

## Tesis de Posgrado

# Caracterización farmacológica y biofísica de los receptores ionotrópicos de Gaba

Goutman, Juan D.

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Goutman, Juan D.. (2003). Caracterización farmacológica y biofísica de los receptores ionotrópicos de Gaba. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3635\\_Goutman.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3635_Goutman.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Goutman, Juan D.. "Caracterización farmacológica y biofísica de los receptores ionotrópicos de Gaba". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3635\\_Goutman.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3635_Goutman.pdf)

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CARACTERIZACION FARMACOLÓGICA  
Y BIOFÍSICA DE LOS RECEPTORES  
IONOTRÓPICOS DE GABA**

Autor

**Lic. Juan D. Goutman**

Director

**Dr. Daniel J. Calvo**

3635

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
(INGEBI UBA-CONICET)

Diciembre 2003

## Resumen

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central de vertebrados y hasta el momento se han caracterizado tres tipos de receptores de GABA, según sus propiedades farmacológicas: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores de GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) y GABA<sub>C</sub> (GABA<sub>C</sub>R) comparten además su mecanismo de señalización, ambos son receptores ionotrópicos con una alta permeabilidad a iones cloruro. Los receptores de GABA<sub>B</sub> son metabotrópicos, generalmente acoplados a proteínas G.

En esta tesis se presenta una extensa caracterización de las propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores de GABA, con especial énfasis en los GABA<sub>C</sub>R. Este subtipo de receptores de GABA fue el último en ser identificado y se caracteriza por su insensibilidad al antagonista clásico GABAérgico, bicuculina y por el lento curso temporal de sus respuestas. Este trabajo se realizó expresando los receptores en ovocitos de *Xenopus laevis* y estudiando sus propiedades con dos diferentes técnicas electrofisiológicas: fijación de voltaje con dos electrodos (FVDE) y *patch-clamp* en la configuración *outside out*.

Los receptores ionotrópicos de GABA (GABA-R) son modulables por una diversidad de compuestos de diferente naturaleza química. Entre ellos se encuentran los flavonoides (F), una familia de compuestos aislados de plantas vasculares que presentan una gran variedad de acciones neurofarmacológicas. Algunos son ansiolíticos y sedantes, y se ha propuesto que su mecanismo de acción sería a través de los GABA<sub>A</sub>R. En este trabajo, evaluamos la acción de un grupo de F sobre las respuestas mediadas por GABA-R. Los F utilizados en este trabajo fueron: quercetina, crisina, apigenina, morina, flavona y  $\alpha$ -naftoflavona. Contra lo esperado, los F evaluados tuvieron un efecto inhibitorio general tanto sobre los GABA<sub>A</sub>R como los GABA<sub>C</sub>R. Quercetina fue el más potente para ambos receptores con un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 4  $\mu$ M en cada caso. También se evaluó la acción de quercetina en otros receptores ionotrópicos de neurotransmisores, como los colinérgicos nicotínicos, serotonina y kainato. En todos ellos se observaron efectos inhibitorios con distinta potencia.

Tanto los GABA<sub>A</sub>R como los GABA<sub>C</sub>R son sensibles al alcaloide picrotoxina. Se han propuesto distintos mecanismos para su acción sobre los GABA<sub>A</sub>R incluyendo efectos no-competitivos y mixtos. Sin embargo, aún no se ha esclarecido suficientemente el mecanismo de acción en los GABA<sub>C</sub>R. Picrotoxina produjo una inhibición reversible con un IC<sub>50</sub> = 0.6  $\pm$  0.1  $\mu$ M. La curva dosis-respuesta (D-R) para GABA en presencia del antagonista (1, 10 y 100  $\mu$ M) sufrió un desplazamiento hacia la derecha y para las concentraciones más altas de esta toxina, una reducción en la respuesta máxima. Este resultado sugeriría un mecanismo de acción de tipo no-competitivo. No obstante, al igual que los antagonistas competitivos, las respuestas a concentraciones bajas de GABA fueron más sensibles a picrotoxina que las más altas. La inhibición por esta toxina fue también dependiente del uso, es decir, requirió la activación de los receptores para ejercer su efecto. La recuperación de la inhibición también fue facilitada por la acción de GABA. Además, picrotoxina produjo un aumento en la velocidad de de-activación de las respuestas al GABA, sugiriendo un mecanismo de tipo no-competitivo. En resumen, la inhibición de los GABA<sub>C</sub>R por picrotoxina tendría un mecanismo de acción no-competitivo o mixto, y dependiente del uso aunque menos que los GABA<sub>A</sub>R.

Los GABA<sub>C</sub>R son sensibles a la modulación por iones trivalentes de la serie de los lantánidos (L) que producen un incremento en las respuestas a GABA. En un estudio previo se caracterizó la acción de uno de los elementos pertenecientes a los L, lantano (La<sup>3+</sup>); mientras que en este trabajo se analizaron los efectos de otro, lutecio (Lu<sup>3+</sup>). Ya en experimentos preliminares, se observó que la acción de Lu<sup>3+</sup> sería más compleja ya que produjo un aumento rápido de la corriente, seguido de una atenuación durante la aplicación del ión sobre la respuesta a GABA. Lu<sup>3+</sup> provocó un aumento en la afinidad aparente por GABA (0.4  $\pm$  0.1  $\mu$ M) y un incremento en la respuesta máxima a concentraciones saturantes de agonista. También se evaluó cómo afectaba la presencia de Lu<sup>3+</sup> a la acción de ciertos antagonistas, como parámetro de la función de los GABA<sub>C</sub>R. El antagonista competitivo, TPMPA, inhibió las respuestas evocadas por GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> con una potencia semejante a lo observado en ausencia de este ión. No obstante, no tuvo un efecto protector de la atenuación de la respuesta mediada por Lu<sup>3+</sup>, sugiriendo que este proceso sería operado por este ión independientemente de GABA. Las respuestas evocadas en presencia de Lu<sup>3+</sup> también fueron sensibles a picrotoxina pero con características diferentes a lo ya descrito. Se elaboró, además, un modelo de *gating* de los GABA<sub>C</sub>R y de la acción de Lu<sup>3+</sup>, donde se propone la existencia de dos estados abiertos, revelado por la presencia de este ión, que además mediaría un proceso de desensibilización independiente de GABA.

Los estudios existentes sobre la cinética de los GABA<sub>C</sub>R fueron hechos con técnicas de pobre resolución temporal, y por esto decidimos realizar esta serie de experimentos en parches de membrana con la técnica de *patch-clamp* en la configuración *outside out*. Las respuestas al GABA obtenidas con esta metodología presentaron un curso temporal característico de los GABA<sub>C</sub>R: activación y de-activación lentas, de varios segundos de duración, con escasa desensibilización. La afinidad aparente por GABA calculada fue 4.0  $\pm$  0.8  $\mu$ M con un n de Hill = 1.7  $\pm$  0.5. La relación corriente-voltaje fue lineal, y el canal mostró una permeabilidad alta a cloruro. Se evaluó la sensibilidad de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana a una serie de agonistas (TACA,  $\beta$ -alanina, glicina), antagonistas (TPMPA, picrotoxina, quercetina, zinc) y moduladores (La<sup>3+</sup> y Lu<sup>3+</sup>) conocidos. Todos estos produjeron efectos similares al descrito previamente. Un estudio más profundo de la cinética de de-activación de las respuestas mostró que a concentraciones altas de agonista, la relajación era mejor descrita por ecuación de decaimiento exponencial de segundo orden; mientras a dosis cercanas al EC<sub>50</sub>, de primer orden. Esto sugeriría un modelo de *gating* con dos estados abiertos con distinta cantidad de moléculas de agonista unido, que fue evaluado realizando simulaciones numéricas de la actividad del receptor.

## Abstract

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in vertebrate central nervous system. Three GABA receptors subtypes have been described according to their pharmacological properties: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, and GABA<sub>C</sub>. GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) and GABA<sub>C</sub> (GABA<sub>C</sub>R) receptors also share their signaling mechanism, they are both ionotropic receptors with high chloride permeability. GABA<sub>B</sub> receptors are metabotropic and commonly coupled to G protein.

In this thesis, we show an extent pharmacological and biophysical description of GABA receptors with special interest in GABA<sub>C</sub>R. This is the more recently identified GABA receptor and characterizes by its resistance to the classic GABAergic antagonist, bicuculine, and its slow time-course responses. Receptors were studied in this work by means of the expression in *Xenopus laevis* oocytes and two different electrophysiological techniques: two-electrode voltage clamp (TEVC) and patch-clamp in outside out configuration.

Ionotropic GABA receptors (GABA-R) can be modulated by a variety of compounds with different chemical structure. Flavonoids (F) are a group of compounds isolated from vascular plant that show distinct neuropharmacological effects. Some of them are anxiolytic and sedative, and a mechanism mediated by GABA receptors has been suggested. In this study, we have evaluated the effects of a group of F on GABA receptors function. The F tested were: quercetin, chrisin, apigenin, morin, flavone and  $\alpha$ -naphthoflavone. Unexpectedly, these F showed an overall inhibitory effects on GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>C</sub>R. Quercetin was the most potent antagonist on both types of receptors with an IC<sub>50</sub> value of approximately 4  $\mu$ M. The actions of quercetin on other ionotropic neurotransmitter receptors, like cholinergic nicotinic, serotonin and kainate, were also tested. Different degrees of inhibition were observed in all of them.

Both GABA<sub>A</sub>R and GABA<sub>C</sub>R can be blocked by the alkaloid picrotoxin. Different mechanisms of action have been proposed for the inhibition of this antagonist on GABA<sub>A</sub>R, including non-competitive and mix effects.. However, the exact mechanism of action for GABA<sub>C</sub>R has not been clarified yet. Picrotoxin produced a reversible inhibition on GABA<sub>C</sub>R with an IC<sub>50</sub> = 0.6  $\pm$  0.1  $\mu$ M. Dose-responses (D-R) curves in the presence of this antagonist (1, 10 and 100  $\mu$ M) were right-shifted and an insurmountable blockage was seen for high concentrations of toxin. All these suggest a non-competitive mechanism of action. However, as described for competitive antagonists, inhibition was more profound with low agonist concentrations than higher. Picrotoxin action was also use-dependent, i.e., receptor activation was required to exert its effect. Antagonist wash out was also facilitated by GABA action. In addition, picrotoxin produced an increase in de-activation rate of GABA-evoked responses, suggesting a non-competitive effect. In summary, GABA<sub>C</sub>R inhibition by picrotoxin would present a non-competitive or mix mechanism of action, and also use-dependent effect, but in a lower degree than GABA<sub>A</sub>R.

GABA<sub>C</sub>R can be modulated by trivalent cations from lanthanides (L) series that produce an increase in GABA-evoked responses. The actions of lanthanum (La<sup>3+</sup>), one of the L, on GABA<sub>C</sub>R have been characterized in a previous study, and here we have analyzed the effects of other L, lutetium (Lu<sup>3+</sup>). In preliminary experiments, Lu<sup>3+</sup> showed more complex actions, with a fast increase in GABA-evoked current, followed by attenuation during ion application. An increase in apparent affinity for GABA (0.4  $\pm$  0.1  $\mu$ M) and also in maximal efficacy was observed in the presence of Lu<sup>3+</sup>. The inhibition of some antagonists was evaluated in the presence of Lu<sup>3+</sup> as a parameter for GABA<sub>C</sub>R function. TPMPA, a competitive antagonist, inhibited the action of GABA and Lu<sup>3+</sup> with a potency similar to that was observed in the absence of this ion. However, Lu<sup>3+</sup> mediated current attenuation was not protected by this antagonist, suggesting that this process would be operated by this modulator independently of GABA. GABA-evoked responses in the presence of Lu<sup>3+</sup> could also be inhibited by picrotoxin but with a different profile than was previously described. In addition, a model for GABA<sub>C</sub>R gating and Lu<sup>3+</sup> actions has been elaborated, in which two open states were proposed based on this ion effect, that would also mediate a desensitization process independent of GABA.

Currently available studies on GABA<sub>C</sub>R kinetics have been carried out with techniques devoid of a proper time resolution. This is why we decided to perform experiments on membrane patches with the patch-clamp technique in outside out configuration. GABA-evoked responses showed typical GABA<sub>C</sub>R characteristics when obtained with this methodology: slow activation and de-activation kinetics, and poor desensitization even at high agonist concentrations. An apparent affinity for GABA of 4.0  $\pm$  0.8  $\mu$ M was calculated with a Hill coefficient = 1.7  $\pm$  0.5. Current-voltage relation was lineal, and the channel was highly permeable to chloride. GABA<sub>C</sub>R present in membranes patches were tested with distinct already-known agonists (TACA,  $\beta$ -alanine, glycine), antagonists (TPMPA, picrotoxin, quercetin, zinc) and modulators (La<sup>3+</sup> and Lu<sup>3+</sup>). They all showed similar effects to what was already described. An extensive study on de-activation kinetics of GABA-evoked currents showed that relaxation at high concentrations was better fit by a second order exponential decay equation, while at EC<sub>50</sub> doses a first order was used. This would suggest a gating model with two open states with distinct number of agonist bound molecules, that was evaluated by numerical simulations of receptors function.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

Juan D. Goutman, Maximiliano D. Waxemberg, Francisco Doñate-Oliver, Pablo E. Pomata & Daniel J. Calvo. (2003) Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors.  
European Journal of Pharmacology 461, 79-87.

Juan D. Goutman & Daniel J. Calvo. (2003) Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA<sub>ρ1</sub> receptor.  
British Journal of Pharmacology (en prensa).

## Agradecimientos

A Dani, por la difícil tarea de dirigir y guiar. Por darme aire y formación hasta terminar este trabajo. Y por hacerlo de un modo humano y cálido. Muchas gracias.

A Pablo y Carolina. Si hubiera podido elegir los compañeros ideales, sin ninguna duda, serían ellos. Porque bancan siempre, siempre. Porque son solidarios hasta el cortocircuito y el quemado de equipos. Por soportarme en los malos días y en los buenos, matarnos de risa. Por toda la ayuda y por la amistad.

A Gastón, por ayudarme y dejarlo ayudar. Por ser amigo.

A Santi, porque siempre es bueno conocer buena gente.

A Belén, por toda la ayuda. Por prestarse a discutir experimentos, por dar consejos, y estar siempre dispuesta.

A Eleo, Carla, Migue, Pao, Noe, Ana, Maru, Jime y Jessica, por las mismas benditas razones. Por estar desde el principio.

A Julián, por esa amistad que sólo él genera. Por la solidaridad y la alegría.

A Ariel Escobar, por una temporada única de aprendizaje constante. Por soportarme en su casa tanto tiempo y estar siempre dispuesto. Por las simulaciones y la discusión de los modelos.

A Tania, por su calidez y generosidad. Por darme de comer como nunca en la vida.

A Carlo Manno y a Carlitos, por su amistad espontánea y sus ganas de divertirse.

A todos ellos, que lograron que uno llegue a tener nostalgia de vivir en Lubbock.

Al Dr. Ramón Latorre y a su laboratorio, y a Carlos Gonzáles, del CECS de Valdivia, por darme lugar y tiempo para aprender a hacer sellos en los ovocitos.

A los Rubinstein. Por estar siempre. A Diego, Tomás y Dani Portal por la amistad.

A Norberto, porque no se imagina lo importante que es encontrarse todas las mañana con alguien que te da un abrazo y un beso. Porque siempre escucha y da buenos consejos.

A Martín, por la nafta super.

A todo el INGEBI. A Gladys, Mari, Leonor, Irma, Marta, María de los Angeles, Alicia, Mariano, Paladini y Pablito.

A todos ellos que con su lucha hacen posible la Universidad pública y gratuita, y la investigación científica en la Argentina.

A mis viejos y a Mariana. Porque nunca faltó nada que uno pudiera esperar de ellos.

A Marta, Alejandro, Elisa y Santiago. A Luis, María José, Diego, Meme, Nati y Marco Aurelio. Por recibirme como si fuera hijo, hermano, nieto...

Al Dr. Miguel Leivi.

A los Testigos. Que son todos.

A Juli. Sin vos: ni esto ni nada.

## INDICE GENERAL

	Página
Introducción	1
Breve reseña histórica de la transmisión sináptica	2
Receptores de GABA	3
Estructura de los receptores de GABA	4
Localización de los receptores ionotrópicos de GABA	7
Propiedades farmacológicas de los receptores ionotrópicos de GABA	11
Propiedades biofísicas de los receptores ionotrópicos de GABA	20
Objetivos	25
Materiales y métodos	26
<i>Expresión de receptores sinápticos en ovocitos de rana</i>	26
<i>Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARNc</i>	26
<i>Obtención, preparación y mantenimiento de los ovocitos</i>	28
<i>Inyección de los ovocitos</i>	29
<i>Registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas mediada por receptores</i>	30
<i>Registro por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos de los ovocitos de Xenopus</i>	30
<i>Registro de las corrientes iónicas con la técnica de patch-clamp en la configuración outside out</i>	33
<i>Análisis de los datos</i>	36
<i>Modelo cinético de los GABA<sub>C</sub>R</i>	37
Resultados y Discusión	38
Capítulo I: Modulación por flavonoides de las corrientes iónicas mediadas por receptores de GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	39
I. 1 Introducción	40
I. 2 Resultados	40
I. 3 Discusión	48
Capítulo II: Estudios sobre el mecanismo de acción de picrotoxina en los receptores de GABA <sub>C</sub>	53

II. 1 Introducción	54
II. 2 Resultados	54
II. 3 Discusión	60
Capítulo III: Efecto de lutecio ( $\text{Lu}^{3+}$ ) sobre el mecanismo de <i>gating</i> de los receptores de $\text{GABA}_C$	65
III. 1 Introducción	66
III. 2 Resultados	66
III. 3 Discusión	75
Capítulo IV: Propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores de $\text{GABA}_C$ en parches de membrana	85
IV. 1 Introducción	86
IV. 2 Resultados	87
IV. 3 Discusión	95
Conclusiones	106
Referencias	108

---

**INTRODUCCIÓN**  
**Y**  
**OBJETIVOS**

---

---

## Breve reseña histórica de la transmisión sináptica

Las células nerviosas difieren de otras células del cuerpo en su habilidad para comunicarse entre sí rápidamente, y muchas veces a través de largas distancias y con gran precisión. Esta comunicación rápida y precisa es posible gracias a dos mecanismos de señalización: la conducción axonal y la transmisión sináptica.

Charles Sherrington introdujo el término “sinapsis” a fines del siglo XIX [1] para describir una zona especializada de contacto entre neuronas, que había sido por primera vez caracterizada por Ramón y Cajal como el sitio a través del que se comunican una neurona con otra [2].

Casi toda la primera mitad del siglo XX estuvo marcada por la controversia entre las hipótesis de la transmisión sináptica eléctrica y química. Los trabajos realizados en esta época se basaban en el estudio de sinapsis ganglionares y neuro-musculares, y no fue hasta el descubrimiento en esta última del potencial de placa (*end plate potential*, EPP) a fines de los años '30, que esta divergencia comenzó a allanarse. En un principio, y paradójicamente, con la caracterización del EPP por J. Eccles, quien apoyaba fuertemente la hipótesis de la transmisión eléctrica [3] y luego, a través de estudios de Schaefer [4], Kuffler [5, 6] y Fatt y Katz. En estos trabajos se observó que los EPP tenían un rol excitatorio y precedían siempre al potencial de acción en el músculo. Fenómenos similares se observaron luego en otras sinápsis periféricas.

Los primeros estudios de la fisiología sináptica en el sistema nervioso central (SNC) fueron realizados por Eccles y col., quienes casi inesperadamente, descubrieron los potenciales postsinápticos inhibitorios (PPSIs) [7]. Ellos observaron que el disparo de potenciales de acción en las motoneuronas de la médula espinal se podía inhibir estimulando la vía aferente del músculo que se oponía al movimiento del músculo inervado por la motoneurona. Las aferentes de un músculo antagonista producen PPSIs que previenen que el potencial de membrana del segmento inicial del axón alcance el umbral de disparo. Estos PPSIs hiperpolarizan la membrana y generalmente atenuan a los potenciales sinápticos producidos por sinapsis excitatorias.

A pesar de que los PPSIs de las motoneuronas estudiadas por Eccles estaban mediados por otro neurotransmisor, en el cerebro y en la médula espinal el principal neurotransmisor que media la inhibición sináptica es el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

El GABA fue descubierto casi simultáneamente por Awapara y Roberts en 1950 a partir de extractos de cerebros de mamíferos, pero su rol inhibitorio fue establecido por Florey y col.,

---

algunos años después, en neuronas del órgano receptor de estiramiento del acocil (en inglés crayfish).

El mismo Roberts descubrió que el GABA se sintetiza en las neuronas a partir del glutamato en una reacción catalizada por un subtipo de la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD) [8]. Las neuronas que sintetizan el GABA se denominan GABAérgicas. Se estima que alrededor de un 30% de las neuronas del SNC de mamíferos presentan esta característica, entre las que se encuentran la mayoría de las interneuronas de la corteza cerebral [9], las células de Purkinje del cerebelo [10, 11] y las células amácrinas de la retina.

## Receptores de GABA

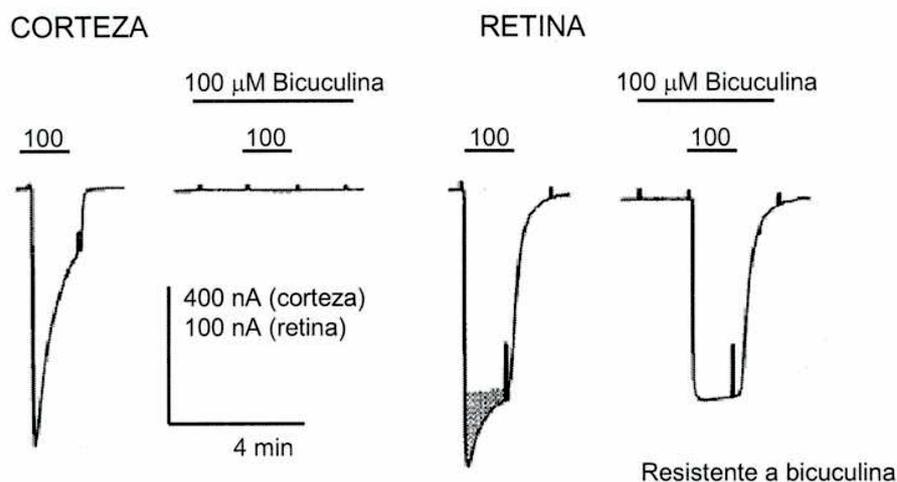
Como se mencionó, el rol fisiológico preponderante del GABA es el de producir inhibición sináptica en neuronas del SNC a través de los PPSIs en la neurona postsináptica. Las propiedades de estos eventos sinápticos dependen del tipo de receptor de GABA que medie la acción del neurotransmisor.

La clasificación actual de los receptores de GABA se propuso a mediados de los años '80 [12] y se realizó sobre la base de sus propiedades farmacológicas, designando tres clases de receptores como: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores de GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) se caracterizan por su sensibilidad al antagonista bicuculina, mientras que los receptores de GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) son insensibles a la inhibición por este antagonista, pero activables por baclofen.

A su vez, los receptores de GABA<sub>C</sub> (GABA<sub>C</sub>R) son insensibles a ambos compuestos y esta fue la clave para su caracterización. Las primeras evidencias de la existencia de receptores ionotrópicos de GABA diferentes a los receptores de GABA<sub>A</sub> surgieron a partir de ensayos de *binding* en membranas de cerebelo, y casi simultáneamente, a partir de el estudio de las respuestas sinápticas del tectum óptico de la rana [13, 14].

Posteriormente, Miledi y col. lograron aislar las primeras corrientes iónicas mediadas por GABA<sub>C</sub>R mediante experimentos de expresión heteróloga de ARN mensajero de retina bovina en ovocitos de *Xenopus laevis* confirmando la existencia de este nueva clase de receptor [15] (ver Fig. 1). Las respuestas al GABA observadas en los ovocitos inyectados con ARNm de retina, tenían dos componentes que podían diferenciarse farmacológica y cinéticamente. Una fracción de la respuesta era bloqueable por bicuculina, y la corriente iónica remanente permanecía inalterada aún en presencia de altas concentraciones de este antagonista. Por otra parte, el agonista GABA<sub>B</sub>

baclofen era totalmente inactivo. Estas respuestas, atribuidas a la activación de los receptores de GABA<sub>C</sub>R, mostraban un aspecto muy singular, carecían de desensibilización aún a concentraciones altas de agonista y sus cursos temporales de activación y de-activación eran muy lentos. Como se muestra en la Fig. 1, los ovocitos inyectados con ARNm de corteza cerebral, en cambio, presentaban respuestas del tipo GABA<sub>A</sub>.



**Fig. 1:** Corrientes iónicas evocadas por GABA en ovocitos inyectados con ARNm total aislado de corteza cerebral o retina bovina. Corteza: respuestas mediadas por GABA<sub>A</sub>R, sensibles al antagonista bicuculina. Retina: respuestas mixtas, mediadas por GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R. La región sombreada en el trazo de la izquierda corresponde a la componente GABA<sub>A</sub> de la respuesta, sensible a bicuculina. El trazo de la derecha, mediado por GABA<sub>C</sub>R, corresponde a la componente insensible a este antagonista. (tomado de [15])

## Estructura de los receptores de GABA

### Receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>

Además de las diferencias farmacológicas, los receptores de GABA se distinguen por su mecanismo de funcionamiento. Ambos receptores, GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R, son ionotrópicos o sea canales iónicos y presentan una alta permeabilidad al ión cloruro (Cl<sup>-</sup>). Cuando el GABA se une al receptor, provoca la apertura del canal que lleva al potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio para el Cl<sup>-</sup>, disminuyendo la excitabilidad [16].

Por su estructura, se los considera que los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, y dentro de ésta, a la familia de receptores con lazo de cisteína (*cys loop receptors*), que incluye a los receptores de glicina, serotonina y los colinérgicos nicotínicos (Fig. 2). La topología típica de una subunidad perteneciente a los receptores de esta familia consta de una región N-terminal extracelular muy larga, seguida por 4 dominios transmembrana (M1-M4) y un extremo C-terminal corto extracelular. El N-terminal contiene un péptido señal, sitios de glicosilación y un lazo de 15 residuos cerrado por un puente disulfuro que ha sido propuesto como un determinante conformacional importante para la interacción con el ligando correspondiente [17]. Entre las regiones M3 y M4, además, se extiende un largo lazo intracelular que presenta sitios de fosforilación para PKA, PKC y tirosina-kinasas, enzimas que pueden modular la amplitud de la respuesta del receptor y la tasa de desensibilización [18].

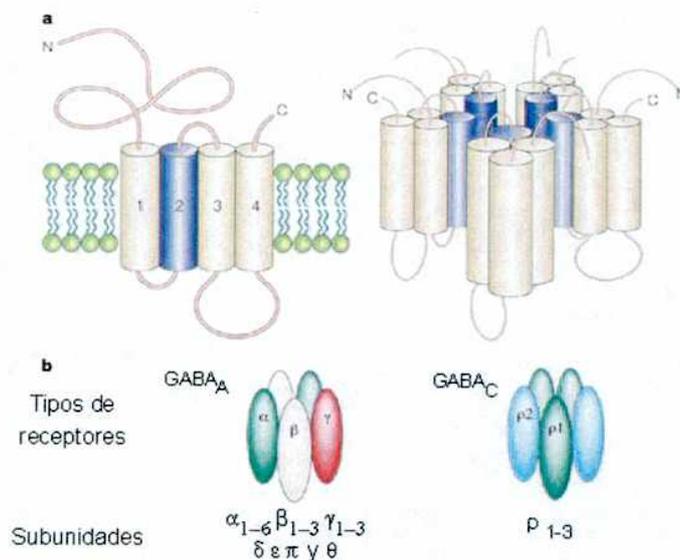
Como se puede apreciar en la Fig. 2a, las subunidades se ensamblan para formar una estructura en forma de anillo que rodea el canal central, el cual está revestido por los segmentos M2 contribuidos por cada subunidad [19]. Esta región resulta crucial para la apertura y cierre del canal (*gating*) y le confiere selectividad al paso de iones [20].

Sobre la base del análisis cristalográfico del receptor colinérgico presente en la electro-placa de *Torpedo* se ha propuesto una estructura pentamérica para los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R y se piensa que los demás miembros de esta superfamilia de receptores compartirían esta característica.

Los GABA<sub>A</sub>R son los receptores de GABA ionotrópicos prototípicos sobre el cual se han realizado la mayor cantidad de estudios y muchas de sus propiedades se conocen con bastante detalle.

Las primeras dos subunidades de los GABA<sub>A</sub>R fueron clonadas en 1987 [21] y hasta el momento, han sido encontradas dieciséis subunidades diferentes involucradas en la formación de GABA<sub>A</sub>R [22]. Estas proteínas son codificadas por genes diferentes y se han clasificadas en seis clases, todas estructuralmente relacionadas y con un peso molecular aproximado de 50 kDa ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1,2L,2S}$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\theta$  y  $\pi$ ). Hay un 30% de identidad de secuencia entre clases de subunidades y un 70% de identidad entre subclases de subunidades [22]. Aunque el número de combinaciones posibles de estas subunidades es teóricamente enorme, se presume que existirían no más de diez subtipos de receptores nativos [23]. La determinación de cuáles de ellos existen *in vivo* reviste de singular importancia considerando que se ha demostrado que las propiedades farmacológicas y

biofísicas de los receptores recombinantes en sistemas de expresión heterólogos dependen de la composición de subunidades [24-26].



**Fig. 2:** **a.** Estructura propuesta para los receptores ionotrópicos de GABA. **b.** Subunidades involucradas en la formación de receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (tomado de [27]).

Según estudios de inmunoprecipitación, alrededor de un 40% de los receptores en el cerebro presentaría la composición  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , lo cual lo convertiría en el subtipo de receptor GABA<sub>A</sub> más abundante [23]. El ensamblado de los receptores con la combinación de subunidades  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  estaría fuertemente favorecido, mientras que el arreglo  $\alpha$ - $\beta$  también daría lugar a receptores funcionales [28], pero con propiedades farmacológicas muy diferentes, como se verá más adelante. La estequiometría de receptores recombinantes o nativos sería de  $2\alpha$ ,  $2\beta$  y  $1\gamma$  según estudios de inmunoprecipitación [28], aunque existen otros trabajos que indicarían la formación de pentámeros con 2 subunidades  $\gamma$  [29, 30].

La subunidad  $\rho_1$  se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de retina humana [31]. Los receptores recombinantes expresados en ovocitos con esta subunidad mediaban corrientes iónicas que tenían las mismas características farmacológicas que las descritas por Miledi y col., es decir, insensibles a bicuculina y baclofen, y además presentaban el mismo curso temporal.

Luego, otras dos subunidades de tipo  $\rho$  fueron halladas y se denominaron  $\rho_2$  y  $\rho_3$ , formando una nueva familia de subunidades de receptores de GABA [32, 33]. Las subunidades  $\rho$  tienen

aproximadamente un 60-70% de identidad de secuencia entre sí y un 30-40% con respecto a subunidades de los GABA<sub>A</sub>R [31, 34].

La composición exacta y estequiometría de las subunidades de los receptores de GABA<sub>C</sub> nativos del SNC, es desconocida. Las subunidades  $\rho_1$  y  $\rho_2$  son capaces de formar homómeros funcionales en diferentes sistemas de expresión heterólogos [31, 32, 35]. Si bien las respuestas mediadas por ambos receptores presentaron propiedades farmacológicas y electrofisiológicas muy similares entre sí, la expresión de subunidades  $\rho_2$  solas dio lugar a corrientes iónicas considerablemente menores a las que resultaban de la expresión de  $\rho_1$ .

Las subunidades  $\rho$  no son capaces de ensamblarse con las subunidades de los GABA<sub>A</sub>R. La co-expresión en ovocitos de  $\rho$  con  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma_2$  y la co-expresión con la subunidad  $\beta$  del receptor de glicina en células HEK no dio lugar a alteraciones detectables en las corrientes macroscópicas [36]. Más aún, experimentos de co-inmunoprecipitación de subunidades  $\rho_1$  y  $\rho_2$  humanas con  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  no mostraron evidencias de que existieran interacciones entre estas proteínas *in vitro* [37]. Sin embargo, la subunidad  $\rho_1$  mutada en el residuo T314 del segmento M2, que produce aperturas espontáneas del canal [38], podría co-ensamblarse con subunidades  $\gamma_{2S}$  de GABA<sub>A</sub>R e incluso con subunidades de receptores de glicina [39].

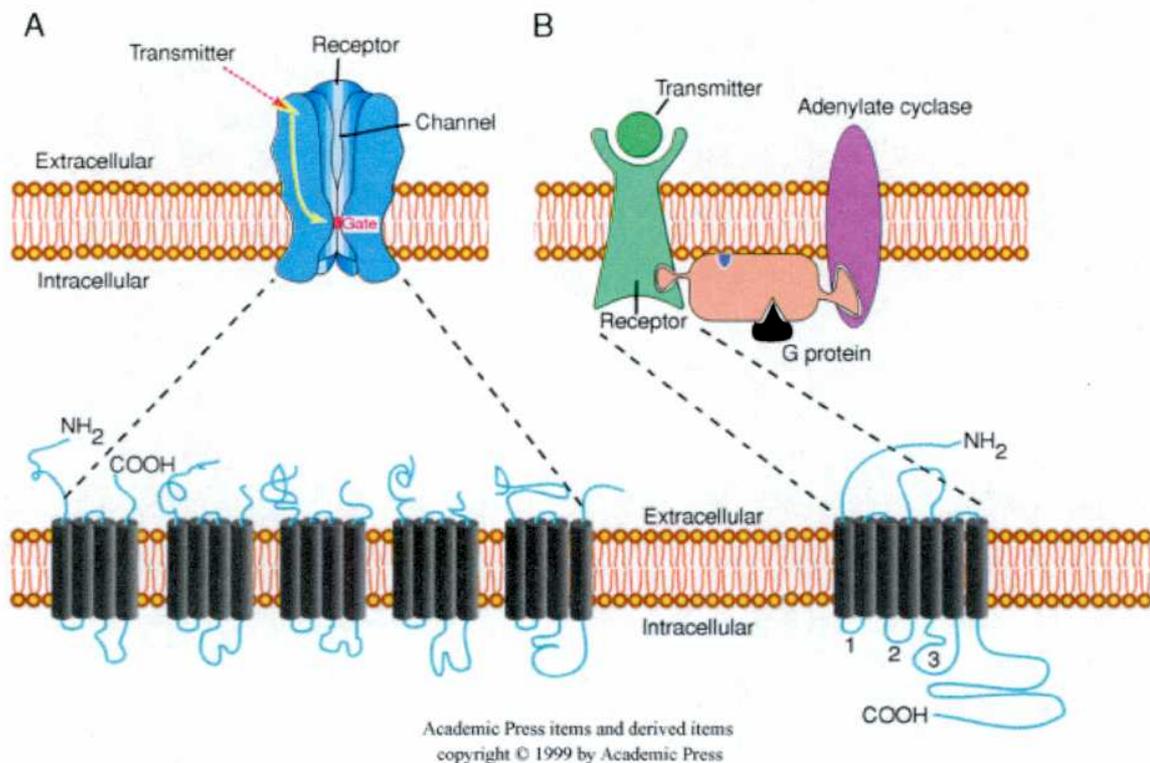
### *Receptores de GABA<sub>B</sub>*

Los receptores de GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) son metabotrópicos (Fig. 3B), generalmente están acoplados a proteínas G y sistemas de segundos mensajeros que actúan sobre canales de Ca<sup>2+</sup> o de K<sup>+</sup>. Los receptores presinápticos aumentan la conductancia de K<sup>+</sup> y disminuyen la conductancia de Ca<sup>2+</sup>, inhibiendo de esta forma la liberación del neurotransmisor. La activación de los GABA<sub>B</sub>R postsinápticos produce una hiperpolarización muy lenta por activación de canales de K<sup>+</sup>. El clonado de subunidades de este receptor reveló que presentan gran similitud estructural con la familia de receptores metabotrópicos glutamatérgicos, con un dominio N-terminal extracelular muy grande y 7 dominios transmembrana [40].

### **Localización de los receptores ionotrópicos de GABA**

Los GABA<sub>A</sub>R son ubicuos en el cerebro y la médula espinal [17]. Según estudios de localización, las subunidades de los GABA<sub>A</sub>R con más amplia distribución son  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$

y  $\gamma_2$  [41, 42]. La subunidad  $\alpha_5$  tendría una expresión más restringida, constituyendo aproximadamente un 20% de la población de GABA<sub>A</sub>R en el hipocampo. A su vez, la expresión de la subunidad  $\alpha_6$  se encuentra casi exclusivamente confinada a las células granulares del cerebelo, e íntimamente relacionada con la expresión de la subunidad  $\delta$  [41]. Los receptores ensamblados con estas dos subunidades presentan además características farmacológicas y biofísicas muy particulares [43].



**Fig. 3:** Estructura de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. **A.** Esquema de un receptor ionotrópico de la familia que contiene un lazo de cisteínas. Se ilustra la región extracelular de unión a ligando, el canal y la compuerta (*gate*). En el diagrama de abajo se detallan las cinco subunidades que forman un receptor. **B.** Esquema de un receptor metabotrópico, de siete pasos transmembranales. También se ilustra a su lado, la vía de señalización a través de la proteína G y la adenilato ciclasa. En la parte de abajo se muestra con más detalle la estructura del receptor.

Además, distintas isoformas de una misma subunidad pueden ser dirigidas a compartimentos neuronales diferentes: en las células piramidales del hipocampo,  $\alpha_2$  está presente en sinapsis axo-

axónicas mientras que  $\alpha_1$  se halla uniformemente distribuida en sinapsis somáticas, en dendritas proximales y distales, en las espinas y en el segmento inicial del axón [27].

En este sentido, se ha propuesto que la gefirina, un proteína clave en el control de la localización postsináptica del receptor de glicina, también cumpliría un rol muy importante en la estabilización de los GABA<sub>A</sub>R en la membrana postsináptica, protegiéndolos contra la endocitosis, a través de su interacción con la subunidad  $\gamma_2$  [44, 45].

Otra proteína, denominada GABARAP, co-inmunoprecipita con los GABA<sub>A</sub>R de extractos de cerebro e interactúa con los microtúbulos [46]. Los GABA<sub>C</sub>R, por el contrario, no interactúan con gefirina ni con GABARAP, sino con una proteína asociada a los microtúbulos llamada MAP-1B [47].

### *Localización y función de los GABA<sub>C</sub>R*

Estudios de localización confirmaron la presencia de las subunidades  $\rho$  de los GABA<sub>C</sub>R en la retina de distintas especies animales. Más precisamente, se observó una intensa inmunoreactividad correspondiente a las subunidades  $\rho$  en la capa plexiforme interna, donde se ubican las interconexiones entre los terminales de las células bipolares y las ganglionares y entre las células amácrinas y las bipolares. Los terminales de las células bipolares son gigantes y constituyen tienen el sitio de liberación del glutamato hacia las células ganglionares. Estas terminales sinápticas son invadidas por un tipo especial de células amácrinas GABAérgicas. En una preparación de células disociadas de la retina, se observó que las subunidades  $\rho$  estarían localizadas dentro de esta terminal [48].

Mediante técnicas de hibridización *in situ* y RT-PCR se observó que la subunidad  $\rho_2$ , pero no la  $\rho_1$ , presenta un alto nivel de expresión en muchas regiones del cerebro, incluyendo cerebelo, corteza, hipocampo y médula espinal [49]. La función de la subunidad  $\rho_2$  en estas regiones del cerebro, es desconocida.

