



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Fisiología, Biología celular y molecular

# **Modulación de la función de los receptores GABA<sub>A</sub> por intermediarios metabólicos redox**

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

**Lic. Manuel Ignacio López Pazos**

**Director de tesis: Dr. Daniel Juan Calvo**

**Directora adjunta: Dra. Andrea Natalia Beltrán González**

Consejero de estudios: Dr. Fernando Marengo

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET) e Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET-UBA).

Buenos Aires, noviembre de 2023.

# Modulación de la función de los receptores GABA<sub>A</sub> por intermediarios metabólicos redox

## RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se asocian generalmente con procesos de plasticidad neuronal, envejecimiento y trastornos neurodegenerativos. Pero también cumplen un importante rol como mensajeros celulares en la señalización redox, modulando la actividad de los receptores de neurotransmisores y canales iónicos. Previamente se reportó que respuestas tónicas mediadas por el receptor GABA<sub>A</sub>α1 son moduladas por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a través de la modificación de grupos tioles en las cisteínas. También se mostró que agentes redox endógenos modulan subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> fásicos, sin embargo los mecanismos de acción subyacentes parecerían ser diversos.

En este trabajo se estudiaron los efectos de las ROS sobre la función de varios subtipos de receptores de GABA<sub>A</sub>. Se expresaron receptores GABA<sub>A</sub> α1β2, α1β2γ2, α1β3, α1β3δ, α5β3 y α5β3γ2 humanos en oocitos de *Xenopus laevis* y se registraron electrofisiológicamente las respuestas evocadas por GABA en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las respuestas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> conformados por subunidades αβ y αβδ resultaron potenciadas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la inclusión de la subunidad γ2 confirió resistencia a la modulación por ROS. Los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas GABA<sub>A</sub> α1β2 resultaron reversibles, dosis dependiente y voltaje independiente. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la curva concentración - respuesta mostró un desplazamiento hacia la izquierda y un aumento de la respuesta máxima. Ensayos de protección química de sulfhidrilos con un agente alquilante irreversible previno parcialmente la potenciación observada, sugiriendo que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estaría mediado al menos por una de las cisteínas del receptor.

**Palabras claves:** Receptores GABA<sub>A</sub>, especies reactivas del oxígeno, peróxido de hidrógeno, modulación redox.

# Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by redox metabolic intermediates

## ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) were involved in neuronal signaling and plasticity in normal physiology, aging and neurodegenerative disorders. Besides, GABAergic neurotransmission is sensitive to redox agents, including ROS. We previously reported the modulation of tonic responses mediated by GABA<sub>A</sub>α1 receptors by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) through thiol modification of cysteines. We also showed that endogenous redox agents modulate phasic GABA<sub>A</sub> receptor subtypes, but diverse molecular mechanisms of action appear to underlie these effects.

In this work, the effects of ROS on the function of various GABA<sub>A</sub> receptor subtypes were studied. Human α1β2, α1β2γ2, α1β3, α1β3δ, α5β3 and α5β3γ2 GABA<sub>A</sub> receptors are expressed in *Xenopus laevis* oocytes and GABA-evoked responses in the presence and absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are recorded electrophysiologically. In the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) responses mediated by receptors containing αβ and αβδ subunits were potentiated, while the presence of the γ2 subunit conferred resistance to ROS modulation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on GABA<sub>A</sub>α1β2 responses were reversible, dose dependent and voltage-insensitive. Concentration-response curves in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed a leftward shift, compared to control values, and an increase in the maximal response. Chemical protection of sulfhydryls with an irreversible alkylating agent partially prevented the observed potentiation, suggesting that the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would be mediated by at least one of the receptor cysteines.

**Key words:** GABA<sub>A</sub> receptors, reactive oxygen species, hydrogen peroxide, redox modulation.

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, por la formación universitaria, gratuita y de calidad.

A CONICET y FONCyT, por las becas otorgadas, sin las cuales no habría ciencia en la Argentina.

A Daniel Calvo, por darme la oportunidad de entrar en el laboratorio, por ser un mentor y por su infinita paciencia.

A Andrea Beltrán González, por enseñarme todo, por la buena onda y por ayudarme tanto a lo largo de toda mi tesis.

A Karina Alleva y todo su grupo por abrir las puertas de su laboratorio con la mejor onda.

A Sofía y al grupo de la Dra. Elgoyhen, por compartir oocitos en tiempos difíciles.

A todos los amigos que hice en la Facultad, por el aguante.

A mi familia, por apoyarme a lo largo de toda mi vida y creer en mí.

A Tamara, por aguantarme todos los días, por formar una familia conmigo y darme su amor incondicional.

A mi hija, por alegrarme la vida.

# ÍNDICE

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>ABREVIATURAS</b>                                                                                                                  | 1  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                                  | 3  |
| A. Neurotransmisión inhibitoria GABAérgica                                                                                           | 3  |
| B. Receptores ionotrópicos de GABA                                                                                                   | 4  |
| i. Clasificación, estructura, localización                                                                                           | 4  |
| ii. Receptores fásicos y tónicos                                                                                                     | 9  |
| C. Modulación de la neurotransmisión por agentes redox                                                                               | 13 |
| i. Características generales                                                                                                         | 13 |
| ii. Especies reactivas del oxígeno                                                                                                   | 16 |
| iii. Rol de las especies reactivas del oxígeno en sistema nervioso central                                                           | 18 |
| iv. Modulación de los receptores GABA <sub>A</sub> por agentes redox                                                                 | 23 |
| v. Modulación de la neurotransmisión GABAérgica por especies reactivas del oxígeno                                                   | 27 |
| <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                     | 32 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                                          | 33 |
| A. Expresión de receptores sinápticos en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>                                                            | 34 |
| i. Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARNc                                                         | 35 |
| ii. Obtención, preparación y mantenimiento de los oocitos                                                                            | 37 |
| iii. Inyección de los oocitos de <i>Xenopus laevis</i>                                                                               | 39 |
| B. Registro electrofisiológico de las corrientes                                                                                     | 40 |
| i. Set up de registro                                                                                                                | 40 |
| ii. Protocolo experimental                                                                                                           | 43 |
| C. Medición de permeabilidad osmótica del agua                                                                                       | 45 |
| D. Drogas utilizadas                                                                                                                 | 47 |
| E. Análisis estadístico                                                                                                              | 47 |
| <b>RESULTADOS</b>                                                                                                                    | 49 |
| A. Efectos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la actividad de los receptores GABA <sub>A</sub> α1β2 y GABA <sub>A</sub> α1β2γ2. | 49 |
| B. Estudio del mecanismo de acción del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre receptores GABA <sub>A</sub> α1β2.                        | 61 |
| C. Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre diferentes subtipos de receptores GABA <sub>A</sub> .                              | 69 |
| D. Experimentos adicionales con otros agentes endógenos y farmacológicos.                                                            | 73 |
| <b>DISCUSIÓN</b>                                                                                                                     | 78 |
| <b>REFERENCIAS</b>                                                                                                                   | 91 |

# ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ácido desoxirribonucleico copia  
AMPc: adenosín monofosfato cíclico  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico  
AQP: acuaporina  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNc: ácido ribonucleico copia  
ATP: adenosín trifosfato  
 $\text{Ca}^{2+}$ : catión calcio  
CE: concentración efectiva  
 $\text{Cl}^-$ : cloruro  
C-R: concentración - respuesta  
C-terminal: carboxilo terminal  
*Cys-loop*: lazo de cisteínas  
DBZ: benzodiazepinas  
DTNB: ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico  
DTT: ditioneitol  
GABA: ácido  $\gamma$ -amino butírico  
GSH: glutatión  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico  
I: amplitud de corriente evocada por GABA  
 $I_{\text{máx}}$ : amplitud máxima de corriente evocada por GABA  
IPSPs: potenciales inhibitorios postsinápticos  
IPSC: corriente inhibitoria postsináptica  
I-V: corriente - potencial  
 $\text{K}^+$ : catión potasio  
LGIC: ligand-gated ion channel, canales iónicos activados por ligando  
MtPIP2,2: acuaporina correspondiente a *Medicago Truncatula*  
n: número de repeticiones  
NADPH: nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato

NEM: N-etilmaleimida  
 $nH$ : n de Hill  
NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato  
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal  
 $\text{NO}^\cdot$ : nitroxilo  
NO: óxido nítrico  
 $\text{NO}^+$ : nitrosium  
N-terminal: amino terminal  
 $\text{O}_2^{\cdot-}$ : superóxido  
 $\text{OH}^\cdot$ : radical hidroxilo  
 $\text{ONOO}^-$ : peroxinitrito  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
Pf: permeabilidad osmótica  
PKA: protein kinasa A  
PKC: protein kinasa C  
 $\text{GABA}_A$ : receptor ionotrópicos de GABA  
 $\text{GABA}_B$ : receptor metabotrópico de GABA  
Receptores P2Y1: receptor purinérgico 2Y1  
Receptores P2X2: receptor purinérgico 2X2  
Receptores TRPM: receptor de potencial transitorio M  
Redox: reacción de oxidación - reducción  
ROS: *reactive oxygen species*, especies reactivas del oxígeno  
SEM: error estándar de la media  
SNC: sistema nervioso central  
SOD: superóxido dismutasa  
TEVC: *two-electrode voltage clamp*, fijación de voltaje con dos microelectrodos  
TPEN: N,N,N',N'-tetraquis (2-piridilmetil) etano-1,2-diamina  
TM: paso transmembrana  
UTR: región no traducida  
Vclamp: voltaje al que se fija el potencial de membrana  
 $V_m$ : potencial de membrana  
 $V_r$ : potencial de reposo  
 $\text{Zn}^{2+}$ : catión zinc

# INTRODUCCIÓN

## A. Neurotransmisión inhibitoria GABAérgica

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso. Ejerce su acción a través de los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> y los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>, que difieren en su estructura, farmacología y características moleculares. Los receptores GABA<sub>A</sub> son canales de Cl<sup>-</sup> activados por ligando y constituyen los principales receptores que median la inhibición en las neuronas en el sistema nervioso central (SNC). Desde un punto de vista farmacológico, estos receptores se caracterizan por ser activados por GABA y el agonista selectivo muscimol, bloqueados por bicuculina y picrotoxina y modulados por benzodiazepinas, barbitúricos y otros depresores del SNC (Macdonald & Olsen, 1994; Sieghart, 1995). Por su parte, los receptores GABA<sub>B</sub> son activados por GABA y por el agonista selectivo baclofen, pero son insensibles a ligandos típicos de los receptores GABA<sub>A</sub>, como bicuculina y muscimol. Los receptores GABA<sub>B</sub> se acoplan a diferentes sistemas efectores (ej: canales de K<sup>+</sup> o canales de Ca<sup>2+</sup>) vía proteínas G asociadas a su vez a sistemas de segundos mensajeros (Bowery et al., 2002; Bettler et al., 2004).

Dada la amplia localización de los receptores GABA<sub>A</sub> en el sistema nervioso de mamíferos, éstos participan virtualmente en todas las funciones fisiológicas del cerebro y son el blanco de numerosas drogas de importancia clínica (Johnston, 2005). De hecho, la modulación

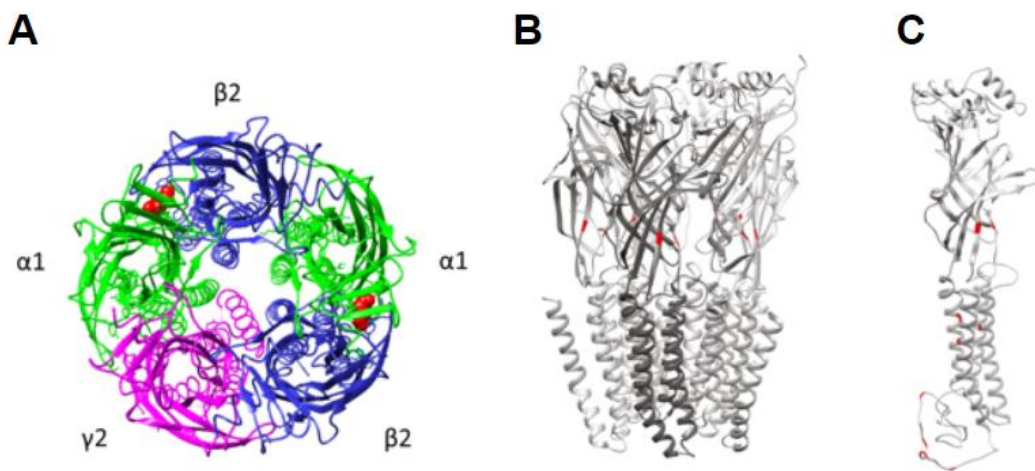
farmacológica de la neurotransmisión GABAérgica juega un rol importante en la terapéutica de numerosos desórdenes neurológicos, incluyendo a los estados de ansiedad, migraña, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, dolor neuropático y depresión (Tolman & Faulkner, 2009).

### **B. Los receptores ionotrópicos de GABA**

#### **i. Clasificación, estructura, localización**

Dentro de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC), los receptores GABA<sub>A</sub> forman parte de una clase de receptores denominada receptores *Cys-loop*, porque poseen un lazo de cisteína. Esta clase incluye a los receptores de acetilcolina nicotínicos (Corringer et al., 2000; Lukas & Bencherif, 2006), de glicina (Breitinger & Becker, 2002) y de serotonina ionotrópicos (Davies et al, 1999; Thompson & Lummis, 2006). Los receptores *Cys-loop* poseen un lazo extracelular de 13 residuos, estabilizado por un puente disulfuro característico, altamente conservado, que constituye un determinante conformacional importante para la interacción con el ligando (Lu, 1997). Los receptores *Cys-loop* se organizan como proteínas de membrana pentaméricas alrededor de un poro central. Cada subunidad consta de un dominio amino terminal extracelular de gran tamaño, 4 pasos transmembrana (TM1-TM4) con estructura de  $\alpha$ -hélice y con un lazo intracelular entre TM3 y TM4. La estructura se completa con un dominio carboxilo terminal extracelular corto. El paso transmembrana TM2 de cada subunidad conforma el canal iónico central (Baenzinger & Corringer, 2011). El lazo intracelular entre

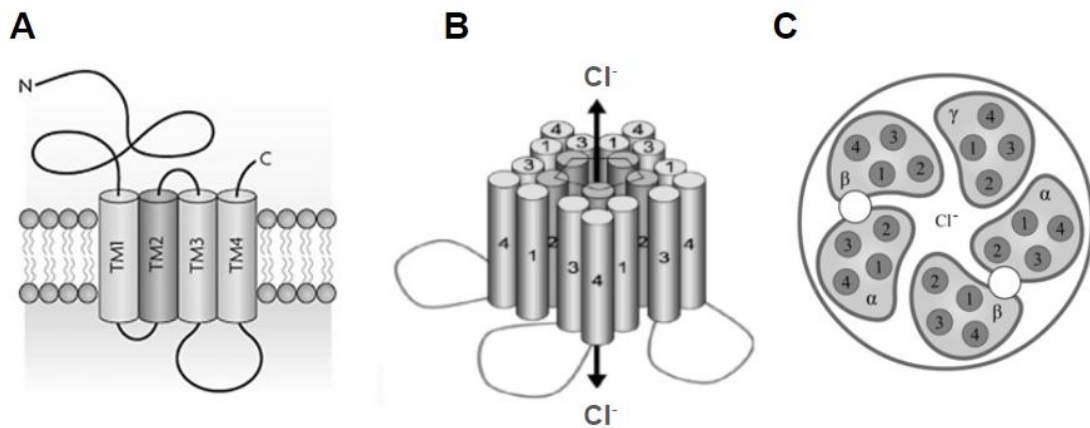
TM3 y TM4 presenta sitios de fosforilación para PKA, PKC y tirosin quinasas capaces de modular la corriente iónica del receptor (Zhang et al., 2001; Sallard et al., 2021). Todos estos dominios funcionales dan lugar a la estructura del receptor, a los sitios de unión al agonista y a diversos sitios de unión para ligandos alostéricos. En la **Figura I-1** se ilustra la estructura general de los receptores GABA<sub>A</sub>.



**Figura I-1. Estructura general de un receptor GABA<sub>A</sub> resuelta por cristalografía.** (A) Vista superior del modelo atómico de un complejo GABA<sub>A</sub>α1β2γ2 (α1 en verde, β2 en azul, γ2 en magenta, GABA en rojo) (modificado a partir de Protein Data Bank ID, 6D6T.pdb). (B) Vista lateral de un homopentámero β3, mostrando la topología de las subunidades. En rojo, se visualizan las cisteínas que forman el Cys-loop (C136 y C150) en el dominio N-terminal extracelular de cada una de las subunidades. (C) Estructura de una subunidad γ2. Además de las cisteínas del Cys-loop se identifican 3 cisteínas transmembranales y 4 residuos en el lazo intracelular M3-M4. Adaptado de Calvo & Beltrán González, 2016.

Los receptores GABA<sub>A</sub> de mamíferos son canales aniónicos selectivos. La unión del GABA a su sitio de unión a agonista está acoplada a la apertura del poro del canal, que permite el flujo de iones Cl<sup>-</sup> a favor de su gradiente electroquímico. En la mayoría de las neuronas en

el adulto, el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  es cercano al potencial de membrana en reposo y la concentración de  $\text{Cl}^-$  dentro de la neurona es mucho menor que en el líquido extracelular. En consecuencia, el aumento de la permeabilidad a  $\text{Cl}^-$  luego de la activación de receptores  $\text{GABA}_A$  reduce la excitabilidad neuronal, produciendo inhibición (Martin & Olsen, 2000). Sin embargo, dependiendo de la expresión de transportadores de  $\text{Cl}^-$ , la concentración de  $\text{Cl}^-$  dentro de la neurona puede aumentar, generándose un potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  menos negativo que el potencial de membrana en reposo. Bajo tales condiciones, la activación de receptores  $\text{GABA}_A$  puede causar una despolarización de la membrana suficiente como para provocar el disparo de un potencial de acción, produciendo excitación. Esta situación es especialmente relevante durante el desarrollo temprano (Ben-Ari, 2002; Furukawa & Fukuda, 2023). Por otro lado, como consecuencia de una fuerte activación de receptores  $\text{GABA}_A$ , el consiguiente aumento de la concentración de  $\text{Cl}^-$  dentro de la neurona podría desplazar el potencial de la membrana hacia el umbral de disparo, generando excitación en rebote de las neuronas (Marty & Llano, 2005). Además de  $\text{Cl}^-$ , los receptores  $\text{GABA}_A$  pueden conducir otros aniones, con distinta permeabilidad. El flujo de bicarbonato podría ser fisiológicamente relevante en determinadas condiciones (Kaila et al., 1997). La importancia del bicarbonato varía con el tejido y es dependiente de la actividad de la anhidrasa carbónica (Rivera et al., 2005; Sallard et al., 2021).



**Figura I-2. Arreglo espacial de los receptores GABA<sub>A</sub>αβγ.** **(A)** Vista esquemática de la topología de cada una de las subunidades que conforman el pentámero de los receptores GABA<sub>A</sub>. **(B)** Los TM2 de las cinco subunidades se organizan para formar el poro central. **(C)** Los sitios de unión a GABA se localizan en las interfases α/β. La fuerza motriz del ión cloruro determina la dirección en la que ocurre el transporte.

Existen 19 genes que codifican para diferentes subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> en humanos, α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ρ1-3, ε, θ y π. El ensamblaje de los receptores GABA<sub>A</sub> como pentámeros produce subtipos cuya estructura determina las propiedades fisiológicas, farmacológicas y biofísicas.

Los distintos subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> que pueden encontrarse en el sistema nervioso difieren en abundancia y en las funciones que desempeñan en los circuitos implicados. Si bien el número de combinaciones posibles entre las diferentes subunidades es enorme en términos teóricos, las evidencias experimentales indican que sólo un número limitado de arreglos se ensamblan *in vivo* dando lugar a receptores funcionales. Se estima que existen alrededor de 50 subtipos funcionales de receptores GABA<sub>A</sub> (Olsen, 2018), la mayoría de ellos son

muy poco frecuentes y su expresión se limita a un tejido específico, a un área cerebral determinada o a una fase particular del desarrollo embrionario, pero en todos los casos desempeñan funciones relevantes en la fisiología del sistema nervioso (Sieghart & Sperk, 2002; Sallard et al., 2021).

La mayoría de los receptores GABA<sub>A</sub> contienen una subunidad  $\gamma 2$ . Entre las  $\alpha$ , la subunidad  $\alpha 1$  es la más abundante y generalmente co-localiza con  $\beta 2$  y  $\gamma 2$ . Las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , se localizan generalmente en el espacio sináptico, mientras que  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  se encuentran fuera de la sinapsis. Los receptores GABA<sub>A</sub> que poseen la subunidad  $\gamma$  pueden encontrarse tanto dentro como fuera de la sinapsis, en tanto que los que contienen la subunidad  $\delta$  se encuentran predominantemente fuera de la sinapsis (Nusser et al., 1998; Storustovu & Ebert, 2006; Belelli et al. 2009; Sente et al., 2022). Los receptores GABA<sub>A</sub> que llevan  $\delta$ , en general, se co-expresan con  $\alpha 4$ , en el giro dentado del hipocampo y en el cuerpo estriado, mientras que la expresión de  $\alpha 6$  se encuentra confinada casi exclusivamente a las células granulares del cerebelo y en general está asociada a  $\delta$  (Sieghart & Sperk, 2002). Por otro lado, las subunidades  $\rho$  se caracterizan por formar receptores homoméricos funcionales. La expresión de receptores GABA<sub>A</sub> $\rho$  es abundante en estructuras relacionadas con el sistema visual, como retina y el nervio óptico, aunque también se reportó la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> $\rho$  en mesencéfalo, tálamo e hipocampo (Enz & Cutting, 1999; Greka et al., 2000; Alakuijala et al., 2005, 2006).

## **ii. Receptores Fásicos y Tónicos**

Por varias décadas, el estudio de los mecanismos de inhibición neuronal mediados por GABA, se enfocó en la caracterización del rol de los receptores GABA<sub>A</sub> localizados en las sinapsis (Macdonald & Olsen, 1994). Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, tienen una afinidad por GABA relativamente baja y median acciones inhibitorias rápidas y transitorias, donde la liberación cuántica de GABA desde una neurona presináptica genera un pico de concentración de GABA en el rango milimolar e induce en la neurona postsináptica eventos de considerable amplitud y rápido decaimiento (Farrant & Nusser, 2005). El curso temporal de estos eventos depende del tamaño de las vesículas sinápticas, la geometría de la sinapsis y el número y arreglo espacial de los receptores postsinápticos (localizados en grupos o *clusters* en la membrana postsináptica) y los transportadores de GABA. Este tipo de acción del GABA se denomina inhibición fásica, y los receptores que median esta clase de respuestas, receptores GABA<sub>A</sub> fásicos. Los subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> fásicos predominantes contienen generalmente a la subunidad  $\gamma 2$  en asociación con  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  o  $\alpha 3$  (GABA<sub>A</sub> $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ , GABA<sub>A</sub> $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$  y GABA<sub>A</sub> $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$ ) (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). La neurotransmisión inhibitoria fásica cumple un papel importante en la regulación del disparo de potenciales de acción en neuronas (Pouille & Scanziani, 2001) y es clave para el funcionamiento de diversos procesos neurofisiológicos, por ejemplo, la generación de actividad rítmica en redes neuronales (Somogyi & Klausberger, 2005), la generación de actividad eléctrica en dendritas (Klausberger, 2009) y la

integración sináptica (Pouille et al., 2009). Luego de su liberación vesicular, el GABA puede difundir desde el sitio de liberación sináptica mediante un fenómeno llamado *spillover* y activar a receptores perisinápticos o incluso a receptores localizados a mayor distancia. Cuando las corrientes resultantes conservan la relación temporal con el evento sináptico se consideran actividad fásica (Farrant & Nusser, 2005).

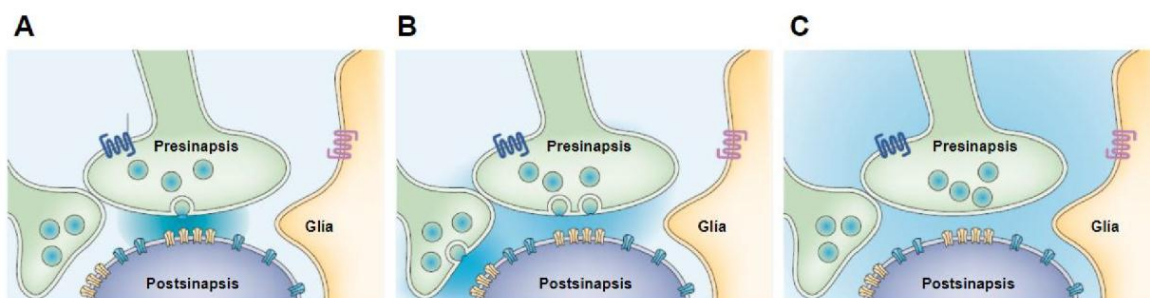
Por otra parte, se identificaron poblaciones de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos que permiten a las neuronas detectar concentraciones bajas de GABA en el compartimiento extracelular (“GABA ambiental”), y generan una forma de inhibición persistente y de curso temporal moderado o lento denominada tónica. Se estima que la concentración ambiental de GABA varía en el rango de decenas de nanomolar a micromolar y 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 (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012; Koh et al., 2023). La actividad GABAérgica tónica fue identificada en primer lugar en células granulares de cerebelo de rata. Kaneda et al. mostraron que los antagonistas selectivos bicuculina y gabazina no solo bloquean las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas, sino también disminuyen la corriente de mantenimiento necesaria para fijar el voltaje de la célula a un potencial determinado (Kaneda et al., 1995). Más adelante, se encontraron receptores tónicos GABAérgicos en giro dentado, amígdala, neuronas tálamo-corticales, neuronas de la capa V de corteza somatosensorial, células piramidales e interneuronas de la región CA1 de hipocampo y retina (Marowsky et al.,

2012; Keros & Hablitz, 2005; Palmer, 2006; Bright & Brickley, 2008; Vardya et al., 2008; Belelli et al., 2009). Los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos poseen propiedades fisiológicas y farmacológicas que los distinguen de los receptores sinápticos fásicos (Stell & Mody, 2002; Koh et al., 2023). Presentan afinidades altas por GABA, median corrientes iónicas de menor amplitud con cinéticas de activación y deactivación lentas, y sufren desensibilización escasa o nula (Farrant & Nusser, 2005). Debido a estas propiedades biofísicas, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> tónicos constituye un mecanismo que, a pesar de la inercia que implica operar con persistencia y lentitud, resulta eficaz a la hora de controlar ajustadamente el tono inhibitorio que regula la excitabilidad y condiciona el procesamiento de la información en los circuitos sinápticos y redes neuronales (Semyanov et al., 2003; Scimemi et al., 2005). Los receptores GABA<sub>A</sub> que combinan subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\delta$ ,  $\rho 1$  y  $\rho 2$  son predominante o exclusivamente extrasinápticos tónicos. Los receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha 5\beta\gamma 2$  y GABA<sub>A</sub> $\alpha 1\beta\delta$  se expresan en el hipocampo y la neocorteza, los GABA<sub>A</sub> $\alpha 6\beta\delta$  en cerebelo y los GABA<sub>A</sub> $\alpha 4\beta\delta$  en tálamo, estriado, hipocampo y neocorteza (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012).

