



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

“Los receptores α_6 -GABA_A median la corriente tónica y modulan la excitabilidad de las motoneuronas de la médula espinal de la tortuga”

TESIS

Que presenta

M. EN C. MARÍA DEL CARMEN ANDRÉS BARRERA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva
Dr. José Rodolfo Delgado Lezama

México, D.F.

FEBRERO, 2015

PREFACIO

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad extender nuestra comprensión de la función de los receptores GABA_A en las motoneuronas espinales. En particular, en este estudio se muestra que las motoneuronas de tortuga expresan receptores GABA_A sensibles a furosemida, constituidos al menos por la subunidad α_6 , que median una corriente inhibitoria tónica y modulan su excitabilidad.

La parte experimental de este trabajo se desarrolló en los laboratorios 9 y 55 de los Departamentos de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (DFBN) y Biología Celular (DBC), respectivamente, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). La tesis fue dirigida por los doctores Diego Ricardo Félix Grijalva profesor titular del DBC, y José Rodolfo Delgado Lezama profesor titular del DFBN. El plan experimental se desarrolló con la asesoría de los doctores Ismael Jiménez Estrada y Rafael Gutiérrez Aguilar profesores titulares del DFBN y del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav-IPN, respectivamente.

Algunos de los resultados de este trabajo fueron presentados en el LVII Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas celebrado en la ciudad de Oaxaca, México, el 1 de Septiembre de 2014. Asimismo, los resultados dieron origen a un trabajo de investigación original que se publicó en la revista *Plos One* en el año 2014 (PMID: 25531288). En el periodo que duró el Doctorado conté con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de la beca académica 219169.

CONTENIDO

PREFACIO	2
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Receptores GABA _A sinápticos y extrasinápticos	8
Expresión de las subunidades de los receptores GABA _A en la médula espinal	11
Corriente tónica GABAérgica en la médula espinal	13
Corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas	15
Subunidad α que forman los receptores GABA _A en las motoneuronas	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Preparación biológica	21
Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (<i>RT-PCR</i>)	21
Inmunoelectrotransferencia (<i>Western blot</i>)	22
Inmunohistoquímica en rebanadas de médula espinal	23
Registro intracelular de las motoneuronas	24
<i>Patch clamp</i> visualizado de las motoneuronas	25
Fármacos empleados	26
Análisis estadístico	27
Análisis de la fluorescencia en las rebanadas de la médula espinal	27
RESULTADOS	29
Expresión de la subunidad α_6 GABA _A en la médula espinal de la tortuga	29
Inmunolocalización de la subunidad α_6 en las motoneuronas	31
Expresión de las subunidades α_4 y δ	33
Registro intracelular	36
Registro de motoneuronas mediante <i>patch clamp</i> visualizado	40

Caracterización de motoneuronas y estabilidad del registro electrofisiológico	42
Activación de receptores GABA _A	44
Efecto de furosemida sobre las motoneuronas en presencia de GABA endógeno	46
Activación de los receptores GABA _A por GABA exógeno	47
Efecto de furosemida sobre las motoneuronas en presencia de GABA exógeno	49
Efecto de la furosemida en las motoneuronas de la tortuga adulta	51
Receptores α_6 GABA _A y corriente tónica en motoneuronas	53
DISCUSIÓN	56
La furosemida modula la excitabilidad de las motoneuronas	56
Resistencia de entrada de las motoneuronas	58
Corriente tónica inhibitoria activada por muscimol y GABA	58
Expresión y localización de las subunidades α_6 en las motoneuronas	60
Tortugas juveniles como modelo de trabajo	62
Importancia funcional de la corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas	63
Conclusión y perspectivas	64
REFERENCIAS	65

RESUMEN

Las motoneuronas están provistas de un amplio repertorio de receptores ionotrópicos y metabotrópicos que modulan su excitabilidad. En el sistema nervioso central maduro, los receptores GABA_A median dos tipos de inhibición, fásica y tónica, producidos por activación de receptores sinápticos y extrasinápticos, respectivamente. En un trabajo previo se demostró que la furosemida facilita el reflejo monosináptico sin afectar el potencial de la raíz dorsal; y se presentó evidencia de la presencia de una inhibición tónica en las motoneuronas mediada por receptores GABA_A activados por el GABA presente en el medio extracelular. Si bien estos hallazgos sugirieron que los receptores GABA_A de alta afinidad podrían tener un papel relevante en el control motor, la identidad molecular y funcional de las subunidades que conformaban a estos receptores GABA_A no fue dilucidada. En este trabajo se investigó la expresión, localización y función de la subunidad α_6 de los receptores GABA_A en las motoneuronas del engrosamiento lumbar de la médula espinal de la tortuga. Empleando técnicas electrofisiológicas, de biología molecular, inmunohistoquímica y microscopía confocal, se demostró que la subunidad α_6 GABA_A se expresa en las motoneuronas y modula su excitabilidad a través de una corriente tónica inhibitoria.

ABSTRACT

Motoneurons are provided with a repertoire of ionotropic and metabotropic receptors and ion channels involved in modulating their excitability. Among the receptors expressed in the motoneurons GABA_A receptors are known to mediate two types of inhibition in the mature nervous system, phasic and tonic, mediated by synaptic and extrasynaptic receptors, respectively. In a previous paper we showed that furosemide facilitated the monosynaptic reflex without affecting the dorsal root potential. In addition, it was demonstrated the presence of a tonic inhibition mediated by GABA_A receptors in motoneurons, which are activated by ambient GABA. Those results suggested that high affinity GABA_A receptors might have an important role in motor control, though the functional identity of the α subunits forming the GABA_A receptors in spinal motoneurons was not elucidated. In this work we investigated the expression, location and function of α_6 GABA_A receptors in motoneurons from the turtle spinal cord. By combining electrophysiological, immunohistochemical and molecular biology techniques with pharmacological tools the functional we show the expression of α_6 subunit-containing GABA_A receptors in motoneurons, which mediate a tonic inhibitory current that modulates its excitability.

INTRODUCCIÓN

El ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, lleva a cabo su acción a través de la activación de dos clases de receptores ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y una clase de receptores metabotrópicos (GABA_B). Los receptores GABA_A son proteínas oligoméricas compuestas por cinco proteínas o subunidades, que forman un canal permeable a los iones de cloruro (Cl⁻) y bicarbonato (HCO₃⁻). Si bien se han identificado una gran diversidad de subunidades (6 α , 3 β , 3 γ , 3 ρ y una δ , ϵ , θ y π), los receptores GABA_A se conforman generalmente por dos subunidades α , dos β y una γ (Fig. 1). Esta última puede ser sustituida por cualquiera de las otras subunidades restantes (Lüscher & Kellera, 2004; Olsen & Sieghart, 2008).

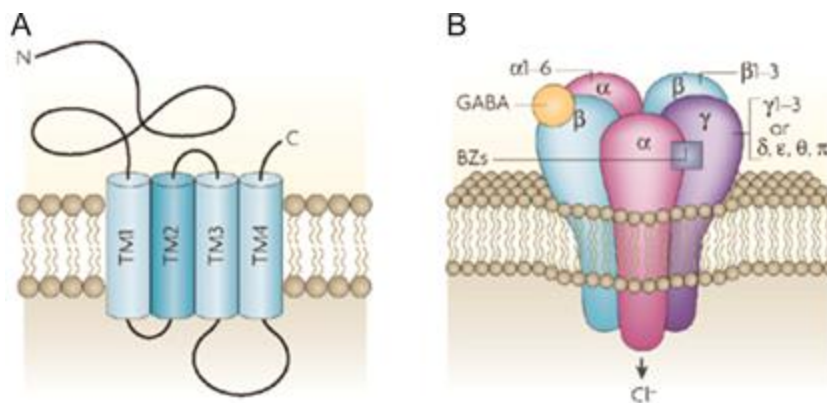


Figura 1. Estructura de los receptores GABA_A. A. Las subunidades de los receptores GABA_A constan de 4 dominios transmembranales (TM1-4), con un amino terminal extracelular que es el sitio de unión al GABA, y un dominio intracelular que es el sitio de unión a proteínas de anclaje y a modificaciones postraduccionales. B. Los receptores GABA_A están compuestos por cinco subunidades 2 α , 2 β y γ , que puede ser sustituida por cualquiera de las otras subunidades (δ , ϵ , θ y π). El sitio de unión al GABA se encuentra entre las subunidades α y β , mientras que el de las benzodiazepinas se localiza entre las subunidades α y γ . Tomado de Jacob *et al.*, 2008.

La gran diversidad de subunidades le confiere a los receptores GABA_A una gran diversidad de propiedades cinéticas y de afinidad por el GABA, y contribuye a determinar

su desensibilización, localización subcelular y perfil farmacológico (Farrant & Nusser, 2005; Mody & Pearce, 2004).

Receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos

Por su localización en las neuronas, los receptores GABA_A se dividen en dos tipos: los sinápticos, agrupados en el elemento postsináptico y que se caracterizan por contener principalmente las subunidades α_1 , α_2 o α_3 en asociación con la subunidad γ_2 ; y los peri o extrasinápticos localizados fuera de las sinapsis y que se conforman principalmente de las subunidades α_4 , α_5 o α_6 asociadas a γ_2 y δ ($\alpha_6\beta_x\delta$; $\alpha_4\beta_x\delta$; y $\alpha_5\beta_x\gamma_2$) (Farrant & Nusser, 2005; Murray *et al.*, 2008).

La función de los receptores GABA_A depende de su localización, de tal modo que la activación de los receptores GABA_A sinápticos genera una corriente fásica de Cl⁻ de corta duración (<100 ms), mientras que los receptores extrasinápticos producen una corriente de Cl⁻ tónica o sostenida (Fig. 2). La cinética de activación, inactivación y desensibilización de los receptores GABA_A, depende principalmente de las subunidades que los conforman, las cuales confieren propiedades farmacológicas diferentes (Olsen & Sieghart, 2008). En general, los receptores sinápticos presentan más baja afinidad por el GABA (EC₅₀ ~6-14 μ M) que los extrasinápticos (EC₅₀ ~0.3-0.7 μ M). Asimismo, ambos tipos de receptores responden de forma distinta a los antagonistas, por ejemplo, los receptores sinápticos se bloquean con bicuculina y picrotoxina a concentraciones <20 μ M y con gabazina a concentraciones <10 μ M, mientras que los extrasinápticos requieren concentraciones de bicuculina o picrotoxina de 100 μ M y de gabazina por arriba de 10 μ M (Farrant & Nusser, 2005).