Se han descrito corrientes iónicas evocadas por GABA con las características de los GABA<sub>C</sub>R en la retina de distintas especies animales. Por un lado, en las células bipolares de la retina de rata y salamandra tigre se describieron corrientes iónicas evocadas por GABA insensibles a bicuculina y baclofen [50, 51]. Estas respuestas, bloqueables por picrotoxina, sólo se observaron cuando el GABA se liberó mediante aplicaciones locales sobre los terminales de

estas células, pero no cuando se realizaban sobre el soma o las dendritas [51]. La activación de los GABA<sub>C</sub>R provocó una disminución de la entrada de calcio en los terminales a través de canales de calcio voltaje dependientes, sugiriendo un importante rol inhibitorio presináptico en estas células [52, 53].

La transmisión GABAérgica de las células amácrinas hacia las terminales de las células bipolares forma además un lazo de realimentación negativo ya que una parte de la información que las células bipolares envían a las células amácrinas vuelve a su terminal [52]. Esto podría aumentar la relación señal-ruido, ampliando el ancho de banda de la respuesta. De esta manera, la sinapsis amácrina-bipolar proveería un sitio de control de la ganancia para la sinapsis bipolar-ganglionar.

Recientemente, se ha descrito que en ratones en los que se ha efectuado una deleción del gen que codifica para la subunidad  $\rho_1$ , las respuestas de tipo GABA<sub>C</sub> están completamente ausentes [54]. El procesamiento visual de estos ratones resultó alterado por lo que estos resultados demuestran que la subunidad  $\rho_1$  es requerida para la expresión de receptores funcionales de GABA<sub>C</sub> y que la ausencia de los mismos afecta al flujo de información dentro de la retina.

También se describieron respuestas tipo GABA<sub>C</sub> en células bipolares del pez dorado [55] y en las células horizontales de la retina del pez gato y perca blanca [56, 57] e incluso en fotorreceptores de porcinos [58].

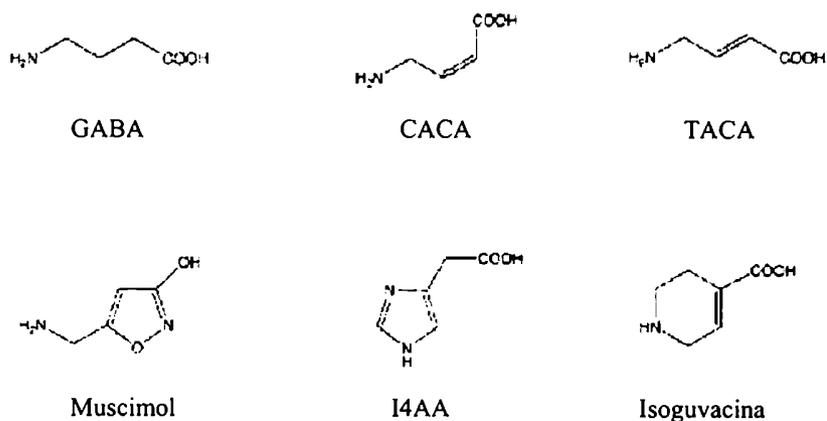
Además de la retina, se han observado respuestas tipo GABA<sub>C</sub> en distintas regiones del cerebro de mamíferos, como en el hipocampo de animales jóvenes [59] y en áreas subcorticales relacionadas con el procesamiento visual. Una de estas regiones es el colículo superior donde es posible encontrar receptores de GABA de tipo A y también C, con efectos contrastantes ya que estos últimos tendrían un efecto desinhibitorio en lugar del rol clásico inhibitorio [60, 61]. Los GABA<sub>C</sub>R estarían localizados en ciertas interneuronas GABAérgicas que mediarían, a su vez, la inhibición sobre neuronas que reciben entradas excitatorias de la retina o corteza. También se hallaron resultados similares en interneuronas del núcleo geniculado lateral, otra área visual del tálamo, donde existirían respuestas mediadas por los tres tipos de receptores de GABA [62].

## Propiedades farmacológicas de los receptores ionotrópicos de GABA

### Agonistas de los receptores ionotrópicos de GABA

El ligando fisiológico de los receptores de GABA es el GABA. Sin embargo se han encontrado en el SNC, otros compuestos capaces de interactuar con estos receptores, como el ácido imidazol-4-acético y  $\beta$ -alanina, que también fueron postulados como agonistas endógenos (ver Fig. 4) [63].

La molécula de GABA posee una considerable flexibilidad conformacional debido a que cada unión simple puede rotar libremente. Esto permite encontrar una gran variedad de análogos conformacionales del GABA con propiedades agonistas. Los receptores de GABA<sub>A</sub> presentan preferencia por las formas parcialmente plegadas de la molécula de GABA y se han encontrado análogos de esta conformación que son potentes agonistas. Algunos de ellos son: el ácido nipecótico, isoguvacina, THIP (4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-c]piridin-3-ol) y P4S (ácido piperidin-4-sulfónico). Mientras que un análogo de la conformación totalmente extendida, el 14AA (ácido imidazol-4-acético), es también un agonista GABA<sub>A</sub>, pero menos potente (ver Fig. 4) [63, 64].



**Fig. 4:** Estructura de algunos agonistas de los receptores ionotrópicos de GABA (tomado de [22]).

El muscimol es uno de los agonistas exógenos más utilizados en el estudio de los receptores de GABA<sub>A</sub>. Esta molécula es un heterociclo que puede existir en forma completamente extendida o en la conformación plegada y exhibe una gran potencia y afinidad por estos receptores.

La unión y des-unión de cada uno de estos agonistas a su sitio en el receptor representa una reacción química que sigue la ley de acción de masas. En estos procesos existe una constante de tiempo que describe la velocidad de entrada de la molécula, que se denomina  $k_{on}$ , y otra para la salida,  $k_{off}$ , que son diferentes para cada agonista. El esquema de la reacción se muestra a continuación:



Donde A, representa a la molécula de agonista y R, al receptor. La relación entre estas dos constantes,  $k_{off} / k_{on}$ , determina la afinidad del receptor por cada uno de ellos y por lo tanto, afecta también en parte al valor de la afinidad aparente (o concentración efectiva para el 50% de la respuesta,  $EC_{50}$ ).

Además, se sabe que la de-activación de las corrientes iónicas mediadas por los receptores está fuertemente determinada por el valor de la constante  $k_{off}$ . Los cursos temporales de las respuestas evocadas por cada uno de los distintos agonistas son muy diferentes y se ha observado que la relajación de las respuestas está correlacionada con la afinidad aparente del agonista utilizado [65, 66].

A su vez, la unión de los distintos agonistas tipo GABA<sub>A</sub> presenta la particularidad de tener una constante de tiempo ( $k_{on}$ ) muy lenta con relación a lo reportado para otros receptores ionotrópicos. Es decir, que la entrada del agonista a su sitio en el receptor está limitada por una barrera de energía, superior a lo esperado para una limitación simplemente difusiva, que sería aún más determinante que la constante  $k_{off}$  sobre la afinidad aparente por cada agonista [65].

Si bien la naturaleza química de todos los agonistas GABA<sub>A</sub> enumerados es muy diferente, así también como la flexibilidad conformacional o la orientación, ninguno de estos factores parece poder explicar las diferencias en las afinidades observadas. Por el contrario, existe una excelente correlación entre este parámetro y la "longitud" de la región de cada una de las distintas moléculas que es similar al GABA [65].

Las propiedades farmacológicas de los receptores GABA<sub>A</sub> dependen de la composición de

subunidades del receptor [24, 25]. Por ejemplo, la afinidad del GABA por el receptor  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , una combinación muy frecuente en el SNC, es de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ . Para otras combinaciones de subunidades se han reportado valores que van desde 1  $\mu\text{M}$  ( $\alpha_5\beta_1$ ) hasta 487  $\mu\text{M}$  ( $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ ) [24, 25, 67].

Los receptores de GABA<sub>C</sub> presentan una sensibilidad al GABA mayor que la exhibida por los de GABA<sub>A</sub>, con valores de afinidad que típicamente van de 1 a 4  $\mu\text{M}$  [15, 32, 56, 68-70]. Por otro lado una característica distintiva de los receptores de GABA<sub>C</sub> es que los análogos del GABA de rotación restringida ácido *trans*-4-aminocrotónico (TACA) y ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA) son activadores muy fuertes (Fig. 4). En estos receptores, TACA es el agonista más potente, seguido por GABA y el muscimol [67]. Otros agonistas GABA<sub>C</sub> de relevancia fisiológica son  $\beta$ -alanina y glicina aunque presentan una afinidad y eficacia máxima mucho menor [71].

Se ha demostrado que la afinidad aparente de los agonistas más potentes de los GABA<sub>C</sub>R; GABA, muscimol y TACA; presenta un grado importante de correlación con la eficacia de cada uno de ellos [66]. Es decir, que la afinidad de *binding* de estos tres agonistas es idéntica pero no así sus eficacias.

Los agonistas GABA<sub>A</sub> THIP, ácido isonipecótico y P4S se comportan como antagonistas del receptor GABA<sub>C</sub> [67].

### *Antagonistas de los receptores ionotrópicos de GABA*

El antagonista competitivo clásico de los receptores GABA<sub>A</sub> es la bicuculina, un alcaloide aislado de la planta *Dicentra cucullaria* (ver Fig. 5). Como se mencionó anteriormente, los receptores GABA<sub>C</sub> son resistentes a la acción de concentraciones bastante altas de bicuculina [15, 63]. Otra clase de antagonistas competitivos de los receptores de GABA<sub>A</sub> son los derivados piridazínicos del GABA, entre los que se encuentra SR95531 que sí tiene un efectos inhibitorios sobre los GABA<sub>C</sub>R [63, 71, 72].

Existe un antagonista específico GABA<sub>C</sub>, denominado TPMPA ((ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metilfosfónico; Fig. 5) de origen sintético, que es dos órdenes de magnitud más potente sobre esta clase de receptores respecto de los otros receptores de GABA [73]. Su mecanismo de acción es de tipo competitivo puro.

Una gran variedad de compuestos son capaces de inhibir las respuestas mediadas por los receptores ionotrópicos de GABA en forma no-competitiva o mixta, como por ejemplo: picrotoxina (Fig. 5) y TBPS (t-butilciclofosforotionato) [16, 63, 74-77].

Picrotoxina es una mezcla equimolar de dos compuestos, picrotoxina y picrotina, aislados de la planta venenosa *Anamirta cocculus*. Su acción antagonista se produce por interacción con sitios de reconocimiento ubicados en la proximidad del canal aniónico. Picrotoxina es incapaz de inhibir la fijación de agonistas a los receptores de GABA<sub>A</sub>, a diferencia de la bicuculina puede producir su efecto aún aplicada intracelularmente [16, 63].

Los mecanismos por los cuales picrotoxina bloquea las corrientes de Cl<sup>-</sup> mediadas por GABA son complejos. La aplicación de esta toxina produjo una reducción de la frecuencia de apertura del canal medida mediante registros de canal único [75]. Según estos autores, la picrotoxina se uniría preferentemente a una forma del receptor de GABA<sub>A</sub> unida al agonista y estabilizaría los estados cerrados del canal iónico asociado a GABA. Este mecanismo de acción diferencial según el estado del canal fue originalmente descrito para fármacos bloqueantes de canales abiertos y se denominó “dependencia del uso” [78]. Sobre la base de estos resultados han postulado un mecanismo alostérico de bloqueo para la picrotoxina sobre los GABA<sub>A</sub>R.

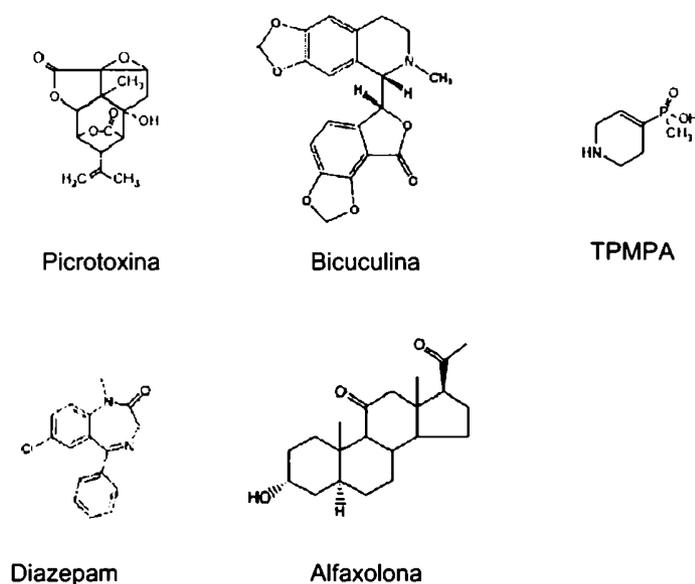
Yoon y col. propusieron que la acción de la picrotoxina es mediada por dos mecanismos diferentes. Por un lado, un bloqueo de las corrientes iónicas activadas por GABA rápido y no-competitivo; y en paralelo, una inhibición de naturaleza acompetitiva que depende del “uso” y requiere un paso previo de unión de moléculas de GABA a su receptor. En este modelo la picrotoxina se comportaría como un antagonista mixto [77].

Los GABA<sub>C</sub>R también son sensibles a la inhibición por picrotoxina aunque su mecanismo de acción sería diferente al descrito para los GABA<sub>A</sub>R. Distintas evidencias indicarían que mecanismo de acción no-competitivo puro no describiría exactamente las acciones de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R [32, 72, 79]. Además, la dependencia del uso de este antagonista sería menos marcada en receptores de bovinos y de vertebrados inferiores [57, 72]. No obstante, muchos aspectos de la inhibición de los GABA<sub>C</sub>R por este antagonista permanecen sin aclarar, y es por esto que hemos indagado en sus propiedades, en un trabajo que se muestra en el Capítulo II de esta tesis.

*Moduladores de los receptores ionotrópicos de GABA: Benzodiazepinas, barbitúricos y  $\beta$ -carbolinas.*

Las benzodiazepinas (BZD) son el grupo de psicofármacos con más alto índice de prescripción médica desde hace décadas debido a sus propiedades ansiolíticas, sedantes, miorrelajantes, anticonvulsivantes e hipnóticas [80-82].

A mediados de los años '70 las sinapsis GABAérgicas fueron identificadas como el sitio de acción de las BZD. Más tarde se descubrió que estas drogas modulaban la actividad de los receptores de GABA<sub>A</sub>, potenciando sus efectos inhibitorios sobre la actividad neuronal [63, 81-85]. Las BZD no tienen actividad por sí mismas pero incrementan la magnitud de las respuestas al GABA mediadas por receptores de GABA<sub>A</sub>. Sobre la base de su potencia farmacológica, es decir, al valor máximo alcanzado de su efecto se clasifican en agonistas totales o parciales. En la Fig. 5 se muestra la estructura química de diazepam, una de las BZD más potentes y conocidas.



**Fig. 5:** Estructura de algunos antagonistas y moduladores de los receptores ionotrópicos de GABA (tomado de [22]).

Las BZD se unen a la subunidad  $\alpha$  del receptor de GABA<sub>A</sub>. Sin embargo la presencia de la subunidad  $\gamma_2$  le confiere al receptor de GABA<sub>A</sub> una alta sensibilidad a BZD [86].

Esta modulación es altamente selectiva. Ninguno de los otros receptores a neurotransmisores (como por ejemplo: aminoácidos inhibitorios como glicina o excitatorios, como glutamato y aspartato; o monoaminas) son afectados por BZD a concentraciones terapéuticas [81].

Otros moduladores farmacológicos de la actividad de los receptores de GABA<sub>A</sub> son las  $\beta$ -carbolinas y los barbitúricos. Sus mecanismos de acción presentan características similares a las descritas para las BZD.

Los barbitúricos fueron utilizados durante años por sus efectos sedantes y anestésicos, hasta la irrupción de las BZD. La razón de este desplazamiento se debió a la extremadamente baja toxicidad de estas últimas. Los barbitúricos poseen dosis letales cercanas a los EC<sub>50</sub> y además sus acciones farmacológicas son muy amplias [63].

Sin embargo, existen también algunas  $\beta$ -carbolinas y BZDs como por ejemplo DMCM (6,7 dimetoxi-4 etil- $\beta$  carbolin-3-carboxilato), o  $\beta$ -CCB y 4'-Cl-Diazepam (RO 5-4864), que poseen efectos completamente opuestos. Son ansiogénicas y proconvulsivantes, y además inhiben las corrientes iónicas mediadas por los GABA<sub>A</sub>R, lo que llevó a que se llamaran agonistas inversos del sitio de BZD [63].

Ciertas BZD modulan la actividad de los receptores de GABA<sub>C</sub>, sin embargo el perfil farmacológico de estas acciones es claramente distinto. La ausencia de subunidad  $\gamma_2$  en los pentámeros y otras características estructurales contribuyen a esta propiedad [87].

Hasta el presente no se han encontrado efectos moduladores de  $\beta$ -carbolinas y barbitúricos sobre receptores de GABA constituidos por subunidades  $\rho$ .

### *Moduladores de los receptores ionotrópicos de GABA: Esteroides*

Los esteroides poseen una amplia y variada influencia sobre las neuronas del SNC de mamíferos. Por ejemplo se encuentran involucrados en diversos procesos en el desarrollo del cerebro, en la migración y regeneración neuronal, en la determinación de la estructura dendrítica, y la modulación de la actividad neuronal y comportamental [88-91]. Muchas de estas acciones responden a la capacidad de muchos esteroides para regular, positiva o negativamente, la expresión génica [90]. Sin embargo, existen esteroides que median eventos de control de la actividad neuronal que son independientes de su acción sobre el genoma. Estos efectos se desarrollan con latencias de segundos a unos pocos minutos, aún en presencia de inhibidores de la síntesis proteica e incluso bloqueando su acceso a los receptores intracelulares [89-91].

Los esteroides pueden actuar sobre distintos tipos de receptores de neurotransmisores y canales iónicos, incluidos los receptores ionotrópicos de GABA, y otros receptores como los de glicina y glutamato [92-95].

Se denominan “neuroesteroides” a aquellos derivados del colesterol sintetizados en células de la glía en el SNC. Algunos de los esteroides para los cuales se ha demostrado este camino biosintético son, por ejemplo, 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (pregnenolona) y varios derivados. Algunos de ellos, como la alopregnanolona (3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona) o el alotetrahidro DOC (alotetrahidrodeoxi corticosterona), se encuentran en altas concentraciones en la corteza cerebral y el hipotálamo de ratas sometidas a estrés [96]. Por el contrario, los “esteroides neuroactivos” son moléculas naturales o sintéticas que presentan algún tipo de actividad sobre el SNC [97].

Gran parte de los esteroides neuroactivos, incluyendo aquellos con efectos anestésicos, como la alfaxolona (ver estructura en Fig. 5), ejercen su acción potenciando alostéricamente las respuestas mediadas por los receptores de GABA<sub>A</sub> [89, 91, 98-103]. Otros esteroides que ejercen acciones similares son, por ejemplo: la progesterona, DOC (deoxicorticosterona), alopregnanolona o los isómeros de la pregnenolona 3 $\alpha$ -OH-DHP y THDOC [91, 92].

También se han encontrado neuroesteroides con efectos proconvulsivante y excitatorios de la actividad neuronal. Ejemplos de éstos son la pregnenolona-sulfato y la DHEAS que presentan una acción inhibitoria sobre las corrientes iónicas evocadas por GABA [90, 91, 104-106].

En un principio se especuló que el sitio de acción de estos esteroides en los receptores de GABA<sub>A</sub> era el mismo que el de los barbitúricos, sobre todo teniendo en cuenta su perfil bioquímico y electrofisiológico [89, 105, 107, 108]. Sin embargo, más tarde se descubrió que sólo compartían algunos aspectos de su mecanismo de acción [98-100, 109, 110].

La acción de los esteroides sobre los receptores de GABA<sub>C</sub> difiere en muchos aspectos. Los anestésicos esteroides clásicos, como alfaxolona, alopregnanolona y 5 $\alpha$ -THDOC presentan efectos contrapuestos: inhiben a altas concentraciones de agonista y potencian a bajas [103, 111, 112]. Otros esteroides como pregnanolona, 5 $\beta$ -THDOC y 5 $\beta$ -DHP, inhiben reversiblemente las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R. Pregnanolona fue el esteroide con mayor potencia inhibitoria, con un mecanismo de acción no-competitivo [113].

### *Moduladores de los receptores ionotrópicos de GABA: Flavonoides*

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular que se encuentran en plantas vasculares [114, 115], pertenecen al grupo de las fenil-benzopironas y presentan una variedad de estructuras básicas. Generalmente se hallan conjugados a azúcares, aunque la forma libre también ha sido identificada en la naturaleza. Los flavonoides son importantes constituyentes de la dieta humana, ya que se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos y flores [116]. Se han descrito una amplia variedad de actividades biológicas para los mismos [114, 117, 118]. Muchos poseen propiedades antivirales y antiinflamatorias, actividades vasculo-protectora y antitrombótica, espasmolítica y efectos estrogénicos, antioxidantes y protectores del riñón [117-120].

También se han caracterizado acciones neurofarmacológicas como analgesia, efectos sobre la movilidad y el sueño [121, 122], la modulación del metabolismo oxidativo neuronal [123], y efectos proconvulsivantes, anticonvulsivantes, sedantes y ansiolíticos [116, 121, 124-128]. Estos efectos sobre el sistema nervioso central (CNS) son complejos e involucran diferentes mecanismos [116, 119, 129], incluyendo acciones sobre receptores sinápticos o canales iónicos [116, 130-138].

Según estudios farmacológicos realizados en roedores, ciertos flavonoides presentan actividad ansiolítica (ej: crisina) o sedante (ej: apigenina). Además numerosos estudios de *binding* han sugerido que algunos flavonoides serían ligandos específicos del sitio de BZDs en receptores de GABA [124, 125, 127, 130].

Basados en estas y otras evidencias, se ha propuesto un mecanismo similar al de las BZDs para la modulación por flavonoides de los receptores de GABA [116, 134, 139]. Sin embargo, no existe todavía una confirmación experimental, a través de estudios funcionales, de esta hipótesis y por esto decidimos ponerla a prueba en el Capítulo I, evaluando los efectos de un grupo de flavonoides (sus estructuras químicas son ilustradas en la Fig. 6 de dicho Capítulo) sobre las corrientes iónicas mediadas por dos tipos de receptores de GABA.

### *Moduladores de los receptores ionotrópicos de GABA: iones*

La capacidad de diversos cationes de modular la actividad de receptores sinápticos y canales iónicos se conoce desde hace años. Por ejemplo, los receptores de glutamato y de glicina son

susceptibles a modulación por iones [140-143]. En particular, los receptores de glutamato tipo NMDA son inhibidos por  $Zn^{2+}$ , mientras que las corrientes mediadas por los receptores de tipo AMPA fueron potenciadas por este mismo ión [141, 142]. Notablemente, se ha encontrado  $Zn^{2+}$  dentro de los terminales nerviosos [144, 145] y se observó además, liberación de este catión a la brecha sináptica luego de la estimulación nerviosa [146, 147]. Estas observaciones sugirieron que la modulación por  $Zn^{2+}$  de receptores sinápticos podría tener una singular relevancia fisiológica.

La primera descripción acerca de la modulación de los  $GABA_A$ R por cationes inorgánicos fue realizada en la sinapsis neuromuscular de la langosta [148]. En ese trabajo se mostró como las corrientes iónicas evocadas por GABA eran bloqueadas por  $Zn^{2+}$  (y  $Cu^{2+}$ ). Luego, se reportaron resultados similares para este mismo ión y también  $Cd^{2+}$  en neuronas del SNC de vertebrados [149].

También se ha caracterizado el efecto de  $Hg^{2+}$  y otros cationes como los trivalentes correspondientes a la serie de los lantánidos, que produjeron un efecto potenciador de las respuestas de los  $GABA_A$ R [150, 151].

Los lantánidos, que pertenecen a los elementos de transición interna según la clasificación periódica, produjeron un aumento en las corrientes iónicas evocadas por GABA, con un ranking de potencia muy definido: los elementos de mayor número atómico eran los que producían mayor efecto. Una caracterización más profunda mostró que dos de los elementos pertenecientes a la serie, terbio ( $Tb^{3+}$ ) y lantano ( $La^{3+}$ , el primero de la serie), produjeron un aumento en la afinidad aparente por el GABA [151, 152]. La potenciación fue dependiente de la concentración y completamente reversible, lo que sugiere que el efecto estaría mediado por una interacción directa con los  $GABA_A$ R. Además,  $Tb^{3+}$  tuvo un efecto *per se* a concentraciones milimolares, independiente de la presencia de GABA.

Sin embargo, se ha reportado que los  $GABA_A$ R de las neuronas de la raíz dorsal de ratas son inhibidos por  $La^{3+}$  [153]. En esta preparación,  $La^{3+}$  produjo una leve potenciación en concentraciones de alrededor de 30  $\mu$ M, pero antagonizó las mismas en el rango milimolar. Estos resultados aparentemente paradójicos podrían ser atribuidos a una acción contraria de  $La^{3+}$  según las subunidades que componen los receptores en uno y otro estudio.

Los  $GABA_C$ R presentan una sensibilidad a los iones similar a la de los  $GABA_A$ R. Se ha demostrado que los  $GABA_C$ R son bloqueables por los cationes divalentes  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , pertenecientes al período 4 de la Tabla Periódica de los elementos [154]. El mecanismo de acción propuesto para  $Zn^{2+}$  fue de tipo mixto: a bajas concentraciones, competitivo y a altas, no-

competitivo [155]. Otros iones que corresponden al período 5, como  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , también tienen efectos bloqueantes sobre los  $\text{GABA}_C\text{R}$  [154, 156].

Tanto  $\text{Hg}^{2+}$  como los lantánidos presentan un efecto modulador sobre los receptores de  $\text{GABA}_C$  expresados en ovocitos [154, 156]. Las respuestas mediadas por estos receptores se vieron incrementadas en presencia de estos cationes trivalentes, y al igual que para los  $\text{GABA}_A\text{R}$ , la potencia fue mayor para los elementos de mayor número atómico, y menor radio iónico.  $\text{La}^{3+}$  produjo un aumento en la afinidad de las respuestas al GABA, provocando un desplazamiento de la curva D-R para este agonista, pero conservando el valor de la respuesta máxima [154].

En el estudio incluido en el Capítulo III, caracterizamos la acción del elemento de la serie de los lantánidos de mayor número atómico, lutecio ( $\text{Lu}^{3+}$ ). En experimentos preliminares,  $\text{Lu}^{3+}$  mostró un efecto sobre las corrientes iónicas mediadas por los  $\text{GABA}_C\text{R}$  que sugirió un mecanismo de acción diferente al de  $\text{La}^{3+}$ . Para este capítulo, se realizaron una serie de experimentos y simulaciones numéricas para intentar entender los efectos de estos iones y proponer su mecanismo de acción.

## Propiedades biofísicas de los receptores ionotrópicos de GABA

### *Permeabilidad y conductancia unitaria*

Como se ha visto, los receptores de  $\text{GABA}_A$  son canales aniónicos a través de los cuales permean, en condiciones fisiológicas, fundamentalmente iones  $\text{Cl}^-$ . Estudios previos de los potenciales sinápticos inhibitorios (IPSPs) mediados por estos receptores permitieron demostrar que estos canales pueden conducir otros iones inorgánicos y orgánicos [157]. La secuencia de permeabilidad a aniones inorgánicos es:  $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Las permeabilidades relativas se obtuvieron midiendo el potencial de reversión de la corriente evocada por GABA cuando el  $\text{Cl}^-$  del lado citoplasmático del canal era reemplazando por distintas especies aniónicas. Sin embargo, la secuencia de conductancia es casi la inversa lo cual indicaría que la tasa de transporte iónico se encuentra limitada por la unión de los aniones a sitios dentro del poro del canal [158]. Los experimentos de sustitución iónica han permitido determinar para el receptor  $\text{GABA}_A$  un tamaño de poro de aproximadamente 5.6 Å.

Estudios de “patch-clamp” en neuronas de la médula espinal en cultivo revelaron que los GABA<sub>A</sub>R tienen múltiples niveles de conductancia. El nivel predominante sería de 30 pS, pero también existirían otros estados de menor probabilidad con conductancias de 12 pS, 19 pS y 44 pS [159]. Es posible que los distintos estados de conducción encontrados reflejen la coexistencia de subtipos de receptores ensamblados con distintas combinaciones de subunidades del receptor. Por ejemplo, en células transfectadas con ADNc de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_2$ , los canales presentaron una conductancia media de 11 pS, mientras que en las células que expresaban combinaciones  $\alpha_1\beta_1$  se registró la actividad de canales con conductancias de 17 pS [16, 25]. Por su parte, los receptores ensamblados con la combinación  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  poseerían una conductancia de 30 pS [16].

Según diferentes estudios, la conductancia unitaria de los GABA<sub>C</sub>R de distintas preparaciones sería muy pequeña, en el orden de 1 pS [50, 160]. Por lo tanto, todos los estudios relacionados con las propiedades intrínsecas al canal se ven dificultados por la pobre resolución de eventos únicos de apertura. No obstante, la permeabilidad relativa para distintos iones pudo ser establecida, observándose una secuencia muy similar a la de los GABA<sub>A</sub>R, pero con una permeabilidad más alta respecto de éstos receptores para SCN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, lo que sugeriría un mayor diámetro del poro [160].

### *Propiedades cinéticas*

En los estudios preliminares de las propiedades cinéticas de los GABA<sub>A</sub>R, se observó que el proceso de activación sería más compleja que el modelo propuesto por Del Castillo y Katz (1) para canales activados por ligando [161, 162].



En aquellos trabajos se realizó un exhaustivo análisis de los tiempos en los que el canal permanecía abierto y cerrado, y se observó que la frecuencia de apertura aumentaba conforme se incrementó la concentración de GABA. Y por otro lado, que las distribuciones de los tiempos en los que el canal permanecía abierto se debían ajustar, al menos, a dos funciones exponenciales, sugiriendo más de un estado abierto y de conectividad algo más compleja.

Las corrientes unitarias a través del canal abierto del receptor GABA<sub>A</sub> pueden ser descritas como ráfagas de actividad interrumpidas por breves períodos de cierre del canal. Estos episodios tienen una duración de 15-40 mseg. con 2-3 interrupciones por ráfaga [159]. Las ráfagas de actividad serían expresión de receptores que unieron GABA y cuyas aperturas y cierres dentro de dicho fenómeno ocurrirían independientemente del ligado o liberación de nuevas moléculas de GABA. Se propusieron tres estados abiertos para este receptor que serían el reflejo de las aperturas con tres constantes de tiempo diferentes. Las constantes no dependerían de la concentración de agonista, y por lo tanto, el aumento en la magnitud de la corriente (o de la P<sub>o</sub>) evocado por mayores concentraciones de GABA sería el reflejo de un incremento proporcional de las aperturas con los tiempos más largos en detrimento de las de menor duración [163].

Este modelo de *gating* fue luego confirmado con registros de corrientes macroscópicas fuera del estado estacionario, donde además se observó que la desensibilización del receptor juega un rol importante en la delineación del curso temporal de la respuesta [164].

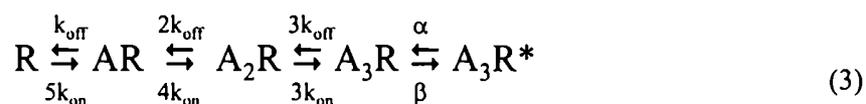
La desensibilización es un proceso de disminución en la amplitud de la respuesta, que se observa para distintos tipos de receptores ionotrópicos durante la aplicación prolongada de concentraciones saturantes de agonista [17]. Este fenómeno fue estudiado por primera vez en los receptores de acetilcolina (AChR) y representaría un importante mecanismo fisiológico de control de la excitación e inhibición en el tiempo [165]. En los GABA<sub>A</sub>R la desensibilización tendría características similares a las de los AChR, como la dependencia del voltaje; y otras distintas, como la insensibilidad a la concentración de Ca<sup>2+</sup> (extra o intracelular) [165, 166]. La magnitud de la desensibilización y la constante de tiempo con la cual se desarrolla dependerían de la concentración de GABA utilizada [167].

Como se mencionó previamente, la conductancia unitaria de los GABA<sub>C</sub>R sería de un valor muy pequeño, dificultando hasta ahora la posibilidad de realizar estudios de canal único para caracterizar las propiedades cinéticas del canal. No obstante, existen evidencias que indicarían que el tiempo medio de apertura sería largo, de cientos de milisegundos o incluso unos pocos segundos, que es coherente con la lenta cinética de relajación observada para estos receptores (ver Fig. 1, retina) [50, 160, 168]. La de-activación de las respuestas macroscópicas se ajustó a una ecuación de decaimiento exponencial de primer orden con una constante,  $\tau_{\text{deact}}$ , de  $\sim 25$  seg. [168]. También se demostró que la molécula de agonista sería capturada por el receptor, durante la apertura del canal, y que esta sería la causa de que se observen tiempos de abierto tan largos.

Los GABA<sub>C</sub>R se caracterizan además porque presentan un grado de desensibilización particularmente bajo, aún a concentraciones altas de agonista [15, 50].

Por esta misma dificultad para resolver eventos de apertura en experimentos de canal único, no ha sido posible hasta ahora determinar en forma directa la cantidad de estados cerrados y abiertos del receptor y sus constantes de tiempo características. Sin embargo, existen algunos estudios que por métodos indirectos permitieron plantear un esquema de *gating* determinado.

Uno de ellos se realizó mediante la expresión de GABA<sub>C</sub>R “heteroméricos”, ensamblados con la subunidad  $\rho_1$  salvaje o con una mutación que disminuía la afinidad aparente por GABA [169]. Al inyectar en ovocitos los ARNc de estas dos subunidades en distintas proporciones fue posible determinar que la cantidad de moléculas de agonista necesarias para activar los receptores sería de entre tres y cuatro. El modelo planteado, entonces, es el que se detalla a continuación:



$$k_{on} = 0.96 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad k_{off} = 0.18 \text{ s}^{-1} \quad \alpha = 0.31 \text{ s}^{-1} \quad \beta = 3.6 \text{ s}^{-1}$$

donde, A representa la molécula de agonista; y R, AR, A<sub>2</sub>R, y A<sub>3</sub>R al receptor en el estado cerrado, ya sea, no unido a agonista, unido a una molécula, a dos moléculas o a tres, respectivamente. A su vez, A<sub>3</sub>R\* representa al receptor en su estado abierto. Las constantes  $k_{on}$  y  $k_{off}$  determinan la afinidad por el agonista y tienen el mismo significado que lo expresado para el modelo (1). Mientras que  $\alpha$  y  $\beta$  son independientes del agonista y son las que esencialmente determinan las propiedades cinéticas del canal, como tiempo medio de abierto, tiempo medio de cerrado o probabilidad de apertura máxima ( $P_{o, \max}$ ).

Los únicos valores reportados para la mayoría de estas constantes de transición fueron obtenidos con una combinación novedosa de técnicas de electrofisiología y “binding” en ovocitos [168]. En este y otro estudio, se planteó la existencia de un solo estado abierto conductor [160, 168].

Generalmente estas constantes son estimadas a partir de registros de canal único, pero debido a la dificultad para realizar esta clase de experimentos en los GABA<sub>C</sub>R, sólo  $\alpha$  fue determinada de este modo [168]. La constante  $\beta$  se calculó indirectamente, obteniéndose un valor muy alto.

Si bien la  $P_{o, \max}$  tampoco pudo ser estimada en forma directa, a concentraciones saturantes de agonista queda definida por la relación  $\beta / (\alpha + \beta)$ , que considerando los valores mencionados determinan una probabilidad muy alta (0.92).

Aunque sus resultados son sólidos, adolecen de la falta de resolución temporal y la dificultad de obtener registros de canal único confiables. Por todo esto, decidimos realizar un estudio de la cinética de las corrientes iónicas macroscópicas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R con un sistema que permita resolver adecuadamente los cursos temporales de activación y de-activación sin alterar sus propiedades intrínsecas. En el Capítulo IV, se muestran los experimentos realizados en este sentido, intentando plantear un esquema cinético del canal que explique los resultados obtenidos.

## **OBJETIVOS**

1. Realizar una extensa caracterización de los receptores ionotrópicos de GABA, con especial énfasis en los receptores de GABA<sub>C</sub>.
  2. Evaluar la acción de un grupo de flavonoides naturales y sintéticos sobre las respuestas mediadas por receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> y relacionar los efectos observados con sus propiedades ansiolíticas y/o sedantes.
  3. Estudiar el mecanismo de acción del alcaloide picrotoxina en los receptores de GABA<sub>C</sub> y comparar sus propiedades inhibitorias con las reportadas para los receptores de GABA<sub>A</sub>.
  4. Caracterizar la modulación de los receptores de GABA<sub>C</sub> por el ión lutecio, perteneciente a la serie de los lantánidos, y plantear un modelo cinético del canal que explique sus efectos.
  5. Realizar un estudio de los receptores de GABA<sub>C</sub> en parches de membrana con un sistema de perfusión rápido que permita resolver la cinética de las respuestas sin afectar su curso temporal intrínseco.
-

---

**MATERIALES**

**Y**

**MÉTODOS**

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

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

### *Expresión de receptores sinápticos en ovocitos de rana*

La expresión de los receptores sinápticos estudiados se realizó mediante la inyección de los ovocitos con soluciones de distintos ARN codificantes. Los ARN se obtuvieron, a su vez, por transcripción *in vitro* de templados de ADN copia (ADNc), o por aislamiento de ARNm nativo a partir de cerebros de rata [170].

### *Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARNc*

Se utilizaron las secuencias completas de ADNc de las subunidades de los distintos receptores, subclonadas en plásmidos aptos para realizar la reacción de transcripción *in vitro*.

La subunidad  $\rho_1$  de los receptores de GABA<sub>C</sub>, utilizada en este trabajo, se subclonó [154] en el sitio EcoRI del plásmido pBluescript KS+ (donado por Dres. Ricardo Milei y Ataúlfo Martínez-Torres). Para lograr mayores niveles de expresión de esta subunidad, como los requeridos en los experimentos del Capítulo IV, se utilizó el plásmido pGEMHE. Este plásmido se diseñó especialmente para aumentar la expresión en ovocitos de *Xenopus*, alargando la vida media de los ARNc en su citoplasma [171]. El ADNc de  $\rho_1$  se subclonó en este plásmido que fue donado por Dra. A. Belen Elgoyhen. El subclonado fue realizado por la Dra. Mariana del Vas.

Los estudios realizados en el Capítulo I involucraron no sólo a los GABA<sub>C</sub>R, sino también los GABA<sub>A</sub>R, receptores nicotínicos colinérgicos, de serotonina y kainato. A continuación se detallan los materiales utilizados para la expresión en ovocitos de cada uno de estos receptores. Las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de receptores de GABA<sub>A</sub> de rata, subclonadas en pBluescript SK- (Promega, Madison, WI, USA) y la subunidad  $\gamma_{2S}$  del mismo origen, pero subclonada en el

---

plásmido sp6, fueron donadas por el Dr. Peter Seeburg. Para mejorar el nivel de expresión de esta última, se subclonó en pBluescript SK-. El inserto se incluyó en un sitio único, EcoRI, por lo que debieron ser chequeados tanto su orientación, como el número de copias en tándem por plásmido. Esto se realizó con EcoRV.

A su vez, las subunidades de los receptores nicotínicos neuronales de rata,  $\alpha_4$  y  $\beta_2$ , y la subunidad 5HT<sub>3A</sub> de los receptores serotoninérgicos de rata, subclonados en el plásmido pGEMHE fueron donados por los Dres. Stephen Heinemann, Jim Boulter y David Johnson.

Los receptores de kainato se obtuvieron a partir del aislamiento de ARNm total de corteza cerebelar de rata con columnas de afinidad con oligos dT [172].

Cada una de esas construcciones se propagaron en la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  y el ADN plasmídico se obtuvo mediante una purificación estándar (maxiprep o miniprep). El ADN plasmídico se precipitó con AcNa y etanol y el precipitado obtenido se secó y resuspendió en agua libre de ARNasas y ADNasas (grado biología molecular; Ambion, Austin, TX). Los plásmidos con cada inserto se linealizaron con las siguientes enzimas de restricción: las subunidades GABA<sub>A</sub>R de rata,  $\alpha_1$  con EcoRV,  $\beta_1$  con HindIII,  $\gamma_{2S}$  con HindIII; GABA<sub>C</sub>R,  $\rho_1$  humana en pBS con Sall;  $\rho_1$  en pGEMHE con NheI; nAChR  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  en NheI; y 5HT<sub>3A</sub> con NheI.