La sensibilidad de los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos a anestésicos, drogas promotoras del sueño, neuroesteroides y alcohol, sugiere que la inhibición tónica puede cumplir un papel importante en la regulación de los estados de conciencia y estar implicada directa o indirectamente en desórdenes del sueño, mediación de los efectos del alcohol y trastornos del humor asociados a estrés, al ciclo ovárico y estar

bajo control regulatorio durante el embarazo (Maguire & Mody, 2007; Belelli et al., 2009). Por otro lado, en patologías como esquizofrenia, epilepsia y enfermedad de Parkinson, se correlacionó la existencia de aberraciones en la inhibición tónica con alteraciones en la dinámica de redes neuronales (Cope et al., 2009; Maldonado-Avilés et al., 2009). Por último, también se postuló la participación de receptores GABA<sub>A</sub> tónicos en desórdenes visuales como miopía, glaucoma y en la recuperación funcional posterior a un ictus (Clarkson et al., 2010; Brickley & Mody, 2012).

La **Figura I-3** ilustra los distintos modos de activación de los receptores GABA<sub>A</sub>.



**Figura I-3. Modos de activación de los receptores GABA<sub>A</sub>.** (A) La liberación de una única vesícula de GABA desde un terminal presináptico activa solamente a los receptores GABA<sub>A</sub> agrupados en la membrana postsináptica que se encuentran en las inmediaciones del sitio de liberación. El sombreado indica la difusión del GABA liberado. (B) La liberación de múltiples vesículas por un potencial de acción promueve el *spillover* de GABA y activa receptores sinápticos, presinápticos e incluso más distantes. (C) Una baja concentración de GABA, que persiste a pesar de a la actividad de los transportadores de GABA, activa receptores extrasinápticos de alta afinidad. *Adaptado de Farrant & Nusser, 2005.*

## **C. Modulación de la neurotransmisión por agentes redox**

### **i. Características generales**

Las reacciones de óxido-reducción (redox) juegan un rol muy importante en la regulación de la función celular en el SNC, en condiciones fisiológicas y patológicas (Annunziato et al., 2002; Lipton et al., 2002; Safiulina et al., 2006; Abramov et al., 2007). Se ha demostrado que la modulación redox regula la actividad de receptores sinápticos ionotrópicos y metabotrópicos, canales iónicos activados por voltaje y transportadores de neurotransmisores expresados en neuronas y células de la glía (Amato et al., 1999; Kishida & Klann 2007; Campanucci et al., 2008; Massaad & Klann, 2011; Penna et al., 2014; Accardi et al., 2014; Accardi et al., 2015; Hogg et al., 2015; Calvo & Beltrán Gonzalez, 2016; Ohashi et al., 2016; Giniatullin et al., 2019). De modo similar a la fosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina, la modificación de residuos de cisteína y otros aminoácidos capaces de sufrir procesos redox regula la función de un gran número de proteínas en el SNC (Lipton et al., 2002; Rice, 2011). Diferentes agentes redox, tanto endógenos como farmacológicos, intervienen en la excitabilidad celular y la transmisión sináptica mediante la modificación química de receptores sinápticos y transportadores de neurotransmisores expresados en neuronas y células de la glía (Annunziato et al., 2002; Abramov et al., 2007). Existe una amplia gama de mecanismos redox dentro de los cuales se incluyen reacciones de grupos sulfhidrilos, hidroxilos o aromáticos, con diversas moléculas relacionadas con óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), metales de transición tales como el hierro y el zinc (Zn<sup>2+</sup>), radical

carbonato, entre otros (Lipton et al., 2002; Singh et al., 2019). Muchos de estos mecanismos de modulación han sido estudiados en el receptor NMDA glutamatérgico (Choi & Lipton, 2000; Hongpaisan et al., 2004; Hidalgo & Arias-Cavieres, 2016; Granzotto et al., 2022). También se observó la participación de procesos redox en el control de la transmisión sináptica mediante la modulación de la liberación de neurotransmisores (Avshalumov et al., 2000; Knapp & Klann 2002; Safiulina et al., 2006; Rice, 2011, Yowtak et al., 2011; Hogg et al., 2015; Hawrysh & Buck, 2019).

En un principio la modulación redox se planteó como un mecanismo celular de protección y reparación de las modificaciones químicas producidas en diversas proteínas por radicales libres generados durante el estrés oxidativo (Annunziato et al., 2002; Rice et al., 2002; Abramov et al., 2007). Actualmente se sabe que, además de este rol preventivo, la modulación redox está involucrada en diversas vías de transducción de señales que controlan la actividad normal en neuronas y células de la glía (Smythies, 1999; Lipton et al., 2002; Safiulina et al., 2006; Kishida & Klann 2007; Bao et al., 2009; Stowe & Camara, 2009; Rice, 2011; Oswald et al., 2018a; Oswald et al., 2018b; Sies & Jones, 2020). En efecto, existe una intrincada red regulatoria endógena que incluye a los agentes reactivos redox como elementos de señalización.

Como resultado de la actividad celular normal diversos agentes redox se generan y liberan en diferentes áreas del sistema nervioso central. Generalmente los agentes redox se encuentran compartimentalizados y los cambios en los niveles locales de estos

compuestos están sujetos a una estricta regulación por mecanismos que pueden presentar dinámicas muy rápidas, del orden de los milisegundos (Rice, 2011; Sies, 2021). Por ejemplo, luego de una despolarización postsináptica sostenida se incrementa significativamente en las neuronas la liberación de glutatión (GSH) dependiente de calcio, y el transporte de ácido ascórbico (Zangerle et al. 1992; Miele, 1994; Wilson et al. 2000; Baxter & Hardingam, 2016; Ballaz & Rebec, 2019).

La concentración celular de los agentes redox pueden variar transitoriamente, alcanzando el rango milimolar, por ejemplo, durante los eventos sinápticos arriba descritos. Esto ocurre en áreas específicas del cerebro como corteza cerebral, hipocampo y retina (Rebec, 1994; Winkler et al. 1994; Rice, 2011). Existen también mecanismos regulatorios de mediano y largo plazo. Por ejemplo, algunos agentes redox pueden sufrir alteraciones significativas que se mantienen a lo largo del desarrollo (Rice, 2011; Oswald et al., 2018a; Oswald et al., 2018b). Los agentes redox pueden además ser permeables a membrana o no, y en este último caso pueden poseer mecanismos de transporte selectivo o inespecífico o estar confinados a un determinado compartimiento.

En el medio extracelular se detecta toda una variedad de agentes antioxidantes y reductores, como ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipoico, ácido úrico, L-cisteína, L-carnitina, L-carnosina, GSH, homocisteína y compuestos lipofílicos como  $\beta$ -caroteno, retinol (vitamina A),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ubiquinol (coenzima Q) y melatonina. También se encuentran agentes oxidantes con distinto grado de toxicidad como  $H_2O_2$ , glutatión oxidado y radicales libres como hidroxilo ( $OH^\bullet$ ),

nitrosium ( $\text{NO}^+$ ), anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ) y anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que puede reaccionar con óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Lipton et al. 2002; Szabó et al. 2007; Ballaz & Rebec, 2019; Singh et al., 2019).

### **ii. Especies reactivas del oxígeno**

Los requerimientos energéticos del cerebro son muy elevados en comparación con el resto de los órganos (Bélanger et al., 2011). Las células excitables, como las neuronas, requieren de una elevada tasa metabólica para mantener los gradientes iónicos indispensables para el disparo de los potenciales de acción, la actividad sináptica y la comunicación celular. Consecuentemente el consumo de oxígeno en las neuronas es muy alto y como producto de la respiración durante el metabolismo oxidativo se generan grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) en todo el SNC (Halliwell, 1992; Stowe & Camara, 2009; Angelova & Abramov 2016; Devine & Kittler, 2018).

La producción celular de ROS (ej:  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{OH}^{\cdot}$ ) es consecuencia de una variedad de procesos celulares. El más común es la respiración mitocondrial, que produce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a partir de la reducción parcial de oxígeno molecular (Liu et al., 2002; Adam-Vizi, 2005; Bao et al., 2009). Otras fuentes de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  incluyen la enzima NADPH oxidasa (Infanger et al., 2006; Rhee, 2006; Bedard & Krause, 2007; Vermot et al., 2021), la monoamino oxidasa (Beckhauser et al., 2016) y la activación neuronal de receptores NMDA y AMPA (Kishida & Klann, 2007; Hidalgo & Arias-Cavieres, 2016; Rho & Boison, 2022). Los niveles de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  son controlados por la proteína superóxido dismutasa, que convierte dos moléculas de  $\text{O}_2^{\cdot-}$

en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y agua. Por su parte, enzimas con función peroxidasa transforman al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno. La GSH peroxidasa -citoplasmática y mitocondrial- (Stöcker et al., 2018) y la catalasa -localizada en los peroxisomas intracelulares- (Dringen et al., 2005) son las peroxidases más importantes.

Datos experimentales, obtenidos utilizando mitocondrias aisladas del cerebro, sugieren que hasta un 5% del  $\text{O}_2$  consumido se convierte en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Arnaiz et al., 1999). En condiciones fisiológicas, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta durante períodos de mayor actividad local (Stepanova et al., 2019) porque se requiere un mayor consumo de  $\text{O}_2$  para restablecer los gradientes iónicos de las células excitables. En todo momento, los niveles celulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reflejan el equilibrio entre generación, metabolización y la difusión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro y fuera de una célula. Limitaciones experimentales de distinto tipo obstaculizan la determinación de concentraciones absolutas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Avshalumov et al., 2007; Sies & Jones, 2020). Los intentos para determinar niveles intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se dificultan aún más por la alta actividad peroxidasa celular, que agota rápidamente concentraciones conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno (Dringen et al., 2005). Diversos estudios alcanzaron a estimar el rango de concentraciones intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fisiológicamente relevantes, sin embargo, no hay consenso reunido respecto a los datos reportados. Evaluando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicada a partir de la cual se genera daño irreversible en cultivos neuronales y usando modelos matemáticos que predicen que los niveles intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  son 10 a 100 veces menores que la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicada de forma exógena, se

estimaron límites superiores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 100 nM a 1  $\mu\text{M}$  (Antunes & Cadenas, 2001; Stone, 2004; Adimora et al., 2010; Sies & Jones, 2020). Por otro lado, se reportó que en rebanadas de hipocampo de conejillo de indias la actividad peroxidasa endógena es suficiente para evitar daño fisiológico irreversible frente a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno en concentración 1,5 mM durante 15 minutos. En cambio, se observa daño si se inhiben farmacológicamente la enzima glutatión peroxidasa o la catalasa antes de aplicar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Avshalumov et al., 2004). Otros estudios demostraron que la función mitocondrial no se ve afectada por concentraciones milimolares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando la red antioxidante del cerebro está intacta (Gerich et al., 2009). En un futuro cercano se esperan mejoras en las determinaciones funcionales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en compartimientos intra y extracelulares de tejidos. Avances en herramientas para el monitoreo de niveles tisulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tales como colorantes y sondas fluorescentes (Miller et al., 2007; Jin et al., 2010; Meyer & Dick 2010; Srikun et al., 2010; Stepanova et al., 2019; Hoehne et al., 2022) y métodos electroquímicos en tiempo real (Li et al., 2010; Sanford et al., 2010; Ahmad et al., 2022) permitirán realizar mediciones directas, sin tener que recurrir a estimaciones.

### **iii. Rol de las especies reactivas del oxígeno en sistema nervioso central**

La homeostasis redox es el equilibrio por el cual se ajusta la generación y eliminación de agentes oxidantes, generalmente a través de diferentes sistemas antioxidantes que hacen frente a procesos biológicos oxidativos. El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio en el

estado redox de la célula, originado por la sobreproducción de ROS o por disfunción de los sistemas antioxidantes. Como consecuencia del estrés oxidativo pueden producirse modificaciones irreversibles en biomoléculas, como peroxidación de lípidos, alteraciones funcionales y estructurales de proteínas y cambios conformacionales y mutaciones del ADN (Dasuri et al., 2012; Singh et al., 2019). El cerebro es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a su alta demanda de oxígeno, a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados y a las características morfológicas que exhiben las neuronas, por ejemplo, una mayor superficie de membrana en relación al volumen citoplasmático. La pérdida de integridad de las membranas neuronales compromete la conducción y la transmisión sináptica (Evans, 1993). La retina resulta aún más vulnerable al daño oxidativo que el cerebro porque además de presentar altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, su consumo de oxígeno es mayor y sufre daño por radiación (Beatty et al., 2000). El estrés oxidativo inducido por ROS ha sido implicado en el envejecimiento normal, la diabetes, los accidentes cerebrovasculares, en patologías del desarrollo y en diversos trastornos neurodegenerativos que incluyen las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y las lesiones por isquemia y reperfusión (Wang & Hekimi, 2015; Sies et al., 2017). En la retina, en el curso de las alteraciones que sufren las células ganglionares, por ejemplo, en procesos de hipoxia-isquemia, glaucoma y degeneración de la mácula, se produce estrés oxidativo (Kaur et al., 2008; Allen & Bayraktutan, 2009; Loh et al., 2009; Kapogiannis & Mattson, 2011; Smith et al., 2017; Sies et al., 2017).

Sin embargo, en condiciones fisiológicas, las ROS pueden funcionar como moléculas de señalización, sin causar daño celular. Durante largo tiempo esto resultó controversial (Dröge, 2002; Rhee, 2006; Giorgio et al., 2007; Demarex & Scorrano, 2009). Sin embargo, la evidencia acumulada durante los últimos años postulan a las ROS como moléculas de señalización fisiológicamente relevantes en diversas células y tejidos, incluyendo al SNC (Klann, 1998; Rhee, 2006; Bao et al., 2009; Stowe & Camara, 2009; Toledano et al., 2010; Woo et al., 2010; Rice, 2011; Oswald et al., 2018a; Oswald et al., 2018b; Singh et al., 2019; Sies & Jones, 2020). En particular, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está implicado en procesos fisiológicos que van desde el desarrollo embrionario hasta la muerte celular (Sundaresan et al., 1995; Nishida et al., 2000; Rhee et al., 2005; Rhee, 2006; Stone & Yang, 2006; D'Autreaux & Toledano, 2007; Miller et al., 2007; Coffman et al., 2009; Gerich et al., 2009; Groeger et al., 2009; Rigoulet et al., 2010). En efecto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como un regulador intracelular de la actividad neuronal (Avshalumov et al., 2005; Miller et al., 2007; Gerich et al., 2009) y mensajero difusible en la señalización neurona-glía y en la comunicación interneuronal, que incluye la regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad (Aizenman et al., 1990; Atkins & Sweatt, 1999; Thiels et al., 2000; Kamsler & Segal, 2003; Safiulina et al., 2006; Campanucci et al., 2008; Lee et al., 2010; Massaad & Klann, 2011; Ohashi et al., 2016a; Giniatullin et al., 2019; Dhawan et al., 2021). Numerosos reportes describen acciones postsinápticas de las ROS sobre canales iónicos ligando o voltaje dependientes, como los receptores NMDA (Aizenman et al., 1990), receptores nicotínicos de acetilcolina

(Campanucci et al., 2008), receptores GABA<sub>A</sub> (Sah et al., 2002; Accardi et al., 2014; Beltrán Gonzalez et al., 2014), receptores de rianodina (Anzai et al., 1998), receptores purinérgicos (Coddou et al., 2009), canales de Ca<sup>2+</sup> y canales de K<sup>+</sup> (Li et al., 1998; Vega-Saenz & Rudy, 1992; Annunziato et al., 2002; Dirksen, 2002). También se describieron efectos presinápticos de las ROS, relacionados con la modulación de la liberación de dopamina en el cuerpo estriado (Chen et al., 2001; Avshalumov et al., 2003) y de acetilcolina en la placa neuromuscular (Giniatullin et al., 2005).

En contraste con otras ROS, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es un radical libre ni un ion. Por lo tanto, su reactividad limitada, junto a la capacidad de atravesar las membranas biológicas (Ramasma, 1982; Makino et al., 2004; Bienert et al., 2007; Adimora et al., 2010; Sies & Jones, 2020), lo convierten en una molécula apropiada para actuar como mensajero difusible y desempeñar un rol destacado en la señalización intracelular. Dada su baja reactividad, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no induce fácilmente daño oxidativo, a menos que encuentre trazas de iones metálicos libres, como cobre o hierro, que pueden catalizar la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a OH<sup>•</sup> altamente reactivo a través de la reacción de Fenton (Sies & Jones, 2020). La capacidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para difundir lejos de su sitio de generación es una característica compartida con otros mensajeros difusibles, tales como el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Dawson & Snyder, 1994; Kiss & Vizi, 2001). La concentración intracelular absoluta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y por lo tanto su disponibilidad para actuar como mensajero difusible, está determinada por el balance entre la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su difusión. La difusión dependerá de la permeabilidad a membrana, que es específica de la

célula, y de la capacidad de remoción que tenga la red antioxidante (Makino et al., 2004; Bienert et al., 2007; Adimora et al., 2010; Mishina et al., 2019; Hoehne et al., 2022).

El papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  como neuromodulador requiere una regulación muy sutil de los sistemas antioxidantes de la célula. Esta red parece estar estructurada de modo tal que los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (y otras ROS) en el medio intracelular puedan alcanzar concentraciones compatibles con las funciones regulatorias a desempeñar, aun considerando que los blancos potenciales pueden estar localizados a distancias significativas, sin dejar de ejercer los mecanismos preventivos del daño oxidativo (Avshalumov et al., 2004). Por tanto, un factor clave a considerar es el sitio donde ocurre la producción de las ROS y el potencial destino de éstas. Esto indica que las reacciones redox estarían confinadas a microambientes, que condicionan severamente el dominio espacial y el curso temporal de la acción de las ROS (Woo et al., 2010; Scialò et al., 2016; Hoehne et al., 2022). Por ejemplo, las células tienen sofisticados mecanismos de control que le permiten regular de manera selectiva y localizada la actividad de enzimas claves para la detoxificación de agentes oxidantes. Las vías de señalización redox requieren de un fino ajuste en la acción conjunta de enzimas tales como catalasa, glutatión peroxidasa, además de sistemas alternativos no enzimáticos antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión. Las altas concentraciones de ascorbato en las neuronas, proporciona un buen mecanismo para el *scavenging* del  $\text{OH}^\bullet$ , que permitiría no interferir con la señalización del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El predominio de glutatión peroxidasa citosólica en glía, y la sub-compartmentalización de

catalasa en los peroxisomas de neuronas y células gliales, permitirían incrementos transitorios de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su posterior extrusión desde el compartimento de generación (Rice, 2000; Avshalumov & Rice 2002; Avshalumov et al., 2004; Dringen et al., 2005; Stowe & Camara, 2009; Woo et al., 2010; Baxter & Hardingham, 2016).

### **iv. Modulación de los receptores GABA<sub>A</sub> por agentes redox**

Diversos estudios describieron los efectos de múltiples agentes redox farmacológicos sobre los receptores GABA<sub>A</sub>. Amato y colaboradores reportaron la modulación redox de receptores GABA<sub>A</sub> murinos recombinantes  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 1\gamma 2\text{S}$  y  $\alpha 1\beta 2\gamma 2\text{S}$  expresados en células HEK y de receptores GABA<sub>A</sub> de neuronas del ganglio cervical superior y neuronas granulares del cerebelo de rata (Amato et al., 1999). El agente reductor ditionitriol (DTT) potenció reversiblemente las respuestas evocadas por GABA en receptores  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 2$ , mientras el agente oxidante ácido dinitrobenzoico (DTNB) las inhibió. El antioxidante endógeno glutatión (GSH) también potenció las respuestas  $\alpha 1\beta 2$ , en tanto que las formas oxidadas del DTT y GSH causaron ligeros efectos inhibitorios. La presencia de subunidad  $\gamma 2$  en los receptores recombinantes redujo la sensibilidad al DTT y DTNB, sugiriendo que la modulación redox de los receptores GABA<sub>A</sub> depende de la composición de subunidades. Por su parte, los receptores GABA<sub>A</sub> de neuronas simpáticas y granulares del cerebelo mostraron menor sensibilidad a DTT y DTNB, posiblemente por la gran población de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen la subunidad  $\gamma$ . Pan y colaboradores, obtuvieron resultados análogos en neuronas ganglionares de retina de rata y demostraron que

residuos de cisteína están involucrados en la modulación redox de los receptores GABA<sub>A</sub> (Pan et al., 1995). En estudios posteriores estudiaron con mayor detalle los mecanismos de acción de los agentes redox sobre receptores GABA<sub>A</sub> recombinantes heteroméricos  $\alpha 1\text{-}3\beta 1\text{-}3$ ,  $\beta 1\text{-}3\gamma 1,2s$ ,  $\alpha 1\beta 1\text{-}3\gamma 1,2s$  y homoméricos  $\beta 2$ , expresados en oocitos de *Xenopus laevis* (Pan et al., 2000). Se observó una modificación significativa de la CE<sub>50</sub> de los receptores  $\alpha\beta\gamma$  en presencia de DTT, pero no del receptor  $\alpha\beta$ , sugiriendo que el mecanismo modulador redox depende de la composición de subunidades. Por último, reportaron que los receptores GABA<sub>A</sub> $\rho 1$  resultaban insensibles a la modulación redox. Teniendo en cuenta que Pan y colaboradores, evaluaron la modulación redox del receptor GABA<sub>A</sub> $\rho 1$  a una única concentración de GABA y considerando que la subunidad  $\rho$  contiene numerosos residuos aminoácidos susceptibles a modulación redox, en nuestro laboratorio se analizaron los efectos de diversos agentes redox sobre respuestas evocadas por un amplio rango de concentraciones de GABA, y mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> $\rho 1$  humanos expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados demostraron que, al igual que los receptores GABA<sub>A</sub> clásicos y otros miembros de la superfamilia de receptores *Cys-loop*, los receptores GABA<sub>A</sub> $\rho 1$  sufren modulación redox. Los agentes reductores DTT, N-acetil cisteína y GSH potenciaron las respuestas GABA<sub>A</sub> $\rho 1$ , en tanto los agentes oxidantes DTNB, DTT oxidado y glutatión oxidado la inhibieron. En todos los casos los efectos fueron rápidos, reversibles y fuertemente dependiente de la concentración de agonista y agente redox (Calero & Calvo, 2008). Estudios posteriores del laboratorio demostraron que los

agentes redox endógenos ácido ascórbico y óxido nítrico también modulan al receptor GABA<sub>A</sub>p1. A través de experimentos de protección química y mutagénesis sitio-dirigida se determinó que tanto el ácido ascórbico como el óxido nítrico actúan directamente sobre el receptor GABA<sub>A</sub>p1 modificando el estado de las cisteínas del *Cys-loop* y que, además de ejercer modulación redox, el ácido ascórbico actúa sobre un histidina de la subunidad p1 generando modulación alostérica (Calero & Calvo, 2008; Calero et al., 2011; Gasulla et al., 2012).