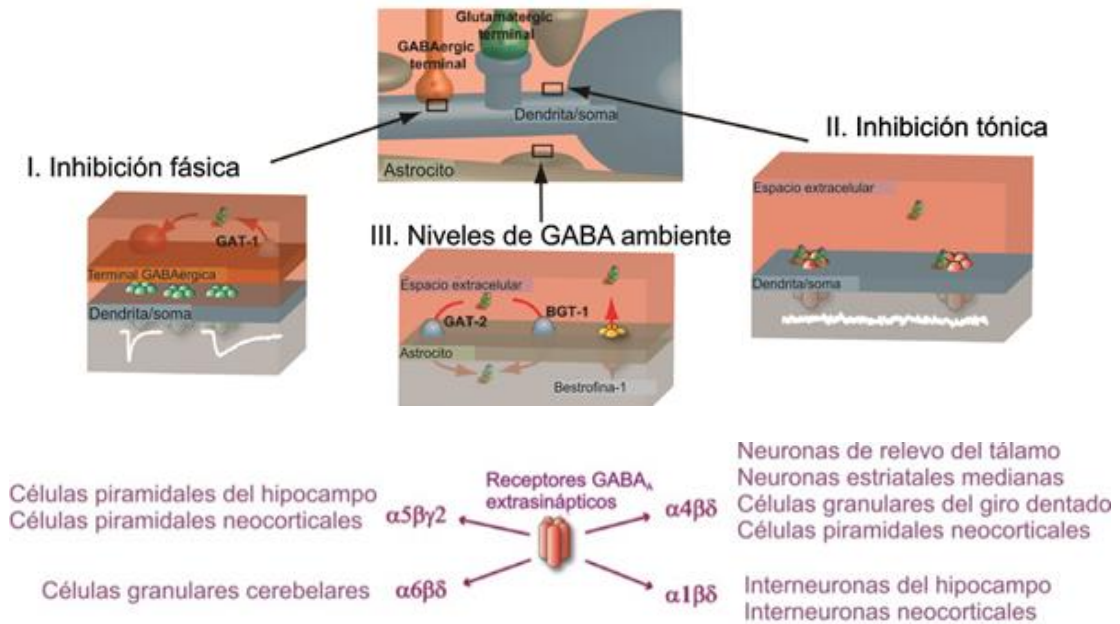


Figura 2. Inhibición fásica y tónica mediada por receptores GABA_A. I. La inhibición fásica se genera por la activación de los receptores sinápticos por el GABA liberado (1-10 mM) en la hendidura sináptica. II. La inhibición tónica se activa por el GABA que difunde fuera de la sinapsis o que podría ser liberado por inversión de los co-transportadores, lo cual genera una corriente sostenida. III. La apertura de estos receptores producen corrientes de rápida activación y corta duración (<100 ms). La baja sensibilidad al GABA y su rápida remoción del espacio extracelular, por los co-transportadores (BGT-1, GAT-1 y GAT-2) previene la desensibilización de los receptores GABA_A. El panel inferior muestra la diversidad molecular de los receptores GABA_A y su expresión diferencial en distintos tipos neuronales. Modificado de Brickley & Mody, 2012.

Se han identificado antagonistas y agonistas inversos específicos para algunas de las subunidades de los receptores GABA_A, como por ejemplo furosemida y L-655,708. La furosemida, además de ser un diurético de asa empleado a altas concentraciones (>1 mM) en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y el edema, tiene una afinidad 100 veces mayor por los receptores conformados por las subunidades α_{4/6} que por los que contienen la subunidad α₁. El L-655,708, un agonista inverso, bloquea la corriente tónica generada por los receptores α₅GABA_A en las neuronas del hipocampo y en las fibras

aferentes primarias (Farrant & Nusser, 2005; Loeza-Alcocer *et al.*, 2013; Delgado-Lezama *et al.*, 2013).

Mediante el empleo de la técnica de registro electrofisiológico en áreas restringidas de membrana, conocida también como *patch clamp*, en el modo de fijación de voltaje y con base en sus diferencias farmacológicas, se ha encontrado que la bicuculina ($>20 \mu\text{M}$) y la gabazina ($>20 \mu\text{M}$), además de bloquear las corrientes fásicas espontáneas, modifican la corriente de mantenimiento necesaria para fijar las células en un potencial de membrana predeterminado (Brickley *et al.*, 1996; Farrant & Nusser, 2005). Este cambio en la corriente de mantenimiento reveló la presencia de una inhibición tónica GABAérgica en neuronas del hipocampo, el tálamo, la corteza somatosensorial, el tallo cerebral y el cerebelo, asociada a un incremento persistente en la conductancia o un cortocircuito de la membrana (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). Los hallazgos reportados en las neuronas de los núcleos supraespinales muestran que una función de la corriente tónica GABAérgica es la modulación de la excitabilidad neuronal, la cual juega un papel relevante en el procesamiento sensorial y el funcionamiento de las redes neurales (Farrant & Nusser, 2005; Nusser & Mody, 2002).

En resumen, los receptores sinápticos que median la corriente fásica transmiten de forma rápida y precisa la información permitiendo la actividad oscilatoria de núcleos neuronales (Farrant & Nusser, 2005; Deidda *et al.*, 2014), y los receptores extrasinápticos, que median la corriente tónica, disminuyen la constante de tiempo y reducen la ventana temporal para la integración de la actividad sináptica (Bai *et al.*, 2001; Farrant & Nusser, 2005).

Expresión de las subunidades de los receptores GABA_A en la médula espinal

Por medio de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa acopladas a retrotranscripción (RT-PCR) y de hibridación *in situ*, se ha mostrado una expresión diferencial del ARNm de las diferentes subunidades de los receptores GABA_A en la médula espinal de la rata y el humano. Por ejemplo, la subunidad α_1 se expresa escasamente en las láminas VII y VIII; mientras que α_2 lo hace abundantemente en las motoneuronas y en las células de Renshaw. Por su parte α_3 se expresa ampliamente en las láminas II-VII y X y escasamente en las motoneuronas, mientras que α_5 se expresa escasamente en las motoneuronas y en las láminas II-VI pero moderadamente en las láminas VII y VIII. Las subunidades β_3 y γ_2 han sido encontradas en el asta ventral y en las motoneuronas, mientras que β_2 ha sido detectada en las láminas IV-VIII. La subunidad ϵ , al igual que α_4 , se expresan en las láminas VII, IX y X (Wisden *et al.*, 1991; Persohn *et al.*, 1991; Petri *et al.*, 2005; Ruano *et al.*, 2000, Delgado-Lezama *et al.*, 2013). Es importante mencionar que la expresión del ARNm que codifica para las subunidades δ y α_6 no ha sido reportada en la médula espinal.

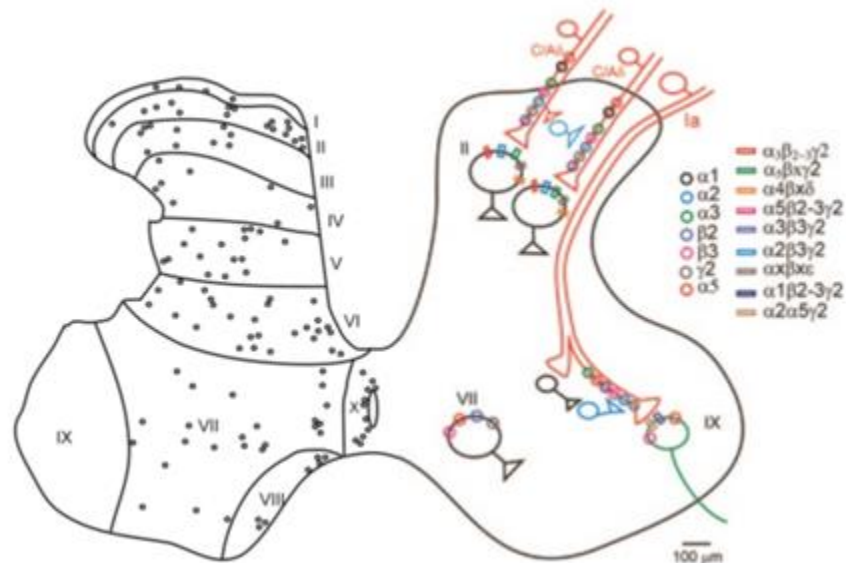


Figura 3. Representación esquemática de la distribución de las subunidades de los receptores GABA_A en la médula espinal. Del lado izquierdo se representa mediante círculos la localización de neuronas positivas a GAD, enzima que sintetiza GABA, en las láminas de Rexed (I-X). A la derecha, se muestra la distribución de las diferentes subunidades de los receptores al GABA. Modificado de Delgado-Lezama *et al.*, 2013 y de Loeza-Alcocer *et al.*, 2013.

El análisis de la expresión de las subunidades de los receptores GABA_A mediante inmunolocalización (Fig. 3), ha mostrado que las subunidades α y β se expresan en las láminas II-IV, VI-VIII y X en rata y en humano. Las subunidades β_{2-3} han sido encontradas en sitios sinápticos y extrasinápticos de dendritas y somas neuronales en las láminas II-VII (Álvarez *et al.*, 1996; Delgado-Lezama *et al.*, 2013), mientras que α_1 ha sido observada extrasinápticamente en las dendritas cercanas al área de las células de Renshaw (Geiman *et al.*, 2002; Delgado-Lezama *et al.*, 2013). La expresión de α_3 , β_{2-3} y γ_2 ha sido reportada en células del asta dorsal y ventral en la rata y en el humano (Álvarez *et al.*, 1996; Bohlhalter *et al.*, 1996). Asimismo, se ha reportado que la subunidad α_2 se expresa escasamente en todas las láminas y que la expresión de α_1 y α_5 se restringe a la lámina III (Bohlhalter *et al.*, 1996), mientras que α_6 lo hace en la lámina II y en las motoneuronas (Gutiérrez *et al.*, 1996; Betley *et al.*, 2009). Por último, la subunidad ϵ se ha localizado en las láminas VII, IX y X (Geiman *et al.*, 2002).

En resumen, con base en los niveles de expresión del ARNm, Bohlhalter y colaboradores (1996) sugirieron que en las motoneuronas podrían expresarse las subunidades α_2 , α_3 , β_3 y γ_2 ; mientras que por los niveles de proteína, las posibles combinaciones de receptores GABA_A propuestas para expresarse en la médula espinal son $\alpha_3\beta_{2-3}\gamma_2$, $\alpha_1\beta_{2-3}\gamma_2$ y $\alpha_5\beta_{2-3}\gamma_2$ y $\alpha_1\alpha_5\beta_{2-3}\gamma_2$ en las láminas III-VIII y X y $\alpha_2\gamma_2$ y $\alpha_2\alpha_5\gamma_2$ en las motoneuronas (Bohlhalter *et al.*, 1996).