El ARNc (sentido) de cada subunidad se sintetizó usando el kit de transcripción T7 mMessage mMachine (Ambion) o RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega). El ARNc sintetizado se purificó con columnas específicas para ARN (Rneasy MiniKit, Qiagen, Valencia, CA) y se separó en alícuotas y se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización. Para chequear la integridad del ARNc obtenido, y previniéndolo de la degradación por ARNasas, se corrió un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, en hielo y durante no más de 30 min. La determinación de la cantidad de ARNc sintetizado se realizó mediante la medición de la absorbancia de luz con longitud de onda de 240 nm en espectrofotómetro.

Como se mencionó, se utilizó el sistema de expresión de los ARNc en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [170].

### *Obtención, preparación y mantenimiento de los ovocitos*

Los ovocitos fueron obtenidos de ranas de uña africanas de la especie *Xenopus laevis* (*Xenopus one*; Ann Arbor, MI o Nasco, Modesto, CA). Estas ranas se mantuvieron en un

ambiente controlado (18-20°C) con ciclo de 12hs./12hs. luz/oscuridad, en peceras con agua limpia libre de cloro, y se las alimentó una vez por semana con hígado de vaca molido.

Los ovocitos se aislaron mediante procedimientos quirúrgicos. Los animales se anestesiaron añadiendo éster etil-3-aminobenzoato (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al agua de la pecera. A través de una pequeña incisión en el abdomen (1cm. aprox.) se extrajeron varios pedazos de ovario, con cientos de ovocitos cada uno. Estos fragmentos se trataron durante 45 a 60 min con una solución de colagenasa tipo IA (Sigma) (0.8 mg./ml.) disuelta en una solución salina sin  $\text{Ca}^{2+}$  (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM; pH 7.6) para disgregar los ovocitos. El tratamiento enzimático se detuvo lavando repetidamente las células con 8 a 10 volúmenes de solución salina sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente se seleccionaron los ovocitos maduros (estadios V y VI) por su mayor tamaño relativo y estos fueron separados de a uno y librados de restos de tejido con la ayuda de pinzas de disección bajo lupa (12X). Aún a simple vista, se puede advertir que estas células presentan un patrón de pigmentación muy particular, como se muestra en la ilustración de la Fig. 6. Una mitad (“hemisferio”) es blanca o ligeramente amarillenta, y la otra, oscura. La integridad en la separación de los pigmentos se utilizó como criterio de viabilidad de los ovocitos.

Finalmente, los ovocitos fueron mantenidos en cultivo en viales de vidrio a 16°C, en grupos de 20 a 40, en una solución Barth's con antibiótico (88 mM NaCl; 0.33 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 0.41 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1.0 mM KCl; 0.82 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 2.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 10 mM HEPES; pH 7.4 ajustado con NaOH, y gentamicina 1.0 mg/ml).

### *Inyección de los ovocitos*

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

Una vez preparado el microinyector los ovocitos se colocaron dentro de una cámara de

inyección que constaba de un caja de petri plástica de 35 mm. de diámetro y cuyo fondo posee membrana de polietileno con pocillos que limitan el movimiento de los ovocitos. La cámara se llena con solución Barth's y los ovocitos se disponen con el polo vegetal (zona a inyectar, de color amarillo o blanco, carente de pigmentos) hacia arriba. La inyección se realizó en el citoplasma celular posicionando el microinyector con micromanipuladores, observando estas maniobras bajo la lupa (12 a 40X). Cada ovocito se inyectó con 50 nl. de solución de ARNc de  $\rho_1$  (~ 0.2 ng./nl.) y luego se mantuvieron en la incubadora (ver sección anterior). Los máximos niveles de expresión de los receptores homoméricos  $\rho_1$  se logran aproximadamente en las 72 hs. después de la inyección.

### *Registro electrofisiológico de las corrientes iónicas mediadas por receptores*

Las corrientes iónicas mediadas por los distintos receptores estudiados se registraron con dos diferentes técnicas electrofisiológicas: fijación de voltaje con dos electrodos (FVDE, en los Capítulo I, II y III) y *patch-clamp* en la configuración *outside out* (Capítulo IV). Cada una de estas técnicas será explicada en detalle; no obstante, parte del "set up" de registro electrofisiológico, que se describirá a continuación, se utilizó en ambos tipos de registros.

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

### *Registro por la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos de los ovocitos de *Xenopus**

Esta técnica permite evaluar la corriente iónica a través de los receptores expresados en toda

la superficie del ovocito. La célula se coloca en una cámara de registro, hecha a partir de una placa de acrílico en la que se talló una canaleta (volumen 100 $\mu$ l) con un orificio de entrada de la perfusión para la aplicación de soluciones en un extremo y un capilar conectado al sistema de succión en el otro.

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

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

Los ovocitos se colocaron en el interior de la cámara, las puntas de los microelectrodos se apoyaron sobre la célula y mediante una vibración mecánica o eléctrica (generada con la función "buzz" del amplificador) se logró acceso al interior celular.

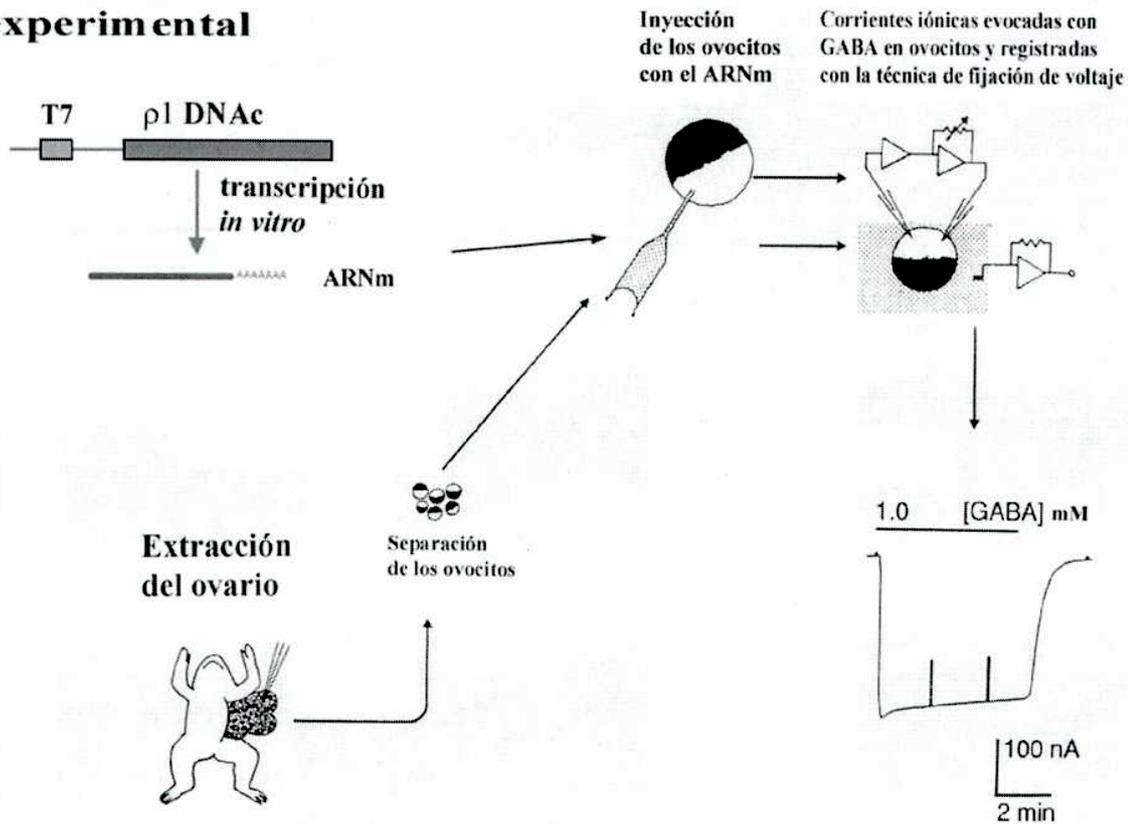
Los ovocitos se perfundieron continuamente (10-20 ml./min.) con una solución de Ringer de rana (115 mM NaCl; 2 mM KCl; 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM HEPES, pH 7).

Los valores del potencial de membrana ( $V_m$ ) normalmente fueron de -20 a -60 mV y el registro de la actividad de los receptores evocada por neurotransmisor se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje con el amplificador descrito anteriormente que permite el control del potencial de membrana. El potencial de membrana al que se fijaron los ovocitos ( $V_{sost}$ ) en estos experimentos fue de -70 mV (salvo indicaciones en contrario, como en las mediciones de la relación corriente-voltaje, I-V), que determina una fuerza electromotriz para el ión Cl<sup>-</sup> de alrededor de -55 mV (en los ovocitos, el potencial de equilibrio para Cl<sup>-</sup>,  $E_{Cl^-} \cong -25$  mV).

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

resultados se analizaron utilizando los programas Clampfit 8.1 (Axon Instruments), GraphPad Prism v. 3.0 (GraphPad Software, Inc.) y MicroCal Origin v. 5.0 (MicroCal, Northampton, MA).

## Procedimiento experimental



**Fig. 6:** Esquema del procedimiento experimental utilizado para la expresión de los receptores sinápticos en ovocitos de *Xenopus* y para realizar los experimentos de FVDE.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23 °C).

Todas las drogas (Sigma) fueron preparadas en el día a partir de stocks concentrados (0.1 M) en solución Ringer, disueltas en DMSO cuando fue necesario, a una concentración máxima de 0.1% (V/V), con la cual no se encontraron alteraciones en las propiedades o respuestas del ovocito durante el tiempo de registro. El pH de cada solución fue ajustado a 7.0.

*Registro de las corrientes iónicas con la técnica de patch-clamp en la configuración outside out*

Como se mencionó previamente, dos o tres días después de la inyección, los receptores se encuentran expresados en la membrana del ovocito. La mayor parte de los receptores se insertan en la membrana cerca del sitio de inyección del ARNc. Si bien no existe aún explicación para esta observación, la concentración de receptores en una región de la membrana facilita considerablemente el registro de corrientes macroscópicas en parches ya que favorece la obtención de una buena relación señal / ruido. Se utilizó en forma rutinaria, el centro del polo vegetal como sitio de inyección ya que es fácilmente identificable dada la forma y la coloración de los ovocitos.

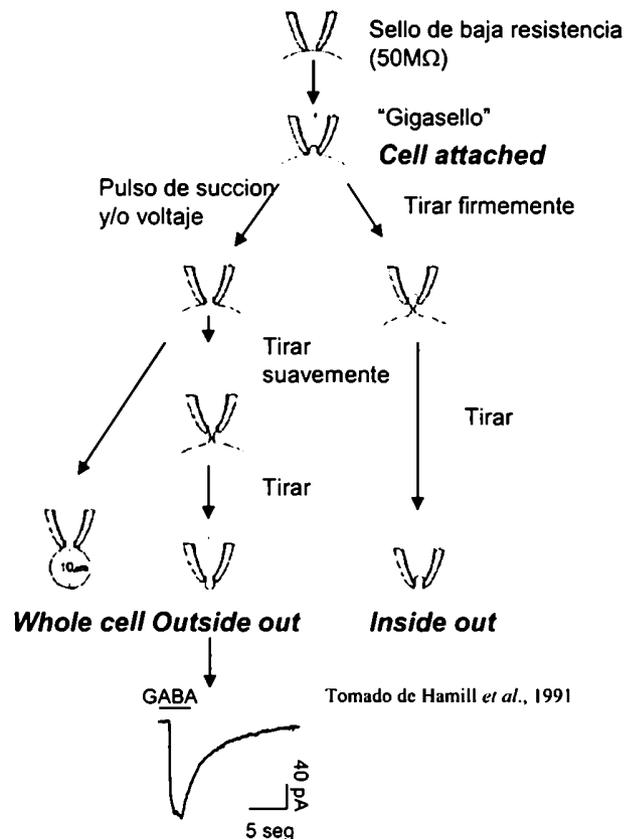
Por fuera de la membrana plasmática, los ovocitos de *Xenopus* presentan una membrana denominada vitelina, y una capa de células foliculares, que es removida durante el tratamiento con colagenasa [170]. La membrana vitelina impide el acceso a la membrana plasmática con la pipeta de *patch* y por esto, fue necesario retirarla antes de empezar el registro [173]. Para ello, se utilizaron un par de forceps de punta muy fina, con los que se removió la membrana muy suavemente de toda la superficie del ovocito.

Para el registro de las corrientes iónicas con esta técnica se utilizaron microcapilares de borosilicato de 100  $\mu$ L (VWR). Previamente, son sumergidos en una mezcla de dimetil-dicloro silano 5 % (v/v) en cloroformo por 20 min y luego secados en estufa. Este procedimiento, facilita la formación del gigasello y atenúa el transitorio capacitivo de las pipetas. Los capilares listos se estiraron en un estirador vertical (modelo P30 Sutter Instruments Co., Novato, CA), de manera de lograr pipetas con resistencias de entre 4-5 M $\Omega$ .

Las pipetas se llenaron con una solución de (en mM): NaCl 115, KCl 1, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1, ATP 3, GTP 0.3, llevada a pH 7.0 con NaOH. También se utilizaron soluciones que contenían KF pero no se observó una mejora en la formación de los sellos, y se reemplazaron por las soluciones con Cl<sup>-</sup> por la ventaja representaba la presencia de este ión dentro de la pipeta, considerando la naturaleza del canal estudiado. Para facilitar aún más la formación del sello, se sumergió la punta de la pipeta (ya estirada y llenada) en una mezcla de aceites minerales liviano y pesado (Sigma) y Parafilm (American National Can, Chicago, IL) fundido. Posteriormente, se colocó sobre el cabezal del amplificador, que a su vez, se encontraba montado sobre un

micromanipulador (modelo MX310R, Newport).

La técnica para obtener registros de patch-clamp en la configuración *outside out* consiste en la formación de un “sello” entre la pipeta de registro y la membrana del ovocito con una resistencia eléctrica del orden de los  $G\Omega$  (“gigasello”) [173]. Para esto, la pipeta se sumergió en la solución de registro, dentro de la camarita donde había sido colocado el ovocito (composición de la solución (en mM): NaCl 115, KCl 1, HEPES 10,  $MgCl_2$  1,  $CaCl_2$  0.2, y llevada a pH 7.0 con NaOH).



**Fig. 7:** Esquema de la formación del “gigasello” en la configuración *outside out* para el registro de las corrientes iónicas mediadas por los  $GABA_C$ R.

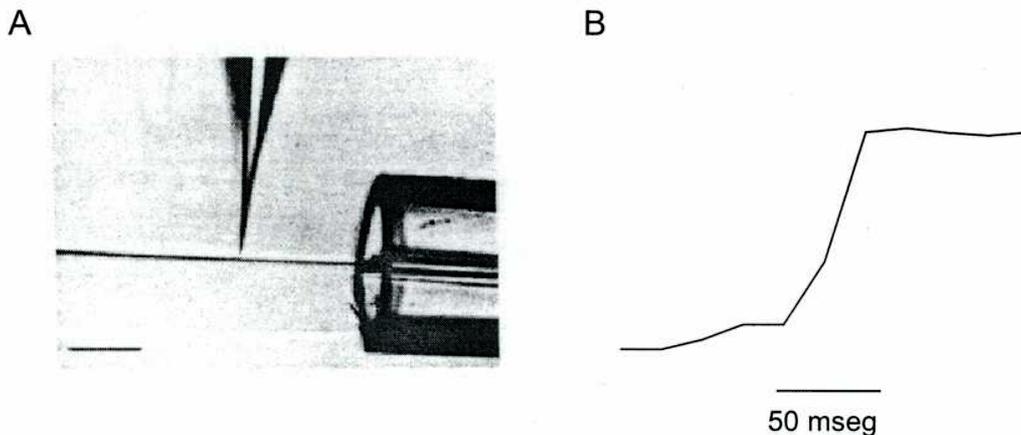
La formación del sello se logró ejerciendo una presión negativa dentro de la pipeta, mientras se controló la resistencia del mismo con un pulso de 5 mV (comandado con la computadora a través de la tarjeta de adquisición) sobre el electrodo y observando los valores de la corriente generada, en el osciloscopio. Una vez logrado el gigasello, se procedió a la ruptura de la

membrana con un golpe rápido y corto de presión negativa. De esta manera, se logró acceso eléctrico al interior de la célula.

Finalmente, para conseguir el sello en la configuración *outside out*, se procedió a retirar la pipeta desplazándola hacia atrás suavemente, por medio del micromanipulador. De esta manera, el parche volvió a formarse, esta vez con la cara extracelular de los receptores mirando hacia el exterior de la pipeta. Este último paso pudo ser controlado debido a que la resistencia del sello aumenta en la medida en la que el parche vuelve a formarse.

El registro de la corriente iónica se efectuó mediante un amplificador Axopatch 2A (Axon Instruments) con un cabezal de  $\beta = 1$ . El  $V_{\text{sost}}$  utilizado fue  $-70$  mV, salvo alguna indicación en contrario, como en las curvas I-V.

La señal amplificada en un factor de entre 1 y 100, se filtró a 2 kHz en un filtro pasabajo tipo Bessel de 4 polos con arquitectura Sallen Key. El filtro, fabricado en forma casera, presenta un control que permite variar la frecuencia de corte entre 20 y 5000 Hz. Además, posee una etapa interna de ganancia de 10 ó 100X. Finalmente la señal pudo observarse en un osciloscopio y se adquirió en una PC como se describió previamente, realizándose el análisis de los registros como se señaló en la sección anterior.



**Fig. 8:** Ilustración del sistema de perfusión sobre parches de membrana, con el sistema de tubos "tita". **A.** Fotografía de la pipeta de registro (al centro) junto al tubo "tita" (a la derecha). **B.** Trazo del "potencial de punta" de la pipeta de registro durante el cambio de solución de perfusión, con distintas concentraciones iónicas, para ilustrar la velocidad del proceso.

La perfusión sobre el parche de membrana que contenía los GABA<sub>C</sub>R, se realizó mediante un tubo denominado "tita" (por su forma similar al de la letra griega  $\theta$ , ver Fig. 8A) (Hilgenberg,

Malsfeld, Alemania). Estos tubos permitieron hacer pasar dos soluciones diferentes en su interior, sin que se mezclen, facilitando los cambios de concentración de las distintas especies de interés en un lapso de tiempo muy corto. El cambio de soluciones se efectuó moviendo ligeramente la pipeta de registro a través del micromanipulador.

El tiempo requerido para realizar un cambio de soluciones sobre la punta de la pipeta de registro fue medido para determinar la fiabilidad de los tiempos calculados en los procesos intrínsecos a los GABA<sub>C</sub>R. En la Fig. 8B se muestra un registro de fijación de corriente para determinar este tiempo, obteniéndose un valor de aproximadamente 50 mseg. en un cambio completo de solución.

### *Análisis de los datos*

En los experimentos ilustrados en el Capítulo II y III, se realizó una estimación de la cinética de ciertos procesos relacionados con la función de los GABA<sub>C</sub>R como la de-activación de las respuestas macroscópicas o la inhibición por ciertos antagonistas. El método utilizado en estos experimentos fue el de la medición del tiempo comprendido en el 10% y el 90% del proceso completo, ya sea la relajación de la respuesta, de la acción de un antagonista o el lavado del mismo.

Para calcular las constantes de tiempo características de los procesos de activación y de-activación de las respuestas estudiadas en el Capítulo IV, se realizaron ajustes individuales de los trazos de corriente por el método de cuadrados mínimos, usando el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Se utilizaron ecuaciones de decaimiento exponencial de primer o segundo orden y el criterio para seleccionar el ajuste con una u otra, fue el de menor chi cuadrado.

Los datos obtenidos, ya sea como porcentajes de inhibición o constantes de tiempo, se promediaron, obteniéndose una media y un error estándar (ES). Para comparar estos grupos de datos se utilizó el test de t de Student o ANOVA de una vía con una significancia de 95%.

Las curvas de saturación (curvas de inhibición y D-R) se ajustaron a la ecuación logística:

$$\frac{A1 - A2}{1 + \left( \frac{[Ago]}{EC_{50} \cdot IC_{50}} \right)^n} + A2$$

Donde  $A_1$  y  $A_2$  son constantes entre 0 y 100 (ó 0 y 1);  $[Ago]$ , es la concentración de agonista;  $EC_{50}$ , concentración efectiva para el 50% de la respuesta;  $IC_{50}$ , concentración efectiva para el 50% de la inhibición.

Los trazos de las corrientes iónicas durante las fases de activación y de-activación se ajustaron a ecuaciones de decaimiento exponencial de primer o segundo orden:

Primer orden: 
$$y_0 + A_1 \exp\left(-\frac{(t - t_0)}{\tau_1}\right)$$

Segundo orden: 
$$y_0 + A_1 \exp\left(-\frac{(t - t_0)}{\tau_1}\right) + A_2 \left(\exp^{-\frac{(t - t_0)}{\tau_2}}\right)$$

Donde  $y_0$  representa el nivel basal del registro;  $A_1$  y  $A_2$ , la amplitud relativa;  $t$ , el tiempo;  $t_0$  el corrimiento temporal; y  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , las constantes de tiempo características.

### *Modelo cinético de los GABA<sub>C</sub>R*

Las simulaciones numéricas del modelo de *gating* del receptor fueron realizadas con un programa casero (donado por el Dr. Ariel Escobar) escrito sobre la plataforma Lab View (National Instruments). Esencialmente, el procedimiento se realizó sobre la base del algoritmo de la matriz Q [174], donde se asume que las transiciones entre estados del canal son eventos estocásticos con una cierta probabilidad de ocurrencia, de la manera de un proceso de Markov homogéneo. El conjunto de ecuaciones diferenciales que describen el modelo se resolvió, numéricamente (LabView), fuera del estado estacionario, o encontrando la expresión analítica para el equilibrio (utilizando el programa Maple 7.0, Waterloo Maple Inc., Waterloo, Ontario, Canada). Los trazos simulados representan la probabilidad de apertura.

---

**RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN**

---

---

## CAPÍTULO I

### **Modulación por flavonoides de las corrientes iónicas mediadas por los receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>**

---

## I. 1. Introducción

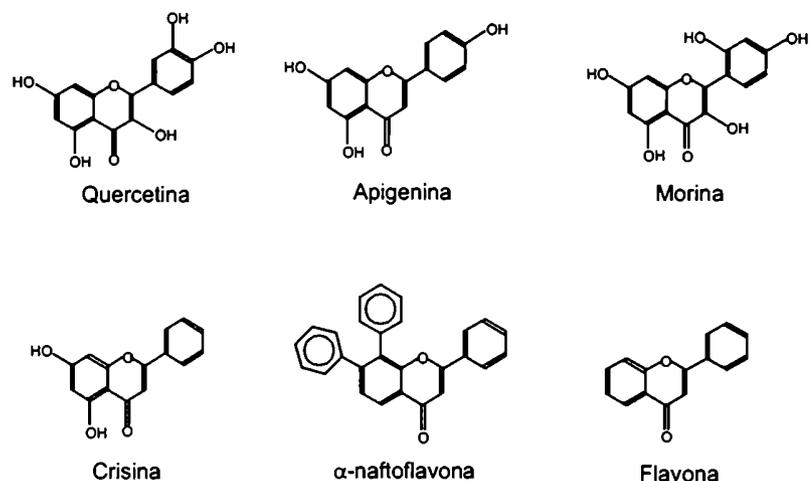
Como se mencionó previamente, se han caracterizado diversas acciones neurofarmacológicas para los flavonoides que estarían mediadas por diferentes mecanismos. Por ejemplo, se ha propuesto que dos de estos compuestos, crisina y apigenina, que presentan efectos ansiolíticos y sedantes, respectivamente; tendrían un mecanismo similar al de las BZD sobre los GABA<sub>A</sub>R [124, 125, 127, 130]. Sin embargo, todavía no existe una confirmación experimental de esta hipótesis y por esto, decidimos ponerla a prueba en este trabajo, evaluando los efectos de un grupo de flavonoides (sus estructuras químicas son ilustradas en la Fig. 9) sobre las corrientes iónicas mediadas por dos tipos de receptores de GABA.

Los flavonoides utilizados fueron: quercetina, crisina, apigenina, morina, flavona y  $\alpha$ -naftoflavona. Todos, menos este último, son de origen natural. En esta serie de experimentos se examinaron sus efectos sobre las corrientes iónicas mediadas por los GABA<sub>A</sub>R ensamblados con las subunidades  $\alpha_1\beta_1\gamma_2s$  y GABA<sub>C</sub>R homomérico  $\rho_1$ . La selectividad de la acción de los flavonoides fue también analizada mediante el análisis del efecto de quercetina sobre otros receptores ionotrópicos de neurotransmisores como el nicotínico neuronal  $\alpha_4\beta_2$ , 5-HT<sub>3A</sub> y receptores de glutamato tipo AMPA/kainato.

## I. 2. Resultados

### *Efecto de los flavonoides sobre los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R expresados en ovocitos de Xenopus*

Quercetina, una antoxantina aislada originalmente del roble (género *Quercus*) y ampliamente distribuida en la naturaleza (ej: en limón, espárragos, etc.), inhibió las respuestas mediadas por ambos tipos de receptores (Fig. 10). Quercetina 30  $\mu$ M inhibió los GABA<sub>A</sub>R en un  $84.5 \pm 6.1$  % (n = 3) y los de GABA<sub>C</sub> en un  $98.9 \pm 1$  %. Para cada tipo de receptor se elaboró una curva de inhibición completa, obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> similares. Para los GABA<sub>A</sub>R el IC<sub>50</sub> fue de  $4.8 \pm 0.5$  (n Hill =  $1.4 \pm 0.2$ ) y para los de GABA<sub>C</sub> de  $4.4 \pm 0.4$  (n Hill =  $1.5 \pm 0.2$ ). Estas diferencias no fueron estadísticamente diferentes (test t, p > 0.05).



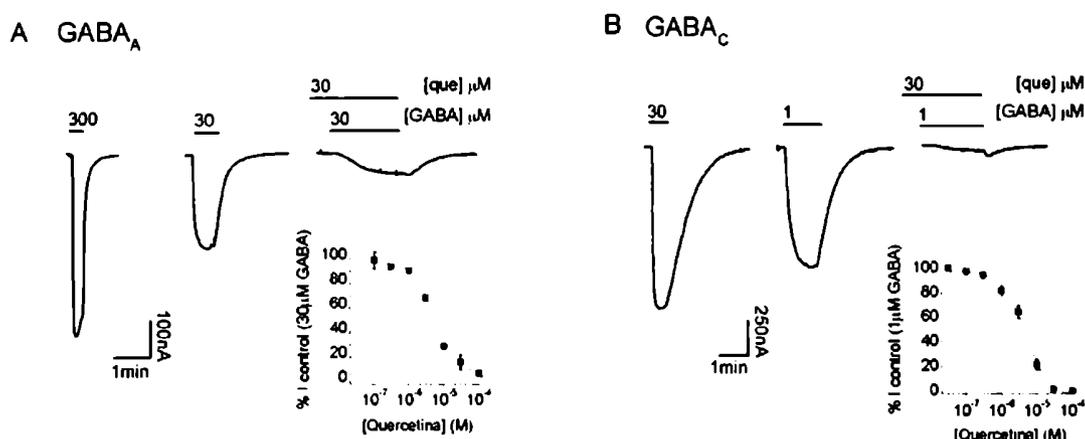
**Fig. 9:** Estructura química de los flavonoides utilizados en este estudio.

Aún a altas concentraciones de GABA, quercetina inhibió las respuestas en ambos tipos de receptores. Este dato es relevante con relación al mecanismo de acción de este antagonista para ambos receptores, indicando un tipo de inhibición no-competitiva. Hemos realizado un estudio más minucioso en este sentido para el efecto de quercetina sobre los GABA<sub>C</sub>R que se mencionará brevemente en el Capítulo II. La inhibición por quercetina se caracterizó por la rapidez y reversibilidad de sus efectos. En la Fig. 10, al final de los experimentos representativos de la aplicación de este flavonoide, se puede apreciar una deflexión rápida en los trazos de corriente, que serían indicativos de una recuperación transitoria del bloqueo durante el lavado de las drogas. Estos pequeños picos en los registros se vieron incrementados para concentraciones más altas de agonistas. Las respuestas de ambos tipos de receptores a aplicaciones de GABA en concentraciones máximas se incluyeron como referencias.

Debido a que los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub> presentaron afinidades aparentes por GABA desiguales, los experimentos mostrados se realizaron con concentraciones de agonista equivalentes en ambos tipos de receptores, correspondientes al EC<sub>50</sub> (30 μM para GABA<sub>A</sub>R y 1 μM para GABA<sub>C</sub>R). Por otro lado, es conocido que los GABA<sub>A</sub>R ensamblado con la combinación de subunidades α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2s</sub> presentan un nivel de desensibilización importante [16]. Sin embargo, a las concentraciones de GABA utilizadas en este trabajo la desensibilización fue

pobre, y además, se tuvo la precaución de realizar aplicaciones de agonista cortas (30 s) y separadas por intervalos de 12 min aproximadamente.

Es importante destacar que el curso temporal de las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R no sólo se diferencian por la pobre desensibilización, sino también por la lenta cinética de relajación, como puede verse claramente en la Fig. 10. Mientras que los GABA<sub>A</sub>R se de-activan en unos pocos segundos, los GABA<sub>C</sub>R requieren de aproximadamente 1.5 min. de lavado.

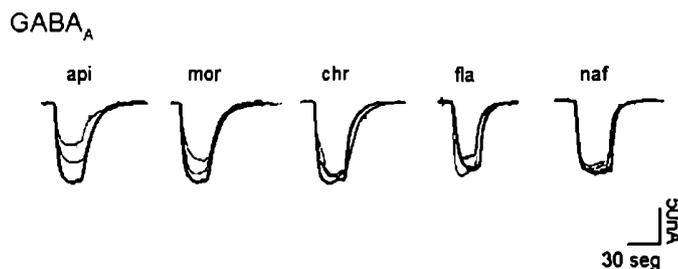


**Fig. 10:** Efectos del flavonoide natural quercetina sobre los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R expresados en ovocitos. **A.** Respuestas representativas (corrientes de Cl<sup>-</sup>) mediadas por GABA<sub>A</sub>R, ensamblados con las subunidades  $\alpha_1\beta_1\gamma_2s$ , en ausencia o después de la exposición a quercetina (que). El flavonoide se aplicó 40 seg. antes y durante la aplicación de 30 μM GABA. Inset: Curva de inhibición para quercetina realizada a la concentración correspondiente al EC<sub>50</sub> para GABA (30 μM). **B.** Igual que en A, pero 1 μM GABA fue utilizado para evocar las respuestas mediadas por GABA<sub>C</sub>R homoméricos  $\rho_1$ . Inset: curva de inhibición para quercetina realizada a la concentración correspondiente al EC<sub>50</sub> para GABA (1 μM GABA). (En esta y las siguientes figuras del Capítulo,  $V_{sost} = -70$  mV).

### *Efecto de diferentes flavonoides sobre los GABA<sub>A</sub>R ensamblados con las subunidades $\alpha_1\beta_1\gamma_2s$ .*

La Fig. 11 ilustra respuestas representativas evocadas con 30 μM GABA en ovocitos que expresaban las subunidades de rata  $\alpha_1\beta_1\gamma_2s$  de los receptores de GABA<sub>A</sub>. Los registros fueron obtenidos en presencia (trazo delgado) o en ausencia (trazo grueso) de concentraciones crecientes de flavonoides.

Todos los flavonoides probados fueron inactivos a concentraciones nanomolares, mientras que en el rango micromolar exhibieron diferentes grados de inhibición. Se observaron efectos dependientes de la concentración en los GABA<sub>A</sub>R para apigenina, crisina y flavona. La Fig. 11 y la Tabla I muestran los resultados obtenidos para aplicaciones de flavonoides a concentraciones de 10 y 30  $\mu$ M (con la excepción de  $\alpha$ -naftoflavona, ver más abajo).



**Fig. 11:** Efectos de diferentes flavonoides sobre GABA<sub>A</sub>R expresados en ovocitos de *Xenopus*. Respuestas representativas mediadas por GABA<sub>A</sub>R evocados por 30  $\mu$ M GABA en ausencia (línea gruesa) o en presencia (línea fina) de apigenina (api), morina (mor), crisina (cri), o flavona (fla) (10 y 30  $\mu$ M), o  $\alpha$ -naftoflavona (naf) (1, 3 y 10  $\mu$ M). Los trazos se superpusieron por simplicidad. Los flavonoides se aplicaron 30 seg. antes y durante la aplicación de GABA.

Apigenina (un compuesto encontrado en perejil y en flores de la manzanilla) y morina (presente en la madera de *Maclura tinctoria*, conocida como madera de Cuba o madera amarilla de Brasil) se comportaron en forma similar a quercetina, pero sus efectos inhibitorios fueron menores. Apigenina 30  $\mu$ M inhibió las respuestas a GABA en los GABA<sub>A</sub>R un  $56.5 \pm 5.5$  % (n = 3), mientras que morina 30  $\mu$ M un  $37.7 \pm 4.3$  % (n = 5). Bajo condiciones similares,  $\alpha$ -naftoflavona (sintética) y crisina (que se encuentra en la pasionaria y en los brotes del álamo) produjeron un suave efecto en las respuestas al GABA (Tabla I).  $\alpha$ -Naftoflavona no pudo ser evaluada a concentraciones mayores a 10  $\mu$ M por problemas de solubilidad en la solución de Ringer (Tabla I).  $\alpha$ -Naftoflavona 10  $\mu$ M inhibió los GABA<sub>A</sub>R un  $17.2 \pm 3.6$  % (n = 5), mientras que el efecto de crisina 30  $\mu$ M fue de solamente un  $12.1 \pm 0.7$  (n = 3).

Flavona, un análogo no-sustituido de los flavonoides (ver Fig. 9) encontrado en muchas plantas, produjo un pequeño pero estadísticamente significativo efecto de potenciación o inhibición de los GABA<sub>A</sub>R dependiendo de la concentración utilizada. Flavona 10  $\mu$ M potenció las respuestas al GABA un  $6.8 \pm 1.2$  % (n = 3) y a 30  $\mu$ M produjo una inhibición de  $14.9 \pm 1.1$  % (n = 3).

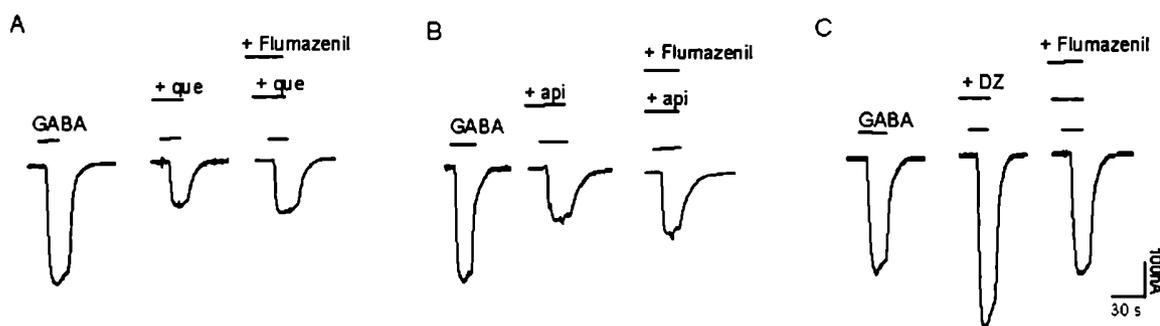
[Flavonoide] ( $\mu\text{M}$ )		GABA <sub>A</sub>		GABA <sub>C</sub>	
		% de cambio (n) (media $\pm$ ES)		% de cambio (n) (media $\pm$ ES)	
que	10	-71.9 $\pm$ 1.5 (3)		-82.7 $\pm$ 2.7 (3)	
	30	-84.5 $\pm$ 4.9 (3)		-98.9 $\pm$ 1.1 (3)	
api	10	-27.4 $\pm$ 1.1 (3)		-39.6 $\pm$ 2.1 (2)	
	30	-50.6 $\pm$ 0.8 (3)		-69.5 $\pm$ 4.2 (4)	
mor	10	-14.6 $\pm$ 0.8 (4)		-16.9 $\pm$ 3.0 (3)	
	30	-38.4 $\pm$ 4.8 (5)		-41.3 $\pm$ 4.0 (3)	
cri	10	- 9.7 $\pm$ 0.4 (2)		- 6.9 $\pm$ 0.3 (4)	
	30	-12.1 $\pm$ 0.5 (2)		-23.3 $\pm$ 5.1 (3)	
fla	10	+ 6.7 $\pm$ 1.0 (4)		-26.9 $\pm$ 3.9 (3)	
	30	-14.8 $\pm$ 0.8 (3)		-55.8 $\pm$ 6.2 (3)	
naf	1	- 3.7 $\pm$ 0.1 (2)		+ 3.7 $\pm$ 0.1 (2)	
	3	- 6.9 $\pm$ 0.2 (2)		+ 2.9 $\pm$ 0.9 (3)	
	10	-17.2 $\pm$ 3.2 (5)		+ 10.2 $\pm$ 1.1 (5)	

**Tabla I:** Modulación de los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R por flavonoides naturales y sintéticos. Los datos expresan los cambios observados (en porcentaje del control, 1  $\mu\text{M}$  GABA) en las respuestas mediadas por los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R en presencia de diferentes flavonoides en las concentraciones indicadas. Los flavonoides naturales utilizados fueron: quercetina (que), apigenina (api), morina (mor), crisina (cri), flavona (fla); y el sintético: naftoflavona (naf). Las respuestas control se evocaron con GABA a las concentraciones correspondientes al EC<sub>50</sub>: 30 $\mu\text{M}$  para GABA<sub>A</sub> y 1  $\mu\text{M}$  para GABA<sub>C</sub>.

El ranking de potencia de inhibición para estos flavonoides (30  $\mu\text{M}$ ) sobre los GABAAR fue entonces: quercetina > apigenina > morina > flavona  $\cong$  crisina (test de Student's,  $p < 0.05$ ). Es importante destacar, que en experimentos preliminares se obtuvieron resultados similares para GABA<sub>A</sub>R ensamblados con las subunidades humanas  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2s}$  (datos no mostrados). Quercetina, apigenina, morina y crisina fueron también ensayados sobre las corrientes iónicas mediadas por GABA sensibles a bicuculina registradas en ovocitos inyectados con ARNm poliA<sup>+</sup> de corteza cerebelar de rata, y todos los flavonoides mostraron efectos idénticos a los descritos para los receptores recombinantes.

Como se mencionó en la Introducción, desde hace tiempo se creía que las propiedades farmacológicas de algunos flavonoides estaba mediada por un mecanismo similar al de las BZDs sobre los receptores de GABA [116, 134, 139]. Por esto, decidimos evaluar si el efecto de quercetina y apigenina sobre los GABA<sub>A</sub>R era sensible al antagonista del sitio de BZDs,

flumazenil. Como se puede observar en la Fig. 12, el efecto de estos flavonoides fue completamente insensible a flumazenil a concentraciones entre 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ , que fueron aún más altas que las utilizadas para bloquear el efecto de diazepam. La inhibición de las corrientes de  $\text{Cl}^-$  mediadas por los  $\text{GABA}_A\text{R}$  por quercetina 10  $\mu\text{M}$  o apigenina 30  $\mu\text{M}$  (valores cercanos al  $\text{IC}_{50}$ ) no fueron prevenidos por flumazenil 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) (Fig. 12). A esta concentración, flumazenil produjo por sí solo un pequeño aumento de las respuestas evocadas por 30  $\mu\text{M}$  GABA, y previno efectivamente la potenciación producida por diazepam (100nM) (Fig. 12C). Estos resultados indicarían que el efecto inhibitorio de apigenina y quercetina no estaría mediado a través del sitio de BZDs en este subtipo de receptor de GABA.



