., & Snyder, S.H. (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat Cell Biol 3, 193–197.

Jinno, S., & Kosaka, T. (2002). Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. J Comp Neurol 449, 1–25.

Johnston, G.A.R. (2005). GABA(A) receptor channel pharmacology. Curr. Pharm. Des. 11, 1867–1885.

Johnston, G.A.R. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. Br. J. Pharmacol. 169, 328–336.

Jones, S.M., & Palmer, M.J. (2009). Activation of the tonic GABAC receptor current in retinal bipolar cell terminals by nonvesicular GABA release. J Neurophysiol 102, 691–699.

Kaneda, M., Farrant, M., & Cull-Candy, S.G. (1995). Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. J. Physiol. 485 (Pt 2, 419–435.

Karlin, A., & Akabas, M. (1998). Substituted-cysteine accessibility method. Methods Enzymol. 293.

Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M.-Y., Wu, H.-E., Gemes, G., McCallum, J.B., Kwok, W.-M., Hogan, Q.H., & Sarantopoulos, C.D. (2009). Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. Mol. Pain 5, 12.

Keros, S., & Hablitz, J.J. (2005). Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABAA conductances in rat neocortex. J. Neurophysiol. 94, 2073–2085.

Keszler, A., Zhang, Y., & Hogg, N. (2010). Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? Free Radic. Biol. Med. 48, 55–64.

Kilb, W., Kirischuk, S., & Luhmann, H.J. (2013). Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. Front. Neural Circuits 7, 139.

Kim, W.K., Choi, Y.B., Rayudu, P. V, Das, P., Asaad, W., Arnelle, D.R., Stamler, J.S., & Lipton, S.A. (1999). Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO. Neuron 24, 461–469.

Klausberger, T. (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. Eur J Neurosci 30, 947–957.

Klyachko, V.A., Jackson, M.B., & Ahern, G.P. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. Trends Neurosci 25, 510–517.

Knapp, L.T., & Klann, E. (2002). Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? J. Neurosci. Res. 70, 1–7.

Kojima, H., Hirata, M., Kudo, Y., Kikuchi, K., & Nagano, T. (2001). Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. J. Neurochem. 76, 1404–1410.

Kolesnik, B., Palten, K., Schrammel, A., Stessel, H., Schmidt, K., Mayer, B., & Gorren, A.C.F. (2013). Efficient nitrosation of glutathione by nitric oxide. Free Radic. Biol. Med. 63, 51–64.

Kourennyi, D.E., Liu, X.D., Hart, J., Mahmud, F., Baldridge, W.H., & Barnes, S. (2004). Reciprocal modulation of calcium dynamics at rod and cone photoreceptor synapses by nitric oxide. J Neurophysiol 92, 477–483.

Kovács, R., Rabanus, A., Otáhal, J., Patzak, A., Kardos, J., Albus, K., Heinemann, U., & Kann, O. (2009). Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. J. Neurosci. 29, 8565–8577.

Ledo, A., Barbosa, R.M., Gerhardt, G.A., Cadenas, E., & Laranjinha, J. (2005). Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 17483–17488.

Ledo, A., Barbosa, R., Cadenas, E., & Laranjinha, J. (2010). Dynamic and interacting profiles of *NO and O2 in rat hippocampal slices. Free Radic. Biol. Med. 48, 1044–1050.

Ledo, A., Barbosa, R.M., & Laranjinha, J. (2012). Modulation of cellular respiration by endogenously produced nitric oxide in rat hippocampal slices. Methods Mol. Biol. 810, 73–88.

Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.K., Chen, H.S., Hartman, J., Sucher, N.J., & Lipton, S.A. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. Neuron 8, 1087–1099.

Leidenheimer, N.J. (1996). Effect of PKG activation on recombinant GABAA receptors. Brain Res Mol Brain Res 42, 131–134.

Leszkiewicz, D.N., & Aizenman, E. (2003). Reversible modulation of GABA(A) receptor-mediated currents by light is dependent on the redox state of the receptor. Eur J Neurosci 17, 2077–2083.

Li, D.-P., Chen, S.-R., & Pan, H.-L. (2002). Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release. J. Neurophysiol. 88, 2664–2674.

Li, D.-P.P., Chen, S.-R.R., Finnegan, T.F., & Pan, H.-L.L. (2004). Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. J. Physiol. 554, 100–110.