Corriente tónica GABAérgica en la médula espinal

La primera evidencia sobre la participación del GABA como neurotransmisor en la médula espinal fue publicada por Curtis y colaboradores (1959), quienes mostraron que la aplicación del GABA en las motoneuronas reducía la magnitud de los potenciales antidrómicos, abolía los potenciales ortodrómicos y deprimía los potenciales excitadores e inhibidores postsinápticos (EPSPs e IPSPs, respectivamente) al disminuir su excitabilidad. Posteriormente se demostró la presencia funcional de los receptores GABA_A en las motoneuronas del gato (Cullheim & Kellerth, 1981; Rudomín *et al.*, 1990) y de la rata neonata (Jonas *et al.*, 1998), donde se registraron potenciales sinápticos inhibitorios resistentes a estricnina y sensibles a picrotoxina/bicuculina. Adicionalmente, en registros del reflejo monosináptico de la raíz ventral de la rana toro (Peng & Frank, 1989) y en registros intracelulares de motoneuronas de la médula espinal de la tortuga adulta (Delgado-Lezama *et al.*, 2004) se encontró que los receptores GABA_A participan en la inhibición de las motoneuronas.

Por otra parte, la primera evidencia de la presencia de una corriente tónica GABAérgica en la médula espinal fue reportada en 1989 por Yang & Zorumski, quienes usando neuronas embrionarias de pollo mostraron que al bloquear esta corriente se produce una despolarización. Este tipo de corriente tónica también ha sido registrada en neuronas de la sustancia gelatinosa de la médula espinal del mamífero (Ataka & Gu, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Fig. 4A). Con base en las propiedades farmacológicas y por la expresión del ARNm, se ha propuesto que los receptores GABA_A conformados por las subunidades $\alpha_5\beta_x\gamma_2$, $\alpha\beta_x\epsilon$ y $\alpha_4\beta_x\delta$, podrían estar mediando dicha corriente tónica (Takahashi *et al.*, 2006).

Al igual que en la sustancia gelatinosa, en interneuronas del asta ventral también se ha registrado una corriente tónica sensible a 100 μM de bicuculina. Sin embargo, los receptores no pudieron ser activados con el GABA ambiente, ni aun bloqueando sus transportadores (Grasshoff *et al.*, 2008). Por otra parte, Castro y colaboradores (2011a), mediante el registro de interneuronas premotoras en la tortuga adulta en presencia de GABA ambiental, encontraron que las corrientes sinápticas se bloquearon con un antagonista de los receptores glicinérgicos sin modificar la corriente de mantenimiento, mientras que al aplicar bicuculina 100 μM , se evidenció una corriente tónica GABAérgica insensible a furosemida pero sensible a L-655,708, agonista inverso de la subunidad α_5 de los receptores GABA_A (Fig. 4B).

Desde el punto de vista funcional, se ha reportado que los receptores GABA_A juegan un papel importante en los patrones estereotipados de la actividad locomotora, por ejemplo en el movimiento alternado (izquierda-derecha) y en el generador de ritmos, ya que el GABA participa en la modulación de la intensidad sináptica a nivel de las motoneuronas, por medio de la activación de receptores GABA_B y GABA_A presinápticos y postsinápticos (Delgado-Lezama *et al.*, 2013).

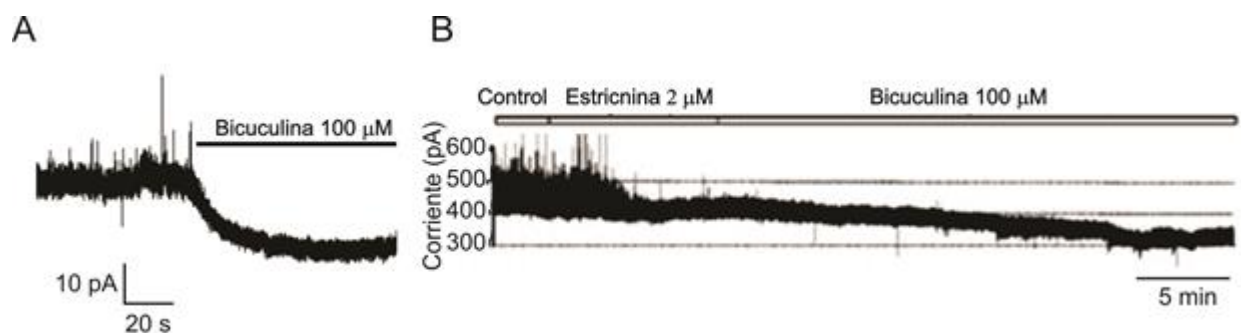


Figura 4. Inhibición tónica GABAérgica en neuronas de la médula espinal. A. Corriente de mantenimiento de una neurona de la sustancia gelatinosa fijada a -70 mV, en presencia de

bicuculina 100 μM se activó una corriente entrante de ~ 20 pA. B. Corriente de mantenimiento registrada en una neurona premotora de la médula espinal de tortuga, en Ringer control y en presencia de estriquina más bicuculina ($V_h = 0$ mV). Tomado de Takahashi *et al.*, 2006 y Castro *et al.*, 2011a.

Corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas

Las motoneuronas espinales, localizadas en las láminas IX en toda la longitud de la médula espinal, consideradas por Sherrington como “la vía final del sistema nervioso”, realizan una función crucial de traducir la actividad cerebral en diferentes tipos de comportamiento motor. Estas neuronas reciben información proveniente de núcleos supraespinales, receptores musculares y de neuronas propioespinales e interneuronas espinales, que procesan información de las vísceras, piel y músculo esquelético. Esta información, en mamíferos, es transmitida a las motoneuronas a través de ~ 5 a 14×10^4 botones sinápticos (Rekling *et al.*, 2000). Por lo relevante de su función, la excitabilidad de las motoneuronas debe estar finamente sintonizada para producir con precisión la actividad muscular coordinada en respuesta a estímulos externos e internos. Más aún, la estabilidad y función de los circuitos de la médula espinal dependen del balance entre la excitación y la inhibición, que es mediada por neuronas glicinérgicas y GABAérgicas y que cubren $\sim 70\%$ de la membrana del soma y dendritas proximales de la motoneurona (Ornung *et al.*, 1998).

Considerando la expresión y el efecto inhibitorio de los receptores GABA_A en las motoneuronas maduras, resulta razonable preguntarse si los dos tipos de receptores GABA_A sensibles a diferentes concentraciones de sus antagonistas pueden coexistir en estas neuronas. Las primeras evidencias que se publicaron sobre la posible activación tónica de los receptores GABA_A en las motoneuronas de tortuga se obtuvieron por medio de registros intracelulares y extracelulares, en donde se reportó la facilitación de los EPSPs en

presencia de bicuculina 40 μM (Delgado-Lezama *et al.*, 2004; Fig. 5A) y del reflejo monosináptico al aplicar picrotoxina y bicuculina 100 μM (Bautista *et al.*, 2010).

Otra evidencia de la activación tónica GABAérgica en las motoneuronas fue aportada por Castro y colaboradores (2011b) mediante registros intracelulares. Estos autores estudiaron la acción de bicuculina (20 y 100 μM) sobre la resistencia de entrada y los EPSPs monosinápticos en presencia de muscimol, un agonista de los receptores GABA_A y mostraron que el muscimol reduce la resistencia de entrada en 58% y la amplitud de los EPSPs en 32%. En estas condiciones, la aplicación de bicuculina 20 μM revirtió parcialmente el efecto producido por el muscimol y lo hizo totalmente cuando se incrementó la concentración del antagonista a 100 μM . Estos datos concuerdan con los reportados en estudios previos en neuronas de los núcleos supraespinales, donde se sabe que la inhibición tónica GABAérgica se bloquea con altas concentraciones de bicuculina o picrotoxina (Farrant & Nusser, 2005). La aplicación de bicuculina 100 μM incrementó la amplitud de los EPSPs así como la resistencia de entrada de las motoneuronas, lo que llevó a concluir que los receptores GABA_A se podrían encontrar tónicamente activos por el GABA del medio extracelular (Fig. 5B; Castro *et al.*, 2011b).

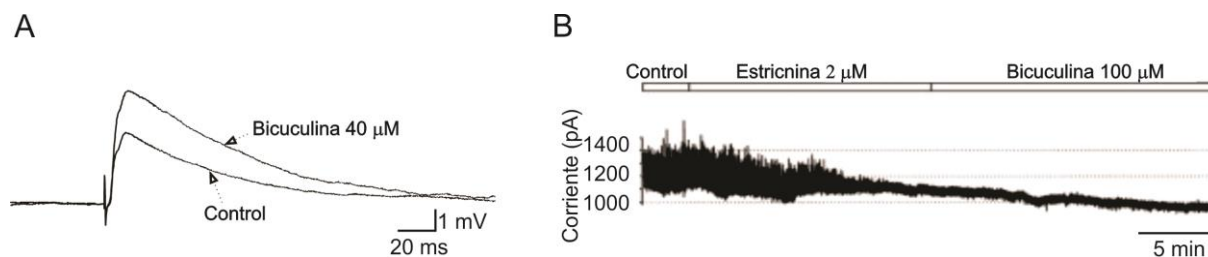


Figura 5. Inhibición tónica GABAérgica en las motoneuronas. Potencial monosináptico excitador evocado por estimulación del funículo dorso lateral, registrado en una motoneurona en Ringer control y en presencia de bicuculina 40 μM . Corriente de mantenimiento registrada en una motoneurona fijada a 0 mV en Ringer control y en

presencia de estricnina más bicuculina. Tomado de Delgado-Lezama *et al.*, 2004 y Castro *et al.*, 2011b.

La demostración de la presencia de la corriente tónica mediada por receptores GABA_A en las motoneuronas, al igual que en las neuronas de los núcleos supraespinales, se realizó empleando la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa. De este modo, fijando la motoneurona a 0 mV, se encontró que la corriente de mantenimiento no se modificó al aplicar bicuculina a una concentración de 20 μ M pero sí se disminuyó la corriente de mantenimiento en 110 ± 19 pA cuando se aplicó bicuculina a una concentración de 100 μ M, (Fig. 4B). Este resultado mostró por primera vez la presencia de una inhibición tónica GABAérgica en las motoneuronas, que podría estar modulando su excitabilidad (Castro *et al.*, 2011b).