Las especies reactivas de nitrógeno también son capaces de modular la neurotransmisión GABAérgica. El óxido nítrico potencia la liberación presináptica del GABA en las sinapsis inhibitorias actuando como una molécula de señalización retrógrada (Szabadits et al., 2007). La acción postsináptica del NO fue menos explorada, pero múltiples evidencias indican que las respuestas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> pueden ser moduladas por NO. Tanto en receptores GABA<sub>A</sub> tónicos como fásicos, se observaron acciones potenciadoras e inhibitorias (Fukami et al., 1998; Castel & Vaudry, 2001; Wall, 2003; Gasulla & Calvo, 2015). Se propuso a la S-nitrosilación como el mecanismo redox por el cual el NO acciona sobre receptores sinápticos y canales iónicos, incluido los receptores GABA<sub>A</sub>. El NO también aumenta las respuestas mediadas por GABA<sub>A</sub>p1 en ovocitos. Experimentos que combinan modificadores selectivos de tioles, scavengers específicos de NO y mutagénesis sitio específica de subunidades p1, mostraron la S-nitrosilación de residuos de cisteínas críticos para la función de receptores GABA<sub>A</sub>p1 (Gasulla et al., 2012). Las corrientes tónicas y fásicas de GABA<sub>A</sub>, en neuronas

piramidales de CA1 en rodajas de hipocampo, también pueden ser moduladas por NO aunque el mecanismo todavía no se conoce (Gasulla & Calvo, 2015). Por otro lado, se demostró que neuronas de hipocampo en cultivo, son moduladas mediante la S-nitrosilación de la proteína gefirina (Dejanovic & Schwarz, 2014). La gefirina es una proteína de andamiaje esencial para el ordenamiento de los receptores GABA<sub>A</sub> en la postsinapsis y forma complejos con nNOS. La inhibición de nNOS resulta en la pérdida de la S-nitrosilación de la gefirina y el subsiguiente aumento del tamaño de los clusters que esta proteína forma, aumentando la cantidad de receptores GABA<sub>A</sub> expresados en la superficie sináptica y de esta forma aumenta la fuerza de la transmisión GABAérgica (Dejanovic & Schwarz, 2014). De esta forma, la S-nitrosilación puede jugar un rol en la plasticidad de las sinapsis inhibitorias controlando diferentes aspectos de la función y el ensamblaje de receptores GABA<sub>A</sub>.

Los niveles basales de Zn<sup>2+</sup> pueden ejercer una inhibición sostenida de las respuestas de los receptores GABA<sub>A</sub>αβ, interactuando de forma específica con residuos de histidina (Pan et al., 2000; Wilkins & Smart, 2002). Esta inhibición es menor en presencia de agentes redox quelantes de cationes como el DTT. La presencia de estos agentes quelantes genera un efecto potenciador *per se* sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, al margen de los mecanismos redox que surgen de la interacción con los residuos sulfhidrilos. Por tanto, quelantes selectivos de Zn<sup>2+</sup> como la tricina o el TPEN (N,N,N',N'-tetraquis (2-piridilmetil) etano-1,2-diamina) (que no interactúan con residuos aminoacídicos de los receptor GABA<sub>A</sub> y no interfieren con la modulación redox) son útiles para evitar la

sobreestimación de la modulación redox (Pan et al., 2000; Wilkins & Smart, 2002). Otros subtipos de receptores como GABA<sub>A</sub>α1β2γ2 y GABA<sub>A</sub>p1 presentan menos sensibilidad al Zn<sup>2+</sup> y la modulación redox que el DTT ejerce sobre ellos no se ve afectada por tricina (Pan et al., 2000; Wilkins & Smart, 2002; Calero & Calvo, 2008). Se desconoce si el Zn<sup>2+</sup> endógeno puede enmascarar la modulación ejercida sobre receptores GABA<sub>A</sub> por agentes redox endógenos.

### **v. Modulación de la neurotransmisión GABAérgica por especies reactivas del oxígeno**

Varios estudios han señalado a las ROS como moduladores de la excitabilidad neuronal, y se ha propuesto que la neurotransmisión GABAérgica constituye uno de sus blancos, involucrando mecanismos de acción tanto presinápticos como postsinápticos (Colton et al., 1986; Sah et al., 2002; Safiulina et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Saransaari & Oja, 2008; Yowtak et al., 2011; Tarasenko et al., 2012; Accardi et al., 2014; Beltrán González et al., 2014; Penna et al., 2014). Los mecanismos presinápticos han sido estudiados con cierto detalle. Diferentes reportes han demostrado que las ROS modulan la liberación y la recaptación de GABA y han caracterizado incluso algunos de los mecanismos de acción involucrados. En rodajas de hipocampo de rata y en cultivos neuronales de retina de pollo se reportó un aumento de la liberación basal de GABA por efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una reducción de la captación de GABA en sinaptosomas como producto de la peroxidación generada por ascorbato de hierro (Sah et al., 1999; Rego, 1996; Palmeira et al., 1993). En condiciones de hipoxia e isquemia, la liberación de GABA en rodajas de

hipocampo de ratón se encuentra exacerbada (Saraansari et al., 1998). Posteriormente, experimentos de liberación de GABA, en homogenatos de hipocampo de ratón, mostraron un marcado aumento de la liberación de GABA en presencia de  $H_2O_2$ . El mecanismo de acción estaría mediado por radicales libres del oxígeno y sería independiente de calcio y dependiente de PKC y óxido nítrico (Saraansari & Oja, 2008). Se reportó también que el  $H_2O_2$  potencia la liberación presináptica del GABA a través de un mecanismo de AMPc dependiente de PKA en neuronas corticales de rata aisladas mecánicamente (Hahm et al., 2010). Diversos estudios mostraron una reducción significativa de los potenciales inhibitorios postsinápticos (IPSPs) en neuronas de hipocampo, corteza cerebral y tálamo expuestas a  $H_2O_2$  y radicales libres del oxígeno (Pellmar, 1995; Frantseva et al., 1998). Los receptores  $IP_3$  pueden actuar como transductores de las acciones modulatorias del  $H_2O_2$  en interneuronas GABAérgicas de la médula espinal (Takahashi et al., 2007). Por otro lado, estudios en sinaptosomas corticales del cerebro de rata mostraron que la activación presináptica de receptores de glutamato induce un aumento en la producción de ROS que estaría en estrecha relación con la liberación de GABA (Tarasenko et al., 2012). Se reportó también que la activación de receptores metabotrópicos  $P2Y_1$  por ATP induce la liberación de ROS difusibles por la glía, facilitando la liberación de GABA en células piramidales CA3 en hipocampo inmaduro de rata (Safiulina et al., 2006). Por último, estudios en neuronas de sustancia gelatinosa demostraron que el incremento de ROS reduce marcadamente la neurotransmisión

inhibitoria a través de la reducción de la liberación sináptica de GABA, mecanismo que contribuiría al dolor persistente (Yowtak et al., 2011).

Las primeras evidencias de los efectos postsinápticos de las ROS sobre los receptores GABA<sub>A</sub> que lograron determinar algunos de los blancos moleculares se realizaron utilizando técnicas bioquímicas. Los primeros estudios reportaron que la generación de O<sub>2</sub><sup>•</sup> incrementa la unión a [<sup>3</sup>H]muscimol a los receptores colinérgicos muscarínicos, en preparaciones de membranas de cerebro de rata (Yoneda et al., 1985). La exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también afecta la unión de GABA, a los receptores GABA<sub>A</sub>, en homogenatos de hipocampo, corteza y cuerpo estriado y aumenta el influjo de Cl<sup>-</sup> mediado por receptores GABA<sub>A</sub> neuronas piramidales CA1 de hipocampo de rata (Sah & Schwartz-Bloom, 1999; Sah et al., 2002). Trabajos más recientes lograron revelar algunos de los mecanismos por los cuales las ROS afectarían la neurotransmisión GABAérgica a nivel postsináptico. Nuestro laboratorio demostró el efecto directo de las ROS sobre los receptores homoméricos GABA<sub>A</sub>p1 expresados en oocitos de *Xenopus laevis* (Beltrán González et al., 2014). En este trabajo se demostró que las aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potencian de manera reversible las respuestas mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub>p1, y se determinó que la cisteína C364, localizada en el lazo que conecta los dominios TM3 y TM4, actúa como un sensor intracelular para la acción de las ROS. Trabajos posteriores demostraron que la sensibilidad a ROS no resulta una propiedad particular de este subtipo de receptor GABA<sub>A</sub>. Aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también lograron incrementar las corrientes tónicas GABAérgicas registradas en células piramidales de hipocampo en CA1

(Penna et al., 2014). Los efectos generados por las ROS no parecieron estar mediados por subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen subunidades  $\alpha 5$  o  $\delta$  (comúnmente encontrados en respuestas tónicas de hipocampo) sino más bien por subtipos que contienen subunidades tales como  $\alpha\beta$ ,  $\alpha 1\beta\delta$ ,  $\alpha 3\beta\gamma 2$ ,  $\alpha 4\delta$ ,  $\alpha 6\delta$  y  $\alpha\beta\epsilon$  (Mortensen & Smart, 2006; Penna et al., 2014). Las acciones modulatorias del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, reportadas tanto en retina como en hipocampo, tuvieron lugar en un rango de concentraciones entre 200 y 500  $\mu$ M, y también dependieron de la concentración de GABA. Los *scavengers* de radicales libres lograron prevenir el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo parcialmente, lo que sugiere que además de radicales hidroxilos y otros ROS involucrados, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría potenciar los receptores GABA<sub>A</sub> de forma directa (Beltrán González et al., 2014; Penna et al., 2014).

A su vez, en neuronas del cerebelo se reportó que la producción de ROS endógeno induce fenómenos de plasticidad sináptica, reforzando la neurotransmisión inhibitoria mediada por receptores GABA<sub>A</sub> (Accardi et al., 2014, 2015). Estos estudios, realizados en células estrelladas y granulares, analizaron la evolución temporal de las respuestas sinápticas GABA<sub>A</sub> al incrementar los niveles de ROS mediante la perfusión intracelular del desacoplante mitocondrial Antimicina A. En ambos tipos celulares, se produjo un aumento de la frecuencia de corrientes sinápticas inhibitorias luego de que se elevara la concentración de las ROS mitocondriales, pero sin detectar cambios en las respuestas tónicas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>. En las células estrelladas el aumento de los niveles de ROS produjo un incremento en los eventos postsinápticos

con cinéticas lentas y amplitudes pequeñas. El mecanismo de acción propuesto por los autores consiste en el reclutamiento de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen subunidades  $\alpha 3$  dentro de sitios específicos en la postsinapsis, sin afectar a los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen subunidades  $\alpha 1$ , ya localizados en esa zona (Accardi et al., 2014). En las células granulares, el aumento de los niveles de ROS también incrementó la transmisión sináptica inhibitoria, pero los nuevos eventos sinápticos no resultaron diferenciables por su cinética y se los asoció con el reclutamiento de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen la subunidad  $\alpha 6$  (Accardi et al., 2015). El mecanismo que subyace a esta plasticidad de receptores inducida por agentes redox aún no fue revelado, sin embargo, las evidencias experimentales sugieren que la producción de ROS regularía el tono inhibitorio GABAérgico en el cerebelo.

En este contexto, nos propusimos continuar con el estudio de los efectos de las ROS sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, incorporando ahora una variedad de subtipos que no habían sido analizados previamente. Para ello, se seleccionaron algunas de las variantes más representativas de los receptores GABA<sub>A</sub> fásicos y tónicos, con el propósito de caracterizar los efectos de las ROS sobre éstos, analizar las similitudes y diferencias con los subtipos ya estudiados y estudiar los posibles mecanismos de acción implicados en la modulación.

## **OBJETIVOS**

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar los efectos de las especies reactivas del oxígeno sobre la función de diversos subtipos de receptores ionotrópicos de GABA. El propósito es comprender el papel que desempeñan estos intermediarios metabólicos en la regulación de la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica fásica y tónica en el sistema nervioso central.

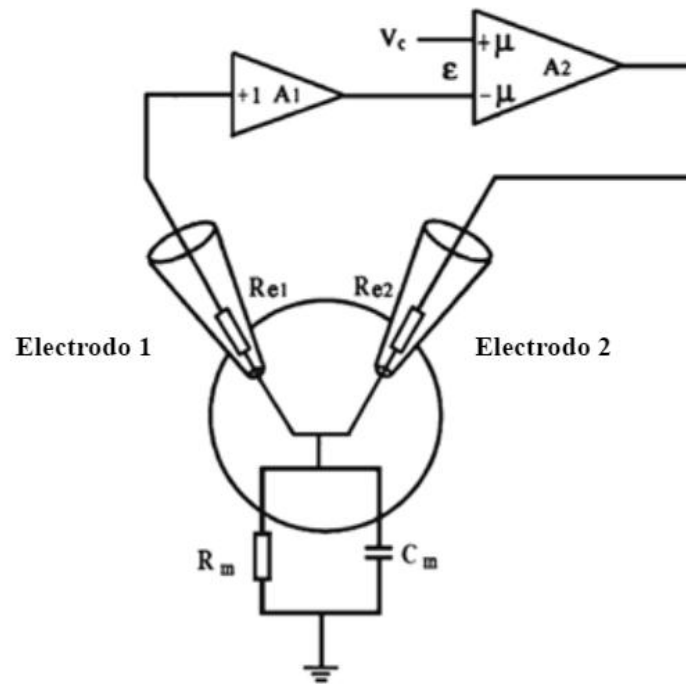
Los objetivos específicos son evaluar las acciones del  $H_2O_2$  sobre los receptores  $GABA_{A\alpha 1\beta 2\gamma 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 1\beta 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 5\beta 3}$ ,  $GABA_{A\alpha 5\beta 3\gamma 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 4\beta 3\delta}$ ,  $GABA_{A\alpha 1\beta 3}$  y  $GABA_{A\alpha 1\beta 3\delta}$  y estudiar el mecanismo de acción involucrado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se estudiaron las propiedades biofísicas de diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> mediante expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y registro de corrientes iónicas evocadas por técnicas electrofisiológicas.

Los oocitos de *Xenopus laevis* son células ampliamente usadas como sistema de expresión heterólogo. Su gran tamaño celular permite su fácil manejo y manipulación, reproducen fielmente las propiedades de los receptores nativos y presentan baja expresión de canales y receptores endógenos en su membrana (Sigel & Minier, 2005).

Por su parte, el método de fijación de voltaje con dos microelectrodos (*two-electrode voltage clamp*, TEVC) en oocitos de *Xenopus laevis* es un método muy poderoso para estudiar la función y regulación de proteínas de membrana. Esta técnica electrofisiológica que permite fijar el potencial de membrana ( $V_m$ ) de células grandes empleando dos microelectrodos de baja resistencia: un microelectrodo de voltaje (que mide iterativamente el  $V_m$ ) y un microelectrodo de corriente (que inyecta la corriente necesaria para ajustar el  $V_m$  al valor deseado). La corriente aplicada resulta igual (y opuesta) a la corriente que atraviesa la membrana celular al voltaje establecido. Se registra entonces la corriente de membrana, que refleja la actividad de los canales o transportadores iónicos presentes. En la **Figura M1** se representa esquemáticamente el principio básico de TEVC en un oocito (Hernandez-Ochoa & Schneider, 2012; Guan et al., 2013).



**Figura M1. Fijación de voltaje con dos microelectrodos en un oocito de *Xenopus laevis*.** El  $V_m$  se monitorea conectando el electrodo de voltaje (electrodo 1) a la entrada de un seguidor de voltaje (A1), que tiene una impedancia de entrada muy alta. La salida de A1, cuyo potencial es prácticamente igual a  $V_m$ , se conecta a una terminal de entrada de un amplificador de fijación de voltaje (A2), un amplificador diferencial de alta ganancia que compara al  $V_m$  con la señal de comando de voltaje ( $V_c$ ) aplicada al otro terminal de entrada. El voltaje de salida resultante de A2 fuerza a fluir a través del electrodo de corriente (electrodo 2) a una corriente proporcional a la diferencia ( $e$ ) entre  $V_m$  y  $V_c$  hacia la célula. La dirección de la corriente se decide por la polaridad del voltaje en la salida de A2, siempre reduciendo  $e$ . Siempre que la ganancia ( $m$ ) de A2 sea suficientemente alta,  $V_m$  puede acercarse a  $V_c$  y así lograr la fijación de  $V_m$ . Mientras tanto, la corriente que pasa a través del electrodo 2 se registra como la corriente de membrana, ya que contrarresta la desviación de  $V_m$  que habría causado la corriente de membrana. Adaptado de Guan et al, 2013.

A continuación se detallan los procedimientos utilizados.

### A. Expresión de receptores sinápticos en oocitos de *Xenopus laevis*

Se expresaron receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2, GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2, GABA $\alpha$ p1,

GABA<sub>A</sub>α5β3, GABA<sub>A</sub>α5β3γ2, GABA<sub>A</sub>α4β3δ, GABA<sub>A</sub>α1β3 y GABA<sub>A</sub>α1β3δ en la superficie de membrana de los oocitos de *Xenopus laevis* mediante la inyección del ARNc codificante para cada subunidad, obtenido previamente por transcripción *in vitro* a partir de un templado ADNc codificante para cada subunidad humana.

**i. Preparación de los templados de ADNc y transcripción *in vitro* de los ARNc**

El laboratorio cuenta con una batería de plásmidos que codifican para las subunidades α1, α4, α5, β2, β3, δ, γ2 o p1 humanas, gentilmente donados por los colegas Ataúlfo Martínez Torres, Ricardo Miledi, Mary Chebib, Cecilia Borghese, R. Adron Harris y Bjarke Ebert. Cada plásmido contiene como inserto un subtipo único de subunidad GABA<sub>A</sub>, clonada en un vector de expresión en oocitos, según se describe en la **Tabla M1**. Todos los plásmidos cuentan con un promotor de polimerasa T7, necesario para la posterior transcripción. Los vector pGEM-HE contienen los segmentos 5'-UTR y 3'-UTR del gen de β-globina de *Xenopus laevis*, que permiten aumentar la vida media de los ARNc en citoplasma.

| Subunidad de GABA <sub>A</sub> | Plásmido  | Enzima de restricción | Posición del Corte |
|--------------------------------|-----------|-----------------------|--------------------|
| $\alpha 1$                     | pcDNA3,1+ | DraIII                | 1532               |
| $\alpha 4$                     | pcDNA3    | SmaI                  | 2093               |
| $\alpha 5$                     | pcDNA3    | DraII                 | 991                |
| $\beta 2$                      | pGEM-HE   | SphI                  | 1505               |
| $\beta 3$                      | pGEM-HE   | NheI                  | 1543               |
| $\gamma 2$                     | pGEM-HE   | NheI                  | 1543               |
| $\delta$                       | pcDNA3    | StuI                  | 2069               |

**Tabla M1.** Detalle plásmido y enzima de restricción empleada para cada subunidad GABA<sub>A</sub>.

Para realizar la transcripción *in vitro* se debe contar con suficiente masa de plásmido linealizado. A tal fin, se procedió a la transformación bacteriana, amplificación en cultivo LB, extracción y purificación del plásmido y digestión con enzima de restricción. Los productos de las digestiones se trataron con proteinasa K y se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, GmbH-Hilden, Alemania). La concentración de los plásmidos linealizados se determinó por comparación con un marcador de masa 1 kb *ladder* en geles de agarosa al 1%. Para realizar estos pasos se contó con la colaboración de la Dra. Mariana del Vas (Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Los plásmidos linealizados se usaron como template para la síntesis *in vitro* de ARNc mediante el kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (Promega, Madison, WI, USA). Las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo del cap, Me<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (Promega, Madison, WI, USA), en proporción 4:1 con respecto al GTP. El ARNc sintetizado se

purificó con columnas específicas para ARN (Rneasy MiniKit, Qiagen, Valencia, CA), se separó en alícuotas y se congeló a -70°C hasta el momento de su uso. La integridad del ARNc se corroboró en geles de agarosa 1%. El ARNc se cuantificó mediante la medición de la absorbancia en espectrofotómetro a longitud de onda de 240 nm usando un Nanodrop y por comparación de las bandas obtenidas en corridas previas. El ARNc obtenido fue posteriormente utilizado para la microinyección de oocitos de *Xenopus laevis*.

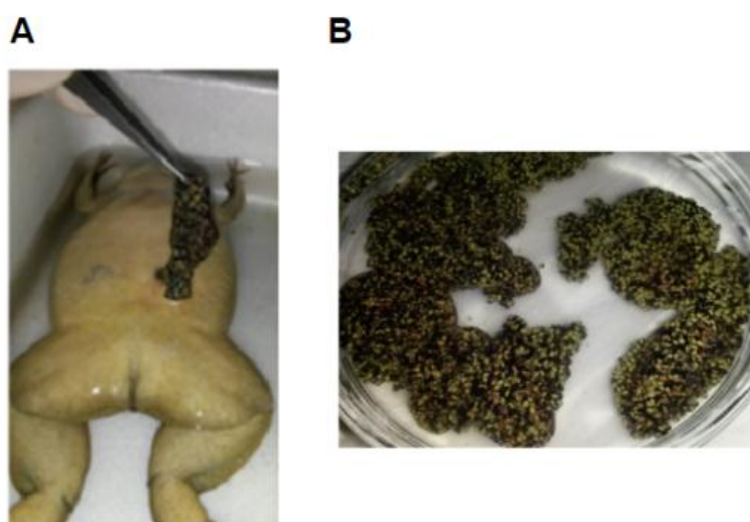
## **ii. Obtención, preparación y mantenimiento de los oocitos**

Se usaron hembras de *Xenopus laevis* obtenidas comercialmente (Nasco, Modesto, CA, EE.UU.). Las ranas se mantuvieron en un bioterio adecuado de ambiente controlado (18-20°C), con un régimen de 12 hs luz /12 hs oscuridad, en grupos de dos y en recipientes de 10 litros con agua filtrada, declorinada y con una dureza total de 200 mg/l (por agregado de sulfato de magnesio). Las ranas se alimentaron dos veces por semana con pellets de alimento balanceado para rana toro. El consumo aproximado es de 3 a 5% del peso vivo.

Para la obtención de los oocitos, se anestesiaron las ranas por sumersión durante 30 minutos en una solución 1,5 g/l de éster etil-3-aminobenzoato (MS 222, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 1 g/l de NaHCO<sub>3</sub> disueltos en agua. Los oocitos se aislaron mediante microcirugía. A través de una pequeña incisión en el abdomen se extrajeron lóbulos ováricos, que contienen cientos de oocitos cada uno (**Figura M2**).

Los lóbulos se lavaron, se abrieron parcialmente bajo lupa con ayuda de

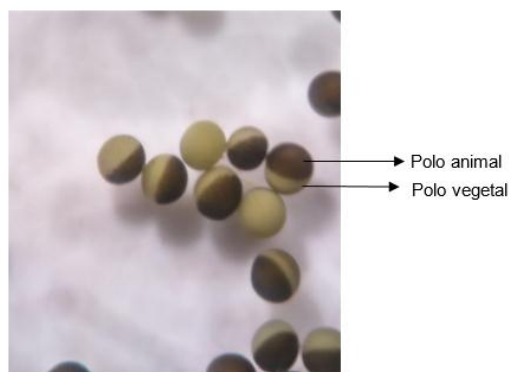
pinzas y se mantuvieron 1-2 hs en solución Barth's (NaCl 88 mM;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,33mM;  $\text{CaCl}_2$  0,41mM; KCl 1,0mM;  $\text{MgSO}_4$  0,82mM;  $\text{NaHCO}_3$  2,4mM; HEPES 10mM; pH 7,4 ajustado con NaOH y gentamicina 0,5 mg/ml y tetraciclina 0,5 mg/ml). Posteriormente, los lóbulos se trataron durante 2 horas con una solución de collagenasa tipo 1 (Worthington Biochem Corp. Lakewood, NJ, USA) 400 U/ml, disuelta en una solución Barth's con agitación lenta para remover la capa folicular de los oocitos. El tratamiento enzimático se detuvo mediante lavados repetidos con solución Barth's para eliminar los restos de collagenasa. Los oocitos se mantuvieron a 18°C en solución Barth's.



**Figura M2. Obtención de oocitos de *Xenopus laevis*.** (A) Remoción quirúrgica de un lóbulo ovárico del abdomen de una rana *Xenopus laevis*. (B) Lóbulo ovárico con oocitos.

A continuación, se seleccionaron bajo lupa oocitos de estadíos maduros (estadíos V y VI) de acuerdo a su tamaño y apariencia. Estas células presentan un patrón de pigmentación particular: un hemisferio es blanco o ligeramente amarillento (polo vegetal) y el otro hemisferio es marrón oscuro (polo animal) (**Figura M3**). Como criterio de viabilidad de los oocitos se tuvo en cuenta la pigmentación de los hemisferios, la turgencia de la membrana y la

ausencia de lesiones. Los oocitos seleccionados se mantuvieron a 18°C en solución Barth's en grupos de hasta 30 oocitos por vial.



**Figura M3. Oocitos de *Xenopus laevis*.** Se observa el polo vegetal (claro) y el polo animal (oscuro).

### **iii. Inyección de los oocitos de *Xenopus laevis***

Los oocitos seleccionados se inyectaron dentro de las 24 hs posteriores a su extracción con el ARNc utilizando un microinyector automático (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.). Las jeringas de inyección se obtuvieron estirando capilares de vidrio (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EEUU) en un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón). Las pipetas se llenaron con aceite mineral y en su extremo se cargaron con ~2μL de solución de ARNc. Una vez preparado el microinyector, se colocaron los oocitos en una caja de Petri de 35 mm de diámetro cuyo fondo posee una membrana de polietileno enrejada que limita su movimiento. La cámara se llenó con solución Barth's y se colocaron los oocitos previamente separados con la línea de separación entre los hemisferios (ecuador) hacia arriba. La inyección se realizó a nivel del ecuador, posicionando el microinyector con micromanipuladores y observando estas

maniobras bajo lupa. Cada oocito se inyectó con 50 nl de solución de ARNc con concentración final entre 0,1 a 1,0 ng/nl. Para los receptores heteroméricos se puso a punto la proporción entre subunidades a inyectar para que la expresión sea eficiente (Borghese et al., 2017). Los oocitos inyectados se mantuvieron en la incubadora a 18°C en solución Barth's. En todos los casos se mantuvieron oocitos sin inyectar como controles. Los máximos niveles de expresión se lograron aproximadamente a entre las 48 a 72 hs post-inyección.

## **B. Registro electrofisiológico de las corrientes**

Las corrientes iónicas mediadas por receptores  $GABA_{A\alpha 1\beta 2\gamma 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 1\beta 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 1}$ ,  $GABA_{A\alpha 5\beta 3}$ ,  $GABA_{A\alpha 5\beta 3\gamma 2}$ ,  $GABA_{A\alpha 4\beta 3\delta}$ ,  $GABA_{A\alpha 1\beta 3}$  y  $GABA_{A\alpha 1\beta 3\delta}$  se evaluaron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Esta técnica permite evaluar la corriente iónica a través de los receptores expresados en la totalidad de la superficie de membrana del oocito, de modo que se registran corrientes macroscópicas.