Li, Y., Zhang, W., & Stern, J.E. (2003). Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: role of GABA. Neuroscience 118, 585–601.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., & Stamler, J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature 364, 626–632.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Sucher, N.J., Pan, Z.H., & Stamler, J.S. (1996). Redox state, NMDA receptors and NO-related species. Trends Pharmacol Sci 17, 186–189.

Lipton, S.A., Choi, Y.-B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A., & Bankston, L.A. (2002). Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. Trends Neurosci. 25, 474–480.

Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., & Stamler, J.S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. Nature 410, 490–494.

Lu, L. (1997). Effect of substituting amino acids in extracellular disulfide loop on GABA rho1 subunit function. Brain Res. 756, 1–8.

Lu, J.-C., Hsiao, Y.-T., Chiang, C.-W., & Wang, C.-T. (2013). GABAA Receptor-Mediated Tonic Depolarization in Developing Neural Circuits. Mol. Neurobiol.

Lukasiewicz, P.D., & Werblin, F.S. (1994). A novel GABA receptor modulates synaptic transmission from bipolar to ganglion and amacrine cells in the tiger salamander retina. J. Neurosci. 14, 1213–1223.

Lukasiewicz, P.D., Eggers, E.D., Sagdullaev, B.T., & McCall, M.A. (2004). GABAC receptor-mediated inhibition in the retina. Vision Res. 44, 3289–3296.

Lv, P., Rodriguez-Contreras, A., Kim, H.J., Zhu, J., Wei, D., Choong-Ryoul, S., Eastwood, E., Mu, K., Levic, S., Song, H., et al. (2010). Release and elementary mechanisms of nitric oxide in hair cells. J. Neurophysiol. 103, 2494–2505.

Maggesissi, R.S., Gardino, P.F., Guimarães-Souza, E.M., Paes-de-Carvalho, R., Silva, R.B., & Calaza, K.C. (2009). Modulation of GABA release by nitric oxide in the chick retina: different effects of nitric oxide depending on the cell population. Vision Res. 49, 2494–2502.

Makara, J.K., Katona, I., Nyíri, G., Németh, B., Ledent, C., Watanabe, M., de Vente, J., Freund, T.F., & Hájos, N. (2007). Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. J. Neurosci. 27, 10211–10222.

Marowsky, A., Rudolph, U., Fritschy, J.M., & Arand, M. Tonic Inhibition in Principal Cells of the Amygdala: A Central Role for alpha3 Subunit-Containing GABAA Receptors. J Neurosci 32, 8611–8619.

Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K., & Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. Trends Pharmacol. Sci. 20, 396–399.

Martina, M., Kilié, G., & Cherubini, E. (1994). The effect of intracellular Ca 2+ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. J. Membr. Biol. 216, 209–216.

Martina, M., Strata, F., & Cherubini, E. (1995). Whole cell and single channel properties of a new GABA receptor transiently expressed in the Hippocampus. J Neurophysiol 73, 902–906.

McCall, M. a, Lukasiewicz, P.D., Gregg, R.G., & Peachey, N.S. (2002). Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. J. Neurosci. 22, 4163–4174.

McEown, K., & Treit, D. (2013). α2 GABAA receptor sub-units in the ventral hippocampus and α5 GABAA receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory. Neuroscience 252C, 169–177.

McMains, E., & Gleason, E. (2011). Role of pH in a nitric oxide-dependent increase in cytosolic Cl- in retinal amacrine cells. J. Neurophysiol. 106, 641–651.

Means, G.E., & Feeney, R.E. (1971). Chemical modification of proteins (San Francisco: Holden-Day).

Moncada, S., & Bolanos, J.P. (2006). Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem 97, 1676–1689.

Morales-Medina, J., Mejorada, A., Romero-Curiel, A., & Flroes, G. (2007). Alterations in dendritic morphology of hippocampal neurons in adult rats after neonatal administration of N’omega'nitro'L' arginine. Synapse 789, 785–789.

Myers, P.R., Minor Jr., R.L., Guerra Jr., R., Bates, J.N., & Harrison, D.G. (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. Nature 345, 161–163.

Nakamura, T., & Lipton, S.A. (2013). Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. Antioxid. Redox Signal. 18, 239–249.

Neitz, A., Mergia, E., Eysel, U.T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2011). Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. Eur. J. Neurosci. 33, 1611–1621.

Neitz, A., Mergia, E., Imbrosci, B., Petrasch-Parwez, E., Eysel, U.T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2013). Postsynaptic NO/cGMP Increases NMDA Receptor Currents via Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Hippocampus. Cereb. Cortex.