Subunidad α que forman los receptores GABA_A en las motoneuronas

Si bien en los trabajos recién mencionados quedó demostrado que los receptores GABA_A son tónicamente activados en las motoneuronas, aún faltaba por averiguar qué subunidades podrían estar conformando a estos receptores. Estudiando la modulación del reflejo monosináptico (RMS) en la médula espinal de la tortuga, Bautista y colaboradores (2010) observaron que en presencia de furosemida (200 μ M), antagonista de los receptores GABA_A conformados por las subunidades $\alpha_{4/6}$ (Korpi *et al.*, 1995; Hamann & Rossi., 2002; Nusser & Mody, 2002; Wall, 2003; Glykys & Mody, 2007a), el RMS se facilitó sin afectar el potencial de la raíz dorsal (Fig. 6), el cual está mediado principalmente por la activación de receptores GABA_A. Este resultado le sugirió a los autores que muy probablemente la facilitación del RMS se produjo por un bloqueo de receptores GABA_A

conformados con las subunidades $\alpha_{4/6}$ localizados en las motoneuronas (Bautista *et al.*, 2010).

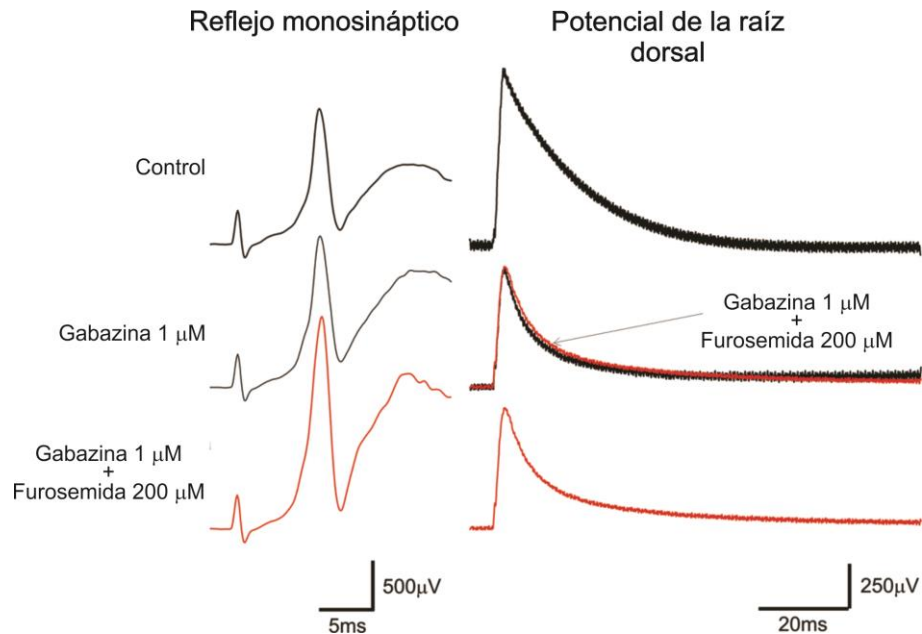


Figura 6. Facilitación del reflejo monosináptico (RMS) por bloqueo de los receptores α_6 GABA_A. Al aplicar gabazina 1 μ M, concentración que bloquea solo a las corrientes sinápticas, el reflejo monosináptico (columna de trazos de la izquierda) no se modificó significativamente, pero si el potencial de la raíz dorsal (columna de trazos de la derecha) mediado por activación de receptores GABA_A (trazo intermedio). La aplicación subsiguiente de furosemida produjo una facilitación del RMS sin afectar el potencial de la raíz dorsal (trazos inferiores). Tomado de Bautista *et al.*, 2010.

Partiendo de estos datos, en mi tesis de Maestría demostré, mediante ensayos de inmunohistoquímica que la subunidad α_6 de los receptores GABA_A está presente en neuronas del asta ventral, tanto en el soma como en las dendritas. Adicionalmente, por medio de registros intracelulares de las motoneuronas en el modo de fijación de corriente, la adición de furosemida (200 μ M) incrementó la resistencia de entrada en $\sim 73.4\%$ ($n=8$) y redujo en $\sim 38\%$ el umbral para evocar un potencial de acción ($n=6$). Debido a que este efecto fue similar al reportado en neuronas granulares de la corteza cerebelosa en presencia

de 500 μM de gabazina y 100 μM de furosemida (Chadderton *et al.*, 2004; Hamann *et al.*, 2003), concluí que los receptores GABA_A conformados por la subunidad α_6 podrían estar mediando la corriente tónica GABAérgica previamente observada en las motoneuronas por Castro y sus colaboradores (2011b). Por otro lado, en otra serie de experimentos encontré que la furosemida no incrementaba la resistencia de entrada en algunas células, lo que podría deberse a que la subunidad α_6 está siendo expresada de manera diferencial en subpoblaciones de motoneuronas que inervan diferentes tipos de músculos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Conociendo que las motoneuronas presentan una corriente tónica mediada por receptores GABA_A y que muy probablemente expresen receptores conformados por las subunidades $\alpha_{4/6}$ que están modulando su excitabilidad, en el presente trabajo de tesis me propuse demostrar que la subunidad que conforma los receptores GABA_A que median la corriente tónica en las motoneuronas es la α_6 .

HIPÓTESIS

Los receptores GABA_A que contienen las subunidades $\alpha_{4/6}$ se expresan, median la corriente tónica y regulan la excitabilidad de las motoneuronas.

OBJETIVO GENERAL

La intención primordial de los experimentos desarrollados en este trabajo fue el investigar por medio de técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica, electrofisiología y herramientas farmacológicas la expresión y función de las subunidad α_6 de los receptores GABA_A en las motoneuronas de la médula espinal de la tortuga.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Investigar la expresión de las subunidad α_6 (y otras que pudieran formar parte de los receptores extrasinápticos como α_4 y δ) en la médula espinal mediante las técnicas de *RT-PCR* y de *Western blot* usando a la tortuga como sistema modelo.
- Determinar la presencia y localización celular de los receptores que contienen dichas subunidades en las motoneuronas usando inmunohistoquímica y microscopía confocal.
- Evaluar empleando la técnica de *patch clamp* visualizado en la configuración de célula completa la participación de los receptores GABA_A, constituidos por las subunidades $\alpha_{4/6}$ en la corriente tónica de las motoneuronas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación biológica

Para realizar los experimentos se utilizaron 15 tortugas juveniles y 30 tortugas adultas del género *Trachemys scripta* con una longitud del caparazón de 9 a 12 cm y de 20 a 30 cm, respectivamente. Para los ensayos moleculares y registros intracelulares se emplearon tortugas adultas, mientras que para los registros de *patch clamp* se usaron tortugas juveniles y adultas. Para realizar los experimentos, las tortugas se anestesiaron con pentobarbital sódico (100 mg/Kg, vía i.p.) y se perfundieron con una solución Ringer que contiene (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 15 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 3 CaCl₂ y 20 glucosa, saturada con 98% de O₂ y 2% de CO₂ (pH 7.5). El engrosamiento lumbar de la médula espinal se extrajo realizando una laminectomía. Dependiendo del protocolo a seguir, el tejido se homogenizó o se cortaron rebanadas transversales.

Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El ácido ribonucleico (ARN) total se aisló del engrosamiento lumbar de la médula espinal de la tortuga usando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante, mientras que el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se sintetizó por retrotranscripción usando muestras de ARN (5 µg) con 3 µl de *random primers* (50 ng/µl) y 1 µl de la enzima M-MLV RT (200 U; Invitrogen) en 20 µl de mezcla a 37°C por 50 min.

En las reacciones de PCR se emplearon oligonucleótidos específicos para la amplificación de las subunidades α_4 , α_6 y δ de los receptores GABA_A. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador de PCR (Thermo Fisher Scientific) empleando el paquete comercial *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) en un volumen de 50 µl

que contenía 5 µl de ADNc; 1x PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4); 0.2 mM de la mezcla de dNTP; 1.5 mM de MgCl₂; 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos para amplificar las subunidades α_4 , α_6 y δ ; y 2.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo con el siguiente protocolo: 94°C por 5 min (1 ciclo), 94°C por 45 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min (30 ciclos), 72°C por 10 min (1 ciclo). Como control positivo, se usaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de actina. Finalmente, los productos de la PCR se purificaron empleando el paquete comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) y se enviaron a secuenciación automática al Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-IPN.

Inmunoelectrotransferencia (*Western blot*)

Para extraer las proteínas del segmento lumbar de la médula espinal de la tortuga se utilizó un amortiguador de lisis que contenía 50 mM de Tris-Cl (pH 8), 150 mM de NaCl, 1% de Tritón X-100, 0.5 mM de PMSF (Sigma) y 1x de Complete (Roche Applied Science). Para la remoción de los detritos celulares se centrifugó el lisado a 12,000 x g por 2 min. La concentración proteica se determinó usando la prueba del ácido bicinonínico. En un volumen de 24 µl se mezclaron 30 µg de proteínas de la médula espinal de tortuga con el amortiguador de carga proteica 1x (1.7% de SDS, 0.1 M de 2-mercaptoetanol, 5% de glicerol, 58 mM de Tris-HCl, 0.002% de azul bromofenol, pH 6.8) y se calentaron por 5 min a 93°C. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

Después de bloquear con leche en polvo libre de grasa al 8% disuelta en TBS Tween 20 al 1% (100 mM de Tris-HCl, 0.9% w/v de NaCl, 0.2% de Tween 20, pH 7.5), las

membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios contra α_6 (1:200; Sigma), α_4 (1:200, Sigma) y δ (1:500, Sigma), disueltos en la solución bloqueadora. Posteriormente, las membranas se lavaron cada 10 min con TBS Tween 20 al 1% e incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (1:10,000; Jackson Immuno Research) diluido en la solución de bloqueo por 1 h. Posteriormente se lavó 3 veces cada 10 min con TBS Tween 20 al 1%. Para la detección de las proteínas, la membrana se trató con un sustrato quimioluminiscente (Immobilon Western; Millipore). Finalmente, la membrana se expuso y reveló por autoradiografía en película fotográfica (Kodak).