### **i. Set up de registro**

El set up de registro electrofisiológico utilizado consta de: una lupa con aumento de 15 a 100X para la observación de la célula y una cámara de registro colocadas sobre una mesa anti-vibratoria, un sistema de perfusión por gravedad de soluciones acoplado a una bomba de succión con trampa de vacío, una fuente de luz con lámpara halógena y fibra óptica, un amplificador, electrodos de vidrio, un filtro de señal pasabajo, un sistema de adquisición y digitalización de señales, un osciloscopio y una jaula de Faraday (dentro de la

cual se coloca la mesa anti-vibratoria, parte del sistema de perfusión y el extremo de la fibra óptica que ilumina la preparación).

La célula se coloca en una cámara de registro, construida a partir de una placa de acrílico en la que se talló una canaleta (volumen 100  $\mu$ l), que tiene en un extremo un orificio de entrada para el sistema de perfusión y en el otro, un capilar conectado al sistema de succión. Los microelectrodos de registro se construyeron con capilares de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, New Haven, CT) estirados con el estirador PB-7 (Narishige). Una vez estirados, los capilares se llenaron con una solución de KCl (3M) y se les introdujo un alambre de plata (Ag) previamente clorurado en lavandina comercial (NaClO 55% aprox.) durante 10 min. De esta manera, el alambre actúa como un electrodo de Ag/AgCl, que permite formar la cupla redox con la solución de KCl, habilitando la continuidad eléctrica entre el amplificador y el microelectrodo de registro. La resistencia del microelectrodo se controla a través del diámetro de la punta del capilar de vidrio estirado. Se usaron microelectrodos con una resistencia entre 0,5 y 1,5 M $\Omega$ . Los microelectrodos de registro se montaron sobre cabezales (preamplificadores) con ganancias de 0,1 y 1X, conectados a un amplificador Axoclamp 2-B (Axon Instruments, Foster City, CA). Cada cabezal de registro estaba asociado a un micromanipulador (Newport Co., Irvine, CA) para el posicionamiento fino de los electrodos. La preparación se llevó a tierra utilizando un cabezal de fijación del voltaje de baño (*bath clamp headstage*), que proporciona una medición precisa de la corriente del baño al crear una tierra virtual y fijar simultáneamente el potencial del baño a cero.

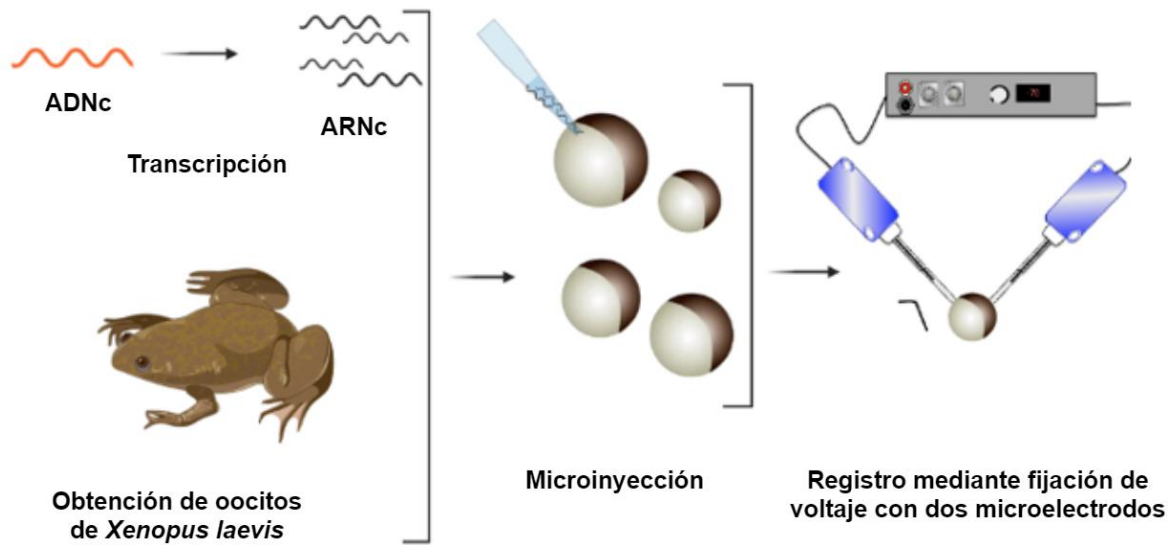
Los oocitos se colocaron en el interior de la cámara, se ubicaron las

puntas de los microelectrodos sobre la membrana celular y se bajaron lentamente hasta lograr el acceso al interior de la célula. Los oocitos se perfundieron continuamente (7-12 ml/min) con solución Ringer (NaCl 115mM; KCl 2mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8mM; HEPES 5mM, MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) 1,68mM, pH 7). Los valores normales de potencial de membrana (Vm) están comprendidos entre -20 a -60 mV. No se trabajó con oocitos con potenciales de membrana menores a -20 mV porque la corriente de *leak* (corriente de fuga) resulta muy alta en estos casos. En los oocitos de *Xenopus laevis* el potencial de equilibrio para el Cl<sup>-</sup> es de alrededor -25 mV. El potencial al que se fijó las membranas de los oocitos (Vc) fue de -70 mV para GABA<sub>A</sub>α1 y -60 mV para GABA<sub>A</sub>α1β2γ2, GABA<sub>A</sub>α1β2, GABA<sub>A</sub>α5β3, GABA<sub>A</sub>α5β3γ2, GABA<sub>A</sub>α4β3δ, GABA<sub>A</sub>α1β3 y GABA<sub>A</sub>α1β3δ. Esto determina una diferencia de potencial de alrededor de -45 a -55 mV para Cl<sup>-</sup>.

Las señales se adquirieron con un conversor analógico digital de 12 bits TL-1 DMA en una PC (486 DX2) mediante el programa Axotape o pClamp v.5.1 (Axon Instruments). Los resultados se analizaron con los programas Clampfit 8.1 (Axon Instruments) y GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

En la **Figura M4** se resume la metodología para el registro de la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>.

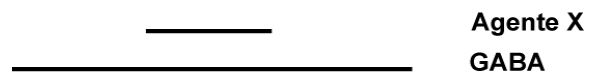


**Figura M4. Registro electrofisiológico por la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.** Los oocitos son extraídos quirúrgicamente de ranas *Xenopus laevis* y microinyectados con ARNc obtenido por transcripción *in vitro* del ADNc. 48 a 72 hs después se registraron las corrientes mediadas por los receptores expresados mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

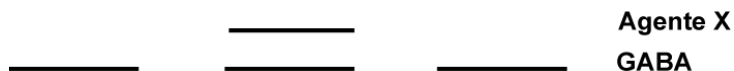
## ii. Protocolo experimental

A continuación se describirán y esquematizarán los principales protocolos ensayados durante este trabajo.

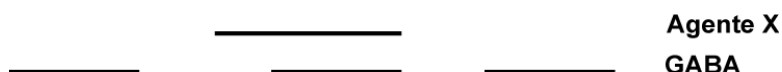
**Protocolo de aplicación *on top*.** Se aplica el agente en estudio cuando la respuesta del agonista alcanza un máximo estable.



**Protocolo de co-aplicación.** Consiste en la aplicación conjunta del agonista y el agente en estudio flanqueada por aplicaciones control del agonista. Cada aplicación está separada por lavados con solución Ringer.



**Protocolo de pre-incubación.** Se trata de un protocolo de co-aplicación que introduce un paso de pre-incubación con el agente en estudio, previo a la aplicación conjunta con el agonista.



**Protocolo de incubación.** Se realiza una incubación con el agente en estudio antes de la aplicación del agonista. Puede incluir o no un paso de lavado intermedio, de acuerdo a las características de los agentes en estudio.



Para medir la intensidad de corriente se sustrajo la corriente de base y se midió la amplitud del pico cuando la respuesta alcanzaba un máximo estable. Este análisis *off line* se realizó con el programa Clampfit 8.1.

Los porcentajes de potenciación se calcularon como  $[(I/I_{\text{control}}).100]-100$ , donde  $I$  indica la amplitud de corriente evocada a una concentración determinada de GABA en presencia del agente modulador en estudio e  $I_{\text{control}}$ , la respuesta en ausencia del modulador. Los porcentajes de inhibición se calcularon como  $100-[(I / I_{\text{control}}).100]$ .

Los receptores GABA<sub>A</sub>αβ presentan una gran sensibilidad al Zn<sup>2+</sup>. Borghese et al. (2017) reportaron que la aplicación de Zn<sup>2+</sup> (10 μM) sobre respuestas evocadas a una CE<sub>50</sub> (esto es, una concentración de agonista que evoca el 50% de la respuesta máxima) genera una inhibición del 99 ± 1 % (n=5) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α1β2, del 89 ± 2% (n=8) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α5β3 y del 85 ± 3% (n=5) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α1β3 expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. Por el contrario, los receptores GABA<sub>A</sub>αβγ/δ presentan una sensibilidad al Zn<sup>2+</sup> reducida. La aplicación de Zn<sup>2+</sup> (10 μM) sobre respuestas evocadas a una CE<sub>50</sub> genera una inhibición del 9 ± 4% (n=7) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α1β2γ2, del 29 ± 6% (n=8) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α5β3γ2, del 35 ± 1% (n=4) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α1β3δ y del 31 ± 6% (n=5) de la respuesta en receptores GABA<sub>A</sub>α4β3δ. En receptores GABA<sub>A</sub> triméricos, la reducción en la sensibilidad al Zn<sup>2+</sup> indica que la tercera subunidad (γ o δ) se expresó e incorporó en dichos receptores. En este trabajo, para controlar la incorporación de la subunidad γ en los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2γ2 y GABA<sub>A</sub>α5β3γ2 y de la subunidad δ en los receptores GABA<sub>A</sub>α1β3δ y GABA<sub>A</sub>α4β3δ, se evaluó el efecto de la aplicación de Zn<sup>2+</sup> (10 μM) sobre las respuestas evocadas a una CE<sub>50</sub> (Borghese et al., 2017).

### **C. Medición de permeabilidad osmótica del agua**

Para realizar estas mediciones se estableció una colaboración con el grupo de investigación liderado por la Dra. Karina Allewa, especialista en el estudio de la estructura, función y regulación de los canales de agua o

acuaporinas. El objetivo fue poner a punto la expresión conjunta en oocitos de un tipo particular de acuaporina permeable a  $H_2O_2$  y receptores  $GABA_A$ . Nuestros colaboradores produjeron ARNc linealizado de acuaporinas correspondientes a *Medicago Truncatula* PIP2,2 (MtPIP2,2) y clonaron el ADNc correspondiente en el vector pCR™8/GW/TOPO® (Thermofisher, USA). Este plásmido se linealizó con extremos 3' de timidina para la ligación directa de productos de PCR amplificados con la enzima Taq polimerasa. Para determinar la correcta expresión y funcionamiento de las acuaporinas, se realizaron una serie de procedimientos en el laboratorio de la Dra. Alleva, los cuales se detallan a continuación.

El estudio de la actividad de las acuaporinas requiere de metodologías que permitan evaluar su capacidad de transporte de agua. Para ello, se expresaron las acuaporinas MtPIP2,2 en oocitos que luego fueron sometidos a un gradiente osmótico. Esto permite estudiar el movimiento transmembranal de agua, facilitado por acuaporina. Para caracterizar el transporte de acuaporinas se utiliza el coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf), parámetro que estima la actividad de transporte de agua desde un punto de vista macroscópico, es decir de la membrana como un todo, y no a nivel de un canal individual. El parámetro Pf se deriva de las ecuaciones propuestas por Kedem & Katchalsky (1958) y Katchalsky & Curran (1965). La permeabilidad osmótica al agua de una membrana indica la facilidad que tienen las moléculas de agua para atravesar dicha membrana, impulsadas por un gradiente osmótico. Para evaluar el cambio de volumen que sufren los oocitos ante un gradiente osmótico, estos se transfieren desde el medio Ringer (200 mOsmol  $Kg^{-1}$ ) a una dilución 1/3 del mismo (66,66 mOsmol  $Kg^{-1}$ ). El cambio de volumen es

monitoreado mediante un sistema de video-microscopía compuesto por una cámara de video conectada a una lupa (Leica L2; Leica, Wetzlar, Alemania). El sistema es programado para capturar imágenes secuenciales. Las imágenes obtenidas muestran al oocito en un plano bidimensional, por lo tanto, se visualiza un área circular, y es a partir del análisis de estas áreas que se infieren los volúmenes celulares utilizando un programa comercial (Image J, versión 1.37). Los valores de volúmenes relativos al volumen inicial del oocito se grafican en función del tiempo transcurrido respecto a la primera imagen ( $t=0$ ). Utilizando regresión lineal, se calcula el valor de la pendiente ( $dV/dt$ ) que permite calcular el coeficiente de permeabilidad osmótica de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Pf = V_0 (dv/dt) / S \times V_a \times (\Delta Osm)$$

Donde:

$V_0$  es el volumen inicial del ovocito ( $9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$ )

$S$  es la superficie inicial del oocito ( $4.5 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ )

$V_a$  es el volumen molar parcial del agua ( $18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ )

$\Delta Osm$  es la diferencia de osmolaridad entre el interior (considerada como la osmolaridad de la solución en la que se mantuvo al oocito hasta el momento del experimento,  $200 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ) y el exterior del oocito. En estos experimentos se empleó la misma solución diluída 3 veces respecto de la solución en la que fue mantenido el oocito, i.e.  $40 \text{ mOsm kg}^{-1}$ . Como control negativo se utilizaron oocitos sin inyectar.

#### **D. Drogas utilizadas**

Las drogas y sales se adquirieron en Sigma-Aldrich y Merck. La

colagenasa fue adquirida por Worthington Biochem Corporation (Lakewood, NJ, USA).

Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de realizarse el experimento. Siempre se controló de manera estricta el pH de las soluciones, ajustándose de ser necesario a 7,0 con NaOH (1 M).

### **E. Análisis estadístico**

Cuando se compararon sólo dos poblaciones de datos, la evaluación estadística se realizó mediante el test t de Student de dos colas. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante ANOVA de un factor, seguida del Test de Tukey. En todos los casos se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ . Los ajustes de las curvas y los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 5.0. Cada valor de media informada se obtuvo a partir de resultados de experimentos realizados en oocitos de al menos dos ranas distintas. Los errores se expresaron como los errores estándares de la media (SEM).

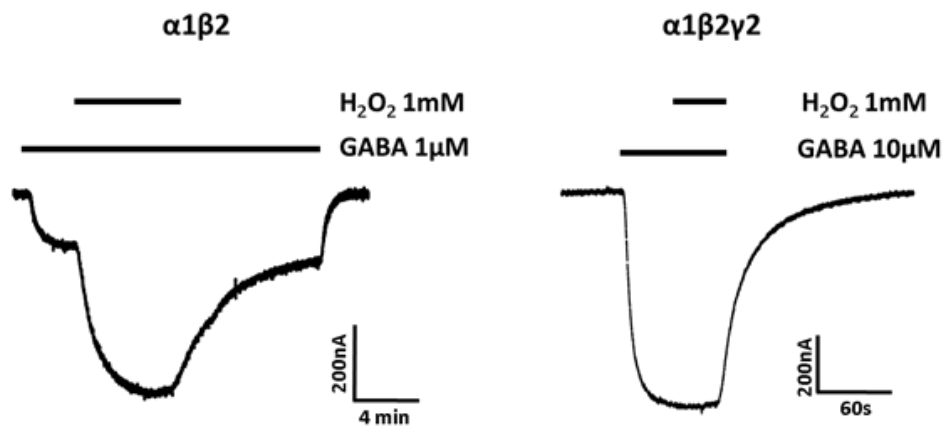
## RESULTADOS

### A. Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 y GABA<sub>A</sub>α1β2γ2.

Las ROS, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), al anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) son moléculas altamente reactivas, que se producen durante el metabolismo celular. Con el propósito de determinar si las ROS también son capaces de modular la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> heteroméricos, y en base a lo reportado previamente para los receptores GABA<sub>A</sub>p1 homoméricos, se evaluaron los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 y GABA<sub>A</sub>α1β2γ2.

Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros colegas, mediante el empleo de diversos agentes moduladores de los receptores GABA<sub>A</sub> de naturaleza química variada, demostraron que a menor concentración de agonista los efectos modulatorios eran mayores (Calero & Calvo, 2008; Calero et al., 2011; Gasulla et al., 2012; Beltrán González et al., 2014). Teniendo en cuenta estas observaciones y las concentraciones efectivas (CE) de GABA para cada subtipo de receptor, se escogieron las concentraciones de GABA correspondientes para estos ensayos, a saber 0,3μM para los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 y 10μM para el caso de los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2γ2. Estas concentraciones de GABA producen respuestas menores al 10% del valor máximo (CE<10) y ofrecen una ventaja adicional, desde un punto de vista técnico, ya que en ese rango el GABA induce corrientes que no presentan desensibilización por agonista y se mantienen estables por períodos prolongados. Al prevenir de este modo la caída de la respuesta en registros

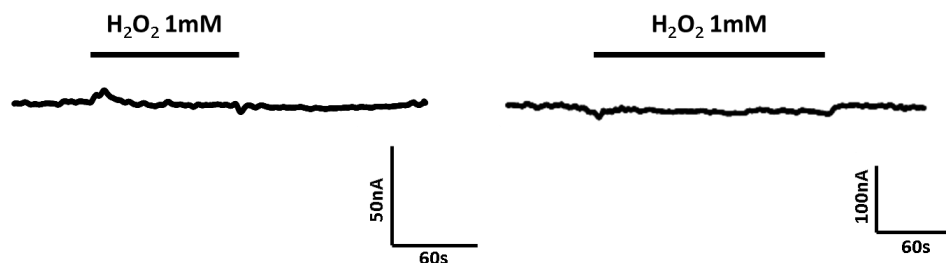
sucesivos, se elimina un factor que incrementa significativamente la variabilidad experimental, de este modo se reduce el error estándar y, por lo tanto, el número de ensayos necesarios para llegar a criterio. Por otro lado, trabajos previos del laboratorio indicaron que la máxima concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aceptable, es decir aquella que no daña o perjudica las propiedades de la membrana del oocito, es de 3mM (Beltrán González et al., 2014). Es preciso señalar que las respuestas mediadas por los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$  se bloquean por el catión divalente  $\text{Zn}^{2+}$  (10 $\mu\text{M}$ ) (Prichett et al. 1989; Draguhn et al. 1990; Smart et al. 1991), mientras que las mediadas por los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2\gamma 2$  muestran una sensibilidad significativamente menor en presencia de este catión divalente. Esta diferencia de sensibilidad permite utilizar al  $\text{Zn}^{2+}$  como herramienta farmacológica para corroborar experimentalmente la presencia de la subunidad  $\gamma 2$ , en los receptores expresados en la membrana del oocito. De este modo, se planearon experimentos control, realizando aplicaciones de  $\text{Zn}^{2+}$  (10 $\mu\text{M}$ ) sobre el máximo estable de las respuestas del receptor  $\text{GABA}_{\text{A}}$  (protocolo denominado *on top*). La **Figura R1 A** ilustra un trazo representativo de la corriente evocada por GABA (1 $\mu\text{M}$ ) sobre los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se aplicó a través del baño de perfusión, en el momento en que la respuesta del agonista alcanzaba un máximo estable. La presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) potenció significativamente la respuesta mediada por GABA (1 $\mu\text{M}$ ). La **Figura R1 B** ilustra un registro representativo de la corriente evocada por GABA (10 $\mu\text{M}$ ) en un oocito que expresa receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2\gamma 2$ . Puede apreciarse que durante la aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se modificó la respuesta al GABA.



**Figura R1. Efectos del  $H_2O_2$  sobre la actividad de los receptores  $GABA_A\alpha 1\beta 2$  y  $GABA_A\alpha 1\beta 2\gamma 2$ .** Trazos representativos de las respuestas evocadas por GABA ( $CE < 10$ ) durante la aplicación *on top* de  $H_2O_2$ . Las aplicaciones del modulador y del ligando se ilustran mediante barras horizontales.

Los resultados sugieren que la presencia de la subunidad  $\gamma 2$  confiere a los receptores  $GABA_A$  expresados una marcada insensibilidad al  $H_2O_2$ . Esta observación es consistente con publicaciones previas, donde se examinaron los efectos de otros agentes farmacológicos redox, ej: reactivos de tioles, sobre este mismo tipo de receptores (Amato et al., 1999). Se realizaron también controles en paralelo, para confirmar que la potenciación observada se debiera exclusivamente a los efectos del tratamiento con  $H_2O_2$  sobre los receptores  $GABA_A\alpha 1\beta 2$ , y no a acciones inespecíficas sobre la membrana del oocito. Para esto se hicieron aplicaciones de 1 ó 3 mM  $H_2O_2$ , en ausencia de GABA, sobre oocitos inyectados con los ARN codificantes para las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 2$  y se registró electrofisiológicamente la línea de base para observar si ocurrían alteraciones. De este modo, se corroboró que el  $H_2O_2$  no tenía efectos per sé que pudieran alterar la interpretación de los resultados. Las aplicaciones de  $H_2O_2$  en ausencia de GABA no tuvieron efectos apreciables sobre la línea de base, tanto en oocitos inyectados ( $\alpha 1/\beta 2$ ) como no inyectados, indicando que el agente oxidante utilizado no afecta

significativamente las propiedades intrínsecas de membrana, por ejemplo, a canales endógenos, u otras proteínas nativas o la bicapa lipídica, etc.

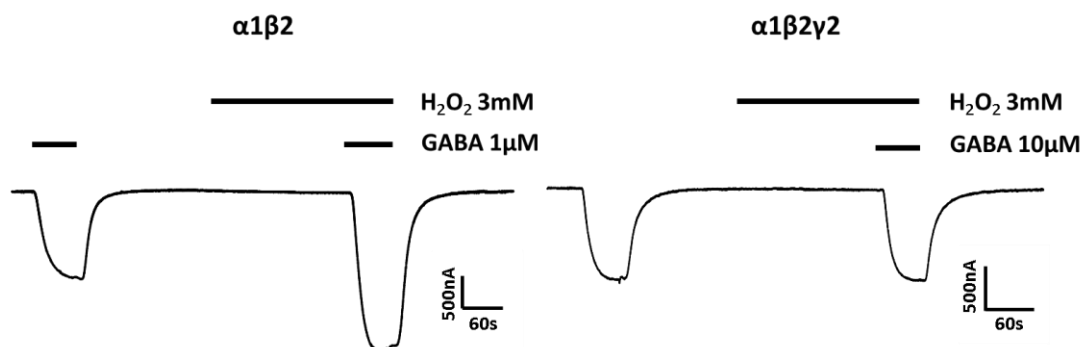


**Figura R2. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no tiene efectos apreciables sobre la línea de base.** Aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) sobre la línea de base de registro en oocitos no inyectados (izquierda) y ovocitos inyectados con ARN codificantes para el receptor  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$  (derecha).

Luego se procedió a caracterizar más detalladamente el efecto modulador del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$ . Se observó que la cinética de las respuestas evocadas por GABA, durante la aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , fue significativamente más lenta que la de su contraparte control, es decir, alcanzaba un máximo estable más tardíamente. Tal como se indicó previamente en estudios de nuestro laboratorio (Beltrán González et al., 2014), un curso temporal de acción lento podría ser, en principio, compatible con un mecanismo de acción intracelular del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donde el desarrollo del proceso de potenciación de las respuestas mediadas por los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$  podría verse limitado por la velocidad de permeación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la membrana plasmática. En función de lo anteriormente descrito, se planearon experimentos para establecer cuantitativamente el curso temporal de acción del  $\text{GABA}_{\text{A}}$ . Para realizar estos experimentos fue necesario tener en cuenta

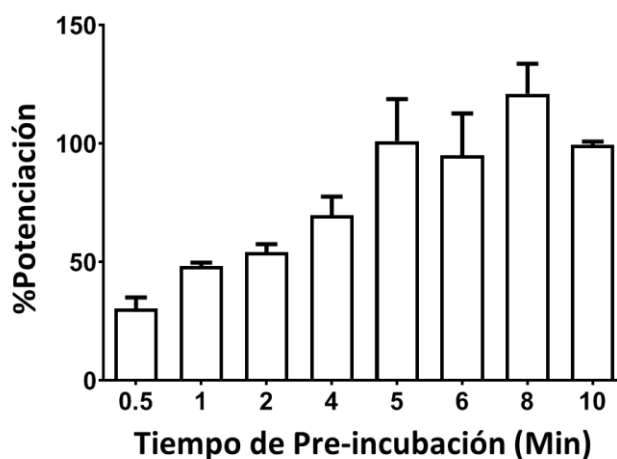
también algunas de las propiedades biofísicas que caracterizan a estos canales activados por ligando.

Los receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 sufren un proceso de desensibilización muy marcado si se los expone al agonista durante períodos prolongados de tiempo, que se evidencia como un decaimiento de la respuesta durante la estimulación con GABA. La magnitud de la desensibilización depende fuertemente de la concentración de GABA, siendo más pronunciada a mayor concentración de agonista. Con el fin de obtener respuestas al GABA cuyo pico, o meseta, se mantuviera estable, se utilizaron concentraciones de GABA que no produjeran más de un 10% de la respuesta máxima (que se obtiene a concentraciones saturantes de GABA), y se redujo lo máximo posible el tiempo de aplicación del agonista. Para lograr estas condiciones se empleó un protocolo de pre-incubación, que consiste de una aplicación inicial de GABA que representa el experimento control, para luego iniciar la pre-incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luego de que la respuesta al GABA ya se ha lavado totalmente y el registro se estabilizó en su línea de base. Finalmente, se aplicaron GABA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conjuntamente. Como se observa en la **Figura R3**, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM) potenció las respuestas de los receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 pero no las de GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2.