Nemargut, J.P., & Wang, G.-Y. (2009). Inhibition of nitric oxide synthase desensitizes retinal ganglion cells to light by diminishing their excitatory synaptic currents under light adaptation. Vision Res. 49, 2936–2947.

Nugent, F.S., Niehaus, J.L., & Kauer, J.A. (2009). PKG and PKA signaling in LTP at GABAergic synapses. Neuropsychopharmacology 34, 1829–1842.

Olsen, R.W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. Pharmacol. Rev. 60, 243–260.

Ooi, L., Gigout, S., Pettinger, L., & Gamper, N. (2013). Triple cysteine module within M-type K+ channels mediates reciprocal channel modulation by nitric oxide and reactive oxygen species. J. Neurosci. 33, 6041–6046.

Pan, Z.H., Bähring, R., Grantyn, R., & Lipton, S.A. (1995). Differential modulation by sulfhydryl redox agents and glutathione of GABA- and glycine-evoked currents in rat retinal ganglion cells. J. Neurosci. 15, 1384–1391.

Pan, Z.H., Zhang, X., & Lipton, S.A. (2000). Redox modulation of recombinant human GABAA receptors. Neuroscience 98, 333–338.

Polenzani, L., Woodward, R.M., & Miledi, R. (1991). Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 4318–4322.

Pouille, F., Marin-Burgin, A., Adesnik, H., Atallah, B. V, & Scanziani, M. (2009). Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. Nat. Neurosci. 12, 1577–1585.

Ramadan, E., Fu, Z., Losi, G., Homanics, G.E., Neale, J.H., & Vicini, S. (2003). GABA(A) receptor beta3 subunit deletion decreases alpha2/3 subunits and IPSC duration. J. Neurophysiol. 89, 128–134.

Ramón y Cajal, S. (1989). Recollections of my life (Cambridge: MIT Press).

Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., & Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J. Pharmacol. 101, 746–752.

Renganathan, M., Cummins, T.R., & Waxman, S.G. (2002). Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na+ channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation. J Neurophysiol 87, 761–775.

Robello, M., Amico, C., Bucossi, G., Cupello, A., Rapallino, M. V, & Thellung, S. (1996). Nitric oxide and GABAA receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. Neuroscience 74, 99–105.

Robello, M., Amico, C., & Cupello, a (1998). Cerebellar granule cell GABA(A) receptors studied at the single-channel level: modulation by protein kinase G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253, 768–773.

Rosas-Arellano, A., Parodi, J., Machuca-Parra, A.I., Sánchez-Gutiérrez, A., Inestrosa, N.C., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2011). The GABA(A)ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. Neurosci. Lett. 500, 20–25.

Rubbo, H., & Radi, R. (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. Biochim Biophys Acta 1780, 1318–1324.

Sah, R., Galeffi, F., Ahrens, R., Jordan, G., & Schwartz-Bloom, R.D. (2002). Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. J. Neurochem. 80, 383–391.

Sakmann, B., & Stuart, G. (1995). Patch-Pipette recordings from the soma, dendrites and axon neurons in brain slices. In Single-Channel Recording, B. Sakmann, and E. Neher, eds. (New York: Plenum Press), p. 503.

Saransaari, P., & Oja, S.S. (2006). Modulation of GABA release by second messenger substances and NO in mouse brain stem slices under normal and ischemic conditions. Neurochem Res 31, 1317–1325.

Sardo, P., Carletti, F., D'Agostino, S., Rizzo, V., La Grutta, V., & Ferraro, G. (2009). Intensity of GABA-evoked responses is modified by nitric oxide-active compounds in the subthalamic nucleus of the rat: a microiontophoretic study. J. Neurosci. Res. 87, 2340–2350.

Sedelnikova, A., Smith, C.D., Zakharkin, S.O., Davis, D., Weiss, D.S., & Chang, Y. (2005). Mapping the rho1 GABA(C) receptor agonist binding pocket. Constructing a complete model. J. Biol. Chem. 280, 1535–1542.

Selvakumar, B., Huganir, R.L., & Snyder, S.H. (2009). S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 16440–16445.

Semyanov, A., & Kullmann, D.M. (2002). Relative picrotoxin insensitivity distinguishes ionotropic GABA receptor-mediated IPSCs in hippocampal interneurons. Neuropharmacology 43, 726–736.