Inmunohistoquímica en rebanadas de médula espinal

En un criostato se cortaron rebanadas transversales de 30 μm de espesor del engrosamiento lumbar de la médula espinal de la tortuga adulta. Después de permeabilizar con PBS-Tritón X-100 al 0.3% durante 15 min, las rebanadas se lavaron con PBS e incubaron con gelatina al 1% y suero fetal bovino (SFB) al 10% durante 30 min para bloquear el marcaje inespecífico. Las rebanadas se incubaron por libre flotación con el anticuerpo primario anti colina acetil transferasa (ChAT, por sus siglas en inglés) durante 24 h a 4°C. Posteriormente, el tejido se lavó 3 veces con PBS-Tritón X-100 al 0.3% y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, se bloqueó nuevamente con gelatina al 1% y SFB al 10% durante 30 min y se incubó con el anticuerpo primario anti- α_6 durante 2 h a temperatura ambiente, y con el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína por 2 h

también a temperatura ambiente. Finalmente, las rebanadas se lavaron 6 veces con PBS-Tritón X-100 al 0.3% y se montaron en *vecta-shield* para su análisis posterior.

La localización de la subunidad α_6 del receptor GABA_A en la médula espinal se realizó empleando un anticuerpo primario anti- α_6 originado en conejo, usado a una dilución de 1:50. Para la localización de las motoneuronas se usó un anticuerpo primario anti-ChAT originado en cabra a una dilución de 1:50. Para visualizar la subunidad α_6 y ChAT se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína anti-conejo originado en cabra a una dilución de 1:50 y anti-cabra originado en burro a una dilución de 1:200, respectivamente. Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se disolvieron en una solución PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 2%, Tritón X-100 al 0.1% y SFB al 5%.

La distribución regional de la subunidad α_6 del receptor GABA_A se visualizó mediante el uso de un microscopio confocal laser (TCP-SP5, Leica), empleando un objetivo de 20x y uno 40x de inmersión en aceite con proyección Neo Fluor 63 (NA: 1.4). Las imágenes se procesaron con el programa LAS AF Versión: 2.1.1 (Leica Microsystems). El mismo procedimiento se realizó para las subunidades α_4 y δ , con la diferencia que las imágenes se observaron empleando un microscopio de epifluorescencia invertido (Axio Observer D1, Zeiss).

Registro intracelular de las motoneuronas

Como se menciona en la Introducción del presente trabajo de tesis, durante mi trabajo de Maestría realicé registros intracelulares de motoneuronas en fijación de corriente en ausencia y en presencia de furosemida, que tuvieron como fin evaluar el papel de los

receptores GABA_A conformados por las subunidades $\alpha_{4/6}$, sobre la resistencia de entrada y la excitabilidad de las motoneuronas. Encontré dos grupos de motoneuronas, uno sensible a furosemida y otro insensible. Por lo tanto, para determinar si la acción de furosemida pudiera estar correlacionada con la resistencia de entrada, que es un referente del tamaño de la neurona y por consiguiente del tipo de músculo que estaría inervando, en el presente trabajo incrementé el número de neuronas registradas intracelularmente en presencia de furosemida.

Los detalles técnicos del registro intracelular pueden ser consultados en mi tesis de Maestría (Andrés, 2010). Brevemente, los registros se realizaron empleando microelectrodos con resistencias de 30-40 M Ω . La resistencia de entrada de las neuronas se evaluó en el modo de fijación de corriente, aplicando pulsos de corriente subumbrales con una duración de 500 ms. La corriente aplicada se graficó en función del cambio de voltaje producido, y tras un ajuste lineal de los datos se obtuvo el valor de la pendiente que es igual a la resistencia de entrada. La rebase y la descarga de potenciales de acción se determinaron aplicando pulsos de corriente umbral y supraumbral con 10 s de duración. La excitabilidad se evaluó graficando la corriente supraumbral contra el número de potenciales de acción producidos. Las variables mencionadas se evaluaron registrando las neuronas en solución Ringer control y en presencia de furosemida (200 μ M).

***Patch clamp* visualizado de las motoneuronas**

La corriente tónica en las motoneuronas se registró con la técnica de *patch clamp* visualizado en la configuración de célula completa y en fijación de voltaje. Empleando un vibratomo (Microm HM650V) se cortaron rebanas transversales del engrosamiento lumbar

de la médula espinal con un espesor de 250 μm . El tejido se colocó en la cámara de registro y se perfundió con solución Ringer control. Se emplearon pipetas de borosilicato de pared gruesa llenas con una solución con la siguiente composición (en mM): CsCl 122, Na₂-ATP 5, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 0.003, EGTA 1, gluconato-Mg 5.6, HEPES-K 5, HEPES-H 5 (pH 7.4).

Para visualizar las neuronas, se empleó un microscopio Olympus (BX51WI) equipado con una cámara digital (DMK 41BU02, Imaging Source), conectada a una computadora donde se almacenaron las imágenes de las neuronas estudiadas. La fijación de voltaje y el registro de la corriente se realizó empleando un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices) conectado a una tarjeta digitalizadora Digidata 1440A (Molecular Devices).

Los protocolos de estimulación y registro se realizaron empleando el programa pClamp (Molecular Devices). Las neuronas que presentaron un cambio en el porcentaje de resistencia de acceso mayor al 20% al final de las maniobras experimentales se descartaron. Las señales registradas se digitalizaron a 20 KHz y fueron filtradas con un filtro pasa bajas de 8-polos Bessel (2 KHz) y se almacenaron en un disco duro para su análisis posterior.

Las motoneuronas registradas en fijación de corriente se clasificaron siguiendo algunos de los criterios reportados previamente: patrón típico de adaptación temprano y tardío de la descarga de potenciales de acción, amplitud pico a pico del potencial de acción de 90-100 mV seguido por una fase de posthiperpolarización rápida y una lenta, la duración del potencial de acción de 0.9-1.2 ms medidos a 10 mV por arriba del umbral de disparo (Hounsgaard *et al.*, 1988; Delgado-Lezama *et al.*, 2004).

Fármacos empleados

Todos los registros intracelulares y de *patch clamp* se realizaron en presencia de 6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2,3-diona (CNQX; 20 μM , antagonista de los receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato), ácido 2-amino-5-fosfono valérico (APV; 20 μM , antagonista de los receptores glutamatérgicos NMDA) y estriquina (2 μM , antagonista de los receptores glicinérgicos). Los valores de referencia fueron tomados usando esta mezcla de antagonistas por lo que me refiero a esta solución a lo largo de la tesis con el término “Ringer control”.

Una vez que se obtuvieron los registros de las neuronas con la técnica de *patch clamp* en la modalidad de fijación de corriente se determinó la resistencia de entrada inicial y la frecuencia de disparo de potenciales de acción. A continuación se cambió a fijación de voltaje y se aplicaron al baño los agonistas de los receptores GABA_A, muscimol (5 μM) o GABA (10-40 μM). En otra serie de experimentos, para determinar la participación de los receptores GABA_A con la subunidad $\alpha_{4/6}$ en la corriente tónica se emplearon los antagonistas de los receptores GABA_A furosemida (200 μM) y picrotoxina (PTX 100 μM). Todos los fármacos se adquirieron de la compañía Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Análisis estadístico

Para determinar la presencia de corriente tónica en las motoneuronas, se realizaron histogramas de 5 a 30×10^4 valores de corriente registrados durante 5 o 30 s, en condición control y en presencia de un agonista o antagonistas de los receptores GABA_A. A cada histograma, se le ajustó una distribución de Gauss para obtener el valor de la corriente media. Empleando el paquete estadístico OriginPro 8, se analizó la diferencia de los

cambios de corriente media para cada condición experimental utilizando las pruebas de *Kolmogorov-Smirnov* con una $p < 0.05$. Además, los datos se sometieron a la prueba estadística de rangos con signo de Wilcoxon, considerándose las medias estadísticamente diferentes cuando $p < 0.05$. Finalmente, los valores se presentan como las medias \pm los errores estándar.

Análisis de la fluorescencia en las rebanadas de la médula espinal

A partir de las proyecciones máximas de los inmunomarcajes, se determinó la intensidad de fluorescencia de las neuronas positivas a ChAT y a la subunidad α_6 utilizando el programa ImageJ 1.48s (NIH, EUA). En un área de 712 píxeles se evaluó la fluorescencia celular total (FCT) aplicando la siguiente fórmula:

$$FCT = \frac{(I_{\alpha_6} - I_{bk1})}{(I_{ChAT} - I_{bk2})}$$

donde,

I_{α_6} = intensidad de la fluorescencia de la subunidad α_6 de los receptores GABA_A.

I_{ChAT} = intensidad de la fluorescencia de ChAT.

I_{bk1} y I_{bk2} = fluorescencia de fondo de la subunidad α_6 y ChAT.

Partiendo de un valor de corte de 1, aquellas neuronas con valores menores se consideraron como células que presentaban una baja inmunotinción a α_6 ; por el contrario, si los valores eran mayores a 1, entonces se consideró que las células presentaban un marcaje alto. El valor medio de la FCT se comparó mediante la prueba estadística *Kolmogorov-Smirnov* con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Expresión de la subunidad α_6 GABA_A en la médula espinal de la tortuga

Dado que las secuencias para las subunidades de los receptores GABA_A que se expresan en la tortuga no han sido aún reportadas, inicialmente y con el fin de investigar la expresión de la subunidad α_6 GABA_A se diseñaron oligonucleótidos específicos (sentido 5'-TATACGTGGAAAAAAGGACC-3' y antisentido 5'-CTGATGCTCAAAGTGGTCAT-3') para ser usados en experimentos de *RT-PCR*, basándose en secuencias conservadas previamente reportadas para otras especies como pez cebra, vaca, caballo, chimpancé, macaco, ratón, rata, gallo y humano. Con estos oligonucleótidos específicos se logró detectar una banda con el tamaño esperado (~300 pb) en el cerebro de rata usado como control positivo, así como en la médula espinal y cerebelo de la tortuga (Figura. 7A).