**Fig. 12:** El antagonista benzodiazepínico flumazenil no previno el efecto de quercetina y apigenina sobre los  $\text{GABA}_A\text{R}$ . **A.** Respuestas representativas mediadas por  $\text{GABA}_A\text{R}$  evocadas por 30  $\mu\text{M}$  GABA, en ausencia o en presencia de 10  $\mu\text{M}$  quercetina (+ que) o 10  $\mu\text{M}$  quercetina y 1  $\mu\text{M}$  flumazenil (+ flumazenil). **B.** Idem A, pero se evaluó el efecto de 30  $\mu\text{M}$  apigenina (+ api) en este caso. **C.** Experimento control representativo del efecto potenciador de 0.1  $\mu\text{M}$  diazepam (+ DZ) sobre la respuesta evocada por 30  $\mu\text{M}$  GABA, que fue prevenido por 1  $\mu\text{M}$  flumazenil (+ flumazenil).

Es importante destacar, que ninguno de los flavonoides estudiados aún a concentraciones altas (quercetina, apigenina y crisina, hasta 100  $\mu\text{M}$ ) tuvo efectos apreciables sobre las propiedades de los ovocitos, como potencial de membrana, resistencia de membrana, o corriente basal durante la fijación de voltaje.

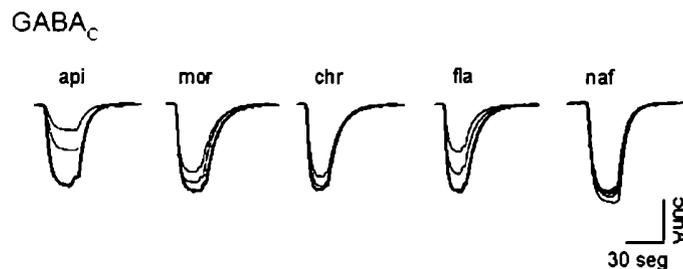
#### *Efecto de diferentes flavonoides sobre los $\text{GABA}_C\text{R}$ homoméricos $\rho_1$*

La acción de este mismo grupo de flavonoides se evaluó en los  $\text{GABA}_C\text{R}$  ensamblados con la subunidad  $\rho_1$  humana. Sus efectos se resumen en la Fig. 13 y en la Tabla I. Los flavonoides

presentaron un perfil inhibitorio general similar al encontrado para los GABA<sub>A</sub>R, salvo por algunas diferencias que serán destacadas.

En la Fig. 10B fue mostrado que la quercetina es un antagonista relativamente potente de los GABA<sub>C</sub>R. Además, observamos que la inhibición por quercetina fue independiente del agonista utilizado para activar los receptores. Así es que tanto GABA, los análogos de conformación restringida del GABA, los ácidos *trans*- y *cis*- aminocrotónico, como así también muscimol, dieron resultados similares (datos no mostrados).

Los efectos causados por quercetina, morina y apigenina (30 μM) en las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R o GABA<sub>A</sub>R fueron equivalentes (Tabla I). Las diferencias obtenidas comparando ambos tipos de receptores no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Morina inhibió las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R en un  $41.3 \pm 4.0 \%$ ,  $n = 3$ , mientras que apigenina un  $69.6 \pm 4.2 \%$  ( $n = 4$ ). Por el contrario, crisina y flavona fueron consistentemente más efectivos sobre los GABA<sub>C</sub>R respecto de los GABA<sub>A</sub>R (Fig. 11 y 13) ( $p < 0.05$ ). Crisina 30 μM inhibió las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R en un  $24.3 \pm 4.3 \%$  ( $n = 3$ ) y 30 μM flavona en un  $55.9 \pm 6.2 \%$  ( $n = 3$ ).



**Fig. 13:** Efectos de diferentes flavonoides sobre GABA<sub>C</sub>R expresados en ovocitos de *Xenopus*. Respuestas representativas mediadas por GABA<sub>C</sub>R evocados por 1 μM GABA en ausencia (línea gruesa) o en presencia (línea fina) de apigenina (api), morina (mor), crisina (cri), o flavona (fla) (10 y 30 μM), o α-naftoflavona (naf) (1, 3 y 10 μM). Los trazos se superpusieron por simplicidad. Los flavonoides se aplicaron 30 seg. antes y durante la aplicación de GABA.

Flavona y α-naftoflavona mostraron diferentes efectos según el tipo de receptor. Flavona no potenció las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R a ninguna de las concentraciones utilizadas, en forma contraria a lo observado para los GABA<sub>A</sub>R. Mientras que α-naftoflavona, que tuvo un leve efecto inhibitorio sobre los GABA<sub>A</sub>R, potenció las repuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R de un modo exiguo, pero consistente. α-Naftoflavona 10 μM aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) las

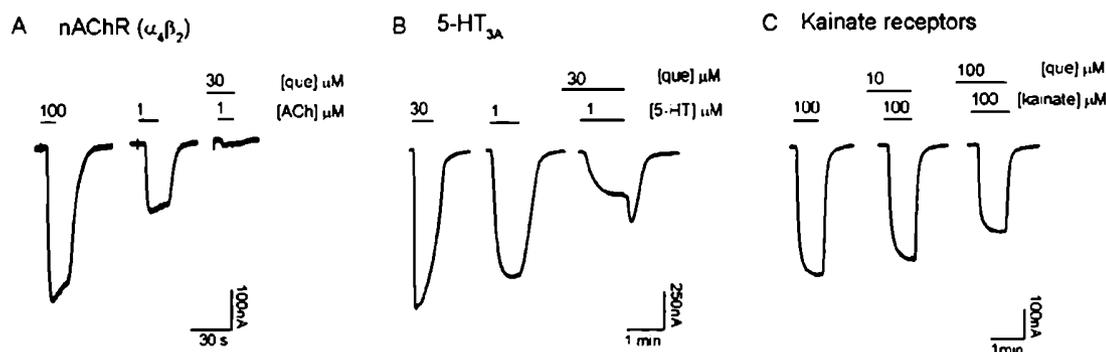
respuestas de los GABA<sub>C</sub>R en un  $10.2 \pm 1.1$  % ( $n = 5$ ). Por lo tanto, el ranking de potencia de antagonismo por flavonoides ( $30 \mu\text{M}$ ) sobre los GABA<sub>C</sub>R fue: quercetina > apigenina  $\cong$  flavona  $\cong$  morina > crisina (test de t,  $p < 0.05$ ).

### *Efecto de quercetina sobre otros receptores de neurotransmisores*

Dado que quercetina fue el modulador más efectivo de los GABA<sub>C</sub>R y GABA<sub>A</sub>R entre los estudiados en este trabajo, decidimos evaluar sus efectos sobre otros receptores ionotrópicos de neurotransmisores para probar su selectividad. En la Fig. 14 se muestran los trazos de corriente correspondientes a respuestas mediadas por receptores recombinantes y nativos del cerebro de rata. Las corrientes iónicas mediadas por los receptores recombinantes nicotínicos neuronales ( $\alpha_4\beta_2$ ) y los 5-HT<sub>3A</sub> y los receptores nativos de AMPA/kainato fueron evaluadas en presencia y ausencia de quercetina en ovocitos pre-incubados con BAPTA-AM. Este quelante fue utilizado para descartar la posibilidad de que una parte de las respuestas obtenidas a través de los AChR o 5-HT<sub>3A</sub>, que son permeables a  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  [175, 176], pudiera deberse a la activación de las conductancias nativas de  $\text{Cl}^-$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  [177]. Además, es necesario aclarar que la pre-incubación de los ovocitos con este quelante no produjo cambios en las repuestas registradas en la solución de Ringer's normal, ni en su magnitud, ni en su cinética. Por otro lado, las respuestas de los receptores de glutamato tipo AMPA/kainato [178, 179] fueron estudiadas mediante la expresión de ARNm de corteza cerebelar de rata. El ácido káinico ( $10 \mu\text{M}$  a  $1 \text{mM}$ ) evocó corrientes iónicas entrantes que acarrearón principalmente iones  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  [178-180]. El curso temporal lento de estas respuestas y la falta de desensibilización confirmaron que la conductancia nativa de  $\text{Cl}^-$  no fue activada durante estos experimentos.

Quercetina produjo una inhibición selectiva de todos estos receptores cuyas corrientes iónicas son catiónicas. Los AChR neuronales ( $\alpha_4\beta_2$ ) fueron también muy sensibles a la modulación por quercetina (Fig. 14A). Quercetina  $10 \mu\text{M}$  inhibió un  $48.1 \pm 5.1$  % ( $n = 4$ ) las repuestas evocadas por  $1 \mu\text{M}$  ACh, mientras que  $30 \mu\text{M}$  produjo una reducción de  $79.9 \pm 4.9$  % ( $n = 4$ ). Los 5-HT<sub>3A</sub> fueron inhibidos por quercetina en un grado menor (Fig. 14B),  $10 \mu\text{M}$  quercetina inhibió las repuestas de  $1 \mu\text{M}$  5-HT un  $10.5 \pm 3.7$  % ( $n = 3$ ) y  $30 \mu\text{M}$  quercetina, un  $54.9 \pm 7.0$  % ( $n = 6$ ). Como se puede observar en la Fig. 14B, un rebote en el trazo de corriente al final la aplicación de 5-HT fue hallado debido al lavado de la quercetina, en forma similar a lo descrito para los

receptores de GABA (Fig. 10). Las corrientes iónicas evocadas por kainato, en ovocitos inyectados con ARNm de corteza cerebelar de rata, fueron inhibidas por quercetina en un modo mucho menor a lo observado en los otros receptores estudiados (Fig. 14C). Quercetina 100  $\mu\text{M}$  inhibieron un  $31.2 \pm 0.6 \%$  ( $n = 4$ ) las respuestas a 100  $\mu\text{M}$  kainato, mientras que 10  $\mu\text{M}$  quercetina produjo una reducción de las mismas un  $11.2 \pm 1.5 \%$  ( $n = 4$ ) y no se observaron efectos para 1  $\mu\text{M}$  quercetina ( $n = 4$ ). Además, las respuestas de kainato fueron insensibles a crisina (100  $\mu\text{M}$ ,  $n = 2$ ) en contraste con lo observado para los  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$  y  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  que fueron inhibidas aproximadamente un 40% bajo condiciones similares.



**Fig. 14:** Efectos de quercetina sobre receptores nicotínicos neuronales, 5-HT y glutamato tipo AMPA/kainato, expresados en ovocitos de *Xenopus*. Respuestas representativas mediadas por receptores de acetilcolina de tipo nicotínico neuronal (ensamblados con las subunidades  $\alpha_4\beta_2$ ) (A), 5-HT $_{3\text{A}}$  (B) y de glutamato tipo AMPA/kainato (C). Los experimentos se realizaron como en la Fig. 10. Las concentraciones de agonistas utilizadas fueron: 1  $\mu\text{M}$  acetilcolina, 1  $\mu\text{M}$  5-HT, y 100  $\mu\text{M}$  kainato.

### I. 3. Discusión

En este Capítulo se muestra la caracterización de las acciones farmacológicas de un grupo de flavonoides sobre los receptores ionotrópicos de GABA a través de un estudio electrofisiológico. Basados en los efectos reportados previamente, ya sea en trabajos con ensayos de *binding*, o experimentos de farmacología *in vivo*; se eligieron un conjunto de compuestos naturales y sintéticos. La principal contribución de esta parte del trabajo es la demostración de que diversos flavonoides modulan la función de los  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$  y  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  y también la de otros receptores ionotrópicos expresados en ovocitos de *Xenopus*. Se observó que los flavonoides producen un

efecto inhibitorio sobre los  $GABA_A$ R ensamblados con las subunidades  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ s y los  $GABA_C$ R homoméricos  $\rho_1$ , así como también los AChR neuronales ensamblados con las subunidades  $\alpha_4\beta_2$ , los 5-HT<sub>3A</sub> y receptores de glutamato tipo AMPA/kainato.

### *Modulación de los $GABA_A$ R y $GABA_C$ R por flavonoides*

Prácticamente todos los flavonoides analizados mostraron una actividad antagonista sobre los  $GABA_A$ R y  $GABA_C$ R. Quercetina fue el más efectivo, pero otros flavonoides como apigenina, morina, y crisina, mostraron efectos similares, mientras que el flavonoides sintético,  $\alpha$ -naftoflavona fue prácticamente inactivo.

Desde hace tiempo se conoce que apigenina y crisina son capaces de unirse a los  $GABA_A$ R en el sitio de reconocimiento de BZDs [124, 127, 135]. También se ha mostrado que apigenina y crisina presentan propiedades sedantes, ansiolíticas o anticonvulsivantes en roedores [124, 127, 181]. Estos y otros resultados llevaron a proponer una acción del tipo de las BZDs para los flavonoides, con agonistas, antagonistas y agonistas inversos del sitio de las mismas [116, 124, 134, 139]. Sin embargo, los estudios acerca del efecto de los flavonoides sobre las corrientes iónicas mediadas por  $GABA_A$ R son escasos [135]. Además, la selectividad de las acciones de los flavonoides por subtipos del receptor de GABA y su posible mecanismo de acción aún no son conocidos en detalle.

Previamente, se reportó que apigenina inhibe competitivamente la unión de flunitrazepam a receptores de  $GABA_A$  cerebrales con un  $K_i$  de 4  $\mu$ M y además presenta actividad ansiolítica en ratones (3-10 mg/kg i.p.) [127]. También se demostró que crisina presenta efectos similares ( $K_i$  = 3  $\mu$ M, ansiolítica con 1-10 mg/kg i.p.) [124, 181]. Por otro lado, el análogo químico quercetina no comparte ninguno de estos efectos [182]. Pero contrariamente a lo esperado para la acción de una BZD, encontramos que crisina y apigenina no potenciaron las repuestas de los  $GABA_A$ R. Esto pudo evidenciarse claramente a través de una comparación directa de los efectos de estos flavonoides y la conocida BZDs, diazepam. Crisina y apigenina, al igual que quercetina, fueron completamente inactivos en el rango nanomolar, mientras que funcionaron como antagonistas de los  $GABA_A$ R a concentraciones micromolares. Además, crisina y apigenina presentaron el mismo efecto en los  $GABA_A$ R y en los  $GABA_C$ R, en forma opuesta a las BZD que sólo modulan

los GABA<sub>A</sub>R. Se observó también, que los efectos de estos dos flavonoides no pudo ser prevenido por el antagonista benzodiazepínico, flumeznil (0.1-10  $\mu$ M).

El efecto inhibitorio de apigenina sobre los GABA<sub>A</sub>R coincide con resultados reportados previamente. Avallone y col. observaron que apigenina (1-10  $\mu$ M) inhibió las respuestas mediadas por los GABA<sub>A</sub>R nativos de células granulares del cerebelo [135]. Además, en forma contradictoria con resultados anteriores [127], propusieron que los efectos sedantes de este flavonoides (25-50 mg/kg i.p.) no estarían mediados por un mecanismo tipo BZD, y que no tendría efectos ansiolíticos (en concentraciones 0.5-10 mg/kg i.p) [135].

Por otro lado, flavona mostró tener los efectos más pronunciadamente diferentes entre los GABA<sub>A</sub>R y los GABA<sub>C</sub>R. Sería necesario realizar más experimentos para determinar la existencia de flavonoides capaces de discriminar entre tipos de receptores de GABA.

Por lo tanto, los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R estudiados en este trabajo se antagonizaron por diferentes flavonoides independientemente de su sensibilidad a las BZDs. Ningún flavonoide de los estudiados mostró un efecto potenciador sobre las respuestas de los GABA<sub>A</sub>R. Nuestros resultados sugieren que la acción de los flavonoides sobre los receptores de GABA<sub>A</sub> diferiría de lo descrito para la modulación clásica de las BZDs.

### *Modulación de otros receptores ionotrópicos de neurotransmisores por flavonoides*

Con el objeto de evaluar la selectividad de la inhibición de los receptores de GABA por quercetina, decidimos examinar sus efectos sobre las corrientes iónicas mediadas por otros receptores ionotrópicos de neurotransmisores. Notablemente, quercetina no sólo afectó la función de canales aniónicos activados por ligando, sino también la de canales catiónicos, como los AChR neuronales ( $\alpha_4\beta_2$ ), 5-HT<sub>3A</sub> y receptores de glutamato tipo AMPA/kainato, expresados en ovocitos de *Xenopus*. Estos resultados son coherentes con evidencias previas que indicaban que los flavonoides tendrían efectos múltiples y poco específicos sobre el CNS. Por ejemplo, los flavonoides pueden modular la actividad de receptores metabotrópicos (receptores de adenosina [132] y receptores opiodes [133]), canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> [131, 137] y la recaptación de catecolaminas [183]. Por lo tanto, el efecto sobre el SNC de un flavonoide en particular podría involucrar la alteración de diferentes sistemas de neurotransmisión, cambios en la excitabilidad neuronal a través de la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje y/o muchos otros mecanismos. Sería necesario realizar un análisis más detallado con el objeto de evaluar

apropiadamente los mecanismos subyacentes a las acciones farmacológicas de los flavonoides en el CNS.

La modulación por flavonoides de los receptores de ACh neuronales, de 5-HT y glutamato no había sido descrita previamente y podría tener relevancia debido al valor de estos receptores en la fisiología normal y patológica; por ejemplo, los efectos de la nicotina en el cerebro humano y desórdenes neuropatológicos [175]; el rol de la 5-HT en la microcirculación cerebral, en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, en el metabolismo cerebral y en las migrañas [184, 185]; y la función de los aminoácidos excitatorios en la plasticidad neuronal y la toxicidad [180]. Sería necesario realizar más experimentos para determinar sensibilidades diferenciales a los flavonoides de los distintos subtipos de receptores de ACh, 5-HT y glutamato y encontrar compuestos selectivos.

### *Mecanismos de acción de la modulación por flavonoides de receptores ionotrópicos de neurotransmisores*

Esta amplia sensibilidad de los distintos receptores estudiados a la acción de los flavonoides, podría indicar una interacción directa con la membrana lipídica. Sin embargo, no parece ser esta la explicación debido a que los efectos de quercetina y otros flavonoides en las respuestas mediadas por estos receptores expresados en ovocitos fueron rápidos, fácilmente reversibles y se desarrollaron a concentraciones relativamente bajas (1-100  $\mu\text{M}$ ). Consecuentemente, no parece posible que los efectos de la quercetina involucren su inserción o penetración en la membrana lipídica que requiere 1 h o más para desarrollarse [186]. Y por lo tanto, una interacción directa con ciertos residuos aminoacídicos del receptor o con el medio lipídico vecino sería posible. Tampoco podríamos descartar mecanismos disímiles para diferentes flavonoides.

El  $\text{IC}_{50}$  de quercetina para ambos tipos de receptores de GABA estudiados fue de alrededor de 4  $\mu\text{M}$ , con un n de Hill de aproximadamente 1.5, lo que sugeriría dos sitios de unión. Una interacción directa entre quercetina y GABA no sería posible dado que la misma inhibición se observó cuando se utilizaron otros agonistas, no relacionados estructuralmente. Además, como puede observar en el Capítulo II la inhibición por quercetina sobre los receptores de  $\text{GABA}_C$  sería no-competitiva.

Hemos observado que los flavonoles (por ej., quercetina, apigenina, morina, crisina, ver Fig. 9) presentaron propiedades similares en los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R, mientras que los análogos como flavona, o  $\alpha$ -naftoflavona que posee grupos fenoles como radicales, mostraron un perfil diferente. Como estos efectos fueron complejos, y dependieron de la concentración utilizada de flavonoide, se deberían realizar más experimentos para establecer adecuadamente los mecanismos subyacentes.

---

## **CAPÍTULO II**

### **Estudios sobre el mecanismo de acción de picrotoxina en los receptores de GABA<sub>C</sub>**

---

## II. 1. Introducción

Como se mencionó previamente, la sensibilidad de los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R a distintos moduladores presenta diferencias substanciales. Los efectos de drogas clásicas que afectan la neurotransmisión GABAérgica como esteroides, BZDs y barbitúricos varían notablemente entre uno y otro tipo de receptor [22]. Los GABA<sub>C</sub>R serían insensibles a la modulación por BZDs, o tendrían un efecto en concentraciones muy superiores a las requeridas para potenciar las repuestas de los GABA<sub>A</sub>R [87]. Por otro lado, la sensibilidad a esteroides neuroactivos presentaría un perfil marcadamente diferente entre ambos tipos de receptores [103, 111, 112].

Antagonistas de tipo competitivo como bicuculina y SR-95531 son inactivos o tienen muy baja afinidad sobre las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R [31, 103], mientras que otros, que presentan un mecanismo de acción no-competitivo, sí presentan un efecto inhibitorio [15, 32, 72, 187]. Algunos de estos últimos, como picrotoxina y TBPS, han sido evaluados en GABA<sub>C</sub>R y mostraron una inhibición semejante a la observada para los GABA<sub>A</sub>R, pero con algunas diferencias. Distintas evidencias indicarían que mecanismo de acción no-competitivo puro no describiría exactamente las acciones de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R [32, 72, 79]. Además, la dependencia del uso de este antagonista sería menos marcada en receptores de retina bovina y de vertebrados inferiores [72, 187].

Para indagar más profundamente en la inhibición producida por el antagonista picrotoxina, decidimos realizar el presente estudio de sus efectos sobre las repuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R ensamblados con la subunidad  $\rho_1$  de retina humana.

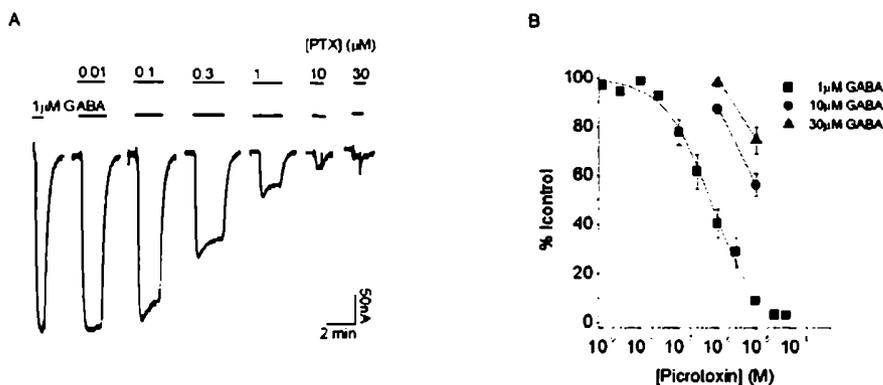
## II. 2. Resultados

### *Caracterización de la acción de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R.*

El primer trazo de la Fig. 12A es una respuesta típica a 1  $\mu$ M GABA en un ovocito inyectado con la subunidad  $\rho_1$ , fijando su potencial de membrana en  $-70$  mV. En los siguientes trazos se muestran corrientes iónicas evocadas por GABA en presencia de concentraciones crecientes, de picrotoxina, entre 0.01 y 30  $\mu$ M, donde la amplitud de las repuestas fue marcadamente menor

por acción de este antagonista. La inhibición fue total para las concentraciones máximas de antagonista aunque el efecto fue siempre reversible.

El curso temporal de las respuestas fue marcadamente diferente cuando se aplicó picrotoxina a ciertas concentraciones. En presencia de 0.1, 0.3 y 1  $\mu\text{M}$  de este antagonista, la respuesta se activó rápidamente, llegando a un máximo transitorio, inmediatamente después del cual se observó una disminución continua en la amplitud de la corriente hasta llegar a un valor estable. El mismo curso temporal se obtuvo no sólo cuando se co-aplicaron picrotoxina y GABA, sino también cuando se realizaron pre-incubaciones con este antagonista (hasta 3 min). Este progreso en el tiempo del nivel de inhibición, se relacionó con la “dependencia del uso” en el efecto de este antagonista, que será tratado más adelante.



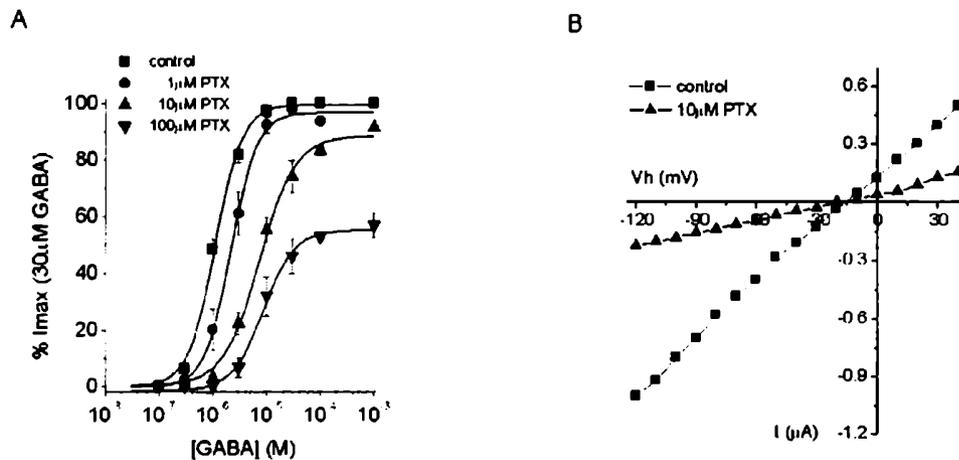
**Fig. 12:** Inhibición de los  $\text{GABA}_{\text{A}}$ R por picrotoxina. **A.** Respuestas representativas mediadas por  $\text{GABA}_{\text{A}}$ R evocadas con 1  $\mu\text{M}$  GABA, en presencia de concentraciones crecientes de picrotoxina. Las aplicaciones de GABA (indicadas por barras) se espaciaron por intervalos de 3 min. de lavado y las corrientes registradas en presencia de picrotoxina (con pre-incubaciones de 40 seg.) se flanquearon con respuestas controles (no mostrados por simplicidad). Para esta figura y las siguientes,  $V_{\text{sost}} = -70$  mV, salvo indicaciones en contrario. **B.** Curva de inhibición para picrotoxina. La inhibición se expresa como fracción de las respuestas control obtenidas con 1  $\mu\text{M}$  GABA.

Con el objeto de evaluar la potencia de picrotoxina realizamos una curva de inhibición, considerando cada valor de antagonismo en el estado estacionario de la respuesta. La Fig. 12B ilustra el promedio de 10 experimentos diferentes donde distintas concentraciones de picrotoxina fueron probadas sobre 1  $\mu\text{M}$  GABA. El  $\text{IC}_{50}$  calculado para picrotoxina fue  $0.6 \pm 0.1$   $\mu\text{M}$  con un

coeficiente de Hill de  $1.0 \pm 0.2$ . Cuando se utilizaron mayores concentraciones de GABA (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) para evocar las respuestas, los niveles de inhibición alcanzados fueron menores.

### Análisis de las curvas D-R

Se realizaron curvas D-R para GABA en presencia de picrotoxina (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) a fin de indagar en su mecanismo de acción en términos de los efectos sobre la afinidad aparente y la eficacia máxima del agonista. Como se ilustra en la Fig. 13A, en presencia de este antagonista se produjo un corrimiento hacia la derecha en la curva, con cambios significativos en el  $\text{EC}_{50}$  para GABA. Los valores calculados fueron: control  $\text{EC}_{50} = 1.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (n de Hill =  $1.8 \pm 0.2$ ), 1  $\mu\text{M}$  picrotoxina  $\text{EC}_{50} = 2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$  (n de Hill =  $2.0 \pm 0.3$ ), 10  $\mu\text{M}$  picrotoxina  $\text{EC}_{50} = 6.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (n de Hill =  $1.6 \pm 0.3$ ) y 100  $\mu\text{M}$  picrotoxina  $\text{EC}_{50} = 8.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$  (n de Hill =  $0.5 \pm 0.2$ ) (test t,  $p < 0.05$ ). Para las dos concentraciones más altas de esta toxina también se observó una reducción en la respuesta máxima a concentraciones saturantes de GABA. Los desplazamientos a la derecha en las curvas, junto a cambios en el coeficiente de Hill y reducciones en las repuestas máximas serían indicativos de un efecto no-competitivo.



**Fig. 13:** Inhibición de los  $\text{GABA}_{\text{C}}$ R por picrotoxina. **A.** Curvas dosis-respuestas par GABA en ausencia o en presencia de (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) picrotoxina. La amplitud de las respuestas se expresan como la fracción de las corrientes evocadas por 30  $\mu\text{M}$  GABA. **B.** Relación corriente-voltaje (I-V) de respuestas evocadas con 1  $\mu\text{M}$  GABA con o sin (10  $\mu\text{M}$ ) picrotoxina. El rango utilizado de potenciales de fijación fue de  $-120$  a  $+40$  mV.

### *Efectos independientes de voltaje de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R.*

La acción de picrotoxina fue independiente del potencial de membrana. Un cambio significativo en la pendiente de la relación I-V, sin desplazamientos en el potencial de reversión de la corriente fueron observados en presencia de 10  $\mu$ M picrotoxina (Fig. 13B).

### *Acciones dependientes del uso de picrotoxina en los GABA<sub>C</sub>R*

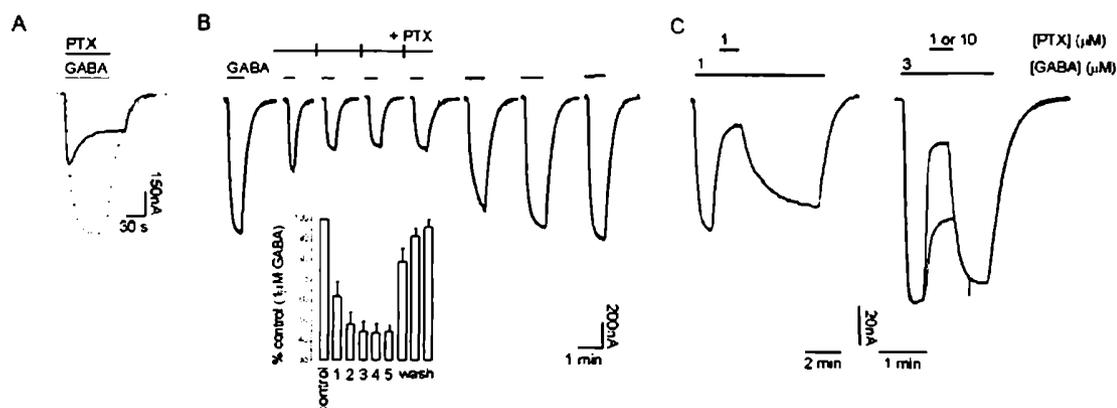
La Fig. 14 ilustra una respuesta a 1  $\mu$ M GABA obtenida por la co-aplicación de 1  $\mu$ M picrotoxina. Como fue mencionado, la corriente iónica alcanzó un máximo transitoriamente y luego disminuyó lentamente debido a un aumento continuo en el grado de inhibición. El porcentaje de inhibición medido al pico de la respuesta, bajo estas condiciones fue  $45.7 \pm 2.5\%$  ( $n = 6$ ), mientras que los valores en el equilibrio fueron de  $64.0 \pm 4.5\%$  ( $n = 6$ ). El trazo punteado de la misma figura muestra una respuesta control (1  $\mu$ M GABA). Este retraso en alcanzar el equilibrio en el grado de inhibición fue atribuido a un desarrollo lento de la acción de picrotoxina. El hecho de que la pre-incubación con el antagonista no previniera este curso temporal de la inhibición indicaría que la activación de los receptores fue un pre-requisito para la unión del antagonista a su sitio.

La diferencia en el nivel de inhibición entre el máximo transitorio y el equilibrio fue menos prominente en la medida que se aumentó la concentración de agonista (no mostrado).

Esta característica "dependiente del uso" de la acción de picrotoxina también se reveló con aplicaciones sucesivas de 1  $\mu$ M GABA durante la incubación sostenida con 1  $\mu$ M picrotoxina (Fig. 14B). Bajo estas condiciones, la primer aplicación de GABA evocó respuestas con una reducción en la amplitud de  $37.7 \pm 7.1\%$  ( $n = 4$ ), mientras que para las siguientes tres se observó un aumento suave pero continuo del nivel de inhibición, alcanzando un máximo de  $55.8 \pm 4.4\%$  ( $n = 4$ ). Estos valores de inhibición no difirieron significativamente de los resultados mostrados en la Fig. 14A, considerando los niveles de inhibición correspondientes al pico y al equilibrio (test t,  $p > 0.05$ ).

Por otro lado, el lavado de picrotoxina también fue facilitado por la activación de los receptores. Después de la acción sostenida de picrotoxina, largos tiempos de lavado (45 min.) con

la solución de Ringer's fueron necesarios para recuperar los valores controles de las respuestas a GABA (datos no mostrados).



**Fig. 14:** Inhibición dependiente del uso y con cinética lenta de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R. **A.** Trazos representativos de respuestas evocadas con 1 μM GABA en presencia de 1 μM picrotoxina (trazo lleno), ya sea pre- ó co-incubada. En trazo punteado se ilustra la respuestas control a 1 μM GABA. **B.** Respuestas características de aplicaciones repetidas de 1 μM GABA (de 50 seg. de duración), durante la incubación continua de 1 μM picrotoxina. La aplicación del antagonista se inició 40 seg. antes de la segunda exposición al GABA y se extendió hasta la número cinco. En las siguientes tres respuestas representan la recuperación de la inhibición. El histograma resume estos experimentos. **C.** Lavado de la inhibición de picrotoxina por acción de distintas concentraciones de GABA (1 μM, en el trazo de la izq. y 3 μM, a la dcha.) Picrotoxina se removió después de alcanzar el equilibrio. Para comparar niveles de inhibición equivalentes, 1 μM picrotoxina se utilizó para inhibir las respuestas evocadas con 1 μM GABA, mientras que para 3 μM GABA, se aplicó 1 y 10 μM picrotoxina.

Por el contrario, tres aplicaciones sucesivas de GABA (Fig. 14B) claramente aceleraron el lavado de picrotoxina, reduciendo el tiempo requerido para la recuperación a unos 15 min. La primera de estas tres respuestas durante el lavado de picrotoxina (sexto registro de la Fig. 14B) mostró una activación muy lenta y no alcanzó un máximo en el período de aplicación del agonista (50 seg.), debido a la restitución parcial de la respuesta control.

Además, observamos que la recuperación de la inhibición también presenta una dependencia en la concentración de agonista. En la Fig. 14C se muestra el efecto de picrotoxina cuando es aplicado una vez que la respuesta a GABA (1 μM a la izquierda, 3 μM a la derecha) llega a su máximo. El grado de inhibición alcanzado no reviste diferencias respecto de lo obtenido con la co-aplicación de ambos compuestos. Como se muestra la figura, una vez que el antagonista es retirado la corriente iónica aumenta por la presencia continua del agonista. Cuando 1 μM GABA

es utilizado, el tiempo de recuperación (medido como el intervalo entre 10-90% de recuperación total) de la inhibición producida por 1  $\mu\text{M}$  picrotoxina fue  $t_{10-90\%} = 128 \pm 13$  seg. En la parte derecha de la Fig. 14C se puede notar claramente que un aumento de la concentración de GABA a 3  $\mu\text{M}$  provocó una fuerte aceleración en el tiempo de lavado para la misma concentración de picrotoxina ( $20 \pm 2$  seg.) Aún cuando dosis más altas de inhibidor fueron utilizadas (10  $\mu\text{M}$ ), que provocaron una inhibición de un  $44.0 \pm 4.7\%$ , el lavado fue más rápido ( $21 \pm 1$  seg.)

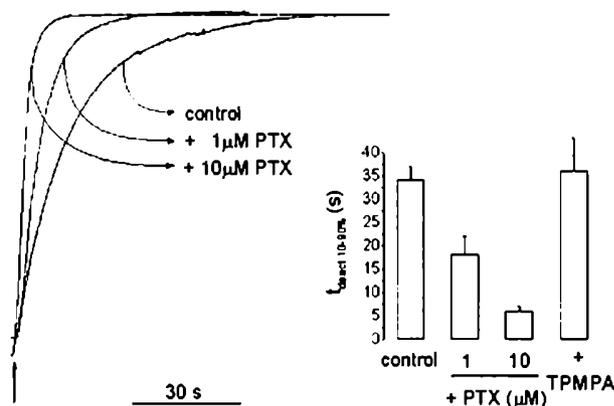
### *Efectos de picrotoxina sobre la cinética de de-activación de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R*

Como se mencionó previamente, los cursos temporales de activación y de-activación de los GABA<sub>C</sub>R son relativamente lentos. Un estudio previo caracterizó esta lenta relajación y la relacionó con una captura del agonista en su sitio de unión por parte del receptor durante los eventos de apertura [168]. Coherentemente, nosotros observamos que las corrientes iónicas alcanzaron su nivel basal en aproximadamente 1 min. después de que el agonista (1  $\mu\text{M}$  GABA) se removió de la camarita de registro. La de-activación pudo ser ajustada a una función exponencial simple con una constante característica  $\tau_{\text{deact}} = 16 \pm 2$  seg. ( $n = 17$ ), que fue similar a la reportada en aquel trabajo [168].

Por otro lado, se ha demostrado que la relajación de las corrientes iónicas mediadas por distintos receptores puede ser acelerada por acción de ciertos antagonistas de naturaleza no competitiva, pero no así por inhibidores competitivos [188, 189]. De este modo, se observó que picrotoxina produjo un incremento en la velocidad de de-activación de las respuestas mediadas por GABA<sub>A</sub>R, pero bicuculina no.

Con el objeto de caracterizar el mecanismo de acción de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R, evaluamos su acción sobre la relajación de las corrientes iónicas mediadas por estos receptores. Se midió el tiempo comprendido entre el 10% y el 90% de la relajación completa de la respuesta ( $t_{\text{deact}10-90\%}$ ) como parámetro del proceso.

Las respuestas control, evocadas con 1  $\mu\text{M}$  GABA, tuvieron un  $t_{\text{deact}10-90\%} = 34 \pm 3$  seg. ( $n = 17$ ). La aplicación de picrotoxina durante el lavado del agonista aceleró significativamente la de-activación de los GABA<sub>C</sub>R (Fig. 15), en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de este antagonista el  $t_{\text{deact}10-90\%}$  fue  $18 \pm 4$  seg. ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) y para 10  $\mu\text{M}$ ,  $t_{10-90\%} = 6 \pm 1$  seg. ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 15:** Incremento en la velocidad de de-activación de los GABA<sub>C</sub>R por picrotoxina, pero no por TPMPA. Trazos representativos de la relajación de respuestas a 1  $\mu$ M GABA (control) y en presencia de 1 y 10  $\mu$ M picrotoxina. Los trazos se superpusieron por simplicidad. El histograma resume los valores calculados de  $t_{10-90\%}$  para respuestas control y en presencia de picrotoxina o TPMPA (ver texto).

El hecho de que los antagonistas competitivos no tengan efecto sobre la de-activación de las respuestas sirvió también como control de que el agonista no estuviera re-uniéndose durante el lavado y por lo tanto, que el sistema de perfusión fue suficientemente rápido [188, 189]. Con el objeto de confirmar que este resultado se verificara en los GABA<sub>C</sub>R, estudiamos el efecto del antagonista competitivo específico, TPMPA, sobre la relajación de las respuestas mediadas por estos receptores. Observamos que para concentraciones de hasta 10  $\mu$ M, TPMPA no tuvo efectos sobre la de-activación, con un  $t_{dact10-90\%} = 36 \pm 7$  seg. (n=4). Estos resultados confirman que TPMPA sería un antagonista competitivo de los GABA<sub>C</sub>R, mientras que picrotoxina sería no-competitivo.