Semyanov, A., Walker, M.C., Kullmann, D.M., & Silver, R.A. (2004). Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci. 27, 262–269.

Sieghart, W., & Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr. Top. Med. Chem. 2, 795–816.

Smith, S.S. (2013). α4βδ GABAA receptors and tonic inhibitory current during adolescence: effects on mood and synaptic plasticity. Front. Neural Circuits 7, 135.

Smith, B.C., & Marletta, M.A. (2012). Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. Curr. Opin. Chem. Biol. 16, 498–506.

Smythies, J. (1999). Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review. Eur J Pharmacol 370, 1–7.

Sokolovski, S., & Blatt, M.R. (2004). Nitric oxide block of outward-rectifying K+ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. Plant Physiol. 136, 4275–4284.

Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J. Physiol. 562, 9–26.

Stamler, J.S., Toone, E.J., Lipton, S.A., & Sucher, N.J. (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. Neuron 18, 691–696.

Stamler, J.S., Lamas, S., & Fang, F.C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. Cell 106, 675–683.

Steinert, J.R., Kopp-Scheinpflug, C., Baker, C., Challiss, R.A., Mistry, R., Haustein, M.D., Griffin, S.J., Tong, H., Graham, B.P., & Forsythe, I.D. (2008). Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. Neuron 60, 642–656.

Steinert, J.R., Chernova, T., & Forsythe, I.D. (2011a). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. Neuroscientist 16, 435–452.

Steinert, J.R., Robinson, S.W., Tong, H., Haustein, M.D., Kopp-Scheinpflug, C., & Forsythe, I.D. (2011b). Nitric oxide is an activity-dependent regulator of target neuron intrinsic excitability. Neuron 71, 291–305.

Stern, J.E., & Ludwig, M. (2001). NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280, R1815–22.

Strata, F., & Cherubini, E. (1994). Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. J Physiol 480 (Pt 3, 493–503.

Sullivan, J.M., Traynelis, S.F., Chen, H.S., Escobar, W., Heinemann, S.F., & Lipton, S.A. (1994). Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. Neuron 13, 929–936.

Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S., & Meissner, G. (2003). Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms. An allosteric function for O2 in S-nitrosylation of the channel. J Biol Chem 278, 8184–8189.

Susankova, K., Tousova, K., & Vyklicky, L. (2006). Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. Mol. Pharmacol. 70, 383–394.

Szabadits, E., Cserep, C., Ludanyi, A., Katona, I., Gracia-Llanes, J., Freund, T.F., Nyiri, G., Cserép, C., Ludányi, A., & Nyíri, G. (2007). Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. J. Neurosci. 27, 8101–8111.

Szabadits, E., Cserep, C., Szonyi, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Watanabe, M., Itohara, S., Freund, T.F., Nyiri, G., & Cserép, C. (2011). NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. J. Neurosci. 31, 5893–5904.

Takahashi, A., Mikami, M., & Yang, J. (2007a). Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa. Eur. J. … 25, 705–716.

Takahashi, H., Shin, Y., Cho, S.J., Zago, W.M., Nakamura, T., Gu, Z., Ma, Y., Furukawa, H., Liddington, R., Zhang, D., et al. (2007b). Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. Neuron 53, 53–64.

Tang, L.H., & Aizenman, E. (1993). The modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurones in vitro. J Physiol 465, 303–323.

Taqatqeh, F., Mergia, E., Neitz, A., Eysel, U.T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2009). More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. J. Neurosci. 29, 9344–9350.

Thomas, D.D., Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Flores-Santana, W., Switzer, C.H., Donzelli, S., Hussain, P., Vecoli, C., Paolocci, N., Ambs, S., et al. (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. Free Radic Biol Med 45, 18–31.

Vardya, I., Drasbek, K.R., Dósa, Z., & Jensen, K. (2008). Cell type-specific GABA A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. J. Neurophysiol. 100, 526–532.

Vidwans, A.S., Kim, S., Coffin, D.O., Wink, D.A., & Hewett, S.J. (1999). Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. J Neurochem 72, 1843–1852.

Vigh, J., & von Gersdorff, H. (2005). Prolonged reciprocal signaling via NMDA and GABA receptors at a retinal ribbon synapse. J. Neurosci. 25, 11412–11423.

Wall, M.J. (2003). Endogenous nitric oxide modulates GABAergic transmission to granule cells in adult rat cerebellum. Eur. J. Neurosci. 18, 869–878.