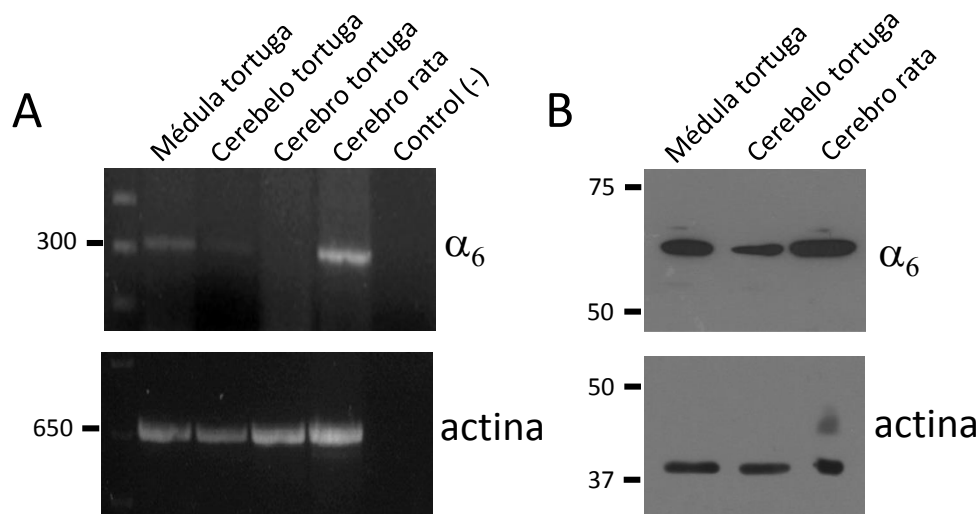


Figura 7. Expresión de la subunidad α_6 de los receptores GABA_A. A. Análisis de la expresión del ADNc de la subunidad α_6 en la médula espinal y en el cerebelo de la tortuga realizado por la técnica de *RT-PCR*. El ARN total del cerebro de rata se usó como control

positivo, mientras que la amplificación de actina (650 pb) se usó como control interno. B. *Western blot* representativo en el que se muestra la expresión a nivel de la subunidad α_6 (~58 kDa) de los receptores GABA_A. En este caso el extracto total de proteínas del cerebro de rata se utilizó como control positivo.

Para confirmar la identidad del fragmento amplificado, se cortó la banda conteniendo al producto de la reacción de PCR del gel, se purificó y se envió a secuenciar. El análisis bioinformático de la secuencia amplificada a partir de la médula espinal de la tortuga indica que existe un alto grado de identidad (~96%) con respecto a la secuencia consenso (Fig. 8).

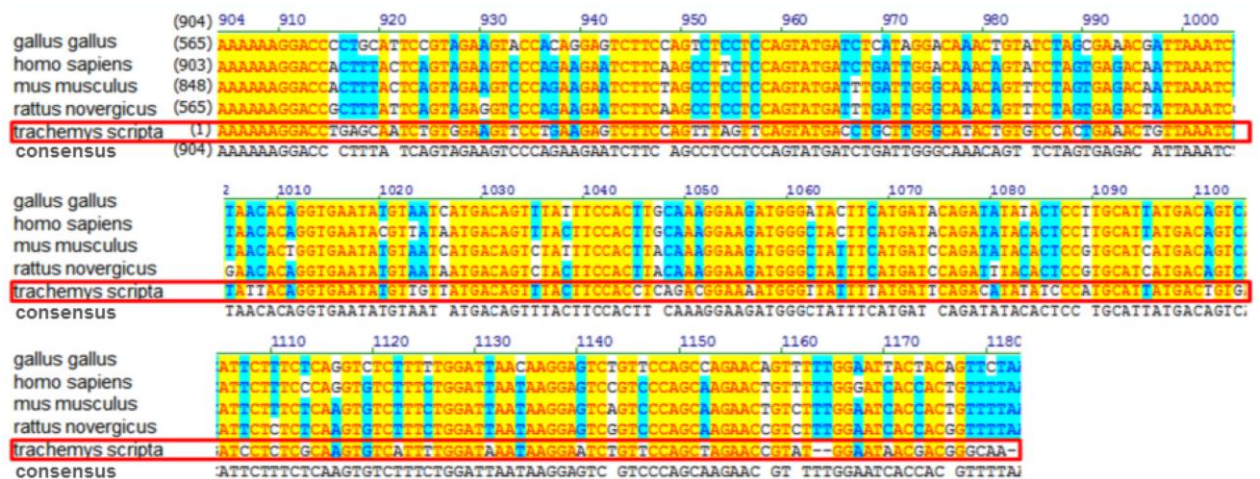


Figura 8. Alineamiento de la secuencia del producto amplificado por PCR para la subunidad α_6 proveniente de la médula espinal de la tortuga con la misma región en otras especies. En las cajas amarillas se muestra las secuencias conservadas tras el alineamiento de los nucleótidos con las secuencias del gallo (*gallus gallus*), del humano (*homo sapiens*), del ratón (*mus musculus*) de la rata (*rattus norvegicus*), de la tortuga (*trachemys scripta*) y la secuencia consenso (*consensus*).

Además de verificar que el ARNm de la subunidad α_6 se expresaba en la médula espinal de la tortuga mediante secuenciación y alineamiento, también se investigó la

presencia de la proteína. Usando un anticuerpo dirigido contra la subunidad α_6 se realizaron ensayos de *Western blot*. El resultado de estos experimentos muestra que en las proteínas extraídas de la médula espinal y del cerebelo de la tortuga, el anticuerpo reconoce una proteína con un peso molecular de ~58 kDa, que coincide con el peso esperado para la subunidad α_6 de los receptores GABA_A y con una proteína identificada en el cerebro de ratón que se empleó como control positivo (Fig. 7B). En resumen, estos resultados indican que la subunidad α_6 se expresa en la médula espinal y en el cerebelo de la tortuga adulta.

Inmunolocalización de la subunidad α_6 en las motoneuronas

Una vez que se determinó que la subunidad α_6 se expresaba tanto en la médula espinal como en el cerebelo de la tortuga adulta, a continuación se decidió estudiar su distribución celular con la técnica de inmunofluorescencia confocal. Como se observa en la figura 9A, la señal específica para los receptores GABA_A que contienen la subunidad α_6 se encuentra presente en la asta ventral, distribuida en el soma de neuronas y en regiones que muy probablemente corresponden a su árbol dendrítico.

Para determinar si esta subunidad podría encontrarse específicamente en las motoneuronas, en esta misma preparación se realizó un marcaje contra la enzima colina acetil transferasa (ChAT), marcador específico de éste tipo celular (Fig. 9B). Al realizar la sobreposición de ambas imágenes se observó que la inmunoreactividad para los receptores GABA_A que contienen la subunidad α_6 se encuentra en el soma de las motoneuronas y en sus extensiones neuronales (Figs. 9A, B y 9D).

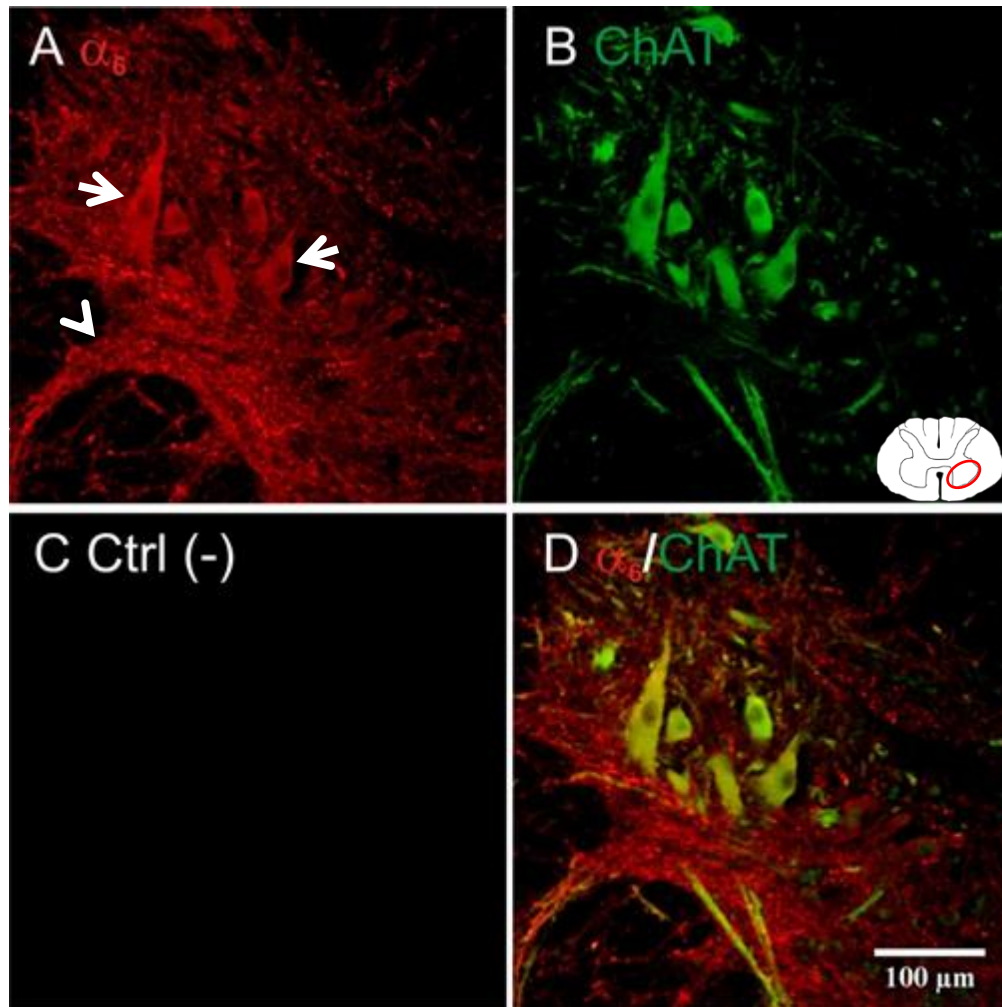


Figura 9. Inmunolocalización de la subunidad α_6 en las motoneuronas. A. Marcaje de la subunidad α_6 en los somas de las motoneuronas (flecha) y en lo que probablemente sean sus dendritas (punta de flecha). B. Marcaje de las motoneuronas con el anticuerpo contra la colina cetil transferasa (ChAT) en el asta ventral (círculo rojo). C. Control negativo en ausencia de los anticuerpos primario para ChAT. D. Sobreposición de las imágenes A y B; la presencia del color amarillo/naranja sugiere la presencia de la subunidad α_6 en las motoneuronas. Cortes ópticos de 3 μm .

Aun cuando se observó una amplia distribución de la señal para la subunidad α_6 , se encontró que algunas motoneuronas no presentaban claramente una marca específica para la proteína (Fig. 10). Esta observación se correlaciona con los registros electrofisiológicos publicados en mi tesis de Maestría donde se muestran algunas células que no respondieron

al efecto de la furosemida (Andrés, 2010). Tomados en su conjunto, los datos aquí mostrados sugieren que no todas las motoneuronas expresan la subunidad α_6 de los receptores GABA_A, sin embargo se requieren experimentos adicionales para poner a prueba esta hipótesis.