## II. 4. Discusión

### *Mecanismo de acción de picrotoxina*

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la inhibición de las respuestas de los GABA<sub>A</sub>R por picrotoxina, o su forma activa picrotoxina. Un efecto alostérico con

características mixtas, competitivo y no-competitivo fue sugerido [75, 190]. Otros autores postularon dos modelos más para la interacción de picrotoxina. En uno de ellos, picrotoxina bloquea los GABA<sub>A</sub>R a través de dos sitios, uno no-competitivo, y otro a-competitivo y dependiente del uso. El segundo modelo sugiere que picrotoxina podría actuar sobre dos tipos diferentes de receptores [77]. Sin embargo, todos estos estudios coinciden en descartar como mecanismo posible un bloqueo de canal abierto.

Para los GABA<sub>C</sub>R hemos observado que picrotoxina causó un desplazamiento hacia la derecha en las curvas D-R para GABA (Fig. 13A). El efecto de 1  $\mu$ M picrotoxina pudo ser completamente revertido por aplicaciones de GABA en concentraciones saturantes. Sin embargo, a concentraciones más altas del antagonista, por ej. 10 y 100  $\mu$ M, la inhibición no pudo recuperarse, indicando un mecanismo de acción no-competitivo. Por otro lado, es sabido que los antagonistas no-competitivos puros presentan una potencia de inhibición (IC<sub>50</sub>) constante a cualquier concentración de agonista. Picrotoxina, contrariamente, inhibió más fuertemente las respuestas a bajas dosis de GABA (Fig. 12B). Por lo tanto, un mecanismo mixto de inhibición, competitivo y no-competitivo, como el propuesto por Wang y col., no podría ser descartado [32, 79].

En un trabajo reciente, se ha revelado que picrotoxina no induciría rearrreglos estructurales en el bolsillo de unión al ligando en los GABA<sub>C</sub>R, pero sí en otras regiones de la proteína involucradas en la apertura del canal [191]. Estos resultados argumentarían a favor de un mecanismo de acción no-competitivo.

Como se ha demostrado previamente, la de-activación de los GABA<sub>A</sub>R es acelerada por la presencia de antagonistas de tipo no-competitivos, pero no para los competitivos [188]. Esta propiedad se atribuyó a un fuerte aumento de la afinidad por el agonista cuando el canal asociado está en su estado abierto. De este modo, bicuculina no produjo ningún cambio en la de-activación de las repuestas de los GABA<sub>A</sub>R debido a su incapacidad para desplazar al agonista de su sitio de unión. En cambio, picrotoxina acelera la relajación ya que su acción no depende de la unión del agonista al receptor.

Los GABA<sub>C</sub>R presentan una cinética de de-activación muy lenta que ha sido relacionada con un mecanismo de captura del agonista en su sitio de unión durante la apertura del canal en forma similar (aunque previa) a lo observado para los GABA<sub>A</sub>R [168]. Basados en toda esta evidencia, hemos evaluado el mecanismo de acción de picrotoxina sobre la relajación de las corriente iónicas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R. Se observó un fuerte aumento en la velocidad de de-

activación en presencia de picrotoxina, aún a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , que sólo produce un desplazamiento a la derecha en la curva D-R.

Bajo condiciones similares, el antagonista competitivo específico de los GABA<sub>C</sub>R, TPMPA, no indujo cambios en los tiempos de relajación. Esto indicaría que no se produjo un re-ligado del agonista al receptor durante el lavado ya que el sistema de perfusión fue suficientemente rápido. Por lo tanto, el curso temporal de la relajación de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R no estaría distorsionado por defectos en el sistema de perfusión. También fue posible medir la tardanza en el recambio de la perfusión dentro de la camarita de registro y este tiempo nunca fue superior a 3 seg., que es bastante menor que la relajación completa de la corriente.

Sin embargo, y con el objeto de evitar hacer referencia directa o indirecta a las constantes de transición microscópicas del esquema de gating, comparamos los procesos de de-activación calculando el tiempo comprendido entre el 10 y 90 % del proceso de de-activación en lugar de ajustar los trazos de corriente a ecuaciones exponenciales y calculando el característico  $\tau$ .

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado para los GABA<sub>C</sub>R de retina bovina y humana expresados en ovocitos de *Xenopus* [32, 72]. Obtuvimos un IC<sub>50</sub> de  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  para picrotoxina, que es muy parecido a los valores calculados en aquellos trabajos. Sin embargo, otros estudios realizados en GABA<sub>C</sub>R nativos de distintos animales de sangre fría encontraron valores diferentes de IC<sub>50</sub>s: 0.2  $\mu\text{M}$  [70], 0.6  $\mu\text{M}$  [187], y 2.4  $\mu\text{M}$  [192], en todos los casos calculados con dosis saturantes de GABA; indicando que podrían existir diferentes variantes del receptor.

### *Dependencia del uso*

El efecto dependiente del uso de picrotoxina ha sido extensamente caracterizado en los GABA<sub>A</sub>R de diferentes tipos neuronales [72, 75, 77]. Los efectos de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R también fueron dependientes del uso, pero en un grado mucho menor [72]. Estudios con mutaciones puntuales sugirieron que el sitio de unión de picrotoxina en los GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>C</sub>R estaría localizado en el extremo interno del segmento M2 [38, 193-195]. Por lo tanto, la unión de GABA podría inducir un cambio conformacional en la estructura del sitio de picrotoxina que diera cuenta del efecto dependiente del uso descrito para picrotoxina.

Durante la aplicación continua de picrotoxina, se desarrolló un aumento en el grado de inhibición con aplicaciones repetidas de GABA (Fig. 14B). Alternativamente, como los GABA<sub>C</sub>R no desensibilizan, o desensibilizan muy poco a concentraciones moderadas de agonista, los aumentos en la eficacia de bloqueo pueden ser evaluados adecuadamente con respuestas sostenidas en el tiempo (Fig. 14A). Atribuimos este aumento en la potencia de picrotoxina observada en ambos tipos de experimentos a una acción dependiente del uso. Resultados similares fueron previamente observados para el efecto de picrotoxina en GABA<sub>C</sub>R de la retina bovina y del pez gato [72, 187].

El uso de altas concentraciones de agonista previno la aparición del pico transitorio en el trazo de corriente producido por efecto de picrotoxina. Esto indicaría que el equilibrio de inhibición se alcanzó más rápidamente con dosis más altas de GABA. Dicho de otro modo, el curso temporal de la acción de picrotoxina dependió de la concentración de agonista. Por otro lado, el aumento en la concentración de picrotoxina también eliminó los máximos transitorios, sugiriendo que las transiciones a los estados bloqueados también eran dependientes de la concentración, como era esperable.

La recuperación de la inhibición por picrotoxina pudo observarse en ausencia de GABA sólo después de largos lavados con solución de Ringer, aunque fue claramente facilitado por la activación de los receptores (Fig. 14B). Similarmente, los GABA<sub>C</sub>R de retina bovina y pez gato también mostraron dependencia del uso durante la recuperación de la inhibición [72, 187]. Previamente, había sido demostrado un efecto similar para picrotoxina sobre los GABA<sub>A</sub>R [75].

Se observó también, una clara dependencia en la concentración de agonista durante el lavado de picrotoxina en presencia de GABA. Altas concentraciones de agonista facilitaron la recuperación de la respuesta independientemente de la concentración de picrotoxina utilizada.

### *Inhibición de los GABA<sub>C</sub>R por otros antagonistas.*

En el marco del presente estudio del mecanismo de acción de picrotoxina sobre los GABA<sub>C</sub>R, también se caracterizó la acción de otros dos antagonistas: quercetina, un flavonoide, y pregnanolona, un esteroide. La descripción correspondiente a estos dos últimos antagonistas se realizó casi completamente en la Tesis de Licenciatura del Lic. Juan D. Goutman y por eso no ha sido incluida en este trabajo. Sin embargo, consideramos que es importante hacer una breve síntesis de los efectos observados para quercetina y pregnanolona ya que el objetivo original

consistía en la comparación del mecanismo de acción de estos tres antagonistas. Los experimentos realizados fueron similares a los mostrados aquí para picrotoxina, es decir, curvas de inhibición, D-R, relación I-V, y los efectos sobre los cursos temporales de activación y de-activación.

La inhibición producida por quercetina se desarrolló rápidamente con un  $IC_{50}$  calculado de  $4.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ . Las curvas D-R de GABA en presencia de este antagonista mostraron un desplazamiento hacia la derecha y una reducción en la respuesta máxima, indicando un mecanismo de acción no-competitivo.

En contraposición a lo observado para picrotoxina, quercetina no mostró dependencia del uso en su acción y la recuperación de la inhibición fue rápida y no requirió de la aplicación de agonista. La activación de las respuestas al GABA en presencia de quercetina (pre-incubada) fue más lenta que el control. Los valores obtenidos para la constante de tiempo  $t_{\text{act } 10-90\%}$  fueron de  $42 \pm 6 \text{ sec}$  ( $n = 4$ ) en presencia de  $10\mu\text{M}$  quercetina y  $23 \pm 3 \text{ sec}$  ( $n = 7$ ) en ausencia de este flavonoide. Este efecto sobre el curso temporal de las respuestas al GABA no fue observado para ninguno de los otros dos antagonistas analizados. Además, la aplicación de quercetina al inicio de la de-activación produjo una aceleración en el tiempo de relajación de las respuestas, lo que confirmaría el efecto no-competitivo de este antagonista en los  $GABA_C$ R.

Pregnanolona inhibió las respuestas de los  $GABA_C$ R en una manera rápida, pero el tiempo requerido para la recuperación de la respuesta control fue largo, requiriendo varios minutos de lavado con solución de Ringer's. Anteriormente se había reportado que el efecto de los esteroides neuroactivos sobre los  $GABA_C$ R dependía fuertemente de la concentración de GABA utilizada, y por esto realizamos tres curvas de inhibición con tres concentraciones diferentes de agonista. Sin embargo, las tres curvas dieron valores de  $IC_{50}$  de aproximadamente  $1 \mu\text{M}$ .

Este antagonista produjo una disminución de la respuesta máxima en las curvas D-R a concentraciones saturantes de agonista, pero no se observaron cambios en la afinidad aparente por GABA. No obstante, es importante destacar, que no pudieron ser evaluadas concentraciones mayores a  $10 \mu\text{M}$  de este esteroide por problemas de solubilidad.

Pregnanolona no mostró dependencia del uso en su acción, y si bien el lavado de la misma fue lento, no se observó una recuperación más rápida debido a la activación de los receptores.

---

## CAPÍTULO III

### **Efecto de lutecio ( $\text{Lu}^{3+}$ ) sobre el mecanismo de *gating* de los receptores de $\text{GABA}_C$**

---

### III. 1. Introducción

Desde hace años se conoce la capacidad de diversos cationes de modular la actividad de receptores sinápticos y canales iónicos en el SNC, con efectos que presentan una singular importancia fisiológica y toxicológica [141, 142, 144-148].

En particular, se ha observado que los receptores de GABA son sensibles a la acción de distintos cationes divalentes y trivalentes [149-151]. Por ejemplo, zinc ( $Zn^{2+}$ ) y cadmio ( $Cd^{2+}$ ) inhiben reversiblemente a los  $GABA_A$ R y  $GABA_C$ R, mientras que mercurio ( $Hg^{2+}$ ) produce un aumento en las respuestas mediadas por ambos tipos de receptores [149, 150, 154, 196].

Otro grupo de iones con efectos potenciadores sobre los receptores ionotrópicos de GABA son los lantánidos. Este conjunto de cationes trivalentes presenta un ranking de potencia, para ambos tipos de receptores, que sigue estrictamente el orden de número atómico de la tabla periódica de los elementos. Además, se ha demostrado que terbio ( $Tb^{3+}$ ) produce un incremento en la afinidad aparente por GABA en los  $GABA_A$ R y que lantano ( $La^{3+}$ ) presentó un efecto similar sobre los  $GABA_C$ R [151, 154].

En el presente estudio tratamos de caracterizar el mecanismo de acción de otro elemento perteneciente a la familia de los lantánidos, lutecio ( $Lu^{3+}$ ), sobre los  $GABA_C$ R. Este ión es el último en la serie de los lantánidos, y por lo tanto, el más potente. En experimentos preliminares, se observó un efecto de  $Lu^{3+}$  sobre las corrientes iónicas mediadas por los  $GABA_C$ R que sugirió un mecanismo de acción diferente al de  $La^{3+}$ . Por eso, decidimos realizar este estudio para caracterizar el efecto de  $Lu^{3+}$  sobre los  $GABA_C$ R, tratando de proponer un mecanismo de acción que explique las diferencias encontradas con  $La^{3+}$ .

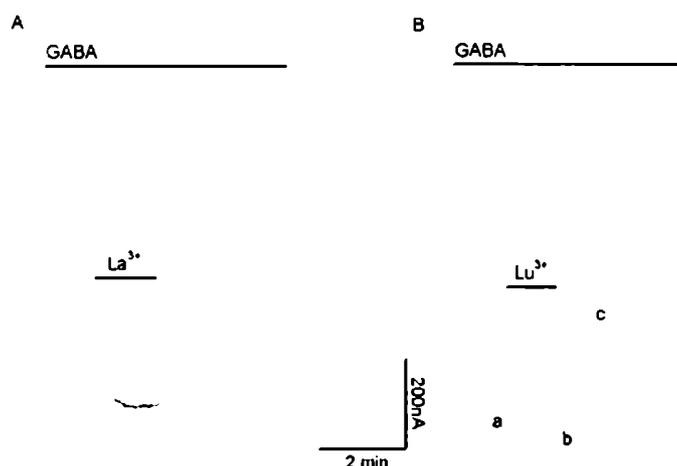
### III. 2. Resultados

#### *Efecto de $Lu^{3+}$ y $La^{3+}$ sobre el curso temporal de las respuestas a GABA*

En la Fig. 16 se ilustran respuestas a GABA ( $3 \mu M$ ) en ovocitos inyectados con la subunidad  $\rho_1$  humana, en presencia de  $La^{3+}$  (A) o  $Lu^{3+}$  (B). Ambos iones fueron aplicados sobre el máximo de las respuestas y puede advertirse el efecto de  $La^{3+}$  que provocó un aumento en la corriente iónica mediada por los  $GABA_C$ R. El efecto de  $La^{3+}$  se sostuvo en el tiempo mientras duró la

aplicación, y una vez iniciado el lavado, el trazo de la corriente retornó en unos pocos segundos al valor correspondiente a la activación debida al GABA.

En la Fig. 16B se muestra el efecto de  $\text{Lu}^{3+}$  sobre las respuestas a  $3 \mu\text{M}$  GABA. Como puede observarse,  $\text{Lu}^{3+}$  también produjo un incremento rápido de la respuesta (indicado con una **a** en el trazo de corriente) y como se mencionó en la introducción, este ión fue el más potente de la serie de los lantánidos.



**Fig. 16:** Modulación de los  $\text{GABA}_C\text{R}$  por  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Lu}^{3+}$ . **A.** Respuesta representativa de la acción de (1 mM)  $\text{La}^{3+}$  sobre la corriente iónica evocada por (1  $\mu\text{M}$ ) GABA. Puede observarse como una vez llegado al máximo el trazo se mantuvo constante durante toda la aplicación del ión y una vez retirado, vuelve al valor de la respuesta evocada por GABA. **B.** Respuesta representativa de la acción de (1 mM)  $\text{Lu}^{3+}$  sobre la corriente iónica evocada por (1  $\mu\text{M}$ ) GABA. El curso temporal de la respuesta fue complejo, observándose un incremento rápido de la respuesta (indicado con una **a**) hasta llegar a un máximo transitorio seguido de una atenuación en la amplitud de la corriente (indicado con una **b**). Por último, se observó una fase de “rebote” (indicado con una **c**).

No obstante, después de haber alcanzado el máximo, la corriente iónica sufrió un proceso de atenuación que en aproximadamente 2 min revirtió casi completamente el efecto potenciador (indicado con una **b** en el trazo de corriente de la Fig. 16B). Si bien este curso temporal nunca se observó con  $\text{La}^{3+}$ , sí se obtuvo para otros lantánidos como gadolinio ( $\text{Gd}^{3+}$ ).

El mismo trazo de la Fig. 16B muestra que una vez retirado el modulador, aún en presencia de GABA, se advirtió una caída casi inmediata en la amplitud de la misma hasta valores por debajo del que correspondía a la activación por GABA (indicado con una **c** en el trazo de

corriente). Pero luego, el trazo de corriente se recuperó lentamente hasta un valor similar al inicial. Esta última acción de “rebote” en el trazo de corriente se registró sólo en los casos en los que un grado importante de atenuación había sido alcanzado previamente.

En este trabajo intentamos explicar las diferencias encontradas en los cursos temporales de las respuestas en presencia de  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Lu}^{3+}$ . Esto involucró la caracterización de los efectos de  $\text{Lu}^{3+}$ , como se mostrará a continuación, con el objeto de establecer diferencias y similitudes con lo descrito previamente para  $\text{La}^{3+}$ .

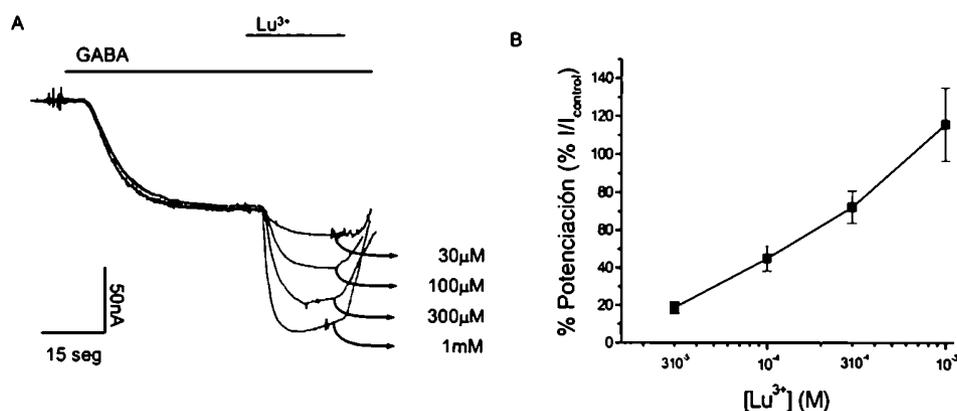
Complementariamente, utilizamos herramientas matemáticas para simular a través de un proceso de Markov, la acción de los  $\text{GABA}_C$ R en respuesta al GABA y a estos moduladores, con el objeto de comprender sus mecanismos de acción. El modelo cinético propuesto, que se muestra más adelante en la Discusión, fue elaborado sobre la base de lo reportado previamente por otros autores [168] pero modificado para un mejor ajuste de los resultados obtenidos aquí. Si bien el comportamiento del modelo se tratará extensamente más adelante, es importante destacar que la principal novedad fue la introducción de un segundo estado abierto, que no había sido descrito anteriormente, revelado por la acción de los lantánidos.

### *Análisis de las curvas D-R*

En la Fig. 17A, se muestran registros superpuestos de aplicaciones de  $\text{Lu}^{3+}$  en concentraciones crecientes sobre las respuestas evocadas por  $1 \mu\text{M}$  GABA. Además del aumento en la amplitud de la corriente iónica, a medida que se aumentó la concentración del ión, se observó un incremento de la velocidad con la que se alcanzó el máximo de respuesta. La curva construida a partir de estos datos, que se muestra en la Fig. 17B, no llegó a un valor de saturación, debido a que no pudieron ser evaluadas concentraciones de este ión más altas que  $1 \text{ mM}$  por limitaciones en la solubilidad. A esta dosis ( $1 \text{ mM}$ ) se experimentó un aumento en las respuestas a GABA de un  $115.7 \pm 19.2 \%$  ( $n=9$ ).

También realizamos una curva D-R de GABA en presencia de  $300 \mu\text{M}$   $\text{Lu}^{3+}$  para estudiar el efecto de este ión sobre la afinidad aparente del receptor y su eficacia máxima. Sorprendentemente, y en contraste con el efecto descrito para  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  produjo un aumento en la respuesta máxima de GABA (Fig. 17A). Incluso para concentraciones de GABA de  $10$  ó  $100 \mu\text{M}$ , las respuestas fueron potenciadas en un  $19.3 \pm 4.7 \%$  y  $20.1 \pm 1.0 \%$  respectivamente. En

experimentos preliminares observamos que el aumento de la respuesta máxima pudo ser incluso mayor para concentraciones superiores de  $\text{Lu}^{3+}$ .



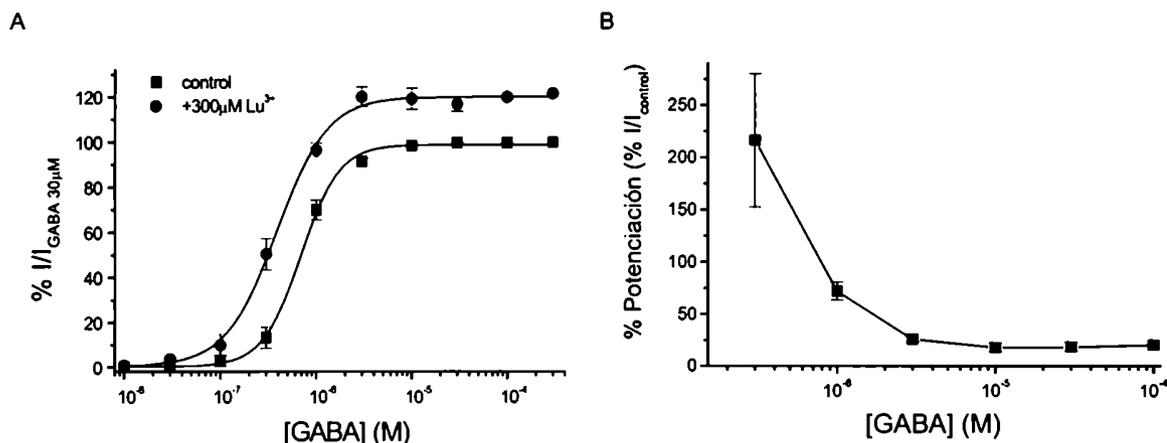
**Fig. 17:** Modulación de los  $\text{GABA}_C\text{R}$  por  $\text{Lu}^{3+}$ . **A.** Respuestas representativas del efecto de concentraciones crecientes de  $\text{Lu}^{3+}$  sobre el máximo de las corrientes evocadas por 1  $\mu\text{M}$  GABA (los trazos fueron superpuestos por simplicidad). Tanto la aplicación del ión como su lavado fueron realizados en presencia de GABA. **B.** Curva de potenciación de  $\text{Lu}^{3+}$ . El efecto se expresa como la fracción de incremento de la respuesta obtenida con 1  $\mu\text{M}$  GABA.

Además, en presencia de  $\text{Lu}^{3+}$  se observó un aumento en la afinidad aparente de los  $\text{GABA}_C\text{R}$ , como se muestra en la Fig. 18A. En ausencia de este ión, el  $\text{EC}_{50}$  calculado fue  $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$  con un  $n$  de Hill de  $2.2 \pm 0.2$ , mientras que con  $\text{Lu}^{3+}$  el  $\text{EC}_{50}$  fue  $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$  con un  $n$  de Hill =  $1.6 \pm 0.1$ .

En la Fig. 18B se representan los mismos datos de la curva D-R en presencia de  $\text{Lu}^{3+}$  de la Fig. 18A, pero expresados de un modo diferente para ilustrar cómo depende el grado de potenciación producido por este ión del nivel de activación alcanzado por GABA. El gráfico claramente muestra que la potencia de  $\text{Lu}^{3+}$  es mayor para concentraciones inferiores de GABA; sin embargo, es difícil precisar el límite superior de la potenciación ya que incluso para dosis de GABA que *per se* no lograron evocar respuestas detectables (30 nM, por ej.), la co-aplicación con  $\text{Lu}^{3+}$  produce una respuesta de una amplitud claramente apreciable (no mostrado).

Al igual que lo reportado para el  $\text{La}^{3+}$  en los  $\text{GABA}_C\text{R}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  no fue capaz de evocar corrientes iónicas *per se* en estos receptores (no mostrado). Tampoco se observaron efectos en ausencia de GABA para  $\text{Tb}^{3+}$ , otro elemento perteneciente a la serie de los lantánidos. La incubación de los  $\text{GABA}_A\text{R}$  con este ión sí produjo una respuesta en ausencia de agonista [197].

Es importante destacar que los resultados expuestos en esta sección no constituirían en sí mismos una evidencia directa de la necesidad de un modelo de *gating* de los GABA<sub>C</sub>R con dos estados abiertos para explicar el fenómeno de la potenciación por lantánidos. Aún el incremento de la respuesta máxima de GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> podría ser coherente con un modelo de un sólo estado abierto.



**Fig. 18:** Modulación de los GABA<sub>C</sub>R por Lu<sup>3+</sup>. **A.** Curva dosis-respuestas para GABA en ausencia y presencia de 300 μM Lu<sup>3+</sup>. La amplitud de las respuestas se expresa como fracción de las corrientes evocadas por 30 μM GABA. **B.** Grado de potenciación logrado con 300 μM Lu<sup>3+</sup> sobre las respuestas evocadas con distintas concentraciones de GABA, expresado como la fracción del aumento en la corriente evocada para cada dosis de agonista.

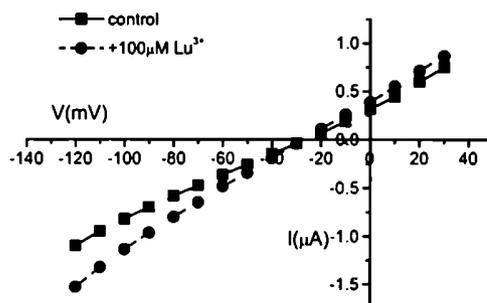
### *Efecto de Lu<sup>3+</sup> sobre la relación corriente - voltaje (I-V)*

En la Fig. 19 se muestran las relaciones corriente-voltaje (I-V) en presencia y en ausencia de 100 μM Lu<sup>3+</sup>. Como puede observarse, el aumento en las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R debido a Lu<sup>3+</sup> no mostró ningún tipo de dependencia del potencial de membrana.

### *De-activación de las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R en presencia de Lu<sup>3+</sup>*

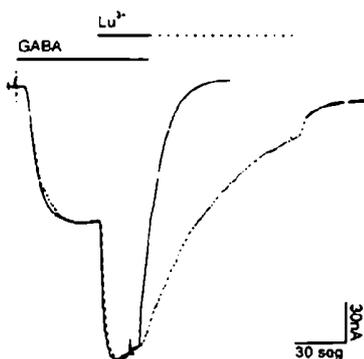
Si bien el estudio en el estado estacionario del efecto de moduladores, como las curvas D-R, brinda importante información acerca de sus mecanismos de acción, el análisis de sus efectos

sobre las cinéticas de los procesos fuera del equilibrio puede ayudar a determinar el esquema de *gating* correspondiente.



**Fig. 19:** Modulación de los  $\text{GABA}_C\text{R}$  por  $\text{Lu}^{3+}$ . Relación corriente-voltaje (I-V) de respuestas evocadas con  $1 \mu\text{M}$  GABA con o sin  $100 \mu\text{M}$   $\text{Lu}^{3+}$ . El rango utilizado de potenciales de fijación fue de  $-120$  a  $+40$  mV.

En el experimento de la Fig. 20, se muestran en trazos superpuestos, los cursos temporales de dos respuestas evocadas por GABA ( $1 \mu\text{M}$ ) con sendas aplicaciones de  $\text{Lu}^{3+}$  ( $1 \text{ mM}$ ) sobre el máximo, en las que la de-activación se evaluó en presencia de este ión (trazo punteado) o en ausencia del mismo (trazo lleno).  $\text{Lu}^{3+}$  produjo un notorio enlentecimiento de la relajación de la corriente iónica. Es importante indicar que la de-activación obtenida durante el lavado con solución de Ringer's tuvo una cinética que no fue diferente a la relajación de la respuesta a  $1 \mu\text{M}$  GABA.

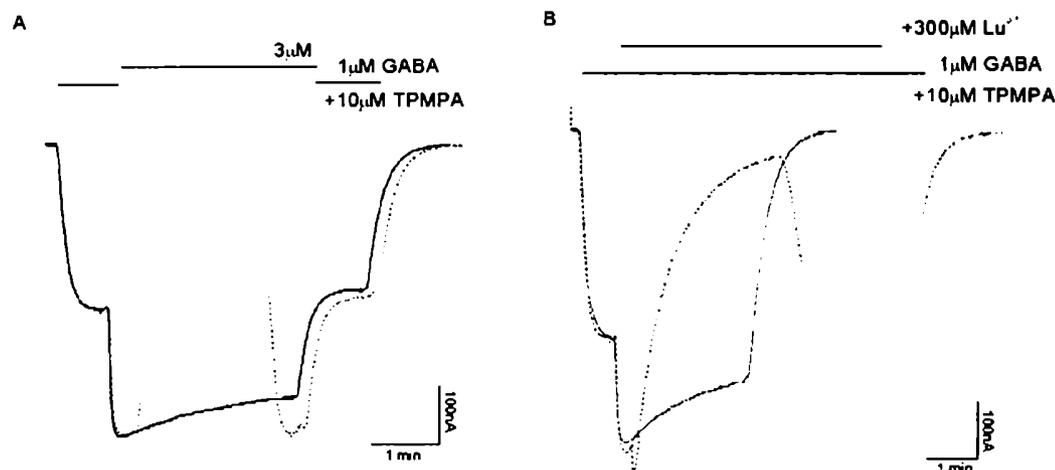


**Fig. 20:**  $\text{Lu}^{3+}$  retrasa la relajación de las respuestas al GABA. Registros representativos de la acción de  $\text{Lu}^{3+}$  sobre la de-activación de respuestas evocadas por  $1 \mu\text{M}$  GABA en presencia de ( $1 \text{ mM}$ ) de este ión. En trazo lleno se muestra el lavado realizado con solución de Ringer's, y en trazo punteado, después de la aplicación de  $\text{Lu}^{3+}$ .

*Inhibición por TPMPA y picrotoxina de las respuestas evocadas por GABA en presencia de  $\text{Lu}^{3+}$ .*

Luego evaluamos cómo afectaba la presencia de  $\text{Lu}^{3+}$  a la acción de ciertos inhibidores de los  $\text{GABA}_C\text{R}$  cuyo mecanismo de acción ya ha sido extensamente estudiado. En esta serie de experimentos se utilizaron los antagonistas TPMPA, que presenta un mecanismo competitivo, y picrotoxina, que en este mismo trabajo de tesis se mostró que actúa como antagonista no-competitivo o mixto. No obstante, ambos producen una inhibición dependiente de la concentración de agonista o del nivel de activación de los receptores [73]. Por esto, diseñamos los experimentos de manera de poder comparar los niveles de inhibición alcanzados, y las constantes de tiempo calculadas para estos procesos, en respuestas de grados de activación similares, ya sea con o sin  $\text{Lu}^{3+}$ . Las respuestas mediadas por  $1 \mu\text{M}$  GABA y  $300 \mu\text{M}$   $\text{Lu}^{3+}$  en promedio evocaron corrientes iónicas de similar amplitud a las registradas con  $3 \mu\text{M}$  GABA (ver Fig. 21A y B) y por eso, éstas fueron las concentraciones utilizadas.

En la Fig. 21A, se representa una respuesta evocada con  $1 \mu\text{M}$  GABA donde una vez alcanzado el máximo, se aumentó la concentración de agonista a  $3 \mu\text{M}$ . La respuesta obtenida se mantuvo durante varios minutos notándose un ligero grado de desensibilización, que si bien no fue de gran amplitud, pudo ser observado reiteradamente a concentraciones altas de GABA. Luego, se aplicó nuevamente  $1 \mu\text{M}$  GABA y finalmente la respuesta se relajó al retirar el agonista del sistema de perfusión. En trazo punteado, se muestra un experimento similar, pero en el que además se aplicó  $30 \mu\text{M}$  TPMPA sobre el máximo de dicha respuesta, produciendo una inhibición de un  $93.6 \pm 6.4 \%$  ( $n = 2$ ). La velocidad con la que este antagonista ejerció su efecto se estimó con una constante de tiempo,  $t_{10-90\%}$ , que en este caso fue  $51 \pm 2$  seg ( $n = 2$ ). El antagonista se lavó en presencia de  $3 \mu\text{M}$  GABA, como también se ilustra en la figura. En unos pocos segundos, la respuesta se recuperó completamente, y en forma notable se observó que la amplitud alcanzada fue ligeramente mayor que la registrada con la aplicación sostenida de GABA (graficada en trazo lleno). Esta diferencia se atribuyó a una protección de la desensibilización operada por el antagonista competitivo que al desplazar al GABA de su sitio impediría que este proceso, dependiente del agonista, avance. Un fenómeno similar se ha reportado en  $\text{GABA}_A\text{R}$  de neuronas de hipocampo de rata [188].

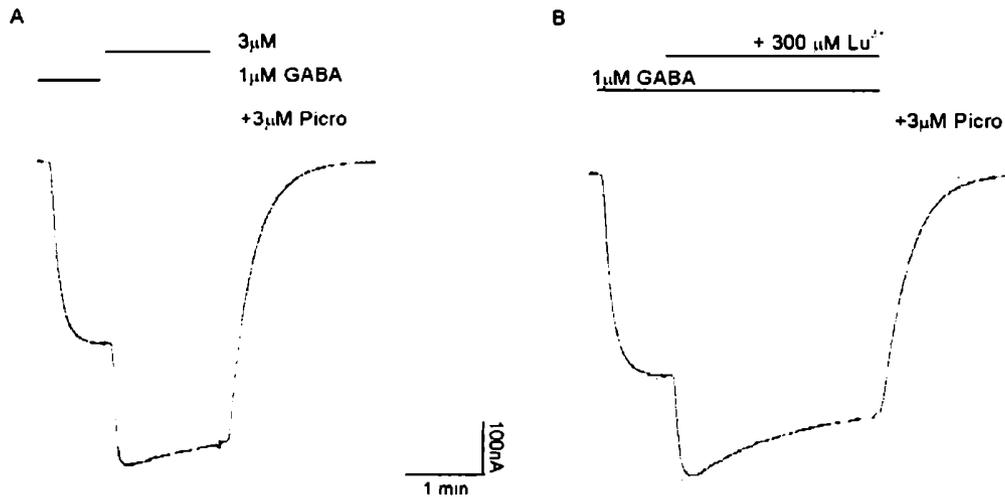


**Fig. 21:** Inhibición por TPMPA de las respuestas evocadas por GABA en presencia o ausencia de  $\text{Lu}^{3+}$ . **A.** Respuestas representativas evocadas con 3  $\mu\text{M}$  GABA en ausencia (trazo lleno) o frente a la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  TPMPA (trazo punteado) sobre el máximo de la misma. Esta concentración de agonista se utilizó para comparar los efectos del antagonista sobre respuestas con o sin  $\text{Lu}^{3+}$  pero con niveles de activación similares. El lavado del TPMPA se llevó a cabo en presencia de 3  $\mu\text{M}$  GABA. **B.** Respuestas representativas evocadas con 1  $\mu\text{M}$  GABA y 300  $\mu\text{M}$   $\text{Lu}^{3+}$  sobre el máximo, en ausencia (trazo lleno) o en presencia de 10  $\mu\text{M}$  TPMPA (trazo punteado).

Las respuestas mediadas por GABA y  $\text{Lu}^{3+}$  también fueron sensibles al antagonista TPMPA. En la Fig. 22B se muestra, en trazo lleno, el efecto de  $\text{Lu}^{3+}$  sobre el máximo de las respuestas al GABA en la que después de alcanzado el máximo, se inicia un proceso de atenuación de la corriente o desensibilización, como se mencionó anteriormente. Se puede observar, al comparar los trazos en presencia o ausencia de  $\text{Lu}^{3+}$ , que el grado de desensibilización es mayor en las respuestas donde existió una potenciación mediada por este ión. Cuando TPMPA fue aplicado, como se muestra en la figura en el trazo punteado, una reducción en los niveles de la corriente de  $93.9 \pm 3.8 \%$  ( $n = 2$ ) fue observada, similar a lo detallado anteriormente. El curso temporal fue más lento, con un  $t_{10-90\%}$  de  $100.6 \pm 10.8$  s ( $n = 2$ ,  $p < 0.05$ ), pero además, no se observó ninguna protección en el proceso de atenuación o desensibilización de la respuesta. Esto último, junto al hecho de que los niveles alcanzados de desensibilización son diferentes, sugeriría un mecanismo independiente del operado por GABA.

En la Fig. 22A se muestra el efecto de picrotoxina sobre las respuestas evocadas con GABA. La aplicación sobre el máximo de la respuesta produjo una inhibición rápida de la misma, con

una constante de tiempo dependiente del nivel de activación (ver Capítulo II), que para 3  $\mu\text{M}$  GABA fue de  $8 \pm 1$  s ( $n = 2$ ). La inhibición alcanzada fue de  $56.7 \pm 7.8$  % ( $n = 2$ ).



**Fig. 22:** Inhibición por picrotoxina de las respuestas evocadas por GABA en presencia o ausencia de  $\text{Lu}^{3+}$ . **A.** Respuestas representativas evocadas con 3  $\mu\text{M}$  GABA en ausencia (trazo lleno) o frente a la aplicación de 3  $\mu\text{M}$  picrotoxina (trazo punteado) sobre el máximo de la misma. Esta concentración de agonista se utilizó para comparar los efectos del antagonista sobre respuestas con o sin  $\text{Lu}^{3+}$  pero con niveles de activación similares. El lavado del picrotoxina se llevó a cabo en presencia de 3  $\mu\text{M}$  GABA. **B.** Respuestas representativas evocadas con 1  $\mu\text{M}$  GABA y 300  $\mu\text{M}$   $\text{Lu}^{3+}$  sobre el máximo, en ausencia (trazo lleno) o en presencia de 3  $\mu\text{M}$  picrotoxina (trazo punteado).

Cuando se aplicó (3  $\mu\text{M}$ ) picrotoxina sobre las respuestas evocadas por GABA en presencia de  $\text{Lu}^{3+}$ , observamos que su efecto fue diferente al registrado en las respuestas a 3  $\mu\text{M}$  GABA. La inhibición progresó muy lentamente, y el nivel alcanzado fue de  $71.2 \pm 0.8$  % ( $n = 2$ ). Como puede observarse, el grado de inhibición fue sensiblemente mayor que el indicado para 3  $\mu\text{M}$  GABA ( $p < 0.05$ ), pero no fue diferente al registrado con una concentración de agonista menor (1  $\mu\text{M}$  GABA:  $71.3 \pm 6.1$  % ( $n = 3$ )). El tiempo requerido para alcanzar el máximo de inhibición fue de  $37 \pm 1$  seg., que es mucho más lento que el calculado cuando la respuesta fue activada con 3  $\mu\text{M}$  GABA ( $p < 0.05$ ) o incluso con 1  $\mu\text{M}$  de este agonista ( $17 \pm 1$  seg.,  $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ). Esto es importante, considerando que la constante de tiempo para la inhibición parecía depender del nivel de activación de las respuestas, es decir, de la concentración de agonista utilizada, según lo

reportado por Woodward y col. y nosotros mismos [72, 113]. Sin embargo, la sensibilidad a picrotoxina parecería no depender simplemente de la probabilidad de apertura ( $P_o$ ).

### III. 3. Discusión

Desde hace tiempo se conoce que las respuestas mediadas por los GABA<sub>A</sub>R son modulables por iones de la familia de los lantánidos. En particular, Tb<sup>3+</sup> potencia las corrientes iónicas a través de estos receptores en el rango micromolar alto. Además, en concentraciones milimolares fue capaz de evocar corrientes iónicas *per se* en los GABA<sub>A</sub>R, al igual que lo observado aquí para Lu<sup>3+</sup>. El efecto mediado por Tb<sup>3+</sup> sería a través de un mecanismo diferente al observado para los barbitúricos y su sitio sería independiente del descrito para cationes divalentes como Zn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> [152].

En este trabajo se realizó un estudio extenso del mecanismo de acción de Lu<sup>3+</sup> sobre las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R. En experimentos preliminares se mostró que las respuestas al GABA en presencia de este ión presentaban un curso temporal diferente al observado con La<sup>3+</sup>. Este resultado sugería que Lu<sup>3+</sup> tendría un mecanismo de acción distinto al de dicho ión.