Walters, R.J., Hadley, S.H., Morris, K.D., & Amin, J. (2000). Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. Nat Neurosci 3, 1274–1281.

Wang, G.Y., Liets, L.C., & Chalupa, L.M. (2003). Nitric oxide differentially modulates ON and OFF responses of retinal ganglion cells. J Neurophysiol 90, 1304–1313.

Wang, G.-Y., van der List, D.A., Nemargut, J.P., Coombs, J.L., & Chalupa, L.M. (2007a). The sensitivity of light-evoked responses of retinal ganglion cells is decreased in nitric oxide synthase gene knockout mice. J. Vis. 7, 7.1–13.

Wang, J.Q., Chu, X.-P., Guo, M.-L., Jin, D.-Z., Xue, B., Berry, T.J., Fibuch, E.E., & Mao, L.-M. (2012a). Modulation of ionotropic glutamate receptors and Acid-sensing ion channels by nitric oxide. Front. Physiol. 3, 164.

Wang, S., Teschemacher, A.G., Paton, J.F., & Kasparov, S. (2006). Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii. FASEB J 20, 1537–1539.

Wang, S., Paton, J.F.R., & Kasparov, S. (2007b). Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarii. Exp. Physiol. 92, 371–382.

Wang, T. a, Yu, Y. V, Govindaiah, G., Ye, X., Artinian, L., Coleman, T.P., Sweedler, J. V, Cox, C.L., & Gillette, M.U. (2012b). Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. Science 337, 839–842.

Wexler, E.M., Stanton, P.K., & Nawy, S. (1998). Nitric oxide depresses GABAA receptor function via coactivation of cGMP-dependent kinase and phosphodiesterase. J Neurosci 18, 2342–2349.

Wood, K.C., Batchelor, A.M., Bartus, K., Harris, K.L., Garthwaite, G., Vernon, J., & Garthwaite, J. (2011). Picomolar nitric oxide signals from central neurons recorded using ultrasensitive detector cells. J. Biol. Chem. 286, 43172–43181.

Wu, H.H., Selski, D.J., El-Fakahany, E.E., & McLoon, S.C. (2001). The role of nitric oxide in development of topographic precision in the retinotectal projection of chick. J. Neurosci. 21, 4318–4325.

Xing, J., Li, D.-P., & Li, J. (2008). Role of GABA receptors in nitric oxide inhibition of dorsolateral periaqueductal gray neurons. Neuropharmacology 54, 734–744.

Xu, M., & Akabas, M.H. (1993). Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. J Biol Chem 268, 21505–21508.

Xue, J.-G.G., Masuoka, T., Gong, X.-D.D., Chen, K.-S.S., Yanagawa, Y., Law, S.K.A., & Konishi, S. (2011). NMDA receptor activation enhances inhibitory GABAergic transmission onto hippocampal pyramidal neurons via presynaptic and postsynaptic mechanisms. J. Neurophysiol. 105, 2897–2906.

Yang, S., & Cox, C.L. (2007). Modulation of inhibitory activity by nitric oxide in the thalamus. J. Neurophysiol. 97, 3386–3395.

Yang, Q., Chen, S.R., Li, D.P., & Pan, H.L. (2007). Kv1.1/1.2 channels are downstream effectors of nitric oxide on synaptic GABA release to preautonomic neurons in the paraventricular nucleus. Neuroscience 149, 315–327.

Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., & Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. Nat Chem Biol 2, 596–607.

Yu, D., & Eldred, W.D. (2005). Gycine and GABA interact to regulate the nitric oxide/cGMP signaling pathway in the turtle retina. Vis. Neurosci. 22, 825–838.

Zanelli, S., Naylor, M., & Kapur, J. (2009). Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. Brain Res. 1297, 23–31.

Zhang, D., Pan, Z., Awobuluyi, M., & Lipton, S. (2001). Structure and function of GABA C receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. Trends Pharmacol. … 22, 42–46.

Zhang, P., Yu, P.-C., Tsang, A.H.K., Chen, Y., Fu, A.K.Y., Fu, W.-Y., Chung, K.K., & Ip, N.Y. (2010). S-nitrosylation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development. J. Neurosci. 30, 14366–14370.