**Figura R3. Efectos del  $H_2O_2$  sobre la actividad de los receptores  $GABA_A\alpha1\beta2$  y  $GABA_A\alpha1\beta2\gamma2$ .** Trazos representativos de las respuestas evocadas por GABA ( $CE < 10$ ) antes y después de la pre-incubación con  $H_2O_2$  (3mM). Las aplicaciones de modulador y ligando se ilustran mediante barras horizontales.

De esta manera, se realizó una curva de potenciación de las respuestas  $GABA_A\alpha1\beta2$  en función del tiempo de pre-incubación con  $H_2O_2$  (**Figura R4**) y se determinó el tiempo de pre-incubación necesario para obtener un máximo estable de potenciación que resultó ser de 5 minutos.

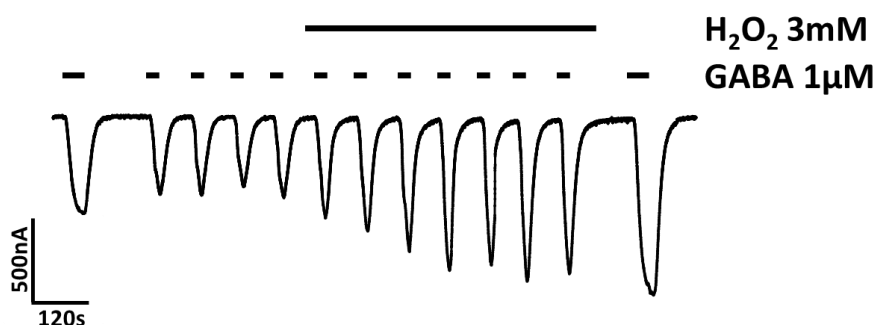


**Figura R4: La potenciación de las corrientes mediadas por los receptores  $GABA_A\alpha1\beta2$  en presencia de  $H_2O_2$  varía según el tiempo de pre-incubación con este modulador.** Curva de porcentaje de potenciación de las respuestas  $GABA_A\alpha1\beta2$  en función del tiempo de pre-incubación con  $H_2O_2$  (3mM). Cada barra representa la media y el SEM.

| Tiempo de Pre-incubación | %Potenciación | N |
|--------------------------|---------------|---|
| 0,5                      | 30,3 ± 4,6    | 4 |
| 1                        | 48,1 ± 1,5    | 4 |
| 2                        | 54,0 ± 3,5    | 3 |
| 4                        | 69,7 ± 7,8    | 3 |
| 5                        | 101,0 ± 17,8  | 5 |
| 6                        | 95,0 ± 17,7   | 3 |
| 8                        | 121,0 ± 12,7  | 3 |
| 10                       | 99,3 ± 1,5    | 3 |

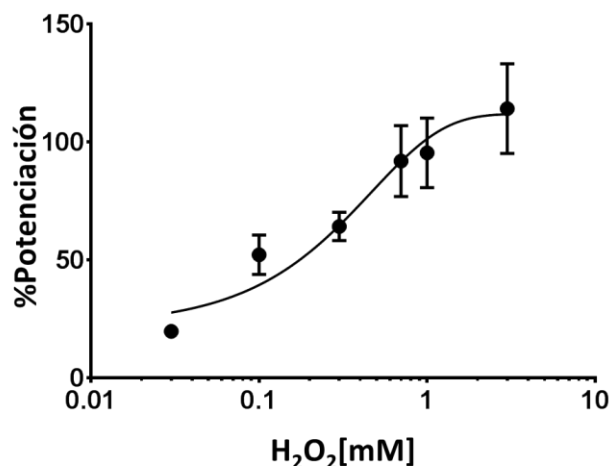
**Tabla R1.** Porcentaje de potenciación de las respuestas evocadas por GABA (0,3 $\mu$ M) luego de la pre-incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM) durante el tiempo indicado. Se informa la media, el SEM y el número de réplicas de las respuestas obtenidas.

Para corroborar el resultado anterior se utilizó otro esquema experimental, que consta de aplicaciones múltiples sucesivas de GABA (1 $\mu$ M) de 20 segundos de duración, en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM) (**Figura R5**). Como vimos, las aplicaciones de GABA de corta duración no produjeron desensibilización de los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2. Para este experimento se eligió una concentración de 1 $\mu$ M GABA, ya bajo estas condiciones existe una relación óptima entre la velocidad de apertura de los canales iónicos, que es el evento molecular subyacente que da forma a la corriente iónica, y el proceso de desensibilización por agonista, que va en dirección opuesta y hace que la respuesta vaya decayendo en amplitud. La **Figura R5** permite observar el efecto potenciador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a medida que progresa, hasta alcanzar un valor máximo estable, alrededor de los 5 minutos, ratificando el resultado que se había obtenido previamente (**Figura R4**). En base a esto, de aquí en más, para los experimentos que involucraron una pre-incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se fijó una duración mínima de 5 minutos.



**Figura R5.** Curso temporal de la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante aplicaciones múltiples de GABA en receptores GABA<sub>A</sub>α1β2. Trazo representativo de las respuestas evocadas por aplicaciones múltiples de GABA (1 μM) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM).

Para evaluar si el grado de potenciación de las respuestas GABA<sub>A</sub>α1β2 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era dependiente de la dosis, determinando una clásica relación dosis-respuesta, se expuso a los oocitos a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de cada una de las aplicaciones de GABA (0,3 μM), como se ilustra en la **Figura R6**. Debido a que por encima de 3 mM el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce daño a la membrana, por ejemplo, incrementa enormemente las corrientes de fuga, se hizo imposible estabilizar de rutina la fijación del voltaje en estos ensayos. Por este motivo, no se examinaron concentraciones mayores. De aquí en más, las aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizaron a una concentración de 1 mM, ya que a esta dosis se produce una marcada potenciación de la actividad de los receptores y a la vez la célula se mantiene lo suficientemente alejada del límite de toxicidad.



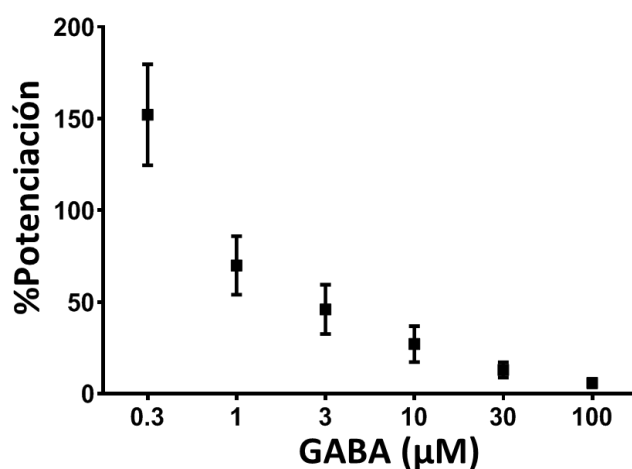
**Figura R6.** Magnitud de la potenciación de las respuestas mediadas por GABA<sub>A</sub>α1β2 en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incremento de las respuestas evocadas por GABA (0,3μM) en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM). Los valores de potenciación se normalizaron, en relación a la amplitud de la respuesta control de GABA. Cada punto representa la media y SEM.

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]mM | %Potenciación | N |
|------------------------------------|---------------|---|
| 0,03                               | 19,8 ± 1,6    | 5 |
| 0,1                                | 52,2 ± 8,3    | 4 |
| 0,3                                | 64,2 ± 6,0    | 7 |
| 0,7                                | 92,0 ± 15,1   | 4 |
| 1                                  | 95,5 ± 14,7   | 4 |
| 3                                  | 114,2 ± 19,0  | 6 |

**Tabla R2.** Porcentaje de potenciación de las respuestas GABA<sub>A</sub>α1β2, evocadas por GABA (0,3μM), en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se informa la media, el SEM y el número de réplicas de las respuestas obtenidas.

Se estudió además si la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las respuestas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 dependía de la concentración de agonista, evaluando el efecto de una pre-incubación de 5 min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) a distintas concentraciones de GABA. La potenciación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las

respuestas evocadas por GABA 1 $\mu$ M fue significativamente menor que la obtenida a GABA 0,3 $\mu$ M, sugiriendo que el efecto depende fuertemente de la concentración de agonista (**Figura R7**). Esta relación proporcional inversa, donde la potenciación por el agente redox disminuye si aumenta la concentración de agonista, es un evento que fue observado previamente para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros moduladores redox, actuando sobre los receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 (Calero & Calvo, 2008; Beltrán González et al., 2014).

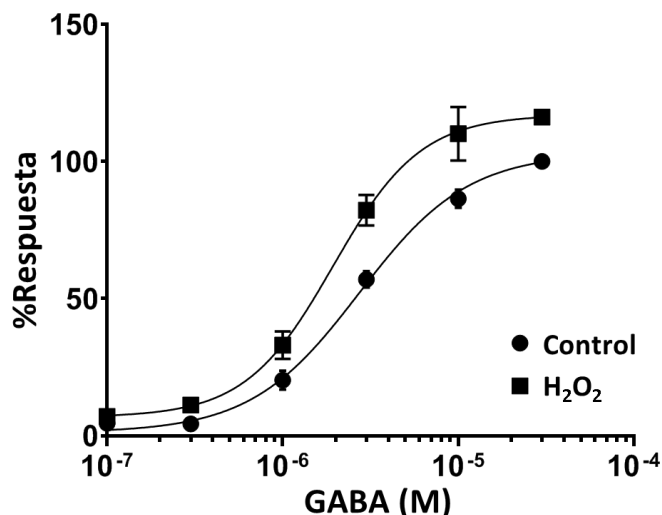


**Figura R7. Potenciación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las respuestas mediadas por GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en función de la concentración (creciente) de GABA.** Potenciación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) sobre las respuestas de los receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 a concentraciones de GABA crecientes. Los valores de potenciación se normalizaron a la amplitud de la respuesta control de GABA. Cada punto representa la media y SEM de las respuestas obtenidas.

| [GABA] $\mu$ M | %Potenciación    | N  |
|----------------|------------------|----|
| 0,3            | 152,1 $\pm$ 27,5 | 10 |
| 1              | 69,9 $\pm$ 15,9  | 8  |
| 3              | 45,9 $\pm$ 13,4  | 6  |
| 10             | 27,0 $\pm$ 9,7   | 7  |
| 30             | 12,9 $\pm$ 4,1   | 35 |
| 100            | 5,7 $\pm$ 2,2    | 6  |

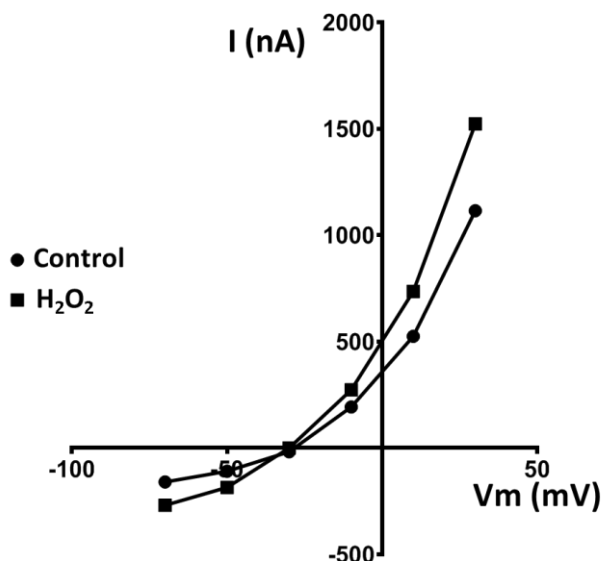
**Tabla R3.** Porcentaje de potenciación de las respuestas GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) en función de la concentración de agonista. Se informa la media y SEM y el número de réplicas de las respuestas obtenidas.

Posteriormente se realizaron curvas C-R, para caracterizar la naturaleza de la potenciación de las respuestas GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2. Para ello, se ensayaron concentraciones crecientes de GABA, en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM). Como se ilustra en la **Figura R8**, la curva C-R sufrió un desplazamiento hacia la izquierda por acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que fue concomitante con un incremento significativo de las corrientes máximas ( $CE_{50} \text{ GABA}=2,7$  (2,4 a 3,0)  $\mu$ M,  $nH=1,46\pm0,12$ ;  $CE_{50} \text{ GABA+H}_2\text{O}_2=1,9$  (1,5 a 2,4)  $\mu$ M,  $nH=1,85\pm0,38$ ,  $P<0,001$ ). El desplazamiento de la curva hacia la izquierda sugiere un aumento de la afinidad aparente del receptor GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 por el agonista. Es decir, para obtener el mismo porcentaje de respuesta se requirió una menor concentración de GABA. En tanto, el incremento de la respuesta máxima sería compatible con una mayor probabilidad de apertura de los canales en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura R8. Curva C-R para GABA en ausencia (●) y presencia (■) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM).** Las amplitudes de las respuestas están normalizadas a la corriente máxima evocada por aplicación de GABA (30μM) (respuesta máxima). Cada punto representa la media y el SEM de las respuestas obtenidas.

Luego se procedió a calcular las relaciones I-V, de las respuestas evocadas por GABA (0,3μM) mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>α1β2, en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM). De esta forma se pudo comprobar que la modulación ejercida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es independiente del voltaje, ya que el porcentaje de potenciación respecto del valor control no se alteró en ninguno de los puntos experimentales (**Figura R9**). En la curva I-V también puede verse que el potencial de reversión de la corriente iónica no sufrió cambios con el tratamiento, indicando que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no afectaría significativamente las concentraciones iónicas intracelulares y la permeabilidad del canal iónico.



**Figura R9. La modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es independiente del voltaje.** Curva I-V de las respuestas evocadas por GABA (0,3  $\mu$ M), sobre los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM), no muestran una modificación en el potencial de reversión.

## B. Estudio del mecanismo de acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2

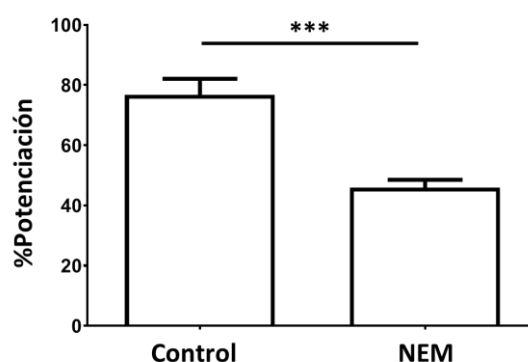
Varios canales iónicos son sensibles a la modulación redox producida por modificación química, por ejemplo, a través de la oxidación o reducción de residuos de cisteína. Estudios previos demostraron que agentes reductores y oxidantes de tioles actúan como moduladores de la función de receptores GABA<sub>A</sub> (Amato et al., 1999; Pan et al., 2000; Calero et al., 2011; Beltrán González et al., 2014). Para evaluar la posible participación de cisteínas en la modulación ejercida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas mediadas por receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2, se estudiaron los efectos de este agente oxidante en presencia y ausencia de un compuesto que modifica irreversiblemente los grupos tioles de las cisteínas, la N-etilmaleimida (NEM). NEM es un agente alquilante, de acción irreversible, capaz de atravesar la membrana plasmática de la célula, que forma enlaces covalentes con grupos sulfhidrilos libres de manera selectiva,

previniendo cualquier reacción química ulterior en esos sitios (a pH 7) (Means & Feeney, 1971; Susankova et al., 2006). Dada la estabilidad y reproducibilidad de la reacción, el NEM fue extensamente utilizado, por ejemplo, para caracterizar la modulación por agentes redox mediada por cisteínas en receptores neuronales, en neuronas en cultivo (Kim et al., 1999; Lipton et al., 1993; Tang & Aizenman, 1993), preparaciones de retina (Pan et al., 1995) y sistemas heterólogos de expresión (Chu et al., 2006; Calero et al., 2011; Beltrán González et al., 2014).

En primer lugar, se realizó una serie de ensayos preliminares incubando a los oocitos durante 2 minutos con NEM 300 $\mu$ M antes de realizar la pre-incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) y luego examinar su efecto sobre las respuestas al GABA. Este protocolo, utilizado previamente en nuestro laboratorio, permitió caracterizar con éxito la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA $\alpha$ 1, pero fue necesario validarlo para los experimentos que involucraron a los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2. Si bien el tratamiento con NEM produjo una leve reducción del efecto modulador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 evocadas por GABA (1 $\mu$ M) (%P<sub>control</sub>=62,4 $\pm$ 11,2; %P<sub>NEM</sub>=38,3 $\pm$ 9,0; n=4; *ns* P=0,15), (ver **Tabla R3**), ésta no llegó a ser estadísticamente significativa.

Cada subunidad p1 contiene en total tres cisteínas, dos extracelulares que forman el *Cys-loop*, y una intracelular ubicada en el linker que conecta al dominio transmembrana TM3 con el TM4. Es decir que cada homómero GABA $\alpha$ 1 contiene cinco cisteínas libres intracelulares y diez extracelulares comprometidas en los cinco *Cys-loops*. Estudios previos del laboratorio mostraron que únicamente las cisteínas intracelulares están involucradas en los efectos modulatorios del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA $\alpha$ 1 (Beltrán

González et al., 2014). Por su parte, los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 contienen un mayor número de residuos de cisteína que los GABA $\alpha$ 1. En efecto, la subunidad  $\alpha$ 1 posee cuatro, dos extracelulares que forman el *Cys-loop*, una en el TM1 y otra en el TM3, pero ninguno intracelular. En tanto, la subunidad  $\beta$ 2 posee tres cisteínas, dos extracelulares que conforman el *Cys-loop*, y una en el TM3 y tampoco porta residuos intracelulares. Dado el mayor número de residuos de cisteína presentes en el receptor GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2, se decidió modificar el protocolo anterior, con la intención de garantizar la alquilación de todos grupos sulfidrilos accesibles, lo que resulta imprescindible para obtener registros de corrientes estables y reproducibles. Los oocitos se trataron esta vez con el agente alquilante NEM (300 $\mu$ M) durante 10 min, antes de realizar la pre-incubación de 5 min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM), y de la correspondiente aplicación posterior de GABA (1 $\mu$ M). En la **Figura R10** se observa que el tratamiento con NEM previno parcialmente el efecto potenciador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 (%P<sub>control</sub>=76,7 $\pm$ 5,3; %P<sub>NEM</sub>=45,9 $\pm$ 2,6; n=6; P<0,001) indicando la participación de una o más cisteínas en la modulación.

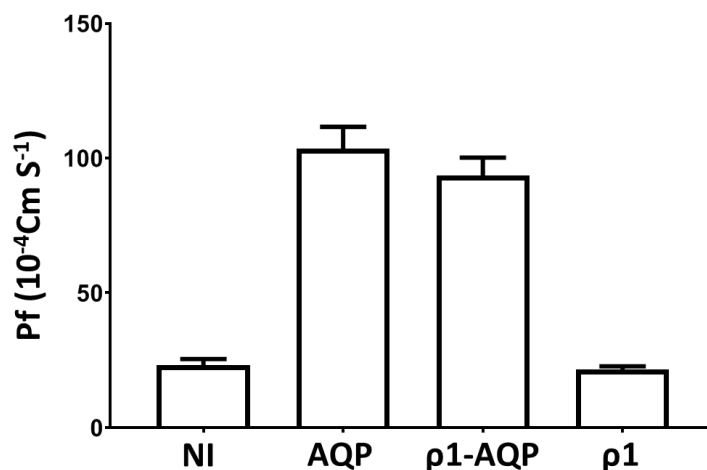


**Figura R10. Residuos de cisteínas estarían involucrados en la modulación de las respuestas GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Porcentaje de potenciación de las respuestas evocadas por GABA 1 $\mu$ M en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM), luego de la incubación con NEM (300 $\mu$ M) durante 10 minutos.

Como se describió anteriormente, la cisteína única localizada en el dominio intracelular de los receptores GABA<sub>A</sub>p1 tiene un rol clave para la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Beltrán González et al., 2014). En aquel caso se observó que la modulación tenía una cinética lenta y requería de largos tiempos de exposición, para que el agente oxidante alcance el efecto máximo a una concentración dada. La similitud en el curso temporal de acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA<sub>A</sub>1β2 podría indicar que algún paso de la modulación tenga lugar también en el compartimiento intracelular. Sin embargo, esta posibilidad evidentemente no implicaría la oxidación de una cisteína, ya que como hemos dicho anteriormente los dominios intracelulares de los receptores GABA<sub>A</sub>1β2 no contienen este tipo de residuos aminoacídicos. Para evaluar este punto, se diseñaron experimentos de inyección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el citoplasma de los oocitos, para lo cual fue necesario en una primera etapa poner a punto el protocolo de inyección, utilizando una pico-bomba. Para ello, se emplearon oocitos que expresaban el receptor GABA<sub>A</sub>p1, donde la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya había sido extensamente caracterizada. El volumen de solución a inyectar se midió utilizando una lupa cuyo ocular portaba un micrómetro, y el rango de volúmenes se graduó entre los 20 y los 70nL. Las inyecciones intracelulares se realizaron sobre la meseta de las respuestas (*on top*) o inmediatamente antes de la aplicación de GABA (0,5μM, 1μM y 10μM). Dada la diferencia entre el volumen inyectado y el volumen de la célula, se calculó que la concentración de la solución inyectada se diluye al menos en un orden de magnitud. Por tal motivo, se decidió inyectar concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 100, 200 y 300mM. Solo se observaron cambios apreciables en las respuestas a GABA al inyectar volúmenes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 70nL, independientemente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

utilizada. En ensayos en los que se inyectó agua o HEPES (pH=7) como control se observó la misma modificación en las respuestas evocadas por GABA. Por lo tanto, los efectos observados podrían deberse a cambios en las propiedades fisicoquímicas de los oocitos como, por ejemplo, las concentraciones iónicas internas, ya que el volumen de la inyección representa un volumen equivalente al 10% del volumen celular. Debido a las limitaciones experimentales descritas, se decidió no seguir adelante con este protocolo.

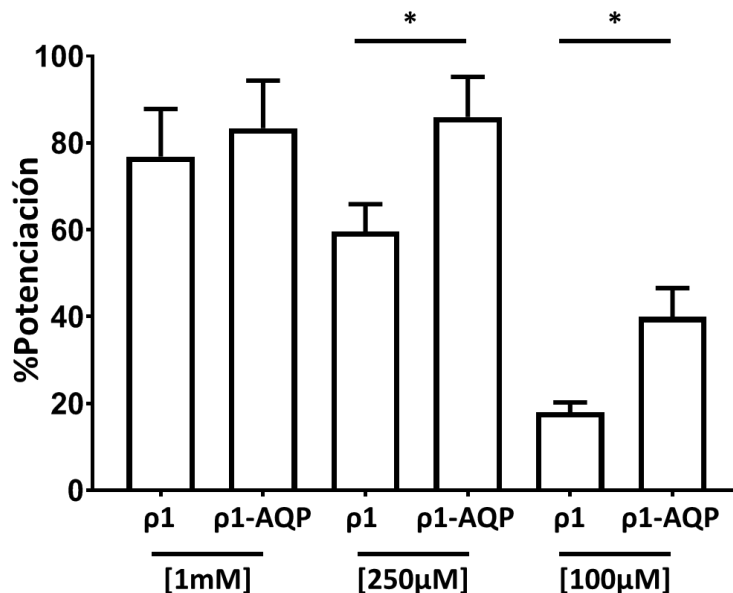
Procurando encontrar un método alternativo que permitiera analizar si las acciones del  $H_2O_2$  sobre los receptores  $GABA_{A\alpha 1\beta 2}$  involucran un mecanismo de acción en el cual el agente actúa desde el compartimiento intracelular, se diseñó un ensayo de expresión conjunta con acuaporinas, en particular la acuaporina de MtPIP2,2. Las acuaporinas son proteínas de membrana permeables al agua, la MtPIP2,2 además tiene la capacidad de permear  $H_2O_2$  (Hooijmaijers et al., 2012; Jozefkiewicz et al., 2015), de modo que se la utilizó para facilitar el flujo del agente oxidante al interior de la célula. Para controlar que la acuaporina MtPIP2,2 se expresara conjuntamente con los receptores  $GABA_{A\alpha 1}$  se realizaron ensayos de “hinchazón” o “swelling” (**Figura R11**) de la siguiente manera. Luego de colocar los oocitos en una solución hipoosmótica, se midió el aumento de volumen a lo largo de un minuto y se determinó el coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf). El aumento de la permeabilidad indica que la expresión de acuaporinas en membrana se hizo efectiva, con la correspondiente facilitación del pasaje del agua al interior celular.



**Figura R11: Determinación de la permeabilidad de la membrana plasmática de los oocitos al agua.** Determinación de la permeabilidad osmótica (Pf) en oocitos: no inyectados (NI); inyectados solo con acuaporina MtPIP2,2 (AQP); inyectados solo con GABA<sub>Ap</sub>1 (p1); inyectados con ambos mRNA (p1-AQP).