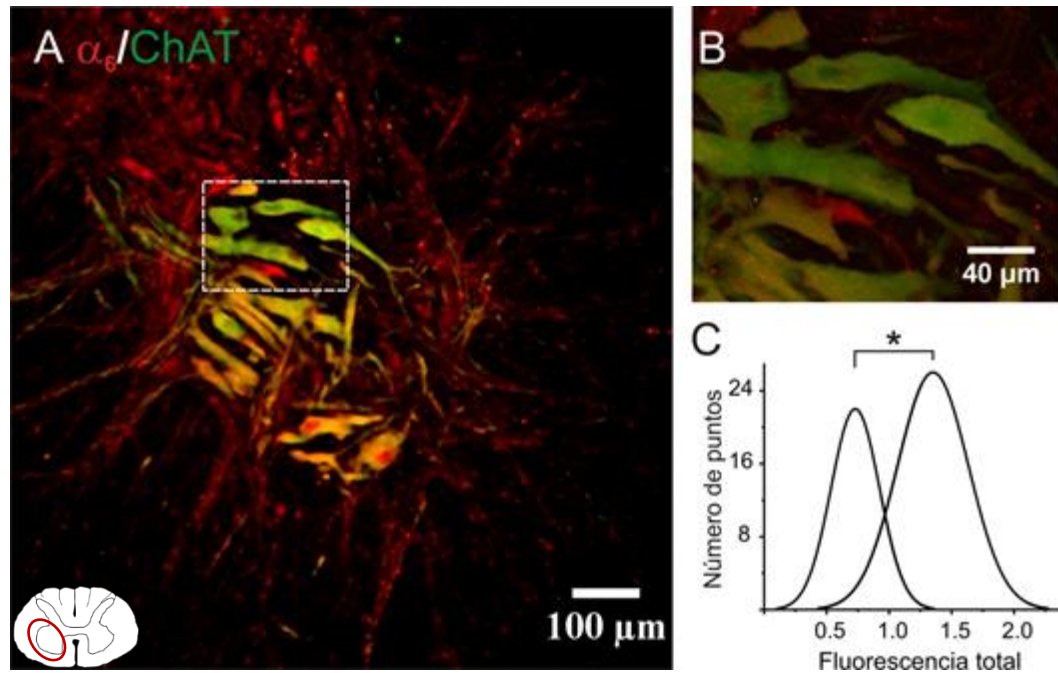


Figura 10. Distribución diferencial de la subunidad α_6 en un conjunto de motoneuronas. A. La subunidad α_6 (rojo) se distribuye ampliamente en el asta ventral (círculo rojo), sin embargo en la sobreposición se observa que algunas motoneuronas no muestran una clara expresión de la subunidad (B). C. El análisis de intensidad de fluorescencia sugiere la presencia de una población de motoneuronas expresan un nivel bajo de la subunidad α_6 . Proyección máxima. Prueba de *Kolmogorov-Smirnov* ($n=222$) con una $p < 0.001$.

Expresión de las subunidades α_4 y δ

Con el objetivo de determinar si las subunidades α_4 y δ , que también se ha reportado participan en la formación de los receptores GABA_A extrasinápticos, se expresan en la médula espinal de la tortuga adulta, se diseñaron oligonucleótidos específicos para

amplificar por *RT-PCR* los transcritos de dichas subunidades. Para el caso de la subunidad α_4 , el oligonucleótido sentido empleado fue 5'-GATACTTTCTTCAGGAATGG-3' y el antisentido 5'- GTTGTTATTCCAAATACAGT-3'. Para tratar de amplificar la subunidad δ el oligonucleótido sentido empleado fue 5'-AGCCGCTTCGTGGACAAGCT-3' mientras que el antisentido fue 5'- GCGGACTTGAAGTTCATCAG-3'. Estos oligonucleótidos se diseñaron con base en secuencias conservadas en pez cebra, ratón, rata, gallo rojo, toro y humano, y con ellos se intentó la amplificación de los transcritos correspondientes tanto en la médula espinal de la tortuga como en el cerebro de rata, que se usó como control positivo. Como se muestra en la Fig. 11, en las condiciones experimentales empleadas no fueron identificados los transcritos de estas subunidades (α_4 y δ) en la médula espinal, el cerebelo y el cerebro de la tortuga.

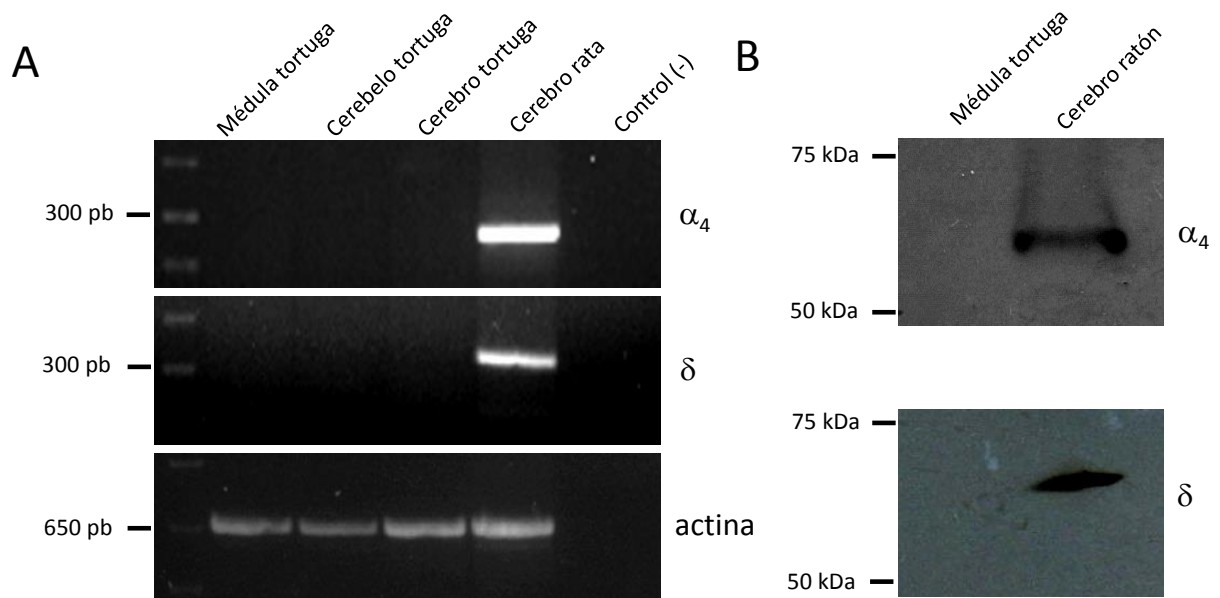


Figura 11. Estudio de la expresión de las subunidades α_4 y δ de los receptores GABA_A. A. Productos de *RT-PCR* en la médula espinal, el cerebelo y el cerebro de tortuga, así como del cerebro de rata, usado como control positivo. La amplificación del gen de actina se usó como control interno de la reacción. B. Expresión de las subunidades α_4 y δ , determinada por *Western blot* en la médula espinal de la tortuga y el cerebro del ratón según se indica.

Adicionalmente, al buscar la expresión de las subunidades α_4 y δ por medio de anticuerpos, se pudo detectar una señal para proteínas con el peso esperado (~64 y ~62 KDa, respectivamente) en el cerebro de ratón, pero no en la médula espinal de la tortuga (Fig. 10B). La expresión de las subunidades α_4 y δ también se investigó mediante inmunohistoquímica y empleando los mismos anticuerpos que en los experimentos de inmunoelectrotransferencia no fue posible identificar la señal específica para ninguna de estas subunidades (Fig. 12).

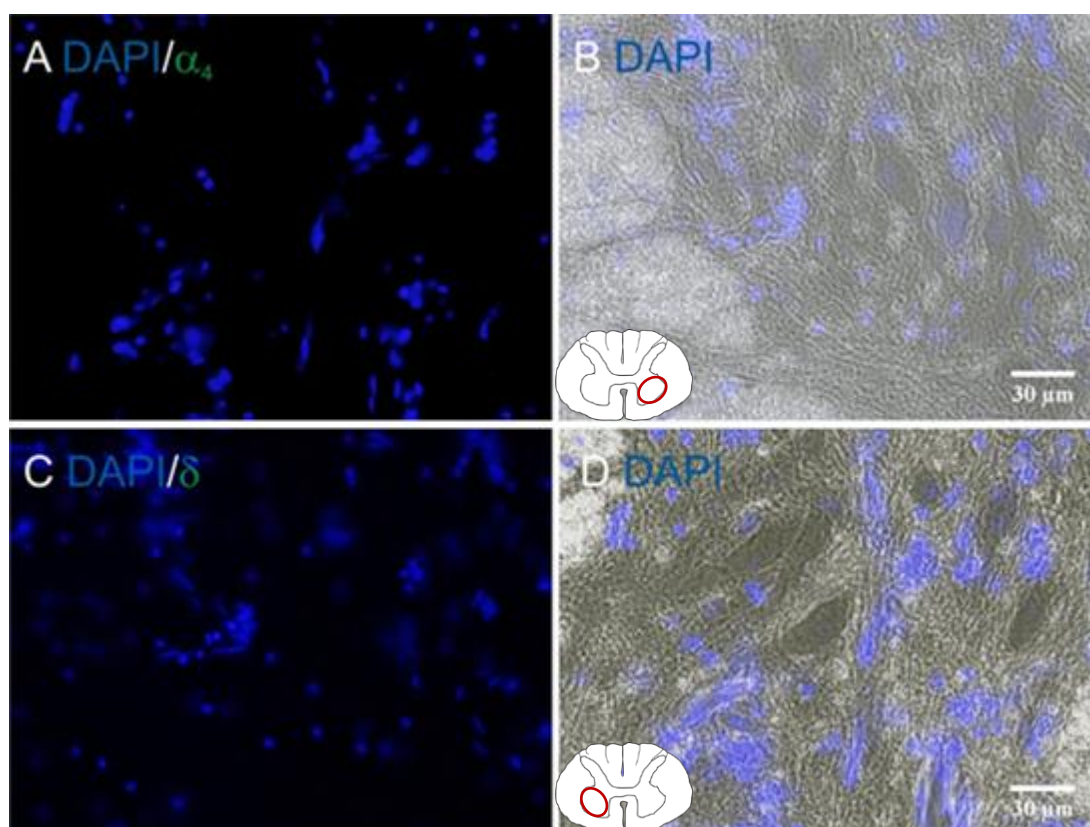


Figura 12. Imágenes de epifluorescencia del asta ventral de la médula espinal de la tortuga adulta. A y C. Tinción empleando anticuerpos dirigidos contra las subunidades α_4 y δ (verde). Nótese la ausencia de señal fluorescente verde. B y D. Para una mejor identificación de las células en el asta ventral (círculo rojo) los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

En resumen, con las herramientas experimentales empleadas en esta serie de estudios no se obtuvo evidencia de la expresión de las subunidades α_4 y δ de los receptores GABA_A en la médula espinal y en el cerebelo de la tortuga adulta. Sin embargo, se encontró que el ARN mensajero, así como la proteína de la subunidad α_6 sí se expresan en la médula espinal y nuestros datos sugieren que la subunidad α_6 se encuentra presente en las motoneuronas inmunoreactivas a ChAT.