La aplicación de Lu<sup>3+</sup> sobre el máximo de las respuestas al GABA produjo un efecto complejo que consistió de un rápido incremento inicial de la corriente iónica seguido de un proceso más lento de atenuación. Para explicar esta segunda fase del efecto de Lu<sup>3+</sup> se propusieron distintas hipótesis.

Primero, se propuso un bloque del canal mediado por este ión, que se descartó debido a la naturaleza aniónica del mismo. Los canales aniónico, como este, presentan en el vestíbulo un anillo formado por residuos de argininas, con una alta densidad de cargas positivas que repelen el acercamiento de cationes, particularmente un catión trivalente, como Lu<sup>3+</sup>.

Luego, se especuló con un efecto indirecto o mediado por mecanismos de señalización intracelular. Sin embargo, existían dos observaciones que contradecían esta hipótesis: el efecto era fácilmente reversible, y además, tenía una dependencia de la concentración de GABA y del tipo de agonista utilizado. Por ejemplo, a concentraciones de GABA de 3 μM se observó un grado de atenuación importante, mientras que a 0.3 μM prácticamente, no existió. Y a su vez, era mayor con β-alanina que con GABA.

Por último, se postuló un mecanismo de desensibilización operado por  $\text{Lu}^{3+}$ , que prácticamente estaría ausente en las respuestas evocadas sólo por GABA. Esta fue la hipótesis más firme con relación a los resultados experimentales obtenidos y subyace al mecanismo de *gating* propuesto en el modelo que se discutirá más adelante.

### *Análisis de las curvas D-R*

El efecto de  $\text{Lu}^{3+}$  sobre los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  no pudo ser evaluado a concentraciones más altas que 1 mM de manera de lograr una curva de saturación completa, debido al límite de solubilidad que presentaba este ión en la solución de Ringer.

Por otro lado, se obtuvo una alta variabilidad en el grado de potenciación de 1 mM  $\text{Lu}^{3+}$ , con valores entre 45 – 190 %. Diversos factores podrían haber contribuido a esta variabilidad. En primer lugar, la escasa solubilidad de la sal de  $\text{Lu}^{3+}$  utilizada ( $\text{LuCl}_3$ ). Por otro lado, la curva D-R para  $\text{Lu}^{3+}$  se realizó a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  GABA que representó una concentración muy cercana al  $\text{EC}_{50}$  en los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ . Las respuestas evocadas con una dosis de agonista de este tipo tienen generalmente una alta variabilidad en el grado de activación respecto al máximo (30  $\mu\text{M}$  en este caso). Esto se debe a que las curvas de saturación que siguen la ecuación logística (ver Materiales y métodos) tienen una fuerte pendiente en el rango de concentraciones alrededor del  $\text{EC}_{50}$  y consecuentemente, pequeñas diferencias en el valor de concentración producen grandes cambios en los niveles de respuesta. Por lo tanto, parte de la variabilidad en el grado de potenciación por  $\text{Lu}^{3+}$  puede adjudicarse a diferencias en el nivel de respuesta evocado con 1  $\mu\text{M}$  GABA ya que como se ve en la Fig. 18B a menor nivel de activación por agonista correspondió un mayor incremento de la respuesta por  $\text{Lu}^{3+}$ .

$\text{Lu}^{3+}$  produjo un aumento en la afinidad aparente por GABA en los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ , al igual que lo reportado para  $\text{La}^{3+}$  [154]. Un fenómeno similar se observó también en los  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$  con  $\text{Tb}^{3+}$  [197]. No obstante, en ninguno de los estudios realizados previamente, se obtuvo además un aumento en la respuesta máxima de GABA como el que se muestra aquí con  $\text{Lu}^{3+}$  en la Fig. 18A.

Este resultado cobra importancia con relación al alto valor de probabilidad de apertura máxima ( $P_{o, \text{max}}$ ) atribuido a los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  [168], que se estimó indirectamente y con un alto margen de error. Más adelante, en la discusión del modelo de *gating* propuesto para este trabajo de tesis se tratará este problema en detalle, pero es importante indicar aquí que un 20 % (o más) de aumento en la respuesta máxima es incompatible con una  $P_{o, \text{max}}$  mayor a 0.8.

No se observaron respuestas de los GABA<sub>C</sub>R por acción de Lu<sup>3+</sup> o La<sup>3+</sup> *per se*. Todos los efectos descritos para estos iones estuvieron mediados por la activación con GABA

### *Interacción de Lu<sup>3+</sup> y antagonistas*

Hemos mostrado también la sensibilidad de las respuestas evocadas por GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> a antagonistas de los GABA<sub>C</sub>R como TPMPA y picrotoxina.

TPMPA es un antagonista específico de los GABA<sub>C</sub>R, para el que ha sido planteado un mecanismo de acción de tipo competitivo al unirse al sitio de reconocimiento para GABA en los receptores [73]. Las respuestas evocadas por GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> fueron sensibles a dicho antagonista, incluso en un nivel similar a lo advertido para GABA en ausencia de dicho ión. El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio fue ciertamente mayor en las respuestas evocadas en presencia de Lu<sup>3+</sup>.

Si bien los GABA<sub>C</sub>R han sido descritos como receptores carente de desensibilización [169], la disminución en la amplitud de la respuesta durante las aplicaciones prolongadas de GABA, indicaría que existe un proceso de desensibilización muy suave (Fig. 21A). Además, la protección de este proceso observada con TPMPA confirmaría esta hipótesis ya que un fenómeno similar se ha reportado para bicuculina en los GABA<sub>A</sub>R que presentan una pronunciada desensibilización [188]. Esta disminución en la amplitud de las respuestas no podrían atribuirse a una caída en la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> debido a que la cantidad calculada de iones Cl<sup>-</sup> que mediarían esta corriente (~10<sup>-9</sup> moles y ~700nA, respectivamente) sería varios órdenes de magnitud menor que la cantidad de Cl<sup>-</sup> presente en el citoplasma celular (~2 10<sup>-6</sup> moles).

La desensibilización observada durante la aplicación de Lu<sup>3+</sup> no fue protegida por la acción de TPMPA (Fig. 21B), en contraste con lo observado para GABA. Esta diferencia indicaría que la atenuación en la amplitud observada durante las aplicaciones de Lu<sup>3+</sup> estaría medida por este ión en forma independiente de la acción de GABA. Además, la disminución en la corriente fue siempre más marcada durante la acción de Lu<sup>3+</sup>.

La inhibición por picrotoxina presentó algunas diferencias entre lo observado para las respuestas evocadas en presencia y ausencia de Lu<sup>3+</sup>. En el equilibrio, la inhibición alcanzada en las respuestas evocadas por 1 μM GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> fue similar a la observada para esta concentración de agonista y en ausencia de dicho ión. Recientemente ha sido reportado un estudio sobre la acción de pregnenolona sulfato (PS) sobre las corrientes mediadas por los

GABA<sub>A</sub>R que presentaba características similares en cuanto a la dependencia en la activación [198]. Sin embargo, allí se mostró como dicha dependencia tenía un sentido contrario a lo observado aquí en el Capítulo II. Este neuroesteroide es más potente a concentraciones mayores de agonista contrariamente a lo que ocurre con picrotoxina, que alcanza mayores niveles de inhibición con menores dosis de agonista. Además, fue demostrado en aquel trabajo, mediante el uso de un agonista parcial, que la apertura del canal es el factor determinante en dicha observación y no la mera ocupación del sitio de agonista en el receptor.

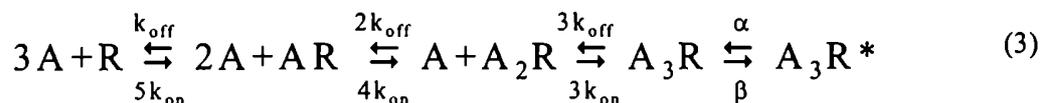
Sobre la base del efecto dependiente del uso de picrotoxina que fue expuesto en el Capítulo II, y los resultados obtenidos en las respuestas evocadas con o sin Lu<sup>3+</sup>, proponemos que la inhibición producida por este antagonista requeriría de la unión del agonista a su sitio de reconocimiento en el receptor y no la apertura del canal.

Como se mencionó en el Capítulo II, el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio en la inhibición por picrotoxina, expresado como el t<sub>10-90%</sub>, fue dependientes del nivel de activación de las respuestas. Por ejemplo, el t<sub>10-90%</sub> con 1 μM GABA fue el doble que el de 3 μM. En las respuestas evocadas con Lu<sup>3+</sup>, la inhibición por picrotoxina fue más lenta y tardó más tiempo en alcanzar el equilibrio con relación a lo observado en ausencia de este ión. Esto confirmaría que la acción de este antagonista no requirió de la apertura del canal, sino que involucró un mecanismo más complejo.

### *Modelo de gating de los GABA<sub>C</sub>R en presencia de Lu<sup>3+</sup>*

Con el objeto de conocer en mayor detalle los efectos producidos por Lu<sup>3+</sup> sobre las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R, realizamos simulaciones numéricas a partir de un modelo matemático de la actividad de los canales incluyendo la acción de estos iones. El esquema básico fue tomado de Chang & Weiss, donde se caracterizó la actividad de los receptores de GABA<sub>C</sub> ensamblados con la subunidad ρ<sub>1</sub> humana expresados en ovocitos de *Xenopus* [168].

El modelo (que se muestra a continuación) fue sugerido a partir de estudios de expresión de receptores “heteroméricos”, ensamblados con la subunidad ρ<sub>1</sub> salvaje o con una mutación que disminuía la afinidad aparente por GABA [169]. Al inyectar en ovocitos los ARNc de estas dos subunidades en distintas proporciones fue posible determinar que la cantidad de moléculas de agonista necesarias para activar los receptores sería de entre tres y cuatro.

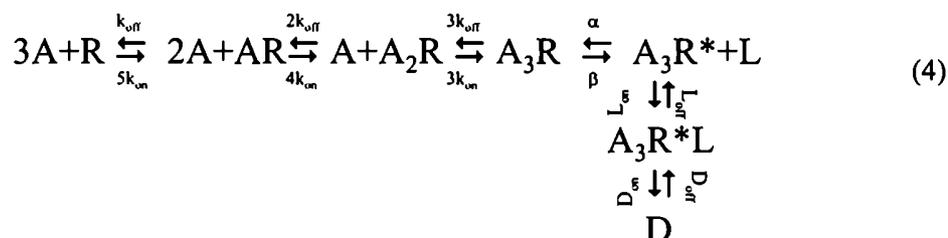


En el modelo, A representa la molécula de agonista; y R, AR, A<sub>2</sub>R, y A<sub>3</sub>R al receptor en estados cerrados, ya sean, no unido a agonista, unido a una molécula, a dos moléculas o a tres, respectivamente. A su vez, A<sub>3</sub>R\* representa al receptor en su estado abierto. El significado y los valores reportados de las constantes de tiempo k<sub>on</sub>, k<sub>off</sub>, α y β, se indican en la Introducción.

La existencia de múltiples estados cerrados sería coherente con la lenta cinética de activación observada en las respuestas macroscópicas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R. A su vez, el curso temporal de relajación de las corrientes iónicas macroscópicas evocadas en ovocitos, junto a algunos registros de canal único realizados, aunque con pobre resolución, sugirieron que los GABA<sub>C</sub>R poseerían un único estado abierto [168].

Antes de profundizar la discusión de los modelos, es importante aclarar algunos puntos relativos a la mecánica de funcionamiento del mismo ya que es la misma lógica que será utilizada en el resto de la sección. Las transiciones entre estados involucradas en la unión de ligando son dependientes de la concentración del mismo, es decir que por ejemplo, la constante correspondiente a la transición entre el receptor en el estado no ligado (R) y el unido a una molécula de agonista (AR) estaría determinada por la expresión 5 k<sub>on</sub> [GABA]. Por el contrario, las transiciones entre estados con más número de moléculas de agonista unidas a otro de menos, así como la transición entre A<sub>3</sub>R y A<sub>3</sub>R\*, que está dada por las constantes α y β, serían independientes de la concentración de GABA.

Algunas modificaciones fueron introducidas en este modelo para lograr un mejor ajuste de los resultados obtenidos en este trabajo. Los valores de las constantes utilizadas se muestran también a continuación.



$$\begin{array}{llll}
 k_{\text{on}} = 0.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} & k_{\text{off}} = 0.11 \text{ s}^{-1} & \beta = 1.11 \text{ s}^{-1} & \alpha = 0.31 \text{ s}^{-1} \\
 L_{\text{on}} = 0.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} & L_{\text{off}} = 0.3 \text{ s}^{-1} & D_{\text{on}} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} & D_{\text{off}} = 10^{-2} \text{ s}^{-1}
 \end{array}$$

En forma análoga a lo indicado para (2), la transición entre A<sub>3</sub>R\* y A<sub>3</sub>R\*L depende de la concentración de lantánidos, pero no la inversa.

Las primeras modificaciones en el modelo de Chang & Weiss se incluyeron debido a las diferencias encontradas en las constantes de de-activación ( $\tau_{\text{deact}}$ ) de las respuestas al GABA entre los resultados de estos autores y los nuestros. La  $\tau_{\text{deact}}$  de las respuestas evocadas por 1  $\mu\text{M}$  GABA calculada en este trabajo de tesis fue 16 seg., mientras que según estos autores la constante para la relajación de las respuestas de 3  $\mu\text{M}$  GABA sería 24 seg. Es importante destacar que la constante de tiempo de este proceso no dependería de la concentración de agonista, según predice el modelo (y también se verifica experimentalmente, como se muestra en el Capítulo IV). Sin embargo, las diferencias que subsisten entre los resultados de Chang & Weiss y los nuestros no parecen ser despreciables e incluso, en nuestras manos, las respuestas evocadas con una y otra concentración de agonista no presentaron consistentemente la misma  $\tau_{\text{deact}}$ . Si bien no fue posible encontrar una explicación concreta a estas diferencias, la principal causa propuesta sería la pobre resolución temporal de los registros de fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos de *Xenopus*. Debido al gran tamaño de estas células, es muy difícil realizar cambios rápidos en las concentraciones extracelulares de agonistas o moduladores (<2 seg.) y por lo tanto las respuestas pueden sufrir distorsiones o cambios en su cinética de activación o de-activación.

Otra de las modificaciones introducidas está relacionada con el valor de  $P_{\text{o,max}}$ , y por lo tanto de las constantes de transición  $\alpha$  y  $\beta$ . Como se mencionó anteriormente, el valor reportado por Chang & Weiss para la  $P_{\text{o,max}}$  de los GABA<sub>C</sub>R se estimó indirectamente a partir de las constantes de transición  $\beta$  y  $\alpha$  [168]. En aquel trabajo, se atribuyó a  $\beta$  un valor mucho más grande que  $\alpha$ . En el equilibrio, para concentraciones altas de agonista, la probabilidad de encontrar un canal en el estado A<sub>3</sub>R\* ( $P_{\text{o,max}}$ ), sería aproximadamente  $\beta / (\alpha + \beta)$ , es decir, 0.92. Este valor es incompatible con un aumento de un 20% en la respuesta máxima producido por Lu<sup>3+</sup> con concentraciones saturantes de GABA. Es posible atribuir esta inconsistencia en los valores de  $P_{\text{o,max}}$ , a que el  $\alpha$  reportado fue medido a partir de registros de canal único en los que, debido a la pequeña conductancia de los canales asociados a los GABA<sub>C</sub>R, resulta muy difícil resolver eventos de apertura y cierre. A su vez,  $\beta$  fue calculado indirectamente a partir de otros parámetros [168].

Para que nuestro modelo no adoleciera del mismo problema, corregimos el valor de  $\beta$  ya que consideramos más apropiado corregir aquella constante cuyo valor reportado no había sido medido directamente. No obstante, no encontramos diferencias importantes en las simulaciones realizadas de las respuestas a GABA con  $\text{Lu}^{3+}$ , cuando se conservó el valor de  $\beta$ , y se modificó el de  $\alpha$ . El valor elegido de esta constante fue de  $1.11 \text{ s}^{-1}$ , lo que determinaría una  $P_{o, \max}$  a concentraciones saturantes de agonista (y en ausencia de moduladores), de 0.77. En experimentos preliminares, se observó que el aumento de la respuesta máxima podría ser algo mayor a un 20 % si se utilizan concentraciones mayores a  $300 \mu\text{M Lu}^{3+}$ , por lo que se intentó mantener la  $P_{o, \max}$  en un valor menor a 0.8.

Por otro lado, las constantes  $k_{\text{off}}$  y  $k_{\text{on}}$  fueron elegidas de manera de que coincidieran con las relación  $k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$  calculada mediante el ajuste de la curva D-R para GABA con la ecuación (3) (que se muestra a continuación). Esta ecuación se obtuvo como solución en el equilibrio del sistema de ecuaciones diferenciales planteadas a partir del modelo cinético del canal (2).

$$\frac{10[\text{GABA}]^p}{5[\text{GABA}]^{\alpha/\beta} K_D^2 + 10[\text{GABA}]^{\beta} \alpha/\beta + 10[\text{GABA}]^{\beta} + K_D^3 \alpha/\beta + 10[\text{GABA}]^2 \alpha/\beta K_D} \quad (4)$$

Donde  $[\text{GABA}]$  representa la concentración de GABA utilizada;  $K_D$  sería igual a  $k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ , la afinidad del sitio de unión a GABA (distinto a afinidad aparente,  $\text{EC}_{50}$ ).

En el esquema planteado se introdujo un nuevo estado abierto,  $A_3\text{RL}^*$ , para reproducir los efectos de  $\text{Lu}^{3+}$  observados experimentalmente. Las constantes de transición fueron adjudicadas de manera de reproducir la dependencia en la concentración de dicho efecto. No obstante, fue posible confirmar estos valores (en rigor, la relación  $L_{\text{off}} / L_{\text{on}}$ , denominada  $K_{\text{DL}}$ ) a través del ajuste de la curva D-R de GABA en presencia de dicho ión (Fig. 18A) con la ecuación (5), que se obtuvo a partir de plantear las ecuaciones diferenciales que describen el modelo, en el estacionario (sin considerar, además, el estado desensibilizado que se describirá a continuación). Esto último es válido, bajo el supuesto que a bajas concentraciones de agonista, la desensibilización es despreciable; y por otro lado, que a altas concentraciones de GABA el máximo de la respuesta con  $\text{Lu}^{3+}$  se alcanza lo suficientemente rápido como para considerar que no se desarrolló prácticamente la desensibilización). El valor de  $K_{\text{DL}}$  calculado de este modo es  $33 \mu\text{M}$ , mientras que con los  $L_{\text{on}}$  y  $L_{\text{off}}$  utilizados en el modelo se obtiene una relación de  $15 \mu\text{M}$ .

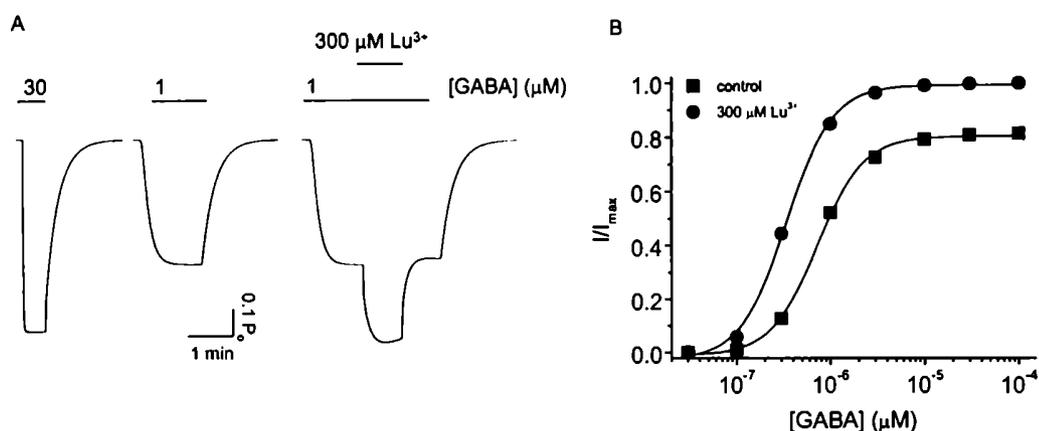
$$\frac{10[GABA]^3 K_{DL} + 10[GABA]^2 \alpha/\beta [L]}{\left( K_{DG}^3 \alpha/\beta K_{DL} + 5[GABA] K_{DG}^2 \alpha/\beta K_{DL} + 10[GABA]^2 \alpha/\beta K_{DL} + 10[GABA]^2 K_{DG} \alpha/\beta K_{DL} + 10[GABA]^3 K_{DL} + 10[GABA]^3 \alpha/\beta [L] \right)} \quad (5)$$

Donde, [GABA] representa la concentración de GABA utilizada;  $K_{DG}$ , la afinidad del sitio de unión a GABA (distinto a afinidad aparente,  $EC_{50}$ );  $K_{DL}$ , la afinidad del sitio de unión a  $Lu^{3+}$ ;  $\alpha$  y  $\beta$ , las constante de transición previamente descriptas; y [L], la concentración de  $Lu^{3+}$  utilizada.

También un estado no conductor denominado D (por desensibilizado) fue incluido con la idea de representar la atenuación del efecto potenciador debido a  $Lu^{3+}$ . En el esquema propuesto, este estado puede ser ocupado exclusivamente desde  $A_3RL^*$ , lo que implica que al igual que este último, sólo puede ser poblado en presencia de  $Lu^{3+}$ . La necesidad de introducir un estado D de estas características provino fundamentalmente de los resultados ilustrados en la Fig. 16B, es decir, de la atenuación seguida a la potenciación de la respuesta obtenida con  $Lu^{3+}$ . Los experimentos realizados en presencia de este ión y TPMPA, que se muestran en la Fig. 21B, donde se puede observar que la desensibilización mediada por  $Lu^{3+}$  sería independiente de un proceso similar que podría ser operado por GABA, confirmaría esta hipótesis. Las constantes de transición correspondientes a este nuevo estado,  $D_{on}$  y  $D_{off}$ , se estimaron a partir de los resultados experimentales, no obstante, su importn.

En la Fig. 23 se muestra el resultado de las simulaciones realizadas con el modelo de *gating* recién descrito de respuestas a GABA, en presencia y ausencia de  $Lu^{3+}$ . En la parte A, se ilustran los trazos correspondientes a la activación de los receptores frente a la estimulación con agonista y con  $Lu^{3+}$ . Tanto la activación como la de-activación de las respuestas evocadas con 1  $\mu M$  GABA presentan valores para las constantes  $\tau_{act} = 9.0$  seg. y  $\tau_{deact} = 16.7$  seg. similares a los obtenidos experimentalmente (no mostrado). En la Fig. 23B se ilustra la curva D-R con las simulaciones realizadas, obteniéndose un  $EC_{50} = 0.7 \mu M$ , con n de Hill = 1.8. El valor de este último es ligeramente diferente al obtenido experimentalmente, aunque se encuentra entre los valores reportados para este receptor [15, 199]. A su vez, la curva D-R en presencia de  $Lu^{3+}$  sufrió un desplazamiento hacia la izquierda y un aumento de la respuesta máxima (~20 %) al igual que lo observado experimentalmente. Los valores calculados de  $EC_{50}$  y n de Hill para esta curva fueron 0.3  $\mu M$  y 1.8.

Es importante aclarar aquí la razón por la que proponemos que la transición al estado  $A_3RL^*$  sería a partir de  $A_3R$  y no otra, como  $A_2R$  por ejemplo. La potenciación a concentraciones altas de agonista, que es una característica distintiva de la modulación por  $Lu^{3+}$  de estos receptores, no es compatible con esta última posibilidad. En el equilibrio a concentraciones de  $30 \mu M$  de GABA, por ejemplo, la probabilidad de encontrar canales en el estado  $A_3R$  es muy alta, y en  $A_2R$  es muy baja; aún para valores de  $L_{on}$  muy altos.

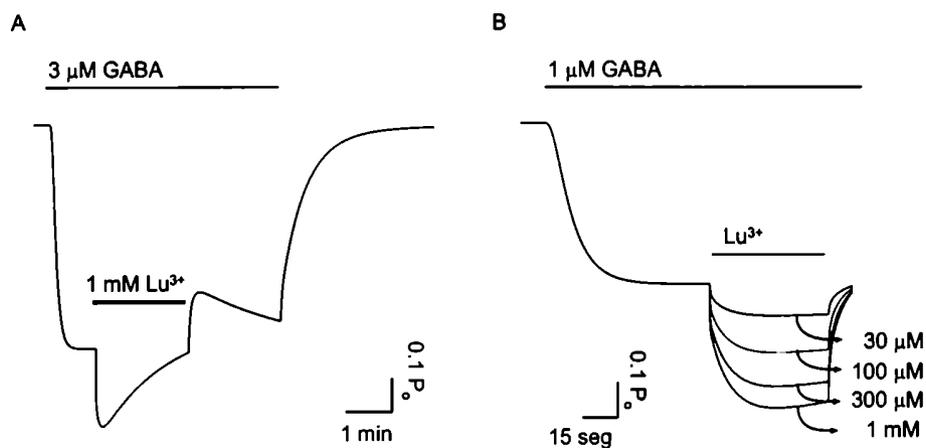


**Fig. 23:** Simulación de respuestas a GABA en presencia o ausencia de  $Lu^{3+}$  con el modelo de *gating* de los  $GABA_C R$ . **A.** Trazos representativos de respuestas a 30 y  $1 \mu M$  GABA y con aplicación de  $Lu^{3+}$  sobre el máximo. **B.** Curva D-R para GABA en presencia o ausencia de  $300 \mu M Lu^{3+}$ .

En la Fig. 24A, se ilustra un trazo representativo de la respuesta a  $3 \mu M$  GABA y la aplicación sobre el máximo de  $1 mM Lu^{3+}$ . Allí puede observarse el curso temporal de la respuesta simulada, que presenta un incremento rápido de la corriente por acción de este ión, seguido de una atenuación más lenta en su amplitud. Luego, un se produjo un fenómeno de “rebote” como en el trazo experimental de la corriente (ver Fig. 16B). En la parte B de la Fig. 24 se muestran trazos representativos de aplicaciones de  $Lu^{3+}$  en concentraciones crecientes sobre la respuesta a  $1 \mu M$  GABA.

En resumen, el modelo de *gating* de los  $GABA_C R$  propuesto reproduce fielmente los resultados obtenidos experimentalmente con respecto a la acción del  $Lu^{3+}$ . No podemos descartar, sin embargo, que otro esquema de *gating* diferente al planteado pueda explicar nuestros resultados en un modo más aproximado. Asimismo, creemos que este puede ser considerado un

mecanismo general para la acción de los lantánidos sobre los GABA<sub>C</sub>R. Como se ha demostrado previamente, La<sup>3+</sup> produce un incremento en la corriente iónica evocada por GABA pero con una potencia menor que Lu<sup>3+</sup> y además con un curso temporal carente de desensibilización. No obstante, el mismo modelo con cambios en las constantes de tiempo L<sub>on</sub> y L<sub>off</sub>, es capaz de reproducir estos resultados.



**Fig. 24:** Simulación de respuestas a GABA en presencia o ausencia de Lu<sup>3+</sup> con el modelo de *gating* de los GABA<sub>C</sub>R. **A.** Trazos representativos de respuestas a GABA en presencia de Lu<sup>3+</sup> donde se observa el característico curso temporal durante el efecto de este ión. **B.** Efecto de Lu<sup>3+</sup> en concentraciones crecientes sobre la respuesta a GABA.

---

## **CAPÍTULO IV**

### **Propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores de GABA<sub>C</sub> en parches de membrana**

---

## IV. 1. Introducción

La transición de un canal iónico entre un estado cerrado estable a uno abierto es extremadamente rara a menos que una fuerza externa lleve al canal a abrirse. En el equilibrio, la proporción de canales cerrados respecto de los abiertos define la diferencia de energías libres de Gibbs entre los dos estados [200]. La fuerza externa cambia esta relación alterando la diferencia de energías libres. En los canales activados por voltaje, la fuerza electrostática asociada con el potencial transmembranal mueve las cargas dentro de la membrana, disparando la apertura del poro [201]. La energía requerida para estos movimientos puede ser calculada a partir de las constantes de transición entre estados midiéndolas con experimentos de saltos de potencial.

La situación es mucho menos clara para los canales activados por ligando. Desde un punto de vista experimental, ha sido mucho más difícil llevar a cabo aplicaciones rápidas de agonista que escalones de voltaje rápidos. Por lo tanto, gran parte de la información sobre los mecanismos de apertura y cierre de estos canales provino de registros de canal único en el estado estable y de curvas dosis-respuesta macroscópicas utilizando aplicaciones de ligandos relativamente lentas.

La técnica de *patch-clamp* es muy utilizada para estudiar mecanismos de *apertura y cierre (gating)* de canales iónicos ya sean activados por voltaje o ligando. Esta metodología permite medir corrientes iónicas de uno o muchos canales mediante distintas configuraciones de registro: “*cell attached*”, “*inside out*” y “*outside out*”. Cada una presenta ventajas de acuerdo al tipo de canal o propiedad que se desee estudiar. En el caso de los canales operados por ligando, la configuración de *outside out* es ideal porque la cara extracelular de los mismos queda hacia fuera de la pipeta de registro. Esto, permite cambiar las concentraciones de ligando, por ejemplo, en unos pocos milisegundos y de esa manera activar los canales sin distorsionar su curso temporal intrínseco. Para producir cambios rápidos se utiliza una segunda pipeta para la perfusión con distintas soluciones cuya punta está dividida al medio, denominada tubos tita (porque se asemeja a la letra griega  $\theta$ ).

Dado que la conductancia de los GABA<sub>C</sub>R es muy pequeña y los registros de canal único no permiten resolver los tiempos de apertura y cierre, aún no se ha podido determinar rigurosamente su mecanismo de *gating*. Los esfuerzos realizados en este sentido involucraron una combinación novedosa de técnicas de electrofisiología y “*binding*” en ovocitos y si bien sus resultados son sólidos, adolecen de la ya mencionada falta de buena resolución temporal [168, 169]. En el

estudio mostrado en el Capítulo III, sugerimos que los GABA<sub>C</sub>R tendrían dos estados abiertos, revelado por la acción de los lantánidos, en contradicción con aquel trabajo.

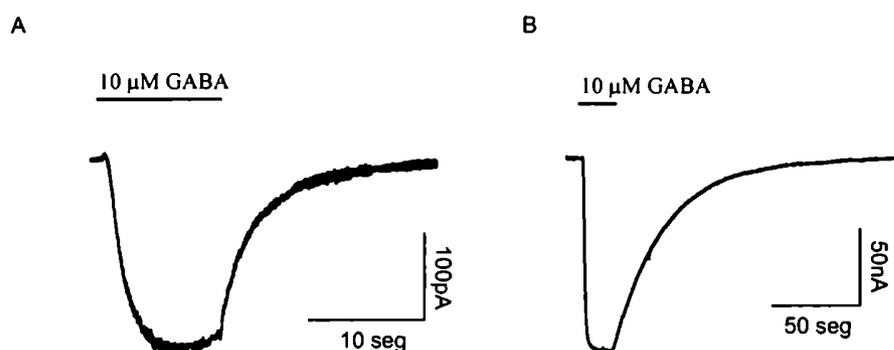
Por esto decidimos utilizar la técnica de *patch-clamp* en su configuración de *outside out* en ovocitos de *Xenopus* inyectados con la subunidad  $\rho_1$  de los receptores GABA<sub>C</sub>. Estos receptores tienen, a su vez, la ventaja de que presentan constantes de tiempo de activación y de-activación relativamente lentas. Por lo cual, este tipo de técnicas representa un medio óptimo con una alta resolución temporal para poder estudiar sus propiedades y características cinéticas.

En toda la primera parte de este trabajo, realizamos una caracterización farmacológica y biofísica de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R evocadas en parches de membrana de ovocitos, para verificar que todas sus propiedades conocidas estuvieran conservadas.

## IV. 2. Resultados

### *Activación de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana de ovocitos*

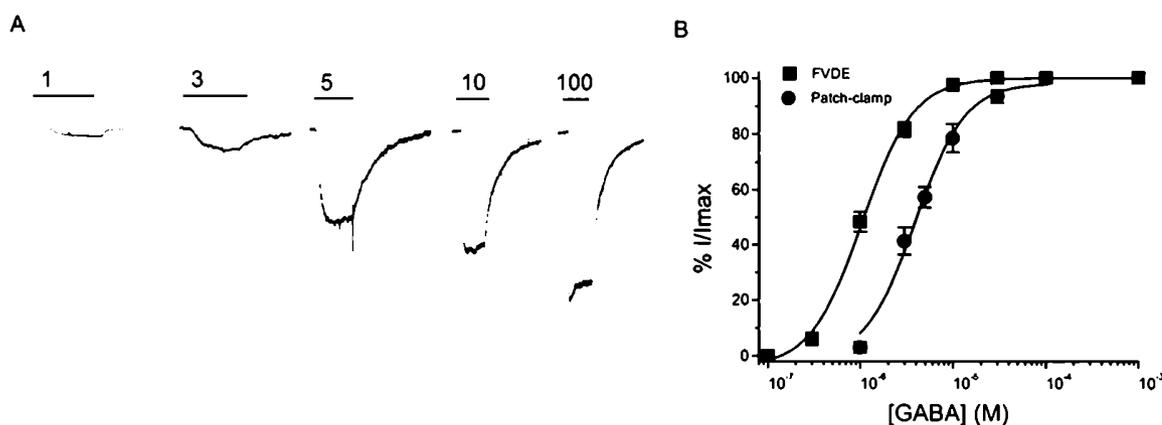
En la Fig. 25A, se ilustra un registro de la corriente iónica mediada por los GABA<sub>C</sub>R utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración *outside out*. La deflexión en el trazo indica la activación de los receptores en la medida en la que el GABA se une a su sitio de acción.



**Fig. 25:** Corrientes iónicas evocadas con GABA en GABA<sub>C</sub>R expresados en ovocitos de *Xenopus*. **A.** Registro con la técnica de *patch-clamp* en configuración *outside out* de respuestas a 10 μM GABA. **B.** Registro la técnica de FVDE en ovocitos enteros de respuestas a 10 μM GABA. Obsérvese la diferencia en las escalas temporales y de amplitud de la corriente iónica.

Se puede observar como las respuestas evocadas con  $10 \mu\text{M}$  GABA se activan rápidamente y se relajan en unos pocos segundos una vez que la pipeta se mueve hacia el lado del tubo tita por el que se hace pasar solución de Ringer. Con fines comparativos, se muestra a su lado la respuesta a GABA registrada en un ovocito entero por la técnica de FVDE. Si bien los tiempos de relajación son bastante diferentes, en ambos tipos de registros este proceso insume mucho más tiempo que el de la activación. Además, el grado de desensibilización es muy bajo con las dos técnicas de registro.

Como se mencionó previamente, en primera instancia decidimos evaluar si las propiedades farmacológicas y fisiológicas extensamente conocidas de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  podían ser repetidas en las respuestas evocadas en parches de membrana. Entre las más importantes se encuentra la relación D-R. En la Fig. 26A se ilustran las respuestas obtenidas con concentraciones crecientes de este agonista. En la parte B de esa figura, se puede observar la curva trazada a partir de los registros obtenidos, calculándose un  $\text{EC}_{50} = 4.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$  y un  $n$  de Hill =  $1.7 \pm 0.5$  ( $n = 5-23$ ). Vale recordar que la afinidad aparente obtenida con en el ovocito entero por la técnica de FVDE fue ligeramente menor a ésta, mientras que el coeficiente de Hill tuvo un valor algo mayor.

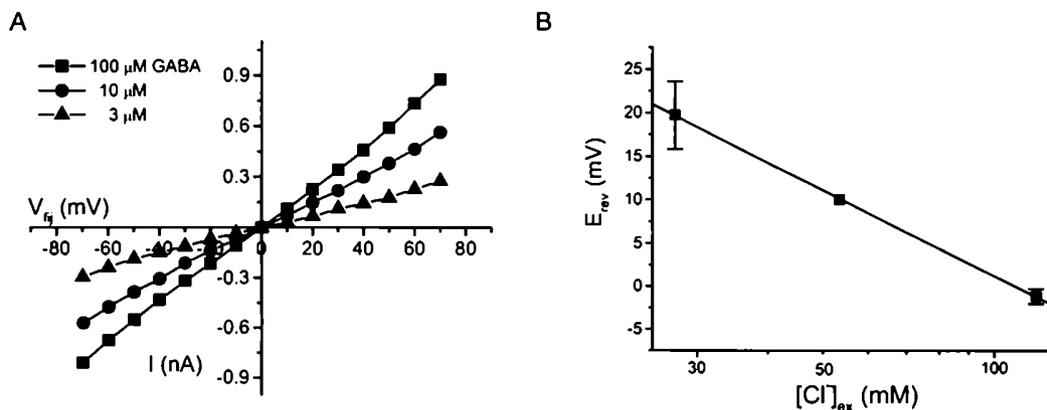


**Fig. 26:** Curva dosis-respuesta para GABA de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  en parches de membrana. **A.** Respuestas representativas a concentraciones crecientes de GABA. **B.** Curva de saturación para este agonista. La amplitud de las corrientes iónicas se representan como fracción de la máxima ( $100 \mu\text{M}$ ). Cada punto refiere a la media y ES. Se incluye con fines comparativos la curva D-R obtenida por FVDE.

### Relación corriente-voltaje y permeabilidad a $\text{Cl}^-$ de las respuestas de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ en parches de membrana

En diversos estudios se han caracterizado las respuestas mediadas por los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  como independientes de voltaje. Decidimos evaluar esta característica en las corrientes iónicas activadas en parches de membrana de ovocitos. Como se ilustra en la Fig. 27A la relación I-V fue completamente lineal y sólo se advierten cambios en la pendiente de la recta en respuesta a la utilización de distintas concentraciones de agonista (3, 10 y 100  $\mu\text{M}$  GABA).

En la Fig. 27B se muestra la dependencia del potencial de reversión ( $E_{\text{rev}}$ ) de la corriente evocada por 1  $\mu\text{M}$  GABA a los cambios en la concentración externa de  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$ ). Como se esperaría para un canal selectivo para  $\text{Cl}^-$ , cuando no existe otra especie permeante, el  $E_{\text{rev}}$  responde a las modificaciones en la  $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$  como lo determina la ecuación de Nernst (o de Goldman-Hogkin-Katz) [201]. Las  $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$  evaluadas fueron 27.4, 53.4 y 118.4 mM, obteniéndose los siguientes valores de  $E_{\text{rev}} = -1.2 \pm 0.9$  mV ( $n = 4$ ), 10 mV ( $n = 1$ ) y  $19.7 \pm 3.9$  mV ( $n = 5$ ), respectivamente.

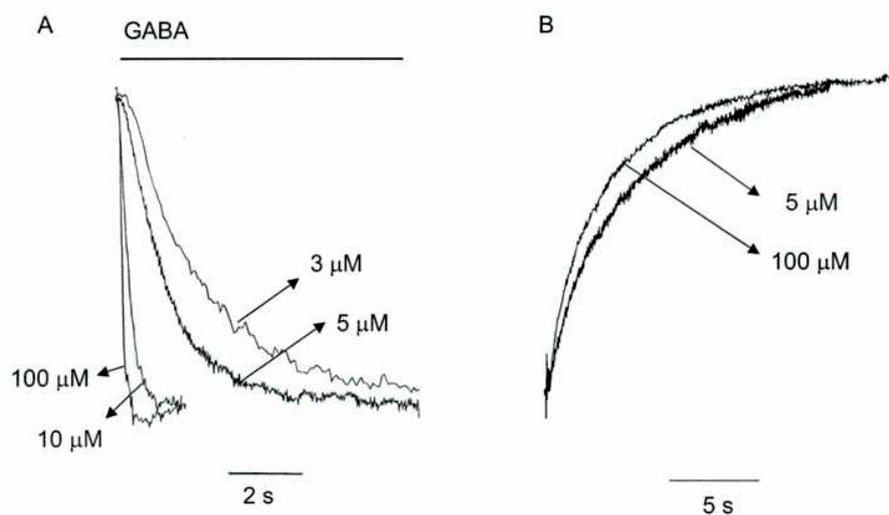


**Fig. 27:** Dependencia del potencial de membrana y permeabilidad a  $\text{Cl}^-$  de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  en parches de membrana. **A.** Relación I-V de respuestas a distintas concentraciones de GABA. Sólo se observaron cambios en la pendiente de la relación lineal para las distintas concentraciones. **B.** Cambios en el potencial de reversión de la corriente ( $E_{\text{rev}}$ ) por modificación de la concentración externa de  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$ ).