Posteriormente se realizaron experimentos para determinar si el incremento de la permeabilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era concomitante con cambios efectivos en la potenciación de la respuesta del receptor al GABA. La **Figura R12** ilustra el grado de potenciación de las respuestas mediadas por los receptores GABA<sub>Ap</sub>1, expresado como porcentaje, que se obtuvo luego de la aplicación de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CE<sub>5-10</sub>) en oocitos que expresaban receptores GABA<sub>Ap</sub>1 (control), y en oocitos que expresaban receptores GABA<sub>Ap</sub>1 conjuntamente con la acuaporina MtPIP2,2 (p1-AQP). Estos ensayos inicialmente se llevaron a cabo a una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) y no se observaron diferencias significativas. En base a eso, se especuló con que el influjo del agente oxidante, facilitado por las acuaporinas, podría resultar insignificante respecto al influjo por difusión simple. Por ese motivo se decidió disminuir la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al reducir la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se reveló una potenciación bastante más marcada en los oocitos que expresaban las acuaporinas (p1-AQP), con respecto a su

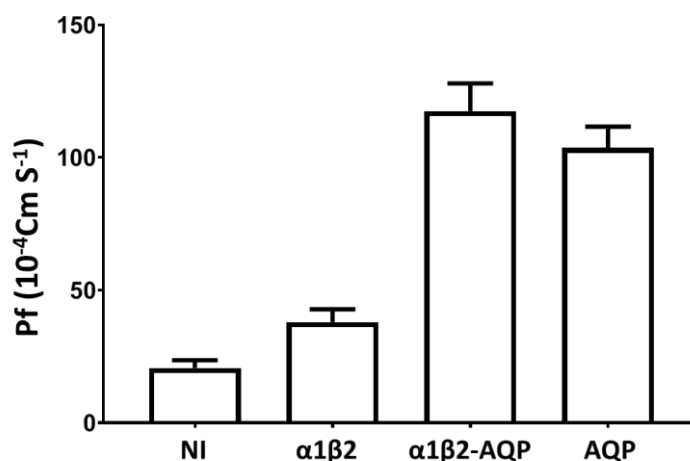
contraparte control (solo  $\rho 1$ ), tanto a  $250\mu\text{M}$  ( $\%P_{\rho 1}=59,6\pm 6,2$ ;  $\%P_{\rho 1\text{-AQP}}=85,9\pm 9,2$ ;  $n=7$ ;  $P<0,05$ ), como a  $100\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\%P_{\rho 1}=17,9\pm 2,2$ ;  $\%P_{\rho 1\text{-AQP}}=39,9\pm 6,6$ ;  $n=5$ ;  $P<0,05$ ).



**Figura R12:** El aumento en la permeabilidad de la membrana al  $\text{H}_2\text{O}_2$  inducido por la acuaporina MtPIP2,2 incrementa el efecto potenciador de este agente sobre la actividad de los receptores  $\text{GABA}_{\text{Ap}1}$ . Porcentaje de potenciación de las respuestas mediadas por  $\text{GABA}_{\text{Ap}1}$  obtenidos para las diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas (\*  $P < 0,05$ ), en presencia o ausencia de acuaporina MtPIP2,2 (AQP).

Los resultados obtenidos permitieron validar la técnica empleada y el experimento descrito representó un control positivo para los siguientes ensayos. De tal modo, se replicó la estrategia utilizando esta vez oocitos que expresaban al receptor  $\text{GABA}_{\text{A}\alpha 1\beta 2}$  como control. Como se puede observar en la **Figura R13**, el grupo que expresaba conjuntamente a los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}\alpha 1\beta 2}$  y la MtPIP2,2 exhibe niveles de permeabilidad osmótica mayores que el grupo que no expresa la acuaporina. Las diferencias observadas entre la columna correspondiente a la expresión de receptores  $\text{GABA}_{\text{A}\alpha 1\beta 2}$  exclusivamente versus el grupo no inyectado, se explica por ligeros artefactos

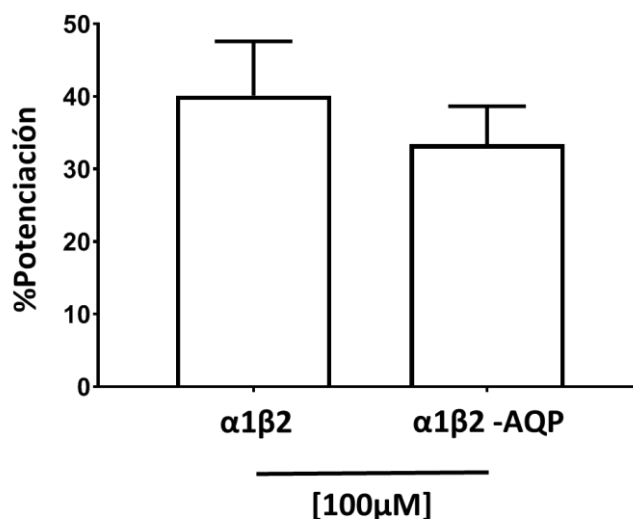
mecánicos de la membrana producidos por la inyección. No se observaron diferencias significativas en la Pf entre los grupos,  $\alpha 1\beta 2$ -AQP vs.  $\rho 1$ -AQP ( $Pf_{\alpha 1\beta 2\text{-AQP}} = 117,5 \pm 10,4$ ;  $Pf_{\rho 1\text{-AQP}} = 93,6 \pm 6,5$ ;  $n=11$ ; *ns*,  $P=0,06$ ). En base a estas observaciones se concluye que la expresión de acuaporinas en membrana no se ve alterada por el tipo de receptor  $GABA_A$  utilizado en estos experimentos.



**Figura R13: Determinación de la permeabilidad osmótica.** Gráfico comparativo de la permeabilidad osmótica (Pf) observada en oocitos no inyectados (NI), en oocitos que expresan  $GABA_A \alpha 1\beta 2$  ( $\alpha 1\beta 2$ ) en solitario y en oocitos inyectados con ambos ARNm,  $GABA_A \alpha 1\beta 2$  y acuaporina ( $\alpha 1\beta 2\text{-AQP}$ ), respectivamente.

Finalmente se estudió el efecto de la pre-incubación con  $H_2O_2$  ( $100 \mu M$ ) sobre las respuestas mediadas por los receptores  $GABA_A \alpha 1\beta 2$  en presencia, o ausencia, de la acuaporina MtPIP2,2 ( $\alpha 1\beta 2\text{-AQP}$  o  $\alpha 1\beta 2$ ). En la **Figura R14**, se puede ver que la presencia de acuaporinas permeables a  $H_2O_2$  no modifica el efecto modulador de este agente sobre las respuestas  $GABA_A \alpha 1\beta 2$  ( $\%P_{\alpha 1\beta 2} = 40,14 \pm 7,4$ ;  $\%P_{\alpha 1\beta 2\text{-AQP}} = 33,4 \pm 5,2$ ;  $n=8$ ; *ns*,  $P=0,45$ ). Este experimento no permite establecer si el sitio de acción del agente oxidante se encuentra o no en el interior celular, pero indica que la facilitación del ingreso de  $H_2O_2$  al compartimiento citoplasmático a través de la acuaporina no produce una mayor potenciación de la actividad del receptor. El largo curso temporal de acción del

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 podría deberse a que los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción se encuentren en un sitio de difícil acceso, o que el pasaje del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la membrana sea imprescindible para que ocurra la modulación.



**Figura R14:** La presencia de la acuaporina MtPIP2,2 no impacta sobre la potenciación de los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porcentaje de potenciación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100μM) sobre respuestas de GABA<sub>A</sub>α1β2 en presencia (α1β2-AQP) o ausencia (α1β2) de MtPIP2,2.

### **C. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>**

Las características farmacológicas y biofísicas de los diversos receptores GABA<sub>A</sub> son determinadas por los subtipos de subunidades que los componen. En secciones anteriores mostramos que los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2γ2 son prácticamente insensibles a la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con el objetivo de analizar de qué manera la composición de subunidades de GABA podía afectar la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se realizaron experimentos empleando otros subtipos de receptores. Para ello fue necesario realizar una trabajosa puesta a punto de las condiciones particulares de expresión para los

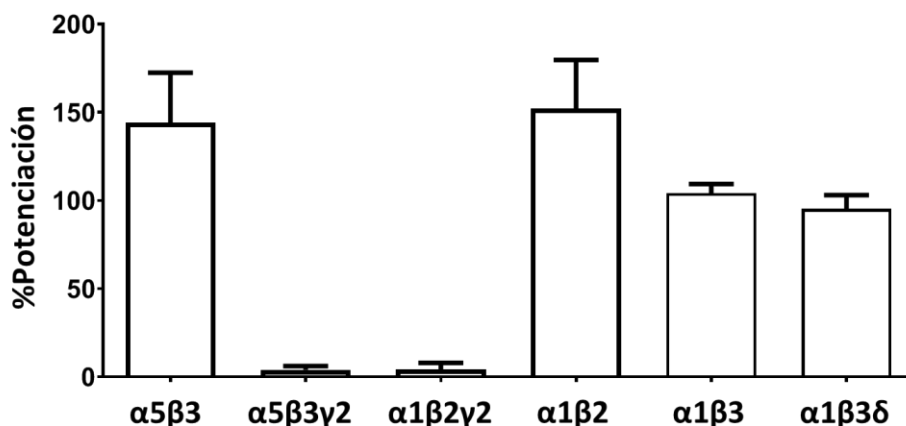
experimentos que implican combinaciones de las distintas subunidades. Esto incluyó a diversos subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>, que hasta el momento no habían sido estudiados en nuestro laboratorio. En la **Tabla R4** se detallan todas las variantes moleculares ensayadas. En la columna derecha se indican las proporciones utilizadas en cada caso y se subrayan aquellas que resultaron permisivas para la expresión de los receptores correspondientes. Cabe aclarar que, como las subunidades  $\beta$  pueden asociarse entre sí para formar receptores GABA<sub>A</sub> $\beta$  homoméricos, se controló que la presencia de monómeros GABA<sub>A</sub> $\beta$  en la población total de receptores fuera insignificante. Como se describió en la sección de materiales y métodos, los receptores GABA<sub>A</sub> $\beta$  homoméricos experimentan aperturas espontáneas y es posible revelar su contribución, anulando su actividad mediante el empleo del bloqueante  $\text{Zn}^{2+}$ , efecto que termina evidenciándose como un cambio en la línea de base del registro electrofisiológico de corriente de los oocitos. Por su parte, los receptores que contienen a las subunidades  $\gamma 2$  o  $\delta$  son mucho menos sensibles a la inhibición por  $\text{Zn}^{2+}$ , que sus contrapartes  $\alpha\beta$ . Esta propiedad permitió corroborar la incorporación de las subunidades  $\gamma 2$  o  $\delta$  cuando correspondía.

| Subtipos de Receptor GABA <sub>A</sub> | Proporciones inyectadas         |
|----------------------------------------|---------------------------------|
| $\alpha 1\beta 2$                      | 1:1 – <u>3:1</u>                |
| $\alpha 1\beta 2\gamma 2$              | 2:2:1 – <u>1:1:3</u>            |
| $\alpha 5\beta 3$                      | 2:1 – 1:1 – <u>5:1</u>          |
| $\alpha 5\beta 3\gamma 2$              | <u>5:1:5</u>                    |
| $\alpha 1\beta 3$                      | 1:1 – <u>3:1</u>                |
| $\alpha 1\beta 3\delta$                | 1:1:10 – <u>1:1:5</u>           |
| $\alpha 4\beta 3$                      | 5:1                             |
| $\alpha 4\beta 3\delta$                | 5:1:5 – 10:1:10 – 1:1:2 – 1:1:5 |
| $\alpha 4\beta 2$                      | 1:1                             |
| $\alpha 4\beta 2\delta$                | 1:1:2 – 1:1:5                   |

**Tabla R4.** Puesta a punto de la expresión de subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> en oocitos de *Xenopus laevis*.

Vale aclarar que los receptores GABA<sub>A</sub> conteniendo a la subunidad  $\alpha 4$  han podido ser expresados muy esporádicamente, condición que por el momento no ha podido ser sorteada experimentalmente e imposibilita su caracterización. En varios de los ensayos se han encontrado también subpoblaciones de receptores constitutivamente activos (por ej.  $\alpha 4\beta\delta$ ), que dificultan el análisis.

La **Figura R15** muestra el efecto de la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) sobre los subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> que han podido ser expresados exitosamente. Los resultados muestran que, entre los receptores estudiados, todas las variantes que contienen  $\alpha\beta$  (GABA<sub>A</sub> $\alpha\beta$ ) son sensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que los porcentajes de potenciación obtenidos en todos los casos fueron mayores al 100%. Por otro lado, la inclusión de la subunidad  $\delta$  no alteró significativamente la modulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%Pot $_{\alpha 1\beta 3}$ =104,3±5,1; %P $_{\alpha 1\beta 3\delta}$ =95,4±7,6; n=7; ns P=0,35), en tanto que la presencia de  $\gamma 2$  siempre produjo receptores insensibles (**Tabla R4**).



**Figura R15: Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>.** Porcentaje de potenciación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) sobre las respuestas de GABA (CE<sub>5-10</sub>) en diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>.

| Subtipo de Receptor | %Potenciación | N  | Protocolo      |
|---------------------|---------------|----|----------------|
| α5β3                | 144,0 ± 28,3  | 7  | On-top         |
| α5β3γ2              | 4,0 ± 2,0     | 4  | On-top         |
| α1β2γ2              | 4,2 ± 3,7     | 4  | On-top         |
| α1β2                | 152,1 ± 27,5  | 10 | Pre-incubación |
| α1β3                | 104,3 ± 5,1   | 7  | Pre-incubación |
| α1β3δ               | 94,4 ± 7,6    | 7  | Pre-incubación |

**Tabla R5: Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>.** Porcentaje de potenciación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) sobre las respuestas de GABA (CE<sub>5-10</sub>) en diferentes subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>. Se indica porcentaje de potenciación (con media y SEM), número de réplicas, y protocolo experimental realizado en cada caso.

Estos resultados muestran que la modulación de las respuestas de los receptores GABA<sub>A</sub> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opera predominantemente sobre los receptores tónicos extrasinápticos (αβ y αβδ). La concentración basal de GABA en el espacio extrasináptico oscila generalmente entre 0,1 y 1μM (Pierce et al., 2020), rango donde caen los valores de concentración de agonista para los cuales se observaron valores máximos o cercanos al máximo en la

potenciación de la actividad de los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma, la modulación de los receptores GABA<sub>A</sub> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría representar un mecanismo de regulación dinámico de la inhibición tónica GABAérgica, aun cuando no se requieran mecanismos de plasticidad de curso más lento, como por ej. cambios en la composición o en el número de receptores expresados en la membrana.

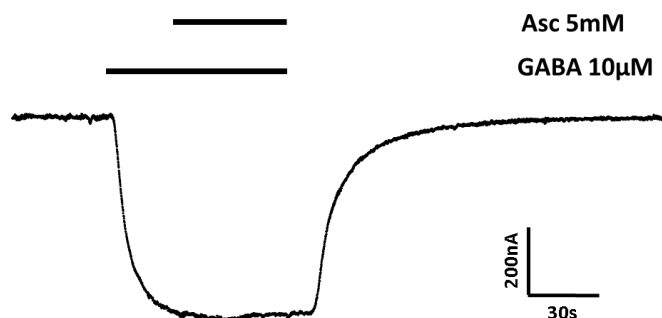
#### **D. Experimentos adicionales con otros agentes endógenos y farmacológicos**

A lo largo de esta tesis se realizaron experimentos preliminares, con otros agentes endógenos y farmacológicos de relevancia para nuestro trabajo, que han dado lugar a diversas líneas de investigación futuras.

#### **Efectos del ácido ascórbico sobre la actividad de los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 y GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2.**

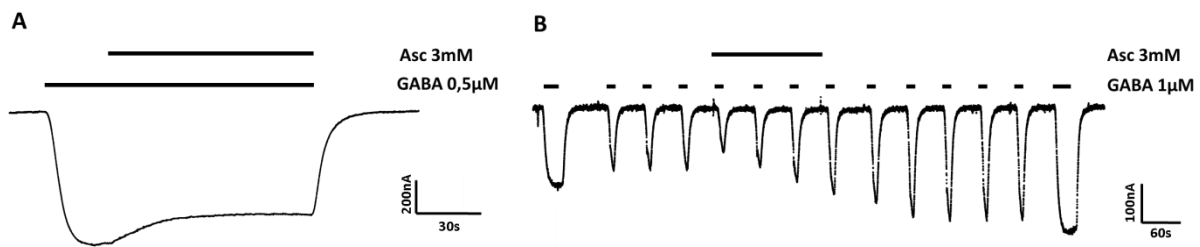
En nuestro laboratorio se estudiaron previamente los efectos del ácido ascórbico sobre las respuestas de receptores GABA $\alpha$ 1 (Calero et al., 2011). Como continuación de aquella línea de investigación, se diseñó un grupo de experimentos para evaluar el efecto del ácido ascórbico sobre otros subtipos de receptores. En esta oportunidad se realizaron aplicaciones de ácido ascórbico *on top* (1, 3 y 5mM) sobre las respuestas mediadas por los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 y GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2, evocadas por 10  $\mu$ M GABA. De manera similar a lo ocurrido con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en ningún caso se observaron efectos modulatorios por parte del ácido ascórbico sobre los receptores GABA $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2 (**Figura R16**)

sugiriendo que la presencia de la subunidad  $\gamma 2$ , podría también conferir insensibilidad a este agente reductor.



**Figura R16.** Las respuestas  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2\gamma 2$  son insensibles al ácido ascórbico. Trazo representativo de una respuesta evocada por GABA (CE<10%) durante la aplicación *on-top* de ácido ascórbico.

Posteriormente se evaluó el efecto del ácido ascórbico sobre las respuestas mediadas por los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$ . Como se observa en la **Figura R17A**, la aplicación de ácido ascórbico (3mM) *on top* generó un efecto inhibitorio en este caso. Sin embargo, tras la remoción del agente modulador se produjo un aumento de la amplitud de las respuestas al GABA. Para analizar con mayor detalle este aspecto, se diseñó un protocolo de aplicaciones múltiples sucesivas de ácido ascórbico, que permitía la exposición de los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$  al ácido ascórbico por períodos prolongados de tiempo, evitando que se desencadene un proceso de desensibilización por agonista. De esta forma, se logró caracterizar el curso temporal del efecto del ácido ascórbico, confirmándose que la modulación que ejerce este agente es bimodal, con una etapa temprana de inhibición y una etapa posterior de potenciación (**Figura R17B**). Los mecanismos implicados serán parte de futuros estudios.



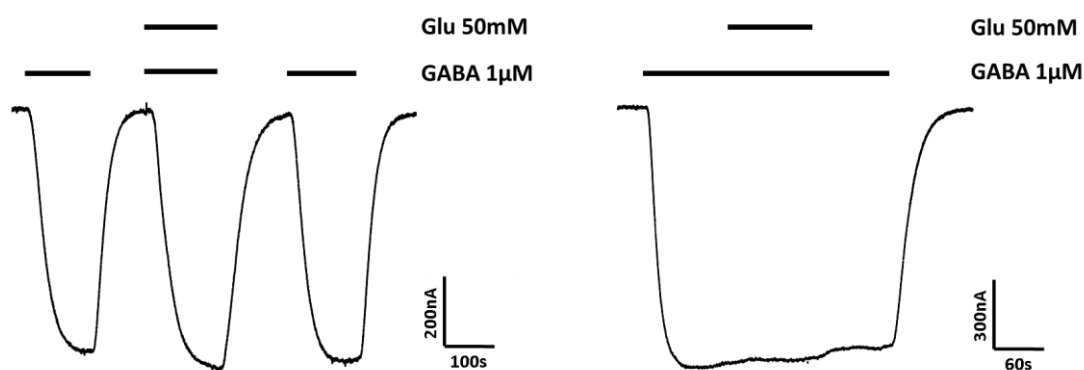
**Figura R17. Ensayos preliminares de caracterización de las acciones del ácido ascórbico sobre la actividad de los receptores  $GABA_A\alpha1\beta2$ .** El ácido ascórbico (3mM) produce un efecto modulador de carácter bimodal, que muestra una etapa temprana de inhibición seguida de una etapa más tardía de potenciación de las respuestas.

### Ensayos con glucosa sobre receptores $GABA_{\alpha1}$

Breitinger y col, han propuesto que la glucosa modula alostéricamente la actividad de los receptores de glicina (Breitinger et al., 2015), una afirmación que podría tener, además de las obvias implicancias fisiológicas por el rol metabólico clave de la glucosa, connotaciones farmacológicas, porque la mayoría de los buffers normofisiológicos utilizados en la experimentación contienen glucosa, pudiendo alterar los resultados experimentales.

En el contexto de las investigaciones de nuestro laboratorio sobre los efectos de intermediarios metabólicos sobre la actividad de los receptores  $GABA_A$ , y dado que los receptores de glicina pertenecen a la misma superfamilia que los receptores  $GABA_A$ , se evaluó si los receptores ionotrópicos de GABA también muestran sensibilidad a los cambios en la concentración de glucosa. A tal fin, se realizaron aplicaciones de glucosa a la concentración máxima examinada previamente por Breitinger y col. (50mM), en las modalidades *on top* y co-aplicación sobre las respuestas mediadas por

receptores GABA<sub>A</sub>1, evocadas a distintas concentraciones de GABA. Cabe destacar que las condiciones experimentales descritas abarcan todo el rango dinámico de activación del receptor. En ninguno de los casos se observaron efectos de la glucosa sobre las corrientes iónicas. Por último, se estudió el efecto de la exposición a glucosa sobre las respuestas GABA<sub>A</sub>1. Para ello se incubaron los oocitos en solución de Ringer con glucosa (10mM) y a continuación se realizó un protocolo de aplicación *on top* con glucosa (50mM) (Figura R18). Tampoco se observaron efectos significativos.

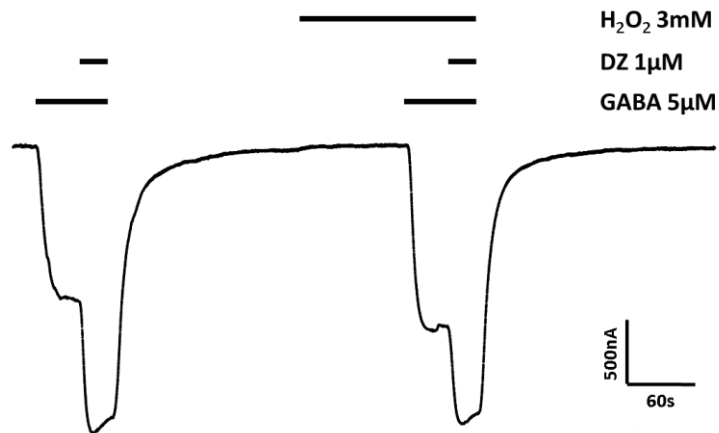


**Figura R18. Registro de la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>1 en presencia y ausencia de glucosa.** Trazos representativos que ilustran las corrientes iónicas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>1, evocadas por GABA (1μM), durante experimentos en los que se co-aplicó glucosa (50mM) (izquierda) o ésta se administró por superfusión mediante la modalidad *on top* (derecha).

### Ensayos con benzodiazepinas y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en receptores GABA<sub>A</sub>1β2γ2

Las benzodiazepinas (BDZ) son drogas de importancia clínica utilizadas comúnmente como ansiolíticos y sedantes pre-anestésicos. Con el propósito de estudiar si la presencia de ROS podría modificar el efecto farmacológico del diazepam, una de las BZDs más típicas, se realizaron experimentos aplicando diazepam (1μM) sobre respuestas a GABA (5μM), mediadas por receptores

GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2, en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM) (**Figura R19**). En las condiciones ensayadas no se revelaron efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por el momento.



**Figura R19.** La potenciación inducida por diazepam sobre las respuestas al GABA mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2 es insensible al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trazo representativo de las respuestas al GABA (5  $\mu$ M) mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2 y su potenciación por diazepam (1  $\mu$ M), obtenidas en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3mM).

## DISCUSIÓN

Las evidencias reunidas en este trabajo de tesis indican que la modulación por  $H_2O_2$  no es una propiedad exclusiva de los receptores homoméricos  $GABA_{Ap1}$ , es decir del subtipo atípico que se expresa casi exclusivamente en la retina y otras regiones visuales. Los resultados confirman que la sensibilidad al  $H_2O_2$  es una característica exhibida por diversos subtipos de receptores  $GABA_A$  homoméricos y heteroméricos, que comúnmente se encuentran en diferentes áreas del SNC. El  $H_2O_2$  modula la función de los distintos receptores heteroméricos  $GABA_A$  de una manera diferencial. Otro aspecto particularmente interesante es que todos los subtipos de receptores  $GABA_A$  analizados, que resultaron susceptibles a la acción del  $H_2O_2$ , se caracterizan por generar respuestas al GABA de tipo sostenido o tónicas (combinaciones de  $\alpha\beta$  y  $\alpha\beta\delta$ ). Mientras que los receptores que contienen a la subunidad  $\gamma 2$  y generan corrientes iónicas transitorias, al ser activados por GABA (respuestas fásicas), exhibieron una marcada resistencia al tratamiento con  $H_2O_2$ . Cabe destacar que las concentraciones de  $H_2O_2$  empleadas aquí caen en el rango de lo que se considera relevante desde distintos puntos de vista, es decir ya sea en términos fisiológicos como farmacológicos o patológicos.

### **Modulación por ROS de las respuestas mediadas por los receptores $GABA_A$**

La modulación de los receptores  $GABA_A$  por agentes redox farmacológicos y endógenos había sido analizada previamente, pero no de una manera sistemática (Pan et al., 1995; Amato et al., 1999; Pan et al., 2000; Sah

et al., 2002; Calero & Calvo, 2008). Los primeros estudios se enfocaron fundamentalmente en la determinación de los efectos de reactivos de grupos sulfhidrilos (tioles) (ej: DTT, DTNB) sobre algunos subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> nativos y recombinantes. En base a estas primeras observaciones, y a trabajos subsiguientes, se planteó la posible existencia de mecanismos moduladores de la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria de naturaleza redox. Sin embargo, en esta etapa inicial, el estudio de agentes con una relevancia fisiológica o patológica concreta, por ejemplo compuestos de origen metabólico, había quedado pendiente, y esto limitaba los alcances de la argumentación. Con posterioridad se retomó esta línea de investigación (Beltrán González et al., 2014), y se reunieron evidencias en favor de la hipótesis de que la modulación redox de la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria cumpliría un rol importante en la fisiología celular. La mayoría de los trabajos subsiguientes también emplearon principalmente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente modulador y fuente de ROS (Accardi et al., 2014; Penna et al., 2014; Accardi et al., 2015).