Zhang, X., Zhou, Z., Winterer, J., Müller, W., & Stanton, P.K. (2006). NMDA-dependent, but not group I metabotropic glutamate receptor-dependent, long-term depression at Schaffer collateral-CA1 synapses is associated with long-term reduction of release from the rapidly recycling presynaptic vesicle pool. J. Neurosci. 26, 10270–10280.

Zhou, J., Kim, D.D., & Peluffo, R.D. (2010). Nitric oxide can acutely modulate its biosynthesis through a negative feedback mechanism on L-arginine transport in cardiac myocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 299, C230–9.

Zhou, Q.-G., Zhu, L.-J., Chen, C., Wu, H.-Y., Luo, C.-X., Chang, L., & Zhu, D.-Y. (2011). Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. J. Neurosci. 31, 7579–7590.

Índice de Figuras

Introducción

Figura I - 1. Esquema de la estructura de los receptores ionotrópicos de GABA. 13

Figura I - 2. Diagrama de las capas de la retina. 15

Figura I - 3. Modos de activación de los receptores de GABA. 17

Figura I - 4. Modulación de GABAARs por agentes rédox. 21

Figura I - 5. Elementos de la Formación hipoacampal. 23

Figura I - 6. Regulación de la síntesis de NO. 24

Figura I - 7. Mecanismos propuestos para la formaciónde S-Nitrosotioles. 26

Figura I - 8. Efectos directos reportados del NO sobre $GABA_AR$. 30

Figura I - 9. Estructura química de donantes de NO de la familia de los NONOatos. 39

Figura I - 10. Estructura química de S-Nitrosotioles. 40

Métodos

Figura M - 1. Ovocitos de *Xenopus laeivs.* 45

Figura M - 2. Registro electrofisiológico por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. 48

Figura M - 3. Diagrama del dispositivo de incubación y la cámara de registros. 51

Figura M - 4. Sistema de video-microscopía IR-DIC. 51

Figura M - 5. Diagrama esquemático del establecimiento de los registros. 53

Capítulo 1.

Figura 1. 1. Potenciación de las respuestas de GABAp1R por DEA. 59

Figura 1. 2. Potenciación de las respuestas de GABAp1R por SNOC. 60

Figura 1. 3. Potenciación de las respuestas de GABAp1R por GSNO. 61

Figura 1. 4. La potenciación de GABAp1R mediada por DEA es rápida y reversible. 62

Figura 1. 5. Curva dosis-respuesta para GABA en presencia y ausencia de DEA. 63

Figura 1. 6. Curva dosis-efecto para el DEA. 64

Figura 1. 7. El efecto potenciador del DEA sobre las respuestas a GABA son mayores a bajas concentraciones de agonista. 65

Figura 1. 8. Los efectos del DEA son independientes del voltaje y no son debidos a cambios en la concentración intracelular de Cl^-. 66

Figura 1. 9. La solución de DEA agotada de NO es inactiva sobre los GABAp1Rs. 67

Figura 1. 10. El NO_2^- no produce efectos sobre las respuestas de los GABAp1Rs. 68

Figura 1. 11. El *scavenger* específico de NO CPTIO bloquea la acción del DEA sobre los GABAp1Rs. 69

Capítulo 2.

Figura 2. 1. El bloqueo de las cisteínas de los GABAρ1Rs con MTSEA previene la potenciación por NO. 74

Figura 2. 2. La potenciación de los GABAρ1Rs por NO es prevenida por el bloqueo de las cisteínas con NEM.76

Figura 2. 3. Curva dosis-respuesta para GABAρ1R mutado en la cisteína intracelular. 77

Figura 2. 4. La mutación de la cisteína intracelular C364 no afecta la potenciación por NO. 78

Figura 2. 5. La modulación por NO de los GABAρ1Rs no se ve afectada por la disminución en la pO_2. 80

Capítulo 3.

Figura 3. 1. Las corrientes fásicas evocadas por *puffs* de GABA, no son afectadas por el donante de NO DEA. 86

Figura 3. 2. La inhibición de la NOS produce un aumento en las corrientes evocadas por *puffs* de GABA registrados en células piramidales de hipocampo. 88

Figura 3. 3. La $I_{TÓNICA}$ GABAérgica puede calcularse a partir de la disminución de la I_H luego de aplicar bicuculina. 90

Figura 3. 4. El donante de NO DEA no produce un cambio significativo de la $I_{TÓNICA}$. 91

Figura 3. 5. Efecto de la inhibición de la NOS sobre la corriente $I_{TÓNICA}$. 92