*Cinética de activación y de-activación de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R*

Como se mencionó previamente, la gran ventaja que representa esta técnica de registro es la posibilidad de realizar cambios en la concentración de agonistas o moduladores de manera rápida sin alterar el curso temporal intrínseco de las respuestas. Por lo tanto, contamos con un método preciso de estudiar los cursos temporales de los procesos de activación y de-activación de las respuestas evocadas con GABA u otros agonistas.

En la Fig. 28 se ilustran los trazos de corriente correspondientes a la activación (A) con distintas concentraciones de GABA (3, 5, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y a la de-activación (B) de respuestas a 5 y 100  $\mu\text{M}$ . Todas las respuestas han sido normalizadas a su valor máximo para facilitar la comparación de sus cursos temporales.



**Fig. 28:** Dependencia en los cursos temporales de activación y de-activación de la concentración de GABA. **A.** Trazos representativos de la activación de respuestas a distintas concentraciones de GABA. **B.** Trazos representativos de la de-activación de las corrientes iónicas evocadas con 5 y 100  $\mu\text{M}$  GABA.

Los trazos de las respuestas correspondientes a las fases de activación y de-activación fueron individualmente ajustados a una función de decaimiento exponencial de primer o segundo orden y se calculó la constante típica  $\tau$  para la activación ( $\tau_{\text{act}}$ ) y para la de-activación ( $\tau_{\text{deact}}$ ).

Como era esperable, la activación de las respuestas fue haciéndose más rápida con

concentraciones crecientes de agonista. Para 5  $\mu\text{M}$  GABA, que representaba una concentración de alrededor del  $\text{EC}_{50}$ , la constante  $\tau_{\text{act}}$  fue de  $1419 \pm 111$  mseg ( $n = 16$ ), mientras que con 100  $\mu\text{M}$  que evocó la respuesta máxima,  $\tau_{\text{act}} = 76 \pm 13$  mseg ( $n = 16$ ). Los valores de  $\tau_{\text{act}}$  para las distintas concentraciones de GABA evaluadas se muestran en la Tabla II.

Más adelante, en la Discusión del presente Capítulo, se mostrará el modelo de *gating* propuesto para el canal asociado a los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  junto a las constantes de tiempo que determinamos. Si bien en esa sección se tratará con profundidad este tema, es importante destacar que los valores calculados con el método recién analizado han servido de guía para obtener los números definitivos para las constantes  $\beta$  y  $\alpha$  que fueron modificados para que las simulaciones reproduzcan más fielmente los resultados experimentales.

También se ilustran los cursos temporales de la de-activación de las respuestas al GABA en la Fig. 28B. Por simplicidad sólo se muestran los trazos (normalizados) correspondientes a la relajación de las respuestas evocadas con 100 y 5  $\mu\text{M}$  de este agonista. Para nuestra sorpresa, el curso temporal de las corrientes iónicas evocadas con 100  $\mu\text{M}$  GABA fue más rápido que el obtenido para 5  $\mu\text{M}$ . Para esta última concentración, la de-activación de las respuestas fue ajustada a una ecuación exponencial de primer orden con una constante de tiempo de  $4541 \pm 449$  mseg. ( $n = 14$ ). Por el contrario, la relajación de las respuestas evocadas con 100  $\mu\text{M}$  GABA fue mucho mejor ajustada con una ecuación exponencial de segundo orden (ver Materiales y métodos), con constantes de tiempo  $\tau_{\text{deact}1} = 4663 \pm 473$  mseg. y  $\tau_{\text{deact}2} = 806 \pm 94$  mseg., con una amplitud relativa de la segunda constante,  $a_2 = 0.43 \pm 0.04$  ( $n = 19$ ). Las constantes de tiempo de de-activación para 3  $\mu\text{M}$  GABA, que fue ajustada a una exponencial de primer orden, y de 10  $\mu\text{M}$ , para la que una ecuación de segundo orden fue requerida, son mostradas en la Tabla II.

Los  $\tau_{\text{deact}}$  de las respuestas evocadas con 3 y 5  $\mu\text{M}$  no fueron estadísticamente diferentes entre sí y tampoco mostraron diferencias con las constantes más lentas de las dos requeridas para ajustar los trazos de 10 y 100  $\mu\text{M}$  (denominadas  $\tau_{\text{deact}1}$  en ambos casos) (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Esto indicaría un mecanismo de de-activación común para todas las concentraciones de agonista utilizadas y para los niveles de activación alcanzados.

A su vez, las constantes de tiempo más rápidas utilizadas con 10 y 100  $\mu\text{M}$  (denominadas  $\tau_{\text{deact}2}$  en ambos casos) tampoco fueron estadísticamente diferentes (test de  $t$ ,  $p > 0.05$ ). Sin embargo, la amplitud relativa para la constante rápida fue mayor en la relajación de las respuestas evocadas con 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ).

[GABA] ( $\mu\text{M}$ )	Activación	De-activación		
	$\tau_{\text{act}}$ (mseg) (media $\pm$ ES) (n)	$\tau_{\text{deact1}}$ (mseg) (media $\pm$ ES) (n)	$\tau_{\text{deact2}}$ (mseg) (media $\pm$ ES)	$a_2$ (media $\pm$ ES)
3	2181 $\pm$ 411 (8)	4528 $\pm$ 985 (6)		
5	1419 $\pm$ 111 (16)	4541 $\pm$ 449 (14)		
10	471 $\pm$ 79 (9)	5257 $\pm$ 385 (6)	767 $\pm$ 185	0.32 $\pm$ 0.08
30	263 $\pm$ 124 (6)	4665 $\pm$ 494 (3)	894 $\pm$ 122	0.38 $\pm$ 0.18
100	76 $\pm$ 13 (16)	4663 $\pm$ 473 (19)	806 $\pm$ 94	0.43 $\pm$ 0.04

**Tabla II:** Constantes de activación y de-activación de las respuestas evocadas por distintas concentraciones de GABA. Se muestra media y ES para la/s constante/s de tiempo calculadas a través del ajuste con una función exponencial de primer o segundo orden de las fases de activación y de-activación de las corrientes iónicas evocadas. Para la de-activación de 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$  GABA, se indica además la amplitud relativa,  $a_2$ , de la constante  $\tau_{\text{deact2}}$ .

Este curso temporal de de-activación, monoexponencial para dosis bajas de agonista, pero biexponencial para concentraciones más altas, sería compatible con un esquema de *gating* con dos estados abiertos y dependientes de la concentración de GABA. Más adelante, se discutirá esta hipótesis sobre la base de los resultados obtenidos y el modelo de *gating* planteado.

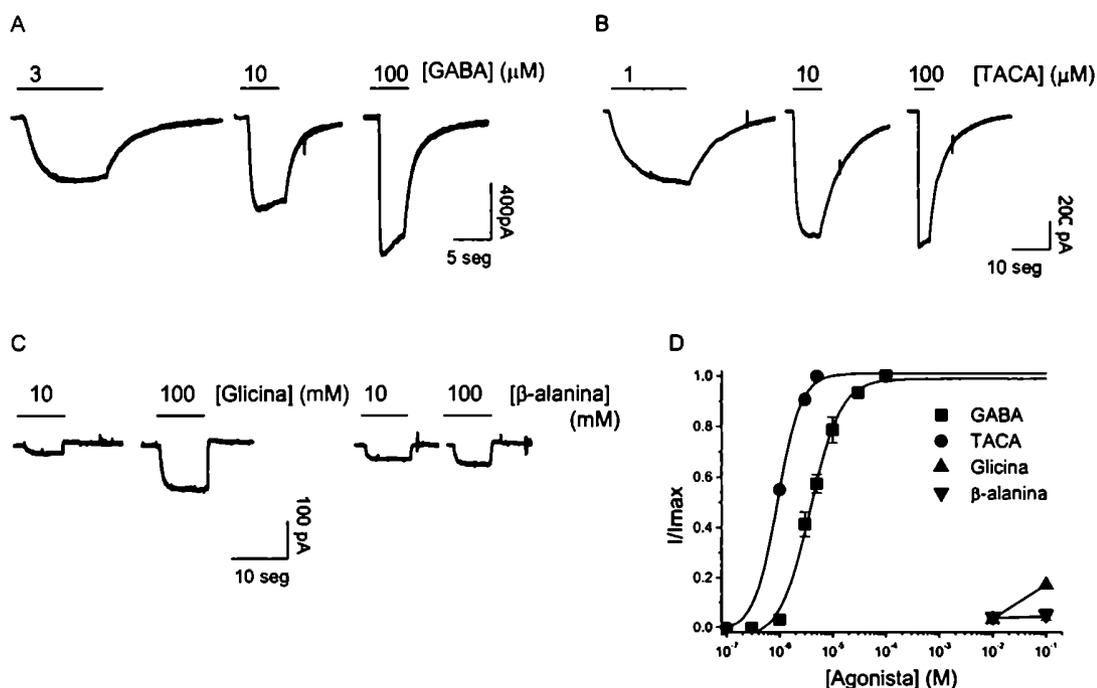
### *Efecto de agonistas y antagonistas sobre los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana de ovocitos*

Otros agonistas de los GABA<sub>C</sub>R, como TACA, muscimol,  $\beta$ -alanina y glicina, se evaluaron en este sistema. De entre todos estos agonistas, el único que presenta mayor afinidad aparente que el GABA es TACA, que se comporta además, como un agonista total. Muscimol,  $\beta$ -alanina, y glicina presentan menor afinidad y son además agonistas parciales [66, 67, 71].

En experimentos preliminares que se muestran en la Fig. 29B y D, TACA fue más potente que GABA, con un  $\text{EC}_{50}$  de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , y con una eficacia máxima equivalente a la de GABA. Las corrientes iónicas evocadas por TACA tuvieron un curso temporal de de-

activación similar a las de GABA; es decir, monoexponencial a concentraciones bajas ( $1 \mu\text{M}$ ), y biexponencial a altas ( $100 \mu\text{M}$ ). Ambas constantes serían más lentas que las observadas para las respuestas evocadas con GABA.

A su vez, los agonistas parciales glicina y  $\beta$ -alanina también evocaron respuestas, con una afinidad aparente y eficacia mucho menor que GABA. Además, los cursos temporales de activación, y fundamentalmente de de-activación de estas corrientes iónicas fueron muy rápidos (Fig. 29C).



**Fig. 29:** Activación de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana por diversos agonistas. **A.** Respuestas representativas evocadas con 3, 10 y 100  $\mu\text{M}$  GABA. **B.** Idem A., con 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  TACA. **C.** Idem A., con 10 y 100 mM glicina y 10 y 100 mM  $\beta$ -alanina. **D.** Curvas D-R para los distintos agonistas. Se ilustra también la curva de GABA para comparar.

También evaluamos la sensibilidad de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membranas a antagonistas de distinta naturaleza. Los antagonistas utilizados fueron: el alcaloide picrotoxina y el flavonoide quercetina que poseen un mecanismo de acción de tipo no-competitivo, el antagonista competitivo específico TPMPA y el  $\text{Zn}^{2+}$ , para el que fue propuesto un mecanismo de tipo mixto [73, 155].

Las respuestas al GABA fueron inhibidas por TPMPA como se muestra en la Fig. 30B. Se

observó una disminución de un  $82.7 \pm 7.7 \%$  ( $n = 2$ ) en la corriente evocada con  $5 \mu\text{M}$  GABA y  $10 \mu\text{M}$  de este antagonista.

El efecto de picrotoxina fue sólo ligeramente menos potente que el observado en las respuestas de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  evocadas en FVDE. La inhibición producida por  $3$  y  $10 \mu\text{M}$  picrotoxina fue de  $57.5 \pm 7.9 \%$  ( $n = 4$ ) y  $76.8 \pm 2.7 \%$  ( $n = 2$ ) respectivamente (Fig. 30B). Vale recordar que los valores correspondientes a estas mismas dos concentraciones de antagonista en FVDE fueron  $71.3 \pm 6.1 \%$  y  $91.1 \pm 1.5 \%$ .

Además, las respuestas en presencia de este antagonista mostraron un curso temporal similar al observado en los registros obtenidos mediante la técnica de FVDE. En el segundo trazo de la Fig. 30B, se muestra una aplicación de picrotoxina sobre el máximo de la respuesta a GABA, donde el equilibrio en la inhibición se alcanzó rápidamente; mientras que el lavado fue muy lento, tomando varios segundos para recuperar el nivel del control. Las respuestas a la aplicación conjunta de picrotoxina y GABA tuvieron un curso temporal que se relacionó con un efecto dependiente del uso: la corriente iónica alcanzó un pico transitoriamente y luego disminuyó lentamente debido a un aumento continuo en el efecto del antagonista.

Quercetina también inhibió las respuestas al GABA en parches de membrana. Como se ilustra en la Fig. 30B,  $10 \mu\text{M}$  de este flavonoide produjo una disminución en la amplitud de las corrientes iónicas de un  $36.5 \pm 14.8 \%$  ( $n = 2$ ).

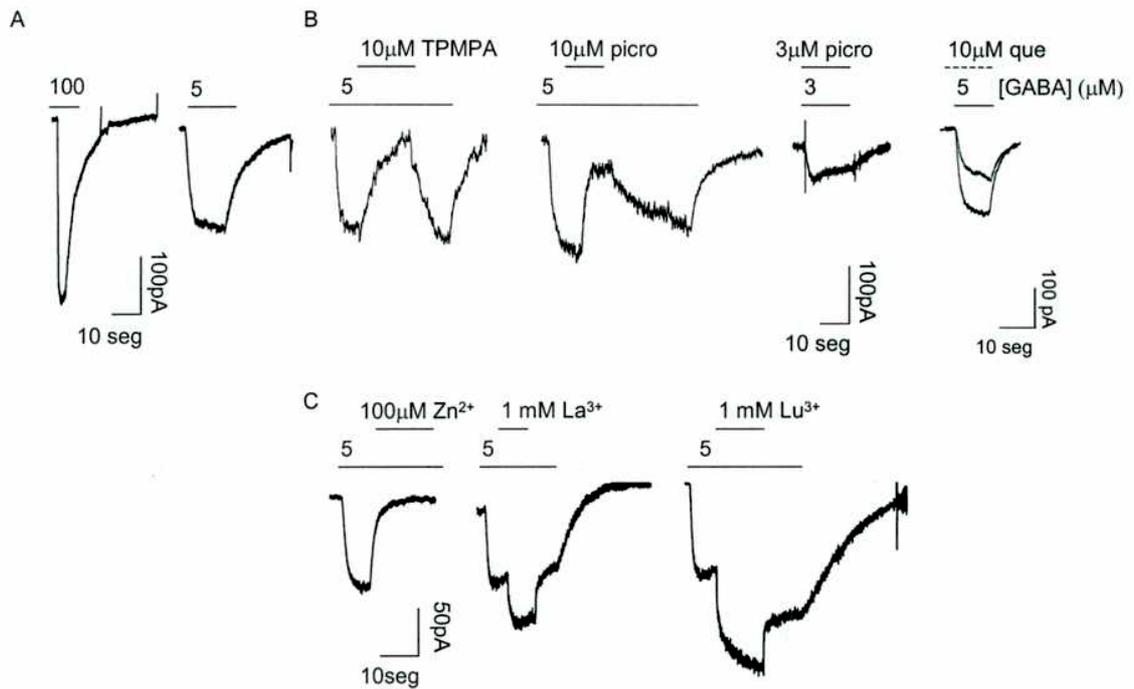
A su vez, el antagonista de tipo mixto,  $\text{Zn}^{2+}$ , provocó una inhibición casi total de las respuestas a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  (Fig. 30C).

También decidimos evaluar la sensibilidad de las respuestas de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$  en parches de membrana a moduladores clásicos de los  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ , como el antagonista ( $10 \mu\text{M}$ ) bicuculina y otros con efectos potenciadores como ( $100 \text{ nM}$ ) diazepam. Ninguno de estos compuestos tuvo efecto en las corrientes iónicas mediadas por los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ , como era esperable de acuerdo a lo reportado extensamente (no mostrado).

### *Modulación por lantánidos de los $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$*

En la Fig. 30C se ilustra el efecto de  $\text{Lu}^{3+}$  y  $\text{La}^{3+}$  sobre los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ . La aplicación de los lantánidos sobre el máximo de las respuestas a  $5 \mu\text{M}$  GABA produjo un aumento muy rápido en la corriente iónica. El grado de potenciación obtenido para  $1 \text{ mM}$  de  $\text{Lu}^{3+}$  fue de  $171 \pm 39 \%$  ( $n =$

6), mientras que para la misma concentración de  $\text{La}^{3+}$  fue de  $106 \pm 27 \%$  ( $n = 6$ ). Además, el curso temporal de la potenciación fue biexponencial, como se puede advertir claramente para la acción de  $\text{Lu}^{3+}$ . Las constantes de tiempo calculadas para este ión fueron  $\tau_{\text{deact1}} = 558 \pm 87$  mseg., y  $\tau_{\text{deact2}} = 71 \pm 13$  mseg ( $n = 5$ ).



**Fig. 30:** Modulación de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana por antagonistas de distinta naturaleza e iones. **A.** Respuestas representativas a 100 y 5 μM GABA. **B.** Inhibición por TPMPA, picrotoxina (picro) y quercetina (que) de las respuestas a GABA. Picrotoxina inhibió las corrientes iónicas ya sea, aplicada sobre el máximo (trazo de la izquierda) o co-incubada con GABA (trazo de la derecha). **C.** Efecto de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Lu}^{3+}$  sobre los GABA<sub>C</sub>R. Las aplicaciones de todos los iones fueron realizadas sobre el máximo de la respuesta a GABA.

### IV. 3. Discusión

#### *Aspectos básicos de la biofísica de los GABA<sub>C</sub>R*

Las respuestas mediadas por los GABA<sub>C</sub>R exhiben un curso temporal muy singular ya que además de presentar un grado de desensibilización muy bajo, aún a concentraciones altas de

agonista, los procesos de activación y de-activación son muy lentos con relación a otros receptores de neurotransmisores. Sin embargo, como además presentan una conductancia unitaria muy pequeña ( $\sim 1$  pS), no existen estudios sobre la base de registros de canal único que revelen en forma precisa parámetros cinéticos de estos receptores.

Los esfuerzos realizados en este sentido involucraron la expresión de GABA<sub>C</sub>R “heteroméricos”, ensamblados con la subunidad  $\rho_1$  salvaje o con una mutación que disminuía la afinidad aparente por GABA. Al inyectar en ovocitos los ARNc de estas dos subunidades en distintas proporciones fue posible determinar que la cantidad de moléculas de agonista necesarias para activar los receptores sería de entre tres y cuatro [169]. Los únicos valores reportados para las constantes de transición entre estos estados fueron obtenidos con una combinación novedosa de técnicas de electrofisiología y “binding” en ovocitos [168]. En ese mismo estudio se planteó la existencia de un solo estado abierto conductor. Si bien sus resultados son sólidos, adolecen de la falta de resolución temporal y la dificultad de obtener registros de canal único confiables.

Afortunadamente, también es posible determinar algunas propiedades cinéticas de canales iónicos activados por ligando a través del análisis de las corrientes iónicas macroscópicas evocadas, como por ejemplo: número de moléculas de agonista requeridas para la activación, cantidad de estados abiertos y cerrados y su conectividad, e incluso, constantes de transición entre estados [202-205]. Así también, la acción de moduladores sobre la función de los receptores brinda una herramienta para este tipo de estudios. Como se expuso en el Capítulo III, la potenciación por lantánidos sugiere la existencia de un segundo estado abierto.

### *GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana*

Decidimos realizar esta serie de experimentos en parches de membrana de ovocitos para indagar en las propiedades cinéticas de los GABA<sub>C</sub>R aprovechando los recursos que brinda esta técnica con relación a su mejor resolución temporal. Sobre la base de los resultados experimentales y los criterios utilizados en la bibliografía, se planteó un esquema de *gating* del canal que será discutido más adelante. Previamente, fue necesario verificar que las características farmacológicas y fisiológicas básicas de estos receptores, que ya han sido extensamente descriptas, estaban conservadas en las respuestas evocadas en parches de membrana.

Las respuestas al GABA registradas mediante esta técnica tuvieron un curso temporal similar al descrito para los GABA<sub>C</sub>R en distintas preparaciones [15, 50, 56, 57]. Sin embargo,

observamos una diferencia importante en los tiempos de activación y de-activación entre los registros obtenidos en parches de membrana y en el ovocito entero. Mientras que en el primero, la relajación no llevó más de 20 seg., en los experimentos de FVDE la de-activación completa demandó aproximadamente 1.5 min. de lavado. Si bien, como se mencionó, los tiempos calculados con esta última técnica podrían estar seriamente comprometidos por la escasa resolución temporal, distintas evidencias (como las que se discuten en el Capítulo II) indicarían que los datos obtenidos, fundamentalmente en lo relacionado con la de-activación, fueron relativamente confiables. Por esto, creemos que las diferencias halladas en los tiempos de activación y de-activación entre las respuestas obtenidas en el ovocito entero y en parches de membrana no podrían adjudicarse completamente a distorsiones en los cursos temporales intrínsecos por déficits en el sistema de perfusión.

En su lugar, proponemos que diferencias en los entornos en los que estarían situados los receptores, que en un caso sería el medio intracelular del ovocito y en otro la solución interior de la pipeta de registro, podrían dar cuenta de los cambios en la cinética de las respuestas. De hecho, se ha demostrado que ciertas proteínas de anclaje de receptores sinápticos al citoesqueleto tienen capacidad de modular las respuestas mediadas por estos receptores [27]. También se ha observado que la cinética de receptores de ACh nicotínicos y de NMDA puede verse afectada por la escisión del parche de membrana [206-208].

Más allá de los artificios que introduciría la técnica, vale aclarar que las cinéticas observadas aquí son muy parecidas a las reportadas para las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R ya sean nativos, en células bipolares de la retina de rata o de peces [50, 56, 57]; e incluso recombinantes, expresados en líneas celulares humanas (HEK) [209]. La afinidad aparente para GABA, obtenida aquí a partir de la curva D-R, está en el rango de los valores reportados para los GABA<sub>C</sub>R en estas preparaciones [15, 50, 56, 57]. El n de Hill calculado, 1.5, es algo menor que el encontrado en las curvas D-R en el ovocito entero. Este valor sugiere que al menos dos moléculas de GABA serían necesarias para producir la activación del receptor. Como se verá más adelante, en el modelo de *gating* propuesto fueron necesarias al menos tres moléculas de agonista, pero la curva D-R simulada tiene un valor muy parecido.

Otros agonistas de los GABA<sub>C</sub>R como TACA, β-alanina y glicina fueron efectivos en esta serie de experimentos, y si bien no se realizó un estudio extenso, el orden de potencia sería el mismo que el ya descrito [64, 71].

Es sabido que los GABA<sub>C</sub>R no presentan dependencia de voltaje y que las relaciones I-V

calculadas son lineales en un rango de  $V_m$  entre  $-120$  y  $+40$  mV. Las respuestas observadas en este trabajo presentan esta misma característica, y además, como era esperable para un canal de  $Cl^-$ , el  $E_{rev}$  de las corrientes evocadas varía en respuesta a un cambio en la  $[Cl^-]_{ex}$  en la manera predicha por la ecuación de Nernst [201].

Con el objeto de evaluar las propiedades farmacológicas de los  $GABA_C$ R estudiados mediante esta técnica, se utilizaron una serie de moduladores con efectos conocidos. Los antagonistas empleados fueron TPMPA, picrotoxina, quercetina y  $Zn^{2+}$ . También se probaron algunos lantánidos como  $La^{3+}$  y  $Lu^{3+}$ , como moduladores positivos de los  $GABA_C$ R. Todos estos presentaron efectos idénticos a los ya extensamente caracterizados para estos receptores [72, 73, 113, 154, 210].

En particular, la inhibición producida por picrotoxina, que ha sido estudiada en el Capítulo II en experimentos realizados en ovocitos enteros, presentó características muy parecidas en las respuestas evocadas en parches de membrana. Principalmente, las respuestas al GABA en presencia de picrotoxina tuvieron un curso temporal con un pico transitorio que fue asociado con el efecto dependiente del uso de este antagonista. Además, la inhibición ejercida sería de una potencia equivalente a la descrita anteriormente, aunque no hemos realizado una curva de inhibición completa para este antagonista.

Respecto de los lantánidos, nuestra intención era realizar un estudio exhaustivo de su mecanismo de acción en los  $GABA_C$ R en parches de membrana aprovechando las ventajas de esta técnica en cuanto a su resolución temporal. Sin embargo, nos enfrentamos con la dificultad de que tanto  $La^{3+}$  como  $Lu^{3+}$  tenían un efecto *per se* sobre la corriente de fuga del parche, provocando una disminución en su amplitud, que distorsionaba el curso temporal de la potenciación de las respuestas de los  $GABA_C$ R. Este efecto indeseado fue relacionado con el bloqueo de canales mecanosensoriales, que según reportes anteriores, son sensibles a los iones lantánidos [211]. Estos canales se activan en respuesta a la presión, pero la misma configuración *outside out* provocaría una tensión sobre el parche de membrana que llevaría a la activación permanente de los mismos durante el tiempo de registro [212]. Distintos esfuerzos concernientes a la eliminación o minimización de este efecto espurio de  $Lu^{3+}$  y  $La^{3+}$  tuvieron relativo éxito.

No obstante, podríamos destacar el curso temporal de la acción de estos iones sobre las respuestas evocadas por GABA. Como se muestra en la Fig. 30C, el incremento en la corriente producto de la aplicación de  $Lu^{3+}$  fue un proceso exponencial de segundo orden con una constante muy rápida, en el rango de las decenas de milisegundos, y otra más lenta. Si bien este

mismo curso temporal nunca fue resuelto en las respuestas obtenidas con lantánidos en el ovocitos entero, las simulaciones realizadas en el Capítulo III, muestran características muy parecidas, con procesos biexponenciales (ver Discusión de ese capítulo).

### *Cinética de los GABA<sub>C</sub>R*

Si bien no es posible establecer unívocamente una relación entre la cinética de las corrientes iónicas macroscópicas de un canal con el esquema de transiciones entre estados del mismo, existen ciertos criterios que permiten determinar algunas características de su modo de *gating* [213]. Por ejemplo, la relajación de la corriente iónica en respuesta a una disminución rápida en la concentración de agonista, puede brindar información acerca de la cantidad de estados abiertos posibles, considerando el curso temporal de la de-activación.

Las cinéticas de activación y de-activación de las respuestas al GABA fueron analizadas con el objeto de determinar algunas propiedades de *gating* de estos receptores. Los cursos temporales de activación de las respuestas a distintas concentraciones de agonista fueron ajustados, en todos los casos, a una ecuación de decaimiento exponencial de primer orden ya que la utilización de una ecuación de segundo orden no brindaba mejores resultados. El aumento en la velocidad de activación, revelado como una disminución en la constante  $\tau_{act}$  conforme aumentaba la dosis de GABA hasta valores saturantes, indicaría que el paso limitante en la activación de las respuestas fue la unión del agonista a su sitio. Por el contrario, a concentraciones mayores, las constantes de apertura y cierre del canal determinarían la cinética de activación y no la de unión del ligando.

La relajación de las respuestas de los GABA<sub>C</sub>R es muy particular ya que toma varios segundos para llegar hasta el nivel basal. Esta propiedad fue asociada a un proceso de captura de la molécula de GABA durante la apertura del canal asociado a los GABA<sub>C</sub>R [168]. Sin embargo, hasta al momento este proceso no había sido estudiado con un sistema de perfusión rápido.

Para nuestra sorpresa, la relajación de las respuestas evocadas con concentraciones altas de agonista fue más rápida que con dosis más bajas. Más aún, el curso temporal de la de-activación de las respuestas a 10 ó 100  $\mu$ M GABA, eran mejor ajustadas por una ecuación de segundo orden con constantes de tiempo que diferían en un orden de magnitud. Este escenario era solamente compatible con un canal con dos estados abiertos diferentes cuyas transiciones a sendos estados cerrados estuvieran determinadas por constantes de tiempo distintas. Como la de-activación a dosis más bajas no mostraban este curso temporal, fue necesario plantear una dependencia en la

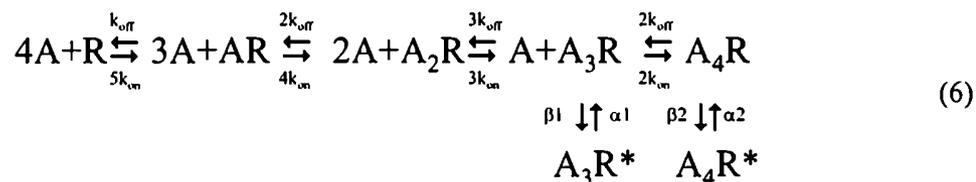
cantidad de moléculas de agonista para cada estado abierto. Es decir, los estados abiertos estarían ligados a estados cerrados donde la transición entre uno y otro sería dependiente de agonista.

### Modelo de gating

El modelo de *gating* que planteamos fue elaborado sobre la base de lo que otros autores han propuesto previamente [168, 169], pero introduciendo los cambios necesarios para poder reproducir en las simulaciones los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. Entre las novedades halladas se tuvo en cuenta las diferencias en la afinidad aparente por GABA, y en los cursos temporales de las respuestas. Especialmente esto último requirió de un detallado análisis de las distintas posibilidades por las importantes consecuencias biofísicas de sus resultados.

La principal observación que debió tomarse en cuenta frente al planteo del modelo que se propondría fue la cinética de de-activación de las respuestas a altas concentraciones de GABA. Por analogía con estudios de otros receptores sinápticos, no encontramos otra explicación a este fenómeno que la existencia de dos estados abiertos diferentes y no ligados entre sí [205]. El hecho que este curso temporal no se haya observado para cualquier concentración de agonista, indicaría que estos dos estados abiertos planteados tendrían diferente cantidad de moléculas de ligando unidas.

El modelo propuesto para los GABA<sub>C</sub>R en este trabajo es el que se detalla a continuación:



$$k_{on} = 0.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{off} = 0.8 \text{ s}^{-1}$$

$$\alpha_1 = 0.26 \text{ s}^{-1}$$

$$\beta_1 = 2.4 \text{ s}^{-1}$$

$$\alpha_2 = 1.9 \text{ s}^{-1}$$

$$\beta_2 = 4.4 \text{ s}^{-1}$$

Donde, en forma análoga a lo descrito en el Capítulo III, A representa al agonista; R, AR, A<sub>2</sub>R y A<sub>3</sub>R, representan al receptor en el estado cerrado ya sea no unido al agonista, unido a una molécula, a dos o a tres, respectivamente. A su vez, A<sub>2</sub>R\* y A<sub>3</sub>R\* representan al receptor en el estado abierto unido a dos moléculas de agonista o a tres, respectivamente.

Como también se indicó en la discusión del modelo del Capítulo III, las transiciones entre estados involucradas en la unión de ligando son dependientes de la concentración del mismo, como entre R y AR, o AR y A<sub>2</sub>R. Esto significa que por ejemplo, la constante correspondiente a la transición entre el receptor en el estado no ligado (R) y el unido a una molécula de agonista (AR) estaría determinada por la expresión  $5 k_{on} [GABA]$ . Por el contrario, las transiciones entre un estado con más número de moléculas unidas de agonista a otro de menos, así como la transición entre A<sub>3</sub>R y A<sub>3</sub>R\* (y viceversa) y entre A<sub>4</sub>R y A<sub>4</sub>R\* (y viceversa) que están dadas por las constantes  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  serían independientes de la concentración de GABA.

Si bien no se contaba con los valores de todas estas constantes para completar el modelo, una primera aproximación surgió del ajuste de la curva D-R para GABA, es decir, de la actividad del canal en el estado estacionario.

La ecuación que surgió como solución en el estacionario del sistema de ecuaciones diferenciales que describe el modelo es la que se detalla a continuación:

$$\frac{[GABA]^n \alpha_1 / \beta_1 \cdot 5 + 10[GABA]^p K_D \alpha_2 / \beta_2}{\left( 10[GABA]^p \alpha_2 / \beta_2 K_D + 5[GABA]^n \alpha_1 / \beta_1 + K_D^4 \alpha_1 / \beta_1 \alpha_2 / \beta_2 + 10[GABA]^p K_D \alpha_1 / \beta_1 \alpha_2 / \beta_2 + \right.} \quad (7)$$

$$\left. + 5[GABA] K_D^3 \alpha_1 / \beta_1 \alpha_2 / \beta_2 + 10[GABA]^p K_D^2 \alpha_1 / \beta_1 \alpha_2 / \beta_2 + 5[GABA]^n \alpha_1 / \beta_1 \alpha_1 / \beta_1 \right)$$

Donde [GABA] representa la concentración de GABA utilizada;  $K_D$  sería igual a  $k_{off} / k_{on}$ , la afinidad del sitio de unión a GABA (distinto a afinidad aparente,  $EC_{50}$ );  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , las constante de transición previamente descriptas.

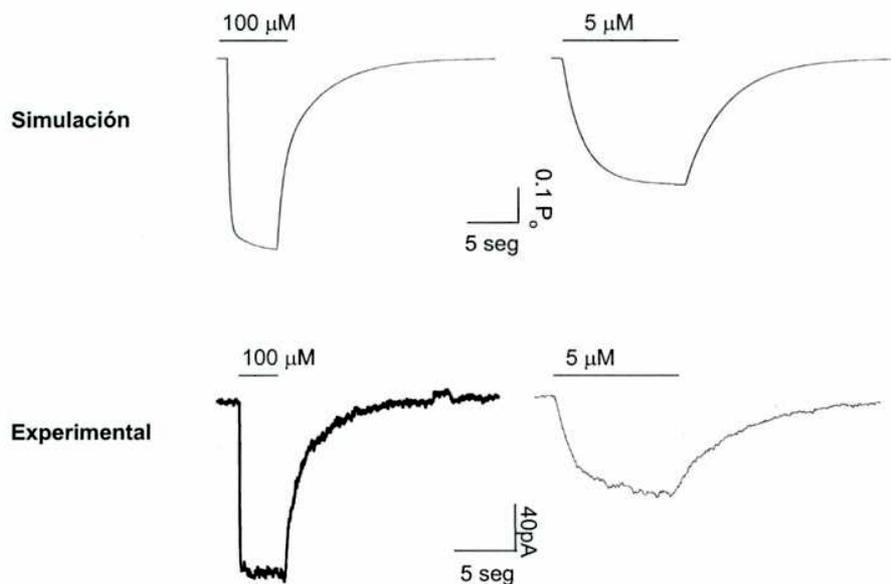
Como puede observarse en la ecuación, el ajuste brinda las relaciones entre las constantes que se desean averiguar, por lo que este método sirve como aproximación para la determinación de las mismas. Considerando que el valor de la  $P_{o, max}$  de la curva D-R es muy crítico para la bondad del ajuste con la ecuación (7), asumimos en forma análoga a lo planteado en el Capítulo III, que este parámetro no podía ser mayor a 0.9. Si bien no contábamos con evidencias concretas para determinar este valor, consideramos que el criterio elegido era amplio, pero también útil, ya que sirvió para descartar otros modelos planteados. Inicialmente, se propuso un modelo diferente, con dos estados abiertos pero con sólo cuatro estados cerrados, y tres sitios de unión a ligando, que reproducía fielmente las propiedades de *gating* de los GABA<sub>C</sub>R fuera del equilibrio. Sin embargo, se descartó porque la ecuación hallada para la solución del sistema en el equilibrio no

era capaz de ajustar los datos experimentales. Esencialmente, no fue posible encontrar valores de constantes que ajustaran los datos cuando la  $P_{o, \max}$  era menor a 0.95.

Las relaciones encontradas fueron:  $K_D = 4.4 \mu\text{M}$ ,  $\alpha_1/\beta_1 = 1.66$ , y  $\alpha_2/\beta_2 = 0.3$ . Estos valores se modificaron luego con el objeto de optimizar el resultado de las simulaciones.

Como puede observarse en la Fig. 31, el modelo reproduce fielmente los cursos temporales de las respuestas a 100 y 5  $\mu\text{M}$  GABA. Se puede notar como la relajación seguida a la respuesta máxima presenta un curso temporal biexponencial, mientras que a concentraciones más bajas, es sólo monoexponencial.

Las constantes de tiempo de la de-activación con 100  $\mu\text{M}$  fueron  $\tau_{\text{deact}1} = 4271$  mseg., y  $\tau_{\text{deact}2} = 636$  mseg, con una amplitud relativa de la componente rápida  $a_2 = 0.49$ . Estos valores son muy similares a los observados experimentalmente, como se mostró en la Fig. 28 y la Tabla II. Esta fue una de las características más salientes de los resultados experimentales y pudo ser reproducido con el modelo planteado. En Fig. 31, se incluyen también respuestas representativas de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana a 5 y 100  $\mu\text{M}$  GABA, con fines comparativos.

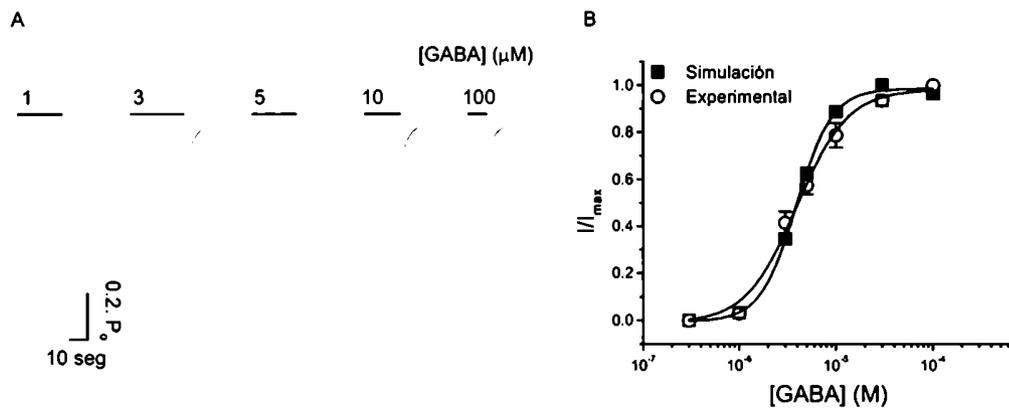


**Fig. 31:** Simulación de las respuestas a GABA con el modelo de *gating* propuesto para los GABA<sub>C</sub>R. Simulación: trazos de la corriente iónica simulada evocada con 100 y 5  $\mu\text{M}$  GABA. Experimental: trazos representativos de las respuestas a las mismas concentraciones de agonista de los GABA<sub>C</sub>R en parches de membrana.

Las simulaciones de las respuestas con 10 y 30  $\mu\text{M}$  de GABA, presentan relajaciones con cinéticas intermedias, es decir, con un curso temporal biexponencial, pero donde la componente rápida ( $\tau_{\text{deact}2}$ ) tuvo una amplitud relativa menor (no mostrado).

En la Fig. 32 se muestran trazos simulados de respuestas a concentraciones crecientes de GABA y la curva D-R construida a partir de estos datos. El  $\text{EC}_{50}$  calculado fue 3.9  $\mu\text{M}$ , prácticamente idéntico al determinado experimentalmente ( $4.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ). No obstante, la constante de Hill obtenida en las simulaciones fue algo mayor a la experimental: 2.3.