Tomando como punto de partida aquellos estudios, y con el objeto de discriminar la sensibilidad a las ROS exhibida por cada uno de los subtipos específicos de receptores GABA<sub>A</sub>, estudiamos los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las respuestas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub>α1β2, para luego ampliar el análisis incorporando otras variantes moleculares heteroméricas del receptor GABA<sub>A</sub> (ej: α1β2, α1β3, α5β3 y α1β3δ, α1β2γ2 y α5β3γ2). Los resultados obtenidos indicaron que la potenciación producida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>α1β2 es reversible, dependiente de la concentración del agente modulador, independiente del voltaje de membrana y

dependiente de la concentración del agonista GABA. Las acciones del  $H_2O_2$  sobre los receptores  $GABA_A$  son selectivas, las respuestas mediadas por los receptores  $GABA_A \alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 3$  y  $\alpha 1\beta 3\delta$  se potencian en presencia de  $H_2O_2$ , en tanto que la actividad de los receptores  $GABA_A \alpha 1\beta 2\gamma 2$  y  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  no se altera en presencia de este agente oxidante.

### **Posibles mecanismos de acción de las ROS sobre las respuestas mediadas por receptores $GABA_A$**

Los residuos de cisteínas de las proteínas son altamente reactivos y comúnmente constituyen los principales blancos para la modulación redox. Los grupos tioles presentes en las cadenas laterales pueden oxidarse reversiblemente a grupos sulfénicos, o bien, reducirse junto con otro grupo tiol y formar un puente disulfuro. Como antecedente más próximo, es necesario señalar que una serie de experimentos realizados por nuestro laboratorio, previamente a esta tesis, demostraron que la potenciación de la actividad de los receptores homoméricos  $GABA_{A\rho 1}$  observada en presencia de  $H_2O_2$  en el medio extracelular, tenía lugar mediante un mecanismo en el que solo interviene una cisteína (C364), localizada en uno de los lazos intracelulares de las subunidades  $\rho 1$  (Beltrán González et al., 2014). En tanto que el par de cisteínas extracelulares que forman el lazo característico de las subunidades de estos receptores (*Cys-loop*) no participan del mecanismo de modulación. Es importante recordar que, como los homómeros  $\rho 1$  se ensamblan pentaméricamente para formar el canal que se activa por el GABA, cada macromolécula individual de este subtipo específico de receptor cuenta en total solamente con 5 residuos de cisteína intracelulares, una por cada subunidad (aparte de las 10 que forman los 5 *Cys-loops*). En este trabajo se encontraron

también evidencias que indican que entre los agentes intervinientes en la modulación se cuentan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por sí mismo, así como también otras ROS que se producen *in situ* a partir de este agente oxidante, por ejemplo, el radical hidroxilo.

En base a las evidencias mencionadas, se analizó si la modulación por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de los receptores heteroméricos  $\text{GABA}_A$  operaba por un mecanismo similar. Los experimentos indicaron que la modificación química con NEM, de los grupos tioles presentes en las subunidades que forman los receptores  $\text{GABA}_{A\alpha 1\beta 2}$ , afectaba significativamente la modulación por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, dado que el NEM previno la potenciación de manera parcial, es posible que uno o más blancos adicionales, además de los residuos de cisteína señalados, estuvieran involucrados en el mecanismo de potenciación de la actividad de los receptores  $\text{GABA}_{A\alpha 1\beta 2}$  por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La mayoría de los agentes moduladores de los receptores  $\text{GABA}_A$  que ejercen sus acciones desde el compartimiento extracelular, como por ejemplo, el  $\text{Zn}^{2+}$ , el ácido ascórbico, el DTT, y algunos moduladores alostéricos positivos como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los anestésicos generales, son de acción rápida y demoran pocos segundos en actuar. En los casos citados el/los sitio/s de acción de los fármacos son accesibles desde el exterior de la célula, y generalmente se localizan en dominios extracelulares, o bien en dominios transmembrana que no presentan barreras a la difusión libre de estos compuestos ni restricciones conformacionales que impidan una interacción química. En contraste con esto, se encontró que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  demora varios minutos en alcanzar el máximo efecto potenciador, en todos y cada uno de los receptores  $\text{GABA}_A$  estudiados que resultaron susceptibles. Es sabido que el

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de modular la actividad de un gran número de canales iónicos, como es el caso de los receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub>, o de los canales mediadores de potenciales receptores transitorios TRPM4 (Coddou et al., 2009; Simon et al., 2010). En los ejemplos citados se ha verificado que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también exhibe un curso temporal de desarrollo muy lento, equivalente al que hemos observado nosotros en su acción sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, y se ha sugerido que los efectos son el resultado de la oxidación de residuos de cisteínas intracelulares (Coddou et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de los receptores GABA<sub>A</sub>α1 y los P2X<sub>2</sub>, y de los canales TRPM4, cuyos dominios intracelulares todos contienen residuos de cisteínas expuestos, accesibles a agentes de modificación química, las subunidades que conforman a los receptores heteroméricos GABA<sub>A</sub> no poseen cisteínas que se encuentren en los dominios intracelulares, es decir orientadas hacia el citoplasma de la célula, con la única excepción de γ2. Es importante aclarar que, si bien las subunidades γ2 contienen cisteínas en uno de sus dominios intracelulares (5 en total cada subunidad γ2), debido a que estos dominios interactúan fuertemente con proteínas de andamiaje como la gefirina, se cree que no estarían accesibles para la acción modificadora de los agentes redox (Allred et al., 2005; Choi & Ko, 2015). En cuanto a las dos cisteínas que forman el lazo distintivo de esta superfamilia de receptores, localizadas en el gran dominio extracelular que porta cada una de las subunidades, tomando en cuenta la accesibilidad de estos sitios a la acción de fármacos actuando desde el compartimiento extracelular y los tiempos de acción exhibidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es altamente improbable que participen de la modulación. Esto sería similar a lo encontrado para los receptores homoméricos GABA<sub>A</sub>α1. Las subunidades

componentes de los receptores heteroméricos GABA<sub>A</sub> si contienen todas ellas en cambio una cisteína en el dominio transmembranal TM3, y en el caso de las subunidades  $\alpha$  una segunda cisteína ubicada en el dominio transmembranal TM1. Interesantemente, la cisteína C313 del dominio transmembrana TM3 de la subunidad  $\beta 3$  participa en la modulación de los receptores homoméricos GABA<sub>A</sub> $\beta 3$  por acción del agente redox farmacológico DTT (Pan et al., 2000). Es sabido que esta cisteína también está involucrada en la modulación por Zn<sup>2+</sup> de los receptores homoméricos GABA<sub>A</sub> $\beta 3$  y heteroméricos GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1\beta 3$  (Pan et al., 2000; Menzikov et al., 2023). Estudios con otros canales iónicos, como por ejemplo, los receptores NMDA y los canales TRPM7, demostraron que los sitios de unión a Zn<sup>2+</sup> también pueden actuar como blancos de la modulación redox (Choi et al., 2001; Inoue et al., 2021). Por este motivo, es posible que la cisteína C287 ubicada en el segmento M3 de la subunidad  $\beta 2$  sea una buena candidata para evaluar en futuros estudios, por ejemplo mediante experimentos que empleen mutagénesis dirigidas a estos residuos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que además de las cisteínas, otros aminoácidos pueden ser también blanco de la modulación redox, por ejemplo, metionina, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina y lisina.

En cualquier caso, hay aspectos que no han sido explorados por el momento, y que deberán necesariamente ser atendidos en estudios subsiguientes. Una de las posibilidades a examinar sería entonces que las cisteínas localizadas en el segmento TM3 (y también en el TM1, en el caso de las subunidades  $\alpha$ ) actúen como blancos para las acciones de las ROS. Si éste fuera el caso, el pasaje del modulador a través de la membrana, con las eventuales restricciones particulares de movilidad y permeabilidad,

representaría un paso limitante que podría explicar el efecto retardado. El hecho de que el  $H_2O_2$ , y las ROS generadas a partir de éste como el radical hidroxilo, sean agentes que pueden permear la membrana plasmática, sugiere que un mecanismo de acción directo sobre estas cisteínas, u otros aminoácidos ubicados en los pasos transmembrana del receptor, podría tener lugar en la medida que éstos estuvieran accesibles, de manera análoga a lo observado para otros reactivos de tioles que actúan sobre residuos aminoácidos ubicados en entornos hidrofóbicos de membrana. En base a esto se planean para el futuro experimentos adicionales, empleando como herramientas *scavengers* de ROS, como ácido lipoico y deferoxamina, y variantes de los receptores que incorporen subunidades mutantes de cisteínas con función conservada, que permitirán confirmar o rechazar esta hipótesis.

La modalidad experimental empleada más comúnmente para evaluar los efectos del  $H_2O_2$ , durante el desarrollo de este trabajo, fue la aplicación del agente modulador en el compartimento extracelular, a través del sistema de superfusión. Para discernir si los efectos de las ROS sobre la función de los receptores  $GABA_A$  procedían preferencialmente desde uno u otro lado de la membrana del oocito, o esto resultaba indistinto, se planearon y ejecutaron dos estrategias experimentales complementarias. Por un lado la administración directa intracitoplasmática de  $H_2O_2$ , mediante microinyecciones del agente en los oocitos, y por otro lado la expresión conjunta de receptores  $GABA_A$  y acuaporinas transportadoras de  $H_2O_2$ , previo a la aplicación del modulador convencional vía superfusión. Lamentablemente, por dificultades técnicas que aún no se han podido sortear, no se logró por el momento establecer correlaciones entre los registros electrofisiológicos obtenidos luego de las

inyecciones intracelulares de  $H_2O_2$  y los obtenidos previamente mediante superfusión de  $H_2O_2$ . Los efectos modulatorios observados durante la superfusión de  $H_2O_2$  sobre los receptores homoméricos  $GABA_{Ap1}$  fueron reproducibles, estadísticamente significativos y pudieron ser contrastados con sus correspondientes controles positivos y negativos. Contrariamente, luego de realizar inyecciones intracelulares de  $H_2O_2$ , o incluso la sola inyección del vehículo en el citoplasma previa al registro de la respuesta electrofisiológica, desestabilizó la línea de base de los registros de tal manera que no se podía proseguir con el experimento en curso. Para poder solucionar este problema definitivamente hubiera sido necesario realizar un muestreo más sistemático, por ejemplo, utilizar distintos buffers de inyección hasta dar con una fórmula que tuviera menor impacto sobre las propiedades intrínsecas de los oocitos y minimizar de este modo los artefactos del registro, pero no se ha podido resolver este punto a tiempo.

Es así que, en lugar de proseguir con la aproximación experimental descrita anteriormente que hubiera demorado los plazos de ejecución, se optó por la segunda alternativa, menos directa, pero que en estudios preliminares resultó más efectiva. Mediante este otro abordaje pudimos determinar que la magnitud de la potenciación de la actividad de los receptores  $GABA_{Ap1}$  inducida por las aplicaciones extracelulares de  $H_2O_2$ , mediante el sistema de superfusión, aumentaba significativamente si los oocitos coexpresaban a MtPIP2,2, una acuaporina particular que permite el transporte de  $H_2O_2$ . Esto sugiere que un aumento de la permeabilidad osmótica de los oocitos al  $H_2O_2$ , debido a la presencia de MtPIP2,2 en la membrana, con la correspondiente facilitación del influjo del agente oxidante, desencadena un aumento de la

concentración intracitoplasmática de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que resulta detectable por parte de las 5 cisteínas (C364) localizadas en el dominio intracelular de cada subunidad  $\rho 1$ , con el consiguiente efecto incremental en la potenciación de la actividad de los receptores homoméricos  $\text{GABA}_{\rho 1}$ . El análisis de los datos arrojó que para una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 250  $\mu\text{M}$  la potenciación en las células que expresan acuaporinas es de 86% y de 60% en las que solo expresan el receptor  $\text{GABA}_{\rho 1}$ . Esto corresponde a una variación de 26% en términos absolutos y de 43% con respecto al valor control (60%). Mientras tanto, cuando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  era de 100  $\mu\text{M}$ , la potenciación con y sin acuaporinas es de 40% vs. 18% respectivamente, lo que equivale a una variación absoluta del 22% y una variación relativa de más del doble (122%). Esto indica que, en el rango de concentraciones estudiadas, el influjo del agente oxidante a través del canal de agua cobra mayor relevancia respecto del influjo total (que incluye también el influjo por difusión simple) cuanto menor es la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el espacio extracelular. Estos resultados son consistentes con el mecanismo de modulación de los receptores homoméricos  $\text{GABA}_{\rho 1}$  por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que fuera postulado previamente por nuestro grupo en base a experimentos que emplearon una aproximación experimental diferente.

En contraste con estas observaciones, cuando los oocitos coexpresan a los receptores heteroméricos  $\text{GABA}_{\alpha 1\beta 2}$  junto a la acuaporina MtPIP2,2, la aplicación extracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante el sistema de superfusión no produjo resultados equivalentes a los observados con los receptores homoméricos  $\text{GABA}_{\rho 1}$ . Antes hemos señalado que la ausencia de residuos intracelulares de cisteína no permitiría a estos receptores detectar la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el compartimiento intracelular de manera directa. Es posible que además la

accesibilidad a los posibles blancos de modulación esté vedada para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  si éste actúa desde el interior celular. Tampoco se descarta la posibilidad de que la modulación por ROS opere indirectamente, por ejemplo, que una vez que la difusión tuvo lugar ocurra algún tipo de interacción permisiva para la modulación del receptor, como la oxidación de un lípido o proteína intrínseca de la membrana asociada a sitios específicos en las subunidades del receptor  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2$ . En estos casos, el transporte del agente oxidante a través de la membrana sería un paso indispensable para que la potenciación tenga lugar, y el grado de efectividad de la acción no dependería tanto de la distribución relativa del agente, como de la garantía de que efectivamente se oxiden una o más moléculas intermediarias cuya localización fuera crítica. Probablemente, la implementación de otros modelos experimentales, como cultivo de células disociadas, o rebanadas de tejido, puedan aportar evidencias más concluyentes.

**Consideraciones finales. Posible relevancia Fisiopatológica.**

En este trabajo se evaluó la sensibilidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 6 subtipos diferentes de receptores heteroméricos  $\text{GABA}_{\text{A}}$ . Como se indicara anteriormente, los receptores compuestos por las combinaciones  $\alpha\beta$  o  $\alpha\beta\delta$  ( $\text{GABA}_{\text{A}} \alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 3$  y  $\alpha 1\beta 3\delta$ ) incrementaron su actividad en presencia de este agente oxidante. Aunque mostraron diferentes grados de sensibilidad. En tanto, la actividad de los receptores que contienen a la subunidad  $\gamma 2$  ( $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2\gamma 2$  y  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ ) no fue afectada. Las diferencias encontradas en la sensibilidad a ROS entre los diferentes subtipos de receptores heteroméricos  $\text{GABA}_{\text{A}}$  podrían ser fisiológicamente relevantes, ya que los receptores  $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 1\beta 2\gamma 2$  se

encuentran exclusivamente en los botones sinápticos, mientras que los GABA<sub>A</sub>α5β3γ2 se ubican mayoritariamente alejados o a cierta distancia de la sinapsis. Nuestros resultados guardan consistencia con reportes previos, donde se ha visto que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la amplitud de las corrientes tónicas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> nativos (no recombinantes) en cultivos neuronales (Penna et al., 2014). Esta modulación variaba en intensidad, dependiendo fundamentalmente del tipo de cultivo utilizado. Los autores argumentan que las variaciones encontradas se explicarían por la expresión diferencial de subpoblaciones de receptores GABA<sub>A</sub> ubicados fuera del espacio sináptico. La potenciación ejercida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las corrientes tónicas macroscópicas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> fue significativamente menor en los cultivos neuronales enriquecidos en células con altos niveles de expresión de la subunidad γ2 (Penna et al., 2014).

Durante el desarrollo de la presente tesis se han realizado además una serie de experimentos exploratorios, tendientes a abrir nuevas líneas de trabajo asociadas al proyecto, con resultados dispares. Por ejemplo, la caracterización preliminar de los efectos del ácido ascórbico sobre los receptores heteroméricos GABA<sub>A</sub> arrojó resultados interesantes, que requerirán estudios más detallados para poder determinar los mecanismos subyacentes a la modulación bimodal observada. Por otra parte, y a pesar de que en los experimentos iniciales no hemos tenido por el momento resultados alentadores, la importancia de la modulación por ROS para las propiedades farmacológicas de los distintos subtipos de receptores heteroméricos GABA<sub>A</sub> es desconocida y representa un tópico que merece seguir siendo investigados, dada la importancia terapéutica de los moduladores alostéricos positivos, con

propiedades ansiolíticas, sedantes y anestésicas, de uso intensivo en la clínica médica.

Por último, es necesario aclarar que no existe un consenso unánime sobre el rango de concentraciones en el que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  operaría como modulador o mensajero celular en condiciones fisiológicas, sean cual sean los modelos experimentales, tejidos y tipos celulares empleados (Calero et al, 2011; Gasulla et al, 2015; Penna et al, 2014; Accardi et al, 2014 y 2015). Por lo tanto, no es sencillo establecer fehacientemente qué niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultan relevantes para una modulación de las características aquí descritas y cuáles no. Algunos autores estiman que el rango de concentraciones entre las que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular fluctúa, en condiciones fisiológicas normales, estaría entre 1 y  $10\mu\text{M}$ , y que perturbaciones transitorias de la homeostasis redox llevarían a que los niveles de este agente se incrementen y oscilen entre 10 a  $100\mu\text{M}$ . Se ha dicho también que si los valores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  superan un valor de concentración de  $10\mu\text{M}$  se inician procesos de oxidación inespecífica de biomoléculas, una situación que desencadenaría procesos patológicos (Sies & Jones, 2020). El estrés oxidativo no solo involucra una exposición a valores elevados de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también esta exposición debe prolongarse en el tiempo. Modelos de estrés oxidativo que emplean isquemia y reperfusión (Kelmanson et al., 2021), o neuroinflamación (Díaz et al., 2022), utilizan exposiciones al  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200\mu\text{M}$ ) de 50 minutos a 24 horas. En el caso de los estudios de estrés oxidativo en canales iónicos como los TRPM2, basta con exponerlos a  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $500\mu\text{M}$ ) por 5 minutos (Zhang et al., 2022) para detectar cambios modulatorios. Otros autores abonan una interpretación alternativa y sugieren que la actividad endógena enzimática de la peroxidasa sería suficiente para evitar un daño fisiológico

irreversible, por ejemplo, frente a la exposición a valores tan altos como 1,5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 15 minutos. Esto ha sido constatado, por ejemplo, en rebanadas de hipocampo de conejo de indias (Avshalumov et al., 2004). Sin embargo, los valores referidos son orientativos, ya que la concentración instantánea de las diversas ROS depende fundamentalmente de la capacidad y efectividad de los múltiples mecanismos de generación y remoción. En nuestro trabajo se utilizaron concentraciones extracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que abarcan tanto el rango teórico fisiológico (30 $\mu\text{M}$ ), como un rango que se supone patológico (100-1000 $\mu\text{M}$ ). Bajo este supuesto se han sumado algunas evidencias que podrían ayudar a entender más cabalmente si la modulación de los receptores  $\text{GABA}_A$  por  $\text{H}_2\text{O}_2$  representa un mecanismo efectivo y relevante en la fisiología neuronal.

## REFERENCIAS

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007). Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27: 1129-1138.

Accardi MV, Brown PM, Miraucourt LS, Orser BA, Bowie D (2015).  $\alpha 6$ -Containing GABAA receptors are the principal mediators of inhibitory synapse strengthening by insulin in cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 35: 9676-9688.

Accardi MV, Daniels BA, Brown PM, Fritschy JM, Tyagarajan SK, Bowie D (2014). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nat Commun* 5: 3168.

Adam-Vizi V (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140-1449.

Adimora NJ, Jones DP, Kemp ML (2010). A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid Redox Signal* 13: 731-743.

Ahmad T, Iqbal A, Halim SA, Uddin J, Khan A, El Deeb S, Al-Harrasi A (2022). Recent Advances in Electrochemical Sensing of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Released from Cancer Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 12: 1475.

Aizenman E, Hartnett KA, Reynolds IJ (1990). Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron* 5: 841-846.

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2: 1257-1263.

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.

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, Talvi-Oja K, Pasternack A, Pasternack M (2005). Functional characterization of rat rho2 subunits expressed in HEK 293 cells. *Eur J Neurosci* 21: 692-700.

Allred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G, Lüscher B (2005). Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J Neurosci* 25: 594-603.

Allen CL, Bayraktutan U (2009) Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4: 461-470.

Amato A, Connolly CN, Moss SJ, Smart TG (1999). Modulation of neuronal and recombinant GABAA receptors by redox reagents. *J Physiol* 517: 35-50.

Angelova PR, Abramov AY (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic Biol Med* 100: 81-85.

Anunziato 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.

- Antunes F, Cadenas E (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: submicromolar levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med* 30: 1008-1018.
- Anzai K, Ogawa K, Kuniyasu A, Ozawa T, Yamamoto H, Nakayama H (1998). Effects of hydroxyl radical and sulfhydryl reagents on the open probability of the purified cardiac ryanodine receptor channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 938-942.
- Arnaiz SL, Coronel MF, Boveris (1999). Nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide production in brain mitochondria after haloperidol treatment. *Nitric Oxide* 3: 235-243.
- Atkins CM, Sweatt JD (1999). Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus. *J Neurosci* 19: 7241-7248.
- Avshalumov MV, Bao L, Patel JC, Rice ME (2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling in the nigrostriatal dopamine pathway via ATP-sensitive potassium channels: issues and answers. *Antioxid Redox Signal* 9: 219-231.
- Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP, Peña DM, Rice ME (2003). Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Neurosci* 23: 2744-2750.
- Avshalumov MV, Chen BT, Rice ME (2000). Mechanisms underlying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* 882: 86-94.
- Avshalumov MV, MacGregor DG, Sehgal LM, Rice ME (2004). The glial antioxidant network and neuronal ascorbate: permissive yet protective for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling? *Neuron Glia Biol* 1: 365-376.
- Avshalumov MV, Rice ME (2002). NMDA-receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87:2896-2903.
- Azzaro AJ, King J, Kotzuk J, Schoepp DD, Frost J, Schochet S (1985). Guinea pig striatum as a model of human dopamine deamination: the role of monoamine oxidase isozyme ratio, localization, and affinity for substrate in synaptic dopamine metabolism. *J Neurochem* 45: 949-956.
- Babior BM (1984). Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959-966.
- Baenziger JE, Corringer PJ (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 60: 116-125.
- Ballaz SJ, Rebec GV (2019). Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator. *Pharmacol Res.* 146: 104321.
- Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, Rice ME (2009). Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J Neurosci* 29: 9002-9010.
- Baxter PS, Hardingham GE (2016). Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 100: 147-152.
- Beatty S, Koh H, Phil M (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45: 115-134.
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R (2016). Reactive oxygen species: physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. *J Exp Neurosci* 10: 23-48.

- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS- generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14: 724-738.
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29: 12757-12763.
- Beltrán González AN, Gasulla J, Calvo DJ (2014). An intracellular redox sensor for reactive oxygen species at the M3-M4 linker of GABAA p1 receptors. *Br J Pharmacol* 71: 2291-2299.
- Beltrán González AN, Pomata PE, Goutman JD, Gasulla J, Chebib M, Calvo DJ (2014). Benzodiazepine modulation of homomeric GABA $\alpha$ 1 receptors: Differential effects of diazepam and 4'-chlorodiazepam. *Eur J Pharmacol* 743: 24-30.
- Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728-739.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004). Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol Rev* 84: 835-867.
- Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282: 1183-1192.
- Borghese CM, Herman M, Snell LD, Lawrence KJ, Lee HY, Backos DS, Vanderlinden LA, Harris RA, Roberto M, Hoffman PL, Tabakoff B. (2017) Novel Molecule Exhibiting Selective Affinity for GABAA Receptor Subtypes. *Sci Rep* 7: 6230.
- Bouzat C, Barrantes FJ, Sigworth FJ (1991). Changes in channel properties of acetylcholine receptors during the time course of thiol chemical modifications. *Pflugers Arch.* 418: 51-61.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallager JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002). International Union Pharmacology. XXXIII. Mammalian  $\gamma$ -aminobutyric acid B receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54: 247-264.
- Breitinger HG, Becker CM (2002). The inhibitory glycine receptor—simple views of a complicated channel. *Chembiochem* 3: 1042-1052.
- Breitinger U, Raafat KM, Breitinger HG (2015). Glucose is a positive modulator for the activation of human recombinant glycine receptors. *J Neurochem* 134: 1055-1066.
- Brickley S, Mody I (2012). Extrasynaptic GABA A receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73: 23-34.
- Bright DP, Brickley SG (2008). Acting locally but sensing globally: impact of GABAergic synaptic plasticity on phasic and tonic inhibition in the thalamus. *J Physiol* 586: 5091-5099.
- Calero CI, Calvo DJ (2008). Redox modulation of homomeric  $\rho$ 1 GABA receptors. *J Neurochem* 105: 2367-2374.
- Calero CI, Vickers E, Cid GM, Aguayo LG, von Gersdorff H, Calvo DJ (2011). Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid. *J Neurosci* 31: 9672-9682.
- Calvo DJ, Beltrán González AN (2016). Dynamic regulation of the GABAA receptor function by redox mechanisms. *Mol Pharmacol* 90: 326-333.