Registro intracelular

Como se mencionó anteriormente, para establecer una posible relación entre el tamaño de las motoneuronas y la sensibilidad a furosemida, en este trabajo de tesis doctoral me propuse aumentar el número de registros intracelulares de motoneuronas y probar su sensibilidad a furosemida. Los resultados de este análisis muestran que la furosemida no afectó ni la resistencia de entrada ni la curva de excitabilidad neuronal (Fig. 13) en 13 de un total de 32 motoneuronas registradas.

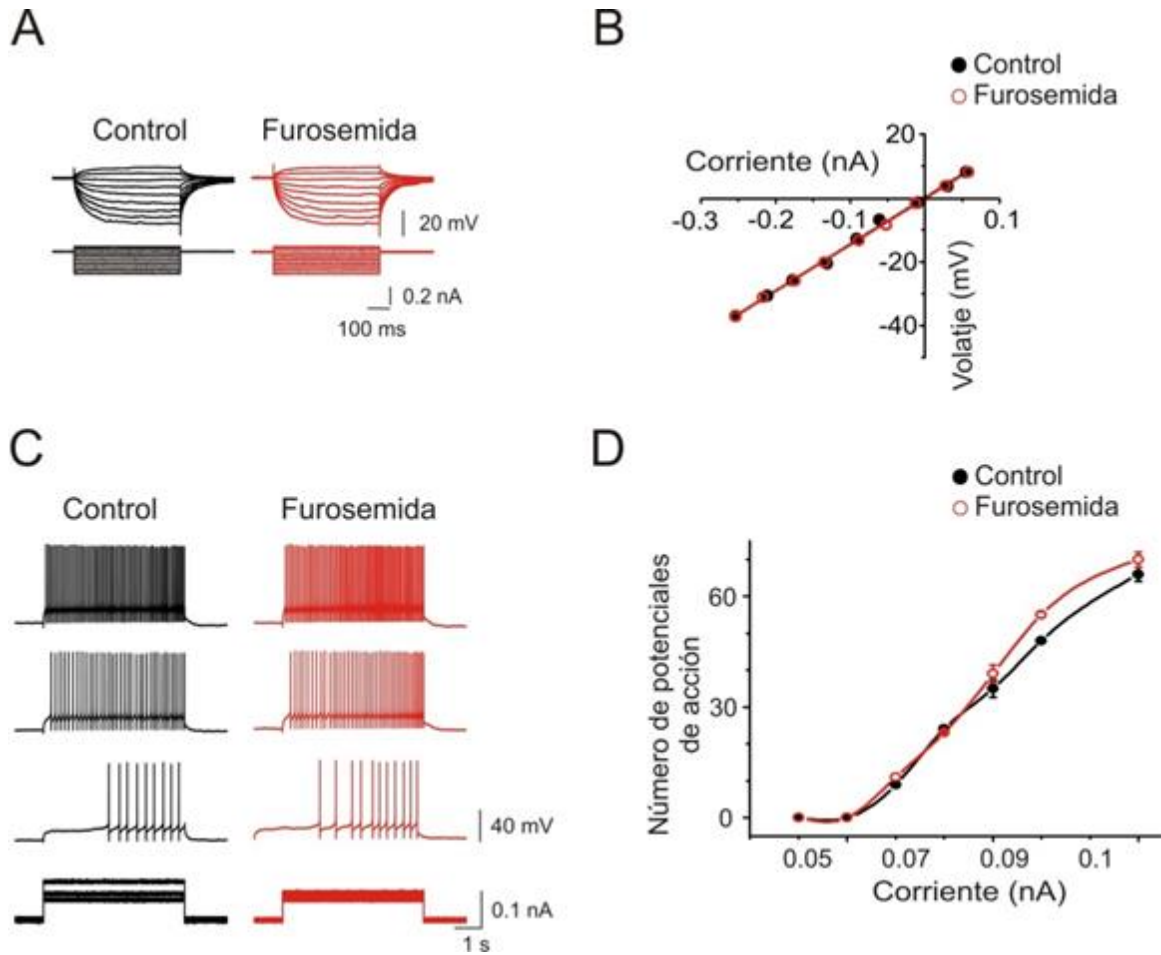


Figura 13. La furosemida no afecta la resistencia de entrada ni la excitabilidad de una subpoblación de motoneuronas en la médula espinal de la tortuga. A. Respuesta en voltaje producida por la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante (subumbrales) según se indica. B. Relación corriente-voltaje (*IV*) obtenida al graficar los valores de corriente contra los cambios de voltaje producidos en una motoneurona (A) en Ringer control (negro) y en presencia de furosemida (rojo). C. Potenciales de acción producidos por los pulsos de corriente despolarizante según se indica en el protocolo mostrado debajo de los trazos. D. Curvas de excitabilidad obtenidas al graficar el número de potenciales de acción obtenidos como se indica en C.

Sin embargo en otro grupo de motoneuronas (Fig. 14B y C) la resistencia de entrada en presencia de furosemida se incrementó en $\sim 43 \pm 10\%$ (control = $26.5 \pm 3.7 \text{ M}\Omega$, furosemida = $37.9 \pm 5.1 \text{ M}\Omega$; $p < 0.001$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon) y la reobase (corriente mínima para evocar un potencial de acción) disminuyó en $\sim 18\%$ (control

= 1.2 nA, furosemida = 0.98 nA; $n = 19$; $p < 0.001$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). Por su parte, la curva de excitabilidad se desplazó hacia la izquierda, lo que indica que la furosemida incrementa la excitabilidad en este grupo de motoneuronas (Fig. 14D).

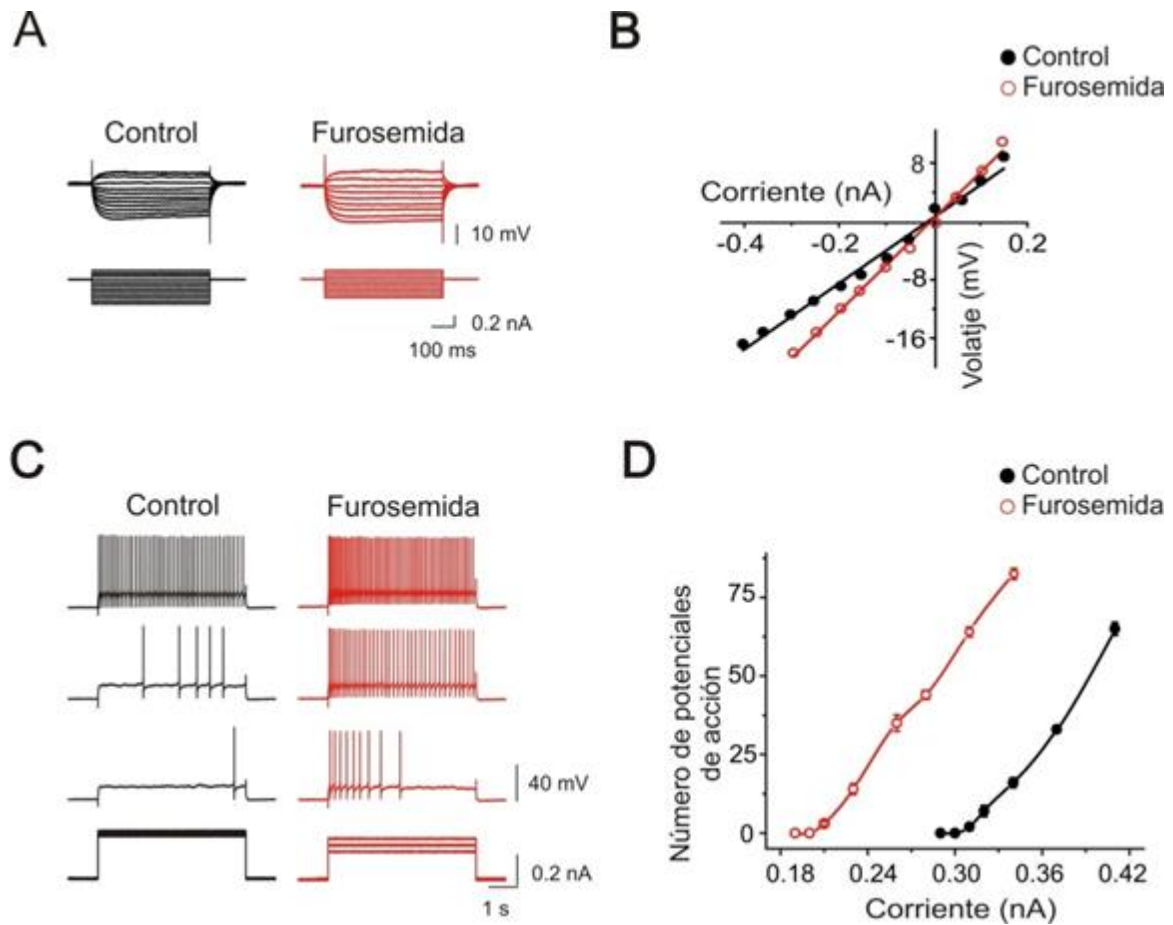


Figura 14. Efecto de la furosemida sobre la resistencia de entrada y la excitabilidad de las motoneuronas. A. Respuesta en voltaje producida por la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante (subumbrales) según se indica. B. Curva IV obtenida tras graficar los cambios de voltaje producidos por los pulsos de corriente subumbral (como en A). La resistencia de entrada es igual a la pendiente de la recta (negro, control 44 M Ω ; rojo, furosemida 66 M Ω). C. Potenciales de acción producidos por los pulsos de corriente despolarizante según se indica en el protocolo mostrado debajo de los trazos. D. Curva de excitabilidad de una neurona registrada intracelularmente en Ringer control (negro) y en presencia de furosemida (rojo; 200 μ M) construida con el número de potenciales evocados

con diferentes valores de los pulsos de corriente despolarizante (como en C). La reobase de la neurona disminuyó de 0.31 a 0.21 nA.

En la figura 15 se graficaron los valores de la resistencia de entrada obtenidos en Ringer control y en presencia de furosemida, observándose que las motoneuronas sensibles a furosemida no están segregadas en función de la resistencia de entrada y por consiguiente de su tamaño.