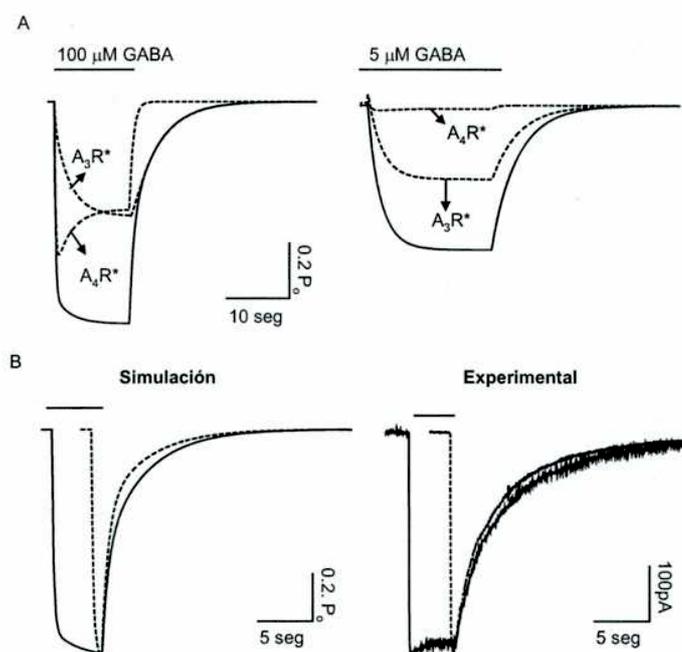
El programa de simulaciones permite además determinar con qué curso temporal se ocupa un estado determinado del modelo durante una respuesta o identificar cuál de los estados conductores contribuye a la corriente iónica estimada. Así, pudimos observar que la gran mayor parte de la respuesta activada con 5  $\mu\text{M}$  GABA estaría mediada por receptores ocupando el estado  $\text{A}_3\text{R}^*$ , como se muestra en la Fig. 33A. Lo mismo se ocurrió cuando se simularon respuestas con concentraciones menores de agonista. Esto explicaría por qué los cursos temporales de activación y de-activación con estas concentraciones de agonista, fueron monoexponenciales.



**Fig. 32:** Simulación de las respuestas a GABA con el modelo de *gating* propuesto para los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ . **A.** Trazos simulados de las respuestas a concentraciones crecientes de GABA. **B.** Curva D-R construida a partir de las simulaciones. La amplitud de cada respuesta se expresa como fracción de la máxima (100  $\mu\text{M}$ ). Se incluye con fines comparativos la curva experimental.

Cuando la activación se realizó con 100  $\mu\text{M}$  del agonista, se observó que ambos estados

abiertos,  $A_4R^*$  y  $A_3R^*$ , contribuyeron a la respuesta en una proporción bastante equilibrada. Algo similar ocurrió con  $10 \mu\text{M}$ , pero en este caso, el estado  $A_4R^*$  fue mayoritariamente poblado. Como se puede observar en la Fig. 33A estos dos estados conductores presentaron cinéticas de relajación diferentes, sugiriendo que esta sería la causa de que las respuestas obtenidas experimentalmente (e incluso en las simulaciones) evocadas con estas concentraciones de GABA presentaran un curso temporal biexponencial.



**Fig. 33:** Curso temporal de ocupación de los dos estado abiertos del modelo de los  $\text{GABA}_{\text{C}}\text{R}$ . **A.** Trazos simulados de respuestas a GABA (trazos llenos) y del curso temporal de ocupación de cada uno de los dos estados conductores (trazo punteado) del modelo propuesto. **B.** Curso temporal de las respuestas simuladas o registradas experimentalmente a aplicaciones de  $100 \mu\text{M}$  GABA de 1 (trazo punteado) ó 4 (trazo lleno) seg. de duración. Los trazos correspondientes a las aplicaciones de agonista de distinta duración se superpusieron por simplicidad.

Sugestivamente, en las respuestas a  $100 \mu\text{M}$  cada uno de estos estados se pobló con un curso temporal propio. Al inicio de la respuesta el estado  $A_4R^*$  contribuyó mayoritariamente al aumento de la  $P_0$ , pero inmediatamente después de llegar a un máximo de ocupación, empezó a bajar, en contrapartida de lo ocurrido con el estado  $A_3R^*$  que monótonicamente fue creciendo en proporción. Por ejemplo, 1 seg. después del inicio de la activación, la proporción de canales en el

estado  $A_4R^*$  respecto del estado  $A_3R^*$  3:1, mientras que 4 seg. después fue casi 1:1. Significativamente, la  $P_o$  en ambos momentos fue de aproximadamente 0.8. Es decir, que cuando la  $P_o$  prácticamente alcanzó su máximo, el equilibrio de las transiciones entre estados del canal aún no habría sido alcanzado. Esto implicaba que de acuerdo a la duración de la estimulación con el agonista, la respuesta estaría mediada por una proporción diferente de canales en uno u otro estado conductor. Y dado que cada uno de ellos presentó cinéticas de relajación diferentes, la respuesta de 1 seg. de duración tendría un curso temporal de de-activación distinto a otra de 4 seg.

Exactamente esto fue lo que obtuvimos simulando respuestas de duración diferente y también lo que observamos experimentalmente. Como se puede observar en la Fig. 33A y B, las respuestas más cortas mostraron un curso temporal de relajación más rápido.

Esta sería una evidencia adicional de la existencia de un segundo estado abierto, ya que consideramos que no podría explicarse este fenómeno con un esquema con un único estado conductor. Si bien el modelo planteado en este trabajo reproduce fielmente los aspectos más críticos de los resultados obtenidos experimentalmente, no podemos descartar que exista otro modelo alternativo que presente una mejor performance.

---

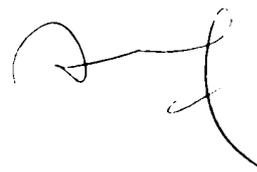
## **CONCLUSIONES**

---

---

## CONCLUSIONES

- El grupo de flavonoides evaluado en este trabajo tuvo un efecto inhibitorio sobre las corrientes iónicas mediadas por los receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. Esto indicaría que los efectos ansiolíticos y/o sedantes de algunos de estos compuestos no estarían mediados por receptores de GABA y que su mecanismo de acción sería más complejo involucrando otros sistemas de neurotransmisión.
- La inhibición de los receptores de GABA<sub>C</sub> por picrotoxina presentó un mecanismo de acción no competitivo, o parcialmente no competitivo y competitivo, es decir, mixto. Sus efectos fueron dependientes del uso, requiriendo la activación de los receptores por GABA para alcanzar el equilibrio.
- La potenciación de los receptores de GABA<sub>C</sub> por lutecio sugiere la existencia de un segundo estado abierto del canal, no descrito hasta el momento. Por otro lado, este ión mediaría un proceso de desensibilización independiente de la acción de GABA.
- El registro de las corriente iónicas mediadas por estos receptores con la técnica de *patch-clamp* en la configuración *outside out*, junto a un sistema de perfusión rápido, permitieron resolver sus cursos temporales intrínsecos y proponer un esquema de *gating* que poseería dos estados abiertos. Esto representa una novedad, en cuanto hasta el momento se creía que los receptores de GABA<sub>C</sub> tenían un solo estado conductor.



---

## REFERENCIAS

1. Sherrington, C.S., *The central nervous system*, in *A textbook of physiology*, M. Foster, Editor. 1897, Macmillan: London.
2. Cajal, S.R.y., *Recollections of my life*. Am. Philos. Soc. Mem. 1937.
3. Eccles, J.C. and W.J. O'Connor, *Responses which nerve impulse evoke in mammalian striated muscles*. J Physiol, 1939. **97**: p. 44-102.
4. Gopfert, H. and H. Schaefer, *Über den direkt und indirekt errgten Aktionsstrom und die Funktion der motorischen Endplatte*. Pflugers Arch. Ges. Physiol., 1938. **239**: p. 597-619.
5. Kuffler, S.W., *Electrical potential changes at an isolated nerve-muscle junction*. J Neurophysiol, 1942. **5**: p. 211-230.
6. Kuffler, S.W., *Further study on transmission in an isolated nerve-muscle junction*. J Neurophysiol, 1942. **5**: p. 309-322.
7. Brock, L.G., J.S. Coombs, and J.C. Eccles, *The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode*. J Physiol, 1952. **117**: p. 431-460.
8. Roberts, E., *GABA in nervous system function - An overview*, in *The Nervous System*, D.B. Tower, Editor. 1975, Raven Press: New York. p. 541-551.
9. Somogyi, P., *The GABAergic synapse in neuronal circuits of the brain*, in *Neuroscience facts*. 1993, Fidia research foundation.
10. Llano, I., et al., *Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices*. J Physiol, 1991. **434**: p. 183-213.
11. Llinas, R. and M. Sugimori, *Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices*. J Physiol, 1980. **305**: p. 171-95.
12. Hill, D.R. and N.G. Bowery, *3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain*. Nature, 1981. **290**(5802): p. 149-52.
13. Sivilotti, L. and A. Nistri, *Pharmacology of a novel effect of gamma-aminobutyric acid on the frog optic tectum in vitro*. Eur J Pharmacol, 1989. **164**(2): p. 205-12.
14. Drew, C.A., G.A. Johnston, and R.P. Weatherby, *Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes*. Neurosci Lett, 1984. **52**(3): p. 317-21.
15. Polenzani, L., R.M. Woodward, and R. Miledi, *Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in Xenopus oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4318-22.
16. Macdonald, R.L. and R.W. Olsen, *GABAA receptor channels*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 569-602.
17. Burt, D.R., *GABAA receptor-activated chloride channels*, in *Chloride Channels*, W.B. Guggino, Editor. 1994, Academic Press: New York. p. 215-263.
18. Feigenspan, A. and J. Bormann, *Modulation of GABAC receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C*. J Physiol, 1994. **481** ( Pt 2): p. 325-30.
19. Unwin, N., *Acetylcholine receptor channel imaged in the open state*. Nature, 1995. **373**(6509): p. 37-43.
20. Galzi, J.L., et al., *Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic*. Nature, 1992. **359**(6395): p. 500-5.
21. Schofield, P.R., et al., *Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family*. Nature, 1987. **328**(6127): p. 221-7.
22. Chebib, M. and G.A. Johnston, *GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology*. J Med Chem, 2000. **43**(8): p. 1427-47.

23. McKernan, R.M. and P.J. Whiting, *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?* Trends Neurosci, 1996. 19(4): p. 139-43.
24. Sigel, E., et al., *The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function.* Neuron, 1990. 5(5): p. 703-11.
25. Verdoorn, T.A., et al., *Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition.* Neuron, 1990. 4(6): p. 919-28.
26. Angelotti, T.P. and R.L. Macdonald, *Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties.* J Neurosci, 1993. 13(4): p. 1429-40.
27. Moss, S.J. and T.G. Smart, *Constructing inhibitory synapses.* Nat Rev Neurosci, 2001. 2(4): p. 240-50.
28. Tretter, V., et al., *Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype.* J Neurosci, 1997. 17(8): p. 2728-37.
29. Quirk, K., et al., *gamma-Aminobutyric acid type A receptors in the rat brain can contain both gamma 2 and gamma 3 subunits, but gamma 1 does not exist in combination with another gamma subunit.* Mol Pharmacol, 1994. 45(6): p. 1061-70.
30. Backus, K.H., et al., *Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor deduced from mutation-induced rectification.* Neuroreport, 1993. 5(3): p. 285-8.
31. Cutting, G.R., et al., *Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(7): p. 2673-7.
32. Wang, T.L., W.B. Guggino, and G.R. Cutting, *A novel gamma-aminobutyric acid receptor subunit (rho 2) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in Xenopus oocytes.* J Neurosci, 1994. 14(11 Pt 1): p. 6524-31.
33. Ogurusu, T., G. Eguchi, and R. Shingai, *Localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor rho 3 subunit in rat retina.* Neuroreport, 1997. 8(4): p. 925-7.
34. Cutting, G.R., et al., *Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4.* Genomics, 1992. 12(4): p. 801-6.
35. Enz, R. and J. Bormann, *A single point mutation decreases picrotoxinin sensitivity of the human GABA receptor rho 1 subunit.* Neuroreport, 1995. 6(11): p. 1569-72.
36. Enz, R. and G.R. Cutting, *GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties.* Eur J Neurosci, 1999. 11(1): p. 41-50.
37. Hackam, A.S., et al., *The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction.* J Biol Chem, 1997. 272(21): p. 13750-7.
38. Pan, Z.H., et al., *Agonist-induced closure of constitutively open gamma-aminobutyric acid channels with mutated M2 domains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6490-5.
39. Pan, Z.H., et al., *Evidence for coassembly of mutant GABAC rho1 with GABAA gamma2S, glycine alpha1 and glycine alpha2 receptor subunits in vitro.* Eur J Neurosci, 2000. 12(9): p. 3137-45.
40. Marshall, F.H., et al., *GABAB receptors - the first 7TM heterodimers.* Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(10): p. 396-9.
41. Laurie, D.J., P.H. Seeburg, and W. Wisden, *The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum.* J Neurosci, 1992. 12(3): p. 1063-76.

42. Wisden, W., et al., *The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon.* J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 1040-62.
43. Tia, S., et al., *Distinct deactivation and desensitization kinetics of recombinant GABAA receptors.* Neuropharmacology, 1996. **35**(9-10): p. 1375-82.
44. Essrich, C., et al., *Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin.* Nat Neurosci, 1998. **1**(7): p. 563-71.
45. Kneussel, M., et al., *Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice.* J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9289-97.
46. Wang, H., et al., *GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton.* Nature, 1999. **397**(6714): p. 69-72.
47. Hanley, J.G., et al., *The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses.* Nature, 1999. **397**(6714): p. 66-9.
48. Enz, R., et al., *Immunocytochemical localization of the GABA<sub>C</sub> receptor rho subunits in the mammalian retina.* J Neurosci, 1996. **16**(14): p. 4479-90.
49. Enz, R., et al., *Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat.* Eur J Neurosci, 1995. **7**(7): p. 1495-501.
50. Feigenspan, A., H. Wässle, and J. Bormann, *Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells.* Nature, 1993. **361**(6408): p. 159-62.
51. Lukasiewicz, P.D., B.R. Maple, and F.S. Werblin, *A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina.* J Neurosci, 1994. **14**(3 Pt 1): p. 1202-12.
52. Lukasiewicz, P.D. and F.S. Werblin, *A novel GABA receptor modulates synaptic transmission from bipolar to ganglion and amacrine cells in the tiger salamander retina.* J Neurosci, 1994. **14**(3 Pt 1): p. 1213-23.
53. Pan, Z.H. and S.A. Lipton, *Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals.* J Neurosci, 1995. **15**(4): p. 2668-79.
54. McCall, M.A., et al., *Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina.* J Neurosci, 2002. **22**(10): p. 4163-74.
55. Matthews, G., *Synaptic mechanisms of bipolar cell terminals.* Vision Res, 1999. **39**(15): p. 2469-76.
56. Qian, H. and J.E. Dowling, *Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells.* Nature, 1993. **361**(6408): p. 162-4.
57. Dong, C.J., S.A. Picaud, and F.S. Werblin, *GABA transporters and GABA<sub>C</sub>-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells.* J Neurosci, 1994. **14**(5 Pt 1): p. 2648-58.
58. Picaud, S., et al., *GABAA and GABA<sub>C</sub> receptors in adult porcine cones: evidence from a photoreceptor-glia co-culture model.* J Physiol, 1998. **513** ( Pt 1): p. 33-42.
59. Strata, F. and E. Cherubini, *Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development.* J Physiol, 1994. **480** ( Pt 3): p. 493-503.
60. Schmidt, M., et al., *Disinhibition in rat superior colliculus mediated by GABA<sub>C</sub> receptors.* J Neurosci, 2001. **21**(2): p. 691-9.
61. Boller, M. and M. Schmidt, *GABA<sub>C</sub> receptors in the rat superior colliculus and pretectum participate in synaptic neurotransmission.* J Neurophysiol, 2003. **89**(4): p. 2035-45.
62. Zhu, J.J. and F.S. Lo, *Three GABA receptor-mediated postsynaptic potentials in interneurons in the rat lateral geniculate nucleus.* J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5721-30.

63. Johnston, G.A., *GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels?* Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(9): p. 319-23.
64. Woodward, R.M., L. Polenzani, and R. Miledi, *Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in Xenopus oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidA and gamma-aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists.* Mol Pharmacol, 1993. **43**(4): p. 609-25.
65. Jones, M.V., et al., *Defining affinity with the GABA<sub>A</sub> receptor.* J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8590-604.
66. Chang, Y., D.F. Covey, and D.S. Weiss, *Correlation of the apparent affinities and efficacies of gamma-aminobutyric acid(C) receptor agonists.* Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1375-80.
67. Kusama, T., et al., *GABA rho 2 receptor pharmacological profile: GABA recognition site similarities to rho 1.* Eur J Pharmacol, 1993. **245**(1): p. 83-4.
68. Bormann, J. and A. Feigenspan, *GABA<sub>A</sub> receptors.* Trends Neurosci, 1995. **18**(12): p. 515-9.
69. Feigenspan, A. and J. Bormann, *Differential pharmacology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors on rat retinal bipolar cells.* Eur J Pharmacol, 1994. **288**(1): p. 97-104.
70. Qian, H. and J.E. Dowling, *Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina.* J Neurosci, 1994. **14**(7): p. 4299-307.
71. Calvo, D.J. and R. Miledi, *Activation of GABA rho 1 receptors by glycine and beta-alanine.* Neuroreport, 1995. **6**(8): p. 1118-20.
72. Woodward, R.M., L. Polenzani, and R. Miledi, *Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in Xenopus oocytes. I. Effects of Cl<sup>-</sup> channel inhibitors.* Mol Pharmacol, 1992. **42**(1): p. 165-73.
73. Ragozzino, D., et al., *Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acidC receptor antagonist.* Mol Pharmacol, 1996. **50**(4): p. 1024-30.
74. Akaike, N., et al., *Multiple mechanisms of antagonism of gamma-aminobutyric acid (GABA) responses.* Cell Mol Neurobiol, 1987. **7**(1): p. 97-103.
75. Newland, C.F. and S.G. Cull-Candy, *On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat.* J Physiol, 1992. **447**: p. 191-213.
76. Takeuchi, A. and N. Takeuchi, *A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish.* J Physiol, 1969. **205**(2): p. 377-91.
77. Yoon, K.W., D.F. Covey, and S.M. Rothman, *Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons.* J Physiol, 1993. **464**: p. 423-39.
78. Adams, P.R., *Drug blockade of open end-plate channels.* J Physiol, 1976. **260**(3): p. 531-52.
79. Wang, T.L., et al., *A single amino acid in gamma-aminobutyric acid rho 1 receptors affects competitive and noncompetitive components of picrotoxin inhibition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11751-5.
80. Haefely, W., J.R. Martin, and P. Schoch, *Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors.* Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(11): p. 452-6.
81. Haefely, W. and P. Polc, *Physiology of GABA enhancement by benzodiazepines and barbiturates*, in *Benzodiazepin/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties*. 1986, Alan R. Liss, Inc.
82. Nutt, D., *Benzodiazepine terminology.* Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(3): p. 86.

83. Braestrup, C. and R.F. Squires, *Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3805-9.
84. Costa, E. and A. Guidotti, *Recent studies on the mechanism whereby benzodiazepines facilitate GABA-ergic transmission*. Adv Exp Med Biol, 1979. **123**: p. 371-8.
85. Mohler, H. and T. Okada, *Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system*. Science, 1977. **198**(4319): p. 849-51.
86. Pritchett, D.B., et al., *Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology*. Nature, 1989. **338**(6216): p. 582-5.
87. Calvo, D.J. and R. Miledi, *Interaction of benzodiazepines with homomeric GABA $\rho$ 1 receptors from human retina*. 1998, Abstract 28th. Annual Meeting Society for Neuroscience.
88. Schumacher, M., P. Robel, and E.E. Baulieu, *Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids*. Dev Neurosci, 1996. **18**(1-2): p. 6-21.
89. Gee, K.W., *Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore*. Mol Neurobiol, 1988. **2**(4): p. 291-317.
90. Orchinik, M. and B. McEwen, *Novel and classical actions of neuroactive steroids*, in *Neurotransmission*. 1993, Research biochemicals Incorporated.
91. Paul, S.M. and R.H. Purdy, *Neuroactive steroids*. Faseb J, 1992. **6**(6): p. 2311-22.
92. Wu, F.S., T.T. Gibbs, and D.H. Farb, *Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone*. Mol Pharmacol, 1990. **37**(5): p. 597-602.
93. French-Mullen, J.M. and K.T. Spence, *Neurosteroids block Ca $^{2+}$  channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons*. Eur J Pharmacol, 1991. **202**(2): p. 269-72.
94. Gillo, B. and Y. Lass, *The mechanism of steroid anaesthetic (alphaxalone) block of acetylcholine-induced ionic currents*. Br J Pharmacol, 1984. **82**(4): p. 783-9.
95. Prince, R.J. and M.A. Simmonds, *5 beta-pregnan-3 beta-ol-20-one, a specific antagonist at the neurosteroid site of the GABAA receptor-complex*. Neurosci Lett, 1992. **135**(2): p. 273-5.
96. Purdy, R.H., et al., *Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4553-7.
97. Robel, P. and E.E. Baulieu, *Neurosteroids: biosynthesis and function*. Vol. 22. 1994.
98. Callachan, H., et al., *Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1987. **231**(1264): p. 359-69.
99. Cottrell, G.A., J.J. Lambert, and J.A. Peters, *Modulation of GABAA receptor activity by alphaxalone*. Br J Pharmacol, 1987. **90**(3): p. 491-500.
100. Mistry, D.K. and G.A. Cottrell, *Actions of steroids and bemegride on the GABAA receptor of mouse spinal neurones in culture*. Exp Physiol, 1990. **75**(2): p. 199-209.
101. Puia, G., et al., *Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors*. Neuron, 1990. **4**(5): p. 759-65.
102. Wieland, S., et al., *Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one*. Brain Res, 1991. **565**(2): p. 263-8.
103. Woodward, R.M., L. Polenzani, and R. Miledi, *Effects of steroids on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in Xenopus oocytes by poly(A) $^{+}$  RNA from mammalian brain and retina*. Mol Pharmacol, 1992. **41**(1): p. 89-103.

104. Deutsch, S.I., J. Mastropaolo, and A. Hitri, *GABA-active steroids: endogenous modulators of GABA-gated chloride ion conductance*. Clin Neuropharmacol, 1992. **15**(5): p. 352-64.
105. Majewska, M.D., *Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance*. Prog Neurobiol, 1992. **38**(4): p. 379-95.
106. Majewska, M.D., S. Demirgoren, and E.D. London, *Binding of pregnenolone sulfate to rat brain membranes suggests multiple sites of steroid action at the GABAA receptor*. Eur J Pharmacol, 1990. **189**(4-5): p. 307-15.
107. Lambert, J.J., et al., *Neurosteroids and GABAA receptor function*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(9): p. 295-303.
108. Majewska, M.D., *Neurosteroids: GABA-agonistics and GABA-antagonistics modulators of the GABAA receptor*. FIDIA research foundation symposium series. Vol. 8. 1991.
109. Twyman, R.E. and R.L. Macdonald, *Neurosteroid regulation of GABAA receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture*. J Physiol, 1992. **456**: p. 215-45.
110. Turner, D.M., et al., *Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the gamma-aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **248**(3): p. 960-6.
111. Morris, K.D., C.N. Moorefield, and J. Amin, *Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(4): p. 752-9.
112. Calvo, D.J. and R. Miledi, *Antagonism of human homomeric GABA $\rho$ 1 receptors by steroids*. 1997: Society for Neuroscience. Abstract.
113. Goutman, J.D. and D.J. Calvo, *Studies on the mechanism of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA $\rho$ 1 human receptor*. Br J Pharmacol, 2003. **in press**.
114. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 2000. **55**(6): p. 481-504.
115. Bohm, B.A., *Introduction to flavonoids. Chemistry and biochemistry of organic natural products*. 1998, Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
116. Medina, J.H., et al., *Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands*. Neurochem Res, 1997. **22**(4): p. 419-25.
117. Miksicek, R.J., *Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(1): p. 37-43.
118. Middleton, E. and C. Kandaswami, *The Impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer.*, in *The Flavonoids*, J.B. Harborne, Editor. 1994, Chapman & Hall: London. p. 619-645.
119. Vohora, S.B., et al., *Effect of biflavonoids of Taxus baccata on the central nervous system*. Indian J Med Res, 1980. **71**: p. 815-20.
120. Barnard, D.L., et al., *Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid, SP-303*. Chemotherapy, 1993. **39**(3): p. 212-7.
121. Speroni, E. and A. Minghetti, *Neuropharmacological activity of extracts from Passiflora incarnata*. Planta Med, 1988. **54**(6): p. 488-91.
122. Picq, M., S.L. Cheav, and A.F. Prigent, *Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity*. Life Sci, 1991. **49**(26): p. 1979-88.

123. Oyama, Y., et al., *Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca(2+)-loaded brain neurons*. Brain Res, 1994. **635**(1-2): p. 125-9.
124. Medina, J.H., et al., *Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties*. Biochem Pharmacol, 1990. **40**(10): p. 2227-31.
125. Haberlein, H., K.P. Tschiersch, and H.L. Schafer, *Flavonoids from Leptospermum scoparium with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract*. Pharmazie, 1994. **49**(12): p. 912-22.
126. Marder, M., et al., *6-Bromoflavone, a high affinity ligand for the central benzodiazepine receptors is a member of a family of active flavonoids*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **223**(2): p. 384-9.
127. Viola, H., et al., *Apigenin, a component of Matricaria recutita flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects*. Planta Med, 1995. **61**(3): p. 213-6.
128. Griebel, G., et al., *Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam*. Neuropharmacology, 1999. **38**(7): p. 965-77.
129. Chakravarthy, B.K., et al., *Isolation of amentoflavone from Selaginella rupestris and its pharmacological activity on central nervous system, smooth muscles and isolated frog heart preparations*. Planta Med, 1981. **43**(1): p. 64-70.
130. Nielsen, M., S. Frokjaer, and C. Braestrup, *High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors in vitro*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(17): p. 3285-7.
131. Koh, D.S., G. Reid, and W. Vogel, *Activating effect of the flavonoid phloretin on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in myelinated nerve fibers of Xenopus laevis [corrected]*. Neurosci Lett, 1994. **165**(1-2): p. 167-70.
132. Ji, X.D., N. Melman, and K.A. Jacobson, *Interactions of flavonoids and other phytochemicals with adenosine receptors*. J Med Chem, 1996. **39**(3): p. 781-8.
133. Simmen, U., et al., *Hypericum perforatum inhibits the binding of mu- and kappa-opioid receptor expressed with the Semliki Forest virus system*. Pharm Acta Helv, 1998. **73**(1): p. 53-6.
134. Dekermendjian, K., et al., *Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex*. J Med Chem, 1999. **42**(21): p. 4343-50.
135. Avallone, R., et al., *Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from Matricaria chamomilla*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(11): p. 1387-94.
136. Mall, M., et al., *Effect of genistein on native epithelial tissue from normal individuals and CF patients and on ion channels expressed in Xenopus oocytes*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(8): p. 1884-92.
137. Saponara, S., G. Sgaragli, and F. Fusi, *Quercetin as a novel activator of L-type Ca(2+) channels in rat tail artery smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(7): p. 1819-27.
138. Calvo, D., et al., *Novel pharmacological effects of flavonoids: functional studies on ionotropic neurotransmitter receptors*. 2000: Synaptic Transmission 100 years after L. Luciani. Symposium in honour of Ricardo Miledi. Rome, Italy. Org: F. Eusebi, F. Grassi, L. Negri, F. Ruzzier. Universita di Roma "La Sapienza". Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia "V. Erspamer". Casa Editrice Scientifica Internazionale. Abstract, p. 25.

139. Marder, M. and A.C. Paladini, *GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure*. *Curr Top Med Chem*, 2002. **2**(8): p. 853-67.
140. Marvizon, J.C. and P. Skolnick, *[3H]glycine binding is modulated by Mg<sup>2+</sup> and other ligands of the NMDA receptor-cation channel complex*. *Eur J Pharmacol*, 1988. **151**(1): p. 157-8.
141. Westbrook, G.L. and M.L. Mayer, *Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons*. *Nature*, 1987. **328**(6131): p. 640-3.
142. Peters, S., J. Koh, and D.W. Choi, *Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons*. *Science*, 1987. **236**(4801): p. 589-93.
143. Cull-Candy, S.G. and R. Miledi, *J Physiol*, 1980. **303**: p. 74P.
144. Haug, F.M., *Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure*. *Histochemie*, 1967. **8**(4): p. 355-68.
145. Holm, I.E., et al., *Quantification of vesicular zinc in the rat brain*. *Histochemistry*, 1988. **89**(3): p. 289-93.
146. Assaf, S.Y. and S.H. Chung, *Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity*. *Nature*, 1984. **308**(5961): p. 734-6.
147. Howell, G.A., M.G. Welch, and C.J. Frederickson, *Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices*. *Nature*, 1984. **308**(5961): p. 736-8.
148. Smart, T.G. and A. Constanti, *A novel effect of zinc on the lobster muscle GABA receptor*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1982. **215**(1200): p. 327-41.
149. Smart, T.G. and A. Constanti, *Differential effect of zinc on the vertebrate GABA<sub>A</sub>-receptor complex*. *Br J Pharmacol*, 1990. **99**(4): p. 643-54.
150. Arakawa, O., M. Nakahiro, and T. Narahashi, *Mercury modulation of GABA-activated chloride channels and non-specific cation channels in rat dorsal root ganglion neurons*. *Brain Res*, 1991. **551**(1-2): p. 58-63.
151. Ma, J.Y. and T. Narahashi, *Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated chloride channel currents by lanthanides in rat dorsal root ganglion neurons*. *J Neurosci*, 1993. **13**(11): p. 4872-9.
152. Ma, J.Y. and T. Narahashi, *Differential modulation of GABA<sub>A</sub> receptor-channel complex by polyvalent cations in rat dorsal root ganglion neurons*. *Brain Res*, 1993. **607**(1-2): p. 222-32.
153. Reichling, D.B. and A.B. MacDermott, *Lanthanum actions on excitatory amino acid-gated currents and voltage-gated calcium currents in rat dorsal horn neurons*. *J Physiol*, 1991. **441**: p. 199-218.
154. Calvo, D.J., A.E. Vazquez, and R. Miledi, *Cationic modulation of rho 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12725-9.
155. Chang, Y., J. Amin, and D.S. Weiss, *Zinc is a mixed antagonist of homomeric rho 1 gamma-aminobutyric acid-activated channels*. *Mol Pharmacol*, 1995. **47**(3): p. 595-602.
156. Sendin, G.C., J.D. Goutman, and D.J. Calvo, *Modulacion de los receptores homomericos GABA<sub>A</sub> por cationes divalentes*. 2000, II Taller de Neurociencias. Vaquerias, Cordoba, Argentina. Abril 2000.
157. Coombs, J.S., J.C. Eccles, and P. Fatt, *The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential*. *J Physiol*, 1955. **130**(2): p. 326-74.

158. Bormann, J., O.P. Hamill, and B. Sakmann, *Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones*. J Physiol, 1987. **385**: p. 243-86.
159. Bormann, J., *Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes*. Trends Neurosci, 1988. **11**(3): p. 112-6.
160. Wotring, V.E., Y. Chang, and D.S. Weiss, *Permeability and single channel conductance of human homomeric rho1 GABAC receptors*. J Physiol, 1999. **521 Pt 2**: p. 327-36.
161. Jackson, M.B., et al., *Single channel currents activated by gamma-aminobutyric acid, muscimol, and (-)-pentobarbital in cultured mouse spinal neurons*. J Neurosci, 1982. **2**(7): p. 889-94.
162. Bormann, J. and D.E. Clapham, *gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(7): p. 2168-72.
163. Macdonald, R.L., C.J. Rogers, and R.E. Twyman, *Kinetic properties of the GABAA receptor main conductance state of mouse spinal cord neurones in culture*. J Physiol, 1989. **410**: p. 479-99.
164. Jones, M.V. and G.L. Westbrook, *Desensitized states prolong GABAA channel responses to brief agonist pulses*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 181-91.
165. Frosch, M.P., S.A. Lipton, and M.A. Dichter, *Desensitization of GABA-activated currents and channels in cultured cortical neurons*. J Neurosci, 1992. **12**(8): p. 3042-53.
166. Mellor, J.R. and A.D. Randall, *Voltage-dependent deactivation and desensitization of GABA responses in cultured murine cerebellar granule cells*. J Physiol, 1998. **506 ( Pt 2)**: p. 377-90.
167. Oh, D.J. and M.A. Dichter, *Desensitization of GABA-induced currents in cultured rat hippocampal neurons*. Neuroscience, 1992. **49**(3): p. 571-6.
168. Chang, Y. and D.S. Weiss, *Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor*. Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 219-25.
169. Amin, J. and D.S. Weiss, *Insights into the activation mechanism of rho1 GABA receptors obtained by coexpression of wild type and activation-impaired subunits*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **263**(1368): p. 273-82.
170. Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa, *Transplanting receptors from brain into oocytes, in Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lecture*, J. Smith, Editor. 1989, Raven Press: New York. p. 57-89.
171. Liman, E.R., J. Tytgat, and P. Hess, *Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs*. Neuron, 1992. **9**(5): p. 861-71.
172. Sumikawa, K., I. Parker, and R. Miledi, *Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channels from brain mRNA in Xenopus oocytes*. Methods in Neuroscience. Academic Press., 1989. **1**: p. 30-44.
173. Methfessel, C., et al., *Patch clamp measurements on Xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels*. Pflugers Arch, 1986. **407**(6): p. 577-88.
174. Colquhoun, D. and A.G. Hawkes, *On the stochastic properties of single ion channels*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1981. **211**(1183): p. 205-35.
175. Buisson, B., et al., *Human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor in HEK 293 cells: A patch-clamp study*. J Neurosci, 1996. **16**(24): p. 7880-91.
176. van Hoof, J.A. and H.P. Vijverberg, *5-HT(3) receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story?* Trends Neurosci, 2000. **23**(12): p. 605-10.

177. Miledi, R. and I. Parker, *Chloride current induced by injection of calcium into Xenopus oocytes*. J Physiol, 1984. **357**: p. 173-83.
178. Gundersen, C.B., R. Miledi, and I. Parker, *Glutamate and kainate receptors induced by rat brain messenger RNA in Xenopus oocytes*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1984. **221**(1223): p. 127-43.
179. Blaschke, M., et al., *Pharmacological differentiation between neuronal and recombinant glutamate receptor channels expressed in Xenopus oocytes*. Neuropharmacology, 1997. **36**(11-12): p. 1489-501.
180. Frerking, M. and R.A. Nicoll, *Synaptic kainate receptors*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 342-51.
181. Wolfman, C., et al., *Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from Passiflora coerulea*. Pharmacol Biochem Behav, 1994. **47**(1): p. 1-4.
182. Salgueiro, J.B., et al., *Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1997. **58**(4): p. 887-91.
183. Ramassamy, C., et al., *The Ginkgo biloba extract, EGb761, increases synaptosomal uptake of 5-hydroxytryptamine: in-vitro and ex-vivo studies*. J Pharm Pharmacol, 1992. **44**(11): p. 943-5.
184. Cohen, Z., et al., *Serotonin in the regulation of brain microcirculation*. Prog Neurobiol, 1996. **50**(4): p. 335-62.
185. Pattichis, K., et al., *5-Hydroxytryptamine release from platelets by different red wines: implications for migraine*. Eur J Pharmacol, 1995. **292**(2): p. 173-7.
186. Movileanu, L., I. Neagoe, and M.L. Flonta, *Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers*. Int J Pharm, 2000. **205**(1-2): p. 135-46.
187. Dong, C.J. and F.S. Werblin, *Use-dependent and use-independent blocking actions of picrotoxin and zinc at the GABAC receptor in retinal horizontal cells*. Vision Res, 1996. **36**(24): p. 3997-4005.
188. Bianchi, M.T. and R.L. Macdonald, *Agonist Trapping by GABAA Receptor Channels*. J Neurosci, 2001. **21**(23): p. 9083-91.
189. Lester, R.A., et al., *Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 565-7.
190. Smart, T. and A. Constanti, *Studies on the mechanism of action of picrotoxinin and other convulsants at the crustacean muscle GABA receptor*. Proc R Soc Lond, 1986. **227**: p. 191-216.
191. Chang, Y. and D.S. Weiss, *Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes with GABA receptor activation and antagonism*. Nat Neurosci, 2002. **5**(11): p. 1163-8.
192. Takahashi, K., S. Miyoshi, and A. Kaneko, *GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABAA receptor channels*. Jpn J Physiol, 1995. **45**(3): p. 437-56.
193. Chang, Y. and D.S. Weiss, *Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening rho1 gamma-aminobutyric acid receptors*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 511-23.
194. Gurley, D., et al., *Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABAA channel that abolish block by picrotoxin*. Receptors Channels, 1995. **3**(1): p. 13-20.
195. Xu, M., D.F. Covey, and M.H. Akabas, *Interaction of picrotoxin with GABAA receptor channel-lining residues probed in cysteine mutants*. Biophys J, 1995. **69**(5): p. 1858-67.

196. Sendin, G.C., J.D. Goutman, and D.J. Calvo, *Studies on the inhibition of GABA $\rho_1$  receptors by divalent cations*. Resultados no publicados, 2002.
197. Ma, J.Y., E. Reuveny, and T. Narahashi, *Terbium modulation of single gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels in rat dorsal root ganglion neurons*. J Neurosci, 1994. **14**(6): p. 3835-41.
198. Eisenman, L.N., et al., *Activation dependent properties of pregnenolone sulfate inhibition of GABAA receptor-mediated current*. J Physiol, 2003.
199. Shimada, S., G. Cutting, and G.R. Uhl, *gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in Xenopus oocytes*. Mol Pharmacol, 1992. **41**(4): p. 683-7.
200. Levine, I.N., *Fisico Quimica*. 2a. ed. 1991: McGraw-Hill/Interamericana de Espana, S. A.
201. Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 1992, Sinauer Associates, Inc.
202. Clements, J.D., et al., *The time course of glutamate in the synaptic cleft*. Science, 1992. **258**(5087): p. 1498-501.
203. Clements, J.D. and G.L. Westbrook, *Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor*. Neuron, 1991. **7**(4): p. 605-13.
204. Jones, M.V. and G.L. Westbrook, *The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission*. Trends Neurosci, 1996. **19**(3): p. 96-101.
205. Legendre, P., *A reluctant gating mode of glycine receptor channels determines the time course of inhibitory miniature synaptic events in zebrafish hindbrain neurons*. J Neurosci, 1998. **18**(8): p. 2856-70.
206. Lester, R.A. and C.E. Jahr, *NMDA channel behavior depends on agonist affinity*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 635-43.
207. Lester, R.A., G. Tong, and C.E. Jahr, *Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor*. J Neurosci, 1993. **13**(3): p. 1088-96.
208. Covarrubias, M. and J.H. Steinbach, *Excision of membrane patches reduces the mean open time of nicotinic acetylcholine receptors*. Pflugers Arch, 1990. **416**(4): p. 385-92.
209. Filippova, N., R. Dudley, and D.S. Weiss, *Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human rho 1 GABAC receptors*. J Physiol, 1999. **518** ( Pt 2): p. 385-99.
210. Goutman, J.D., et al., *Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors*. Eur J Pharmacol, 2003. **461**(2-3): p. 79-87.
211. Yang, X.C. and F. Sachs, *Block of stretch-activated ion channels in Xenopus oocytes by gadolinium and calcium ions*. Science, 1989. **243**(4894 Pt 1): p. 1068-71.
212. Gil, Z., K.L. Magleby, and S.D. Silberberg, *Membrane-pipette interactions underlie delayed voltage activation of mechanosensitive channels in Xenopus oocytes*. Biophys J, 1999. **76**(6): p. 3118-27.
213. Sakmann, B. and E. Neher, *Single Channel Recording*. 2nd ed. 1995, New York: Plenum Press.