- Calvo DJ, Vazquez AE, 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, Krishnaswamy A, Cooper E (2010). Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. *Neuron* 66: 827-834.
- Campanucci VA, 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.
- 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.
- Chen BT, Avshalumov MV, Rice ME (2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *J Neurophysiol* 85: 2468-2476.
- Chen BT, Avshalumov MV, Rice ME (2002). Modulation of somatodendritic dopamine release by endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: susceptibility in substantia nigra but resistance in the ventral tegmental area. *J Neurophysiol* 87: 1155-1158.
- Choi Y, Chen HV, Lipton SA (2001). Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn<sup>2+</sup> modulation of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 21: 392-400.
- Choi YB, Lipton SA (2000). Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* 57: 1535-1541.
- Choi G, Ko J (2015). Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp Mol Med.* 47: e158.
- Chu X, Close N, Saugstad JA, Xiong ZG (2006). ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *J Neurosci* 26: 5329-5339.
- Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST (2010). Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* 468: 305-309.
- Coddou C, Codocedo JF, Li S, Lillo JG, Acuña-Castillo C, Bull P, Stojilkovic SS, Huidobro-Toro JP (2009). Reactive oxygen species potentiate the P2X<sub>2</sub> receptor activity through intracellular Cys430. *J Neurosci* 29: 12284-12891.
- Coffman JA, Coluccio A, Planchart A, Robertson AJ (2009). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo III. Role of mitochondrial redox signaling via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Dev Neurobiol* 330: 123-130.
- Cohen G (1994). Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 738: 8-14.
- Colton C, Colton J, Gilbert D (1986). Changes in synaptic transmission produced by hydrogen peroxide. *J Free Radic Biol Med* 2: 141-148.
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V (2009). Enhanced tonic GABA<sub>A</sub> inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 15: 1392-1398.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 431-458.

- D'Autreaux B, Toledano MB (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824.
- Dasuri K, Zhang L, Keller JN (2012). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* 62: 170-185.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999). The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin receptor function. *Nature* 397: 359-363.
- Dawson TM, Snyder SH (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14: 5147-5159.
- Dejanovic B, Schwarz G (2014) Neuronal nitric oxide synthase-dependent S-nitrosylation of gephyrin regulates gephyrin clustering at GABAergic synapses. *J Neurosci* 34: 7763-7768.
- Demaurex N, Scorrano L (2009). Reactive oxygen species are NOXious for neurons. *Nat Neurosci* 12: 819-820.
- Devine MJ, Kittler JT (2018). Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19: 63-80.
- Dhawan S, Myers P, Bailey DMD, Ostrovsky AD, Evers JF, Landgraf M (2021). Reactive Oxygen Species Mediate Activity-Regulated Dendritic Plasticity Through NADPH Oxidase and Aquaporin Regulation. *Front Cell Neurosci* 15: 641802.
- Díaz HS, Ríos-Gallardo A, Ortolani D, Díaz-Jara E, Flores MJ, Vera I, Monasterio A, Ortiz FC, Brossard N, Osorio F, Río RD (2022). Lipid-Encapsulated Grape Tannins Prevent Oxidative-Stress-Induced Neuronal Cell Death, Intracellular ROS Accumulation and Inflammation. *Antioxidants (Basel)* 11:1928.
- DiChiara TJ, Reinhart PH (1997). Redox modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *J Neurosci* 17: 4942-4955.
- Dirksen RT (2002). Reactive oxygen/nitrogen species and the aged brain: radical impact of ion channel function. *Neurobiol Aging* 23: 837-839.
- Draguhn A, Verdorn TA, Ewert M, Seeburg PH, Sakmann B. (1990). Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA<sub>A</sub> receptor subtypes by  $\text{Zn}^{2+}$ . *Neuron* 5: 781-788.
- Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79: 157-165.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin T-S, Goldberg MP, Choi DW (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15: 6377-6388.
- Enz R, Cutting GR (1999). GABAC receptor  $\rho$  subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci* 11: 41-50.
- Evans PH (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49: 577-587.
- Farrant M, Nusser Z (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6: 215-229.

- Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Carlen PL (1998). Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *J Neurophysiol* 80: 1317-1326.
- 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.
- Furukawa T, Fukuda A (2023). Maternal taurine as a modulator of Cl<sup>-</sup> homeostasis as well as of glycine/GABAA receptors for neocortical development. *Front Cell Neurosci* 17: 1221441.
- Gasulla J, Beltrán González AN, Calvo DJ (2012) Nitric oxide potentiation of the homomeric r1 GABA(C) receptor function. *Br J Pharmacol* 167: 1369-1377.
- Gasulla J, Calvo DJ (2015). Enhancement of tonic and phasic GABAergic currents following nitric oxide synthase inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 590: 29-34.
- Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Müller M (2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflügers Arch* 458: 937-952.
- Giniatullin AR, Petrov A, Giniatullin R (2019). Action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 399: 135-145.
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 722-728.
- Granzotto A, d'Aurora M, Bomba M, Gatta V, Onofri M, Sensi SL (2022). Long-Term Dynamic Changes of NMDA Receptors Following an Excitotoxic Challenge. *Cells* 11: 911.
- Greka A, Lipton SA, Zhang D (2000). Expression of GABA(C) receptor rho1 and rho2 subunits during development of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 12: 3575-3582.
- Groeger G, Quiney C, Cotter TG (2009). Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 11: 2655-2671.
- Guan B, Chen X, Zhang H (2013). Two-electrode voltage clamp. *Methods Mol Biol* 998: 79-89.
- Hahm ET, Seo JW, Hur J, Cho YW (2010). Modulation of Presynaptic GABA Release by Oxidative Stress in Mechanically-isolated Rat Cerebral Cortical Neurons. *Korean J Physiol Pharmacol* 14: 127-132.
- Halliwell B (1992). Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J Neurochem* 59: 1609-1623.
- Hawrysh PJ, Buck LT (2019). Oxygen-sensitive interneurons exhibit increased activity and GABA release during ROS scavenging in the cerebral cortex of the western painted turtle. *J Neurophysiol* 122: 466-479.
- Hernández-Ochoa EO, Schneider MF (2012). Voltage clamp methods for the study of membrane currents and SR Ca(2<sup>+</sup>) release in adult skeletal muscle fibres. *Prog Biophys Mol Biol* 108: 98-118.
- Hidalgo C, Arias-Cavieres A (2016). Calcium, reactive oxygen species, and synaptic plasticity. *Physiology (Bethesda)* 31: 201-215.
- Hoehne MN, Jacobs LJHC, Lapacz KJ, Calabrese G, Murschall LM, Marker T, Kaul H, Trifunovic A, Morgan B, Fricker M, Belousov VV, Riemer J (2022). Spatial and temporal control of mitochondrial H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> release in intact human cells. *EMBO J* 41:e109169.

- Hogg DW, Pamenter ME, Dukoff DJ, Buck LT (2015). Decreases in mitochondrial reactive oxygen species initiate GABAA receptor mediated electrical suppression in anoxia-tolerant turtle neurons. *J Physiol* 593: 2311-2326.
- Hongpaisan J, Winters CA, Andrews SB (2004). Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 10878-10887.
- Hooijmaijers C, Rhee JY, Kwak KJ, Chung GC, Horie T, Katsuhara M, Kang H (2012). Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 125: 147-153.
- Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL (2006). NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 8: 1583-1596.
- Inoue H, Murayama T, Kobayashi T, Konishi M, Yokoyama U (2021). The zinc-binding motif of TRPM7 acts as an oxidative stress sensor to regulate its channel activity. *J Gen Physiol* 153: e202012708.
- Jin H, Heller DA, Kalbacova M, Kim JH, Zhang J, Boghossian AA, Maheshri N, Strano MS (2010). Detection of single-molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling from epidermal growth factor receptor using fluorescent single-walled carbon nanotubes. *Nat Nanotechnol* 5: 302-309.
- Johnston GAR (2005). GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des* 11: 1867-1885.
- Jozefkowicz C, Scochera F, Ayub N, Soto G, Bienert GP, Alleva K (2015). Functional characterization of PIP aquaporins expressed in N<sub>2</sub>-fixing nodules of *Medicago truncatula*. Poster. Latin American Crosstalk in Biophysics and Physiology. Salto, Uruguay.
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J (1997). Long-lasting GABA- mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K<sup>+</sup> transient. *J Neurosci* 17: 7662-7672.
- Kamsler A, Segal M (2003). Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:269-276. Kaneda M, Farrant M, Cull-Candy SG (1995). Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J Physiol* 485: 419-435.
- Kapogiannis D, Mattson MP (2011). Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 10: 187-198.
- Katchalsky A, Curran PF (1965). Nonequilibrium thermodynamics in biophysics. Harvard Univ Press.
- Kaur C, Foulds WS, Ling EA (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol* 2: 879-889.
- Kedem O, Katchalsky A (1958) Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta* 27: 229-246.
- Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, Panova AS, Borodinova AA, Solotnikov MA, Stepanov EA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Pak VV, Ermakova YG, van Belle GJC, Tarabykin V, Balaban PM, Fedotov IV, Fedotov AB, Conrad M, Bogeski I, Katschinski DM, Doeppner TR, Bähr M, Zheltikov AM, Belousov VV, Bilan DS (2021). In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. *Redox Biol* 48: 102178.

- Kennedy RT, Jones SR, Wightman RM (1992). Simultaneous measurement of oxygen and dopamine: coupling of oxygen consumption and neurotransmission. *Neuroscience* 47: 603-612.
- Keros S, Hablitz JJ (2005). Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABA conductances in rat neocortex. *J Neurophysiol* 94: 2073-2085.
- Kim WK, Choi YB, Rayudu PV, Das P, Asaad W, Arnette DR, Stamler JS, Lipton SA (1999). Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO. *Neuron* 24: 461-469.
- Kishida K, Klann E (2007). Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9: 233-244.
- Kiss JP, Vizi ES (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24: 211-215.
- Klann E (1998). Cell-permeable scavengers of superoxide prevent longterm potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 80: 452-457.
- Klausberger T (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 30: 947-957.
- Knapp LT, Klann E (2002). Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C. *J Neurosci* 22: 674-683.
- Koh W, Kwak H, Cheong E, Lee CJ (2023). GABA tone regulation and its cognitive functions in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 24: 523-539.
- Lambeth JD (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189.
- Lee KY, Chung K, Chung JM (2010). Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol* 103: 382-391.
- Li X, Liu Y, Zhu A, Luo Y, Deng Z, Tian Y (2010). Real-time electrochemical monitoring of cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> integrated with in situ selective cultivation of living cells based on dual functional protein microarrays at Au-TiO<sub>2</sub> surfaces. *Anal Chem* 82: 6512-6518.
- Li Y, Yu WP, Lin CW, Chen TY (2005). Oxidation and reduction control of the inactivation gating of Torpedo ClC-0 chloride channels. *Biophys J* 88: 3936-3945.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.
- Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA (2002). Cysteine regulation of protein function-as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci*. 25: 474-480.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80: 780-787.
- Loh A, Hadziahmetovic M, Dunaief J (2009). Iron homeostasis and eye disease. *Biochim Biophys Acta* 1790: 637-649.
- Lu L (1997). Effect of substituting amino acids in extracellular disulfide loop on GABA p1 subunit function. *Brain Res* 756: 1-8.

- Lukas RJ, Bencherif M (2006). Recent developments in nicotinic acetylcholine receptor biology, in *Biological and Biophysical Aspects of Ligand-gated Ion Channel Receptor Superfamilies* (Arias HR eds) pp 2-33, Research Signpost, Kerala, India.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602.
- Maguire J, Mody I (2007). Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci* 27: 2155-2162.
- Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G (1981). Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem* 36: 589-593.
- Makino N, Sasaki K, Hashida K, Sakakura Y (2004). A metabolic model describing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination by mammalian cells including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochim Biophys Acta* 1673: 149-159.
- Maldonado-Avilés JG, Curley AA, Hashimoto T, Morrow AL, Ramsey AJ, O'Donnell P, Volk DW, Lewis DA (2009). Altered markers of tonic inhibition in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166: 450-459.
- Marowsky A, Rudolph U, Fritschy JM, Arand M (2012). Tonic Inhibition in Principal Cells of the Amygdala: A Central Role for alpha3 Subunit-Containing GABAA Receptors. *J Neurosci* 32: 8611-8619.
- Martin DL, Olsen RW (2000). *GABA in the Nervous System: The View at 50 Years*. Lippincott, Williams & Wilkins, New York.
- Marty A, Llano I (2005). Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 28: 284-289.
- Massaad CA, Klann E (2011) Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 14: 2013-2054.
- McCartney CE, McClafferty H, Huibant JM, Rowan EG, Shipston MJ, Rowe ICM (2005). A cysteine-rich motif confers hypoxia sensitivity to mammalian large conductance voltage- and Ca-activated K (BK) channel alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17870-17876.
- Means GE, Feeney RE (1971). Alkylating and similar reagents. In: Means GE, Feeney RE (eds). *Chemical Modification of Proteins*: San Francisco, CA, pp 105-132.
- Menzikov SA, Zaichenko DM, Moskovtsev AA, Morozov SG, Kubatiev AA (2023). Zinc Inhibits the GABAAR/ATPase during Postnatal Rat Development: The Role of Cysteine Residue. *Int J Mol Sci* 24: 2764.
- Meyer AJ, Dick TP (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13: 621-650.
- Miele M, Bautelle MG, Fillenz M (1994). The physiologically induced release of ascorbate in rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. *Neuroscience* 62: 87-91.
- Miller EW, Bian SX, Chang CJ (2007). A fluorescent sensor for imaging reversible redox cycles in living cells. *J Am Chem Soc* 129: 3458-3459.
- Mishina NM, Bogdanova YA, Ermakova YG, Panova AS, Kotova DA, Bilan DS, Steinhorn B, Arnér ESJ, Michel T, Belousov VV (2019) Which Antioxidant System Shapes Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gradients? *Antioxid Redox Signal* 31: 664-670.

- Mortensen M, Smart TG (2006). Extrasynaptic alphabeta subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 577: 841-856.
- Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H (2000). Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408: 492-495.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998). Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18: 1693-703.
- Rho JM, Boison D (2022). The metabolic basis of epilepsy. *Nat Rev Neurol* 18: 333-347.
- Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Shoji H, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T (2016). Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *J Physiol* 594:115-134.
- Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Shoji H, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T (2016). Hydrogen peroxide modulates neuronal excitability and membrane properties in ventral horn neurons of the rat spinal cord. *Neuroscience* 331: 206-220.
- Olsen RW, 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.
- Olsen RW (2018). GABAA receptor: positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology* 136: 10-22.
- Oswald MC, Brooks PS, Zwart MF, Mukherjee A, West RJ, Giachello CN, Morarach K, Baines RA, Sweeney ST, Landgraf M (2018). Reactive oxygen species regulate activity-dependent neuronal plasticity in *Drosophila*. *Elife* 7e39393.
- Oswald MC, Garnham N, Sweeney ST, Landgraf M (2018) Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS Lett* 592: 679-691.
- Oyama Y, Hayashi A, Ueha T, Maekawa K (1994). Characterization of 2,7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res* 635: 113-117.
- Palmeira CM, Santos MS, Carvalho AP, Oliveira CR (1993). Membrane lipid peroxidation induces changes in gamma-[3H]aminobutyric acid transport and calcium uptake by synaptosomes. *Brain Res* 609: 117-123.
- Palmer MJ (2006). Functional segregation of synaptic GABAA and GABAC receptors in goldfish bipolar cell terminals. *J Physiol* 577: 45-53.
- Pan ZH, Lipton SA (1995). Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J Neurosci* 15: 2668-2679.
- Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA (2000). Evidence for coassembly of mutant GABAC p1 with GABAA  $\gamma 2S$ , glycine  $\alpha 1$  and glycine  $\alpha 2$  receptor subunits in vitro. *Eur J Neurosci* 12: 3137-3145.
- Pan ZH, Zhang X, Lipton SA (2000). Redox modulation of recombinant human GABAA receptors. *Neuroscience* 98: 333-338.
- Pellmar TC (1995). Use of brain slices in the study of free-radical actions. *J Neurosci Meth* 59: 93-98.
- Penna A, Wang DS, Yu J, Lecker I, Brown PM, Bowie D, Orser BA (2014). Hydrogen Peroxide Increases GABAA Receptor-Mediated Tonic Current in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci* 34: 10624-10634.

- Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 52: 261-281.
- Pierce SR, Germann AL, Evers AS, Steinbach JH, Akk G (2020). Reduced Activation of the Synaptic-Type GABAA Receptor Following Prolonged Exposure to Low Concentrations of Agonists: Relationship between Tonic Activity and Desensitization. *Mol Pharmacol* 98: 762-769.
- Pouille F, Marin-Burgin A, Adesnik H, Atallah BV, Scanziani M (2009). Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat Neurosci* 12: 1577-1585.
- Pouille F, Scanziani M (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293: 1159-1163.
- Qian H, Ripps H (2009). Focus on molecules: the GABAC receptor. *Exp Eye Res* 88: 1002-1003.
- Ramasarma T (1982). Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biomembranes. *Biochimica Biophysica Acta* 694: 69-93.
- Rebec GV, Pierce RC (1994). A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol* 43: 537-565.
- Rego AC, Santos MS, Oliveira CR (1996). Oxidative stress, hypoxia, and ischemia-like conditions increase the release of endogenous amino acids by distinct mechanisms in cultured retinal cells. *J Neurochem* 66: 2506-2516.
- Rhee SG (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882-1883.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17: 183-189.
- Rice ME (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23: 209-216.
- Rice ME (2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a dynamic neuromodulator. *Neuroscientist* 17: 389-406.
- Rice ME, Forman RE, Chen BT, Avshalumov MV, Cragg SJ, Drew KL (2002). Brain antioxidant regulation in mammals and anoxia-tolerant reptiles: balanced for neuroprotection and neuromodulation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133: 515-125.
- Rice ME, Russo-Menna I (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 82: 1213-1223.
- Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A (2010). Mitochondrial ROS generation and its regulation Mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Antioxid Redox Signal* 14: 459-468.
- Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling: the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* 562: 27-36.
- Safulina VF, Afzalov R, Khiroug L, Cherubini E, Giniatullin R (2006). Reactive oxygen species mediate the potentiating effects of ATP on GABAergic synaptic transmission in the immature hippocampus. *J Biol Chem* 281: 23464-23470.
- Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002). Modulation of the GABA-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80: 383-391.

- Sah R, Schwartz-Bloom RD (1999). Optical imaging reveals elevated intracellular chloride in hippocampal pyramidal neurons after oxidative stress. *J Neurosci* 19: 9209-9217.
- Sallard E, Letourneur D, Legendre P (2021). Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci.* 78:5341-5370.
- Sanford AL, Morton SW, Whitehouse KL, Oara HM, Lugo-Morales LZ, Roberts JG, Sombers LA (2010). Voltammetric detection of hydrogen peroxide at carbon fiber microelectrodes. *Anal Chem* 82: 5205-5210.
- Saransaari P, Oja SS (1998). Release of endogenous glutamate, aspartate, GABA, and taurine from hippocampal slices from adult and developing mice under cell-damaging conditions. *Neurochem Res* 23: 563-570.
- Saransaari P, Oja SS (2008). Characteristics of GABA release induced by free radicals in mouse hippocampal slices. *Neurochem Res* 33: 384-393.
- Scialò F, Sriram A, Fernández-Ayala D, Gubina N, Löhmus M, Nelson G, Logan A, Cooper HM, Navas P, Enríquez JA, Murphy MP, Sanz A (2016). Mitochondrial ROS produced via reverse electron transport extend animal lifespan. *Cell Metab* 23: 725-734.
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005). Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 25: 10016-10024.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003). GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6: 484-490.
- Sente A, Desai R, Naydenova K, Malinauskas T, Jounaidi Y, Miehling J, Zhou X, Masiulis S, Hardwick SW, Chirgadze DY, Miller KW, Aricescu AR (2022). Differential assembly diversifies GABAA receptor structures and signalling. *Nature* 604:190-194.
- Sieghart W (1995). Structure and pharmacology of GABAA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47: 181-234.
- Sieghart W, Ernst M (2005). Heterogeneity of GABAA receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents* 5: 217-242.
- Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012). A novel GABAA receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha+ beta-interface. *Br J Pharmacol* 166: 476-485.
- Sieghart W, Sperk G (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2: 795-816.
- Sies H (2021). Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol* 41: 101867.
- Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 86:715-748.
- Sies H, Jones DP (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21:363-383.
- Sigel E (2002). Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABAA receptors. *Curr Top Med Chem* 2: 833-839.
- Sigel E, Buhr A (1997). The benzodiazepine binding site of GABA A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 425-429.
- Sigel E, Luscher BP (2011). A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. *Curr Top Med Chem* 11: 241-246.

- Sigel E, Minier F (2005). The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49: 228-34.
- Sigel E, Steinmann ME (2012). Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *J Biol Chem* 287: 40224-40231.
- Simon F, Leiva-Salcedo E, Armise'n R, Riveros A, Cerda O, Varela D, Eguiguren AL, Olivero P, Stutzin A (2010). Hydrogen peroxide removes TRPM4 current desensitization conferring increased vulnerability to necrotic cell death. *J Biol Chem* 285: 37150-37158.
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24:1583.
- Smart TG, Moss SJ, Xie X, Huganir RL (1991). GABAA receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol*, 103:1837-1839.
- Smith KA, Waypa GB, Schumacker PT (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. *Redox Biol* 13: 228-234.
- Smythies J (1999). Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review. *Eur J Pharmacol* 370: 1-7.
- Somogyi P, Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26.
- Srikun D, Albers AE, Nam CI, Iavarone AT, Chang CJ (2010). Organelle-targetable fluorescent probes for imaging hydrogen peroxide in living cells via SNAP-tag protein labeling. *J Am Chem Soc* 132: 4455-4465.
- Stell BM, Mody I (2002). Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22: RC223.
- Stepanova A, Konrad C, Manfredi G, Springett R, Ten V, Galkin A (2019). The dependence of brain mitochondria reactive oxygen species production on oxygen level is linear, except when inhibited by antimycin A. *J Neurochem*.148: 731-745.
- Stone JR (2004). An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys* 422: 119-124.
- Stone JR, Yang S (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8: 243-270.
- Stórustovu SI, Ebert B (2006). Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABAA receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1351-1359.
- Stowe DF, Camara AK (2009) Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* 11: 1373-1414.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995). Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270: 296-299.
- 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, Cserép C, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyíri G (2007). Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci* 27: 8101-8111.

- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 662-680.
- Takahashi A, Mikami M, Yang J (2007). Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons. *Eur J Neurosci* 25: 705-716.
- Tang LH, 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.
- Tarasenko A, Krupko O, Himmelreich N (2012). Reactive oxygen species induced by presynaptic glutamate receptor activation is involved in [3H]GABA release from rat brain cortical nerve terminals. *Neurochem Int* 61: 1044-1051.
- Thiels E, Urban NN, Gonzalez-Burgos GR, Kanterewicz BI, Barrionuevo G, Chu CT, Oury TD, Klann E (2000). Impairment of longterm potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci* 20: 7631-7639.
- Thompson AJ, Lummis SCR (2006). 5-HT3 receptors. *Curr Pharm Des* 12: 3615-3630.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW, Zorumski CF (2001). Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31: 75-85.
- Toledano MB, Planson AG, Delaunay-Moisan A (2010). Reining in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for safe signaling. *Cell* 140: 454-456.
- Tolman JA, Faulkner MA (2009). Vigabatrin: a comprehensive review of drug properties including clinical updates following recent FDA approval. *Expert Opin Pharmacother* 10: 3077-3089.
- Vardya I, Drasbek KR, Dósa Z, Jensen K (2008). Cell type-specific GABA A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 100: 526-532.
- Vega-Saenz De Miera E, Rudy B (1992). Modulation of K<sup>+</sup> channels by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1681-1687.
- Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fieschi F (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel)* 10: 890.
- Wall MJ (2003). Endogenous nitric oxide modulates GABAergic transmission to granule cells in adult rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 18: 869-878.
- Wang Y, Hekimi S (2015). Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: untangling the knot. *Science* 350:1204-1207.
- Weng TX, Godley BF, Jin GF, Mangini NJ, Kennedy BG, Yu ASL, Wills NK (2002). Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C839-C849.
- Wilkins ME, Smart TG (2002). Redox modulation of GABAA receptors obscured by Zn<sup>2+</sup> complexation. *Neuropharmacology* 43: 938-944.
- Wilson J X, Peters CE, Sitar SM, Daoust P, Gelb AW (2000). Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes. *Brain Res* 858:61-66.
- Winkler BS, Orselli SM, Rex TS (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 17: 333-349.

Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG (2010). Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation for cell signaling. *Cell* 140: 517-528.

Yoneda Y, Kuriyama K, Takahashi M (1985). Modulation of synaptic GABA receptor binding by membrane phospholipids: possible role of active oxygen radicals. *Brain Res.* 333:111-22.

Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM (2011). Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 152: 844-852.

Zangerle L, Cuenod M, Winterhalter KH, Do KQ (1992). Screening of thiol compounds: depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices. *J Neurochem* 59: 181-189.

Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA (2001). Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends Pharmacol. Sci* 22: 121-132.

Zhang J, Slaughter MM (1995). Preferential suppression of the ON pathway by GABAC receptors in the amphibian retina. *J Neurophysiol* 74: 1583-1592.

Zhang Y, Ying F, Tian X, Lei Z, Li X, Lo CY, Li J, Jiang L, Yao X (2022). TRPM2 Promotes Atherosclerotic Progression in a Mouse Model of Atherosclerosis. *Cells.* 11:1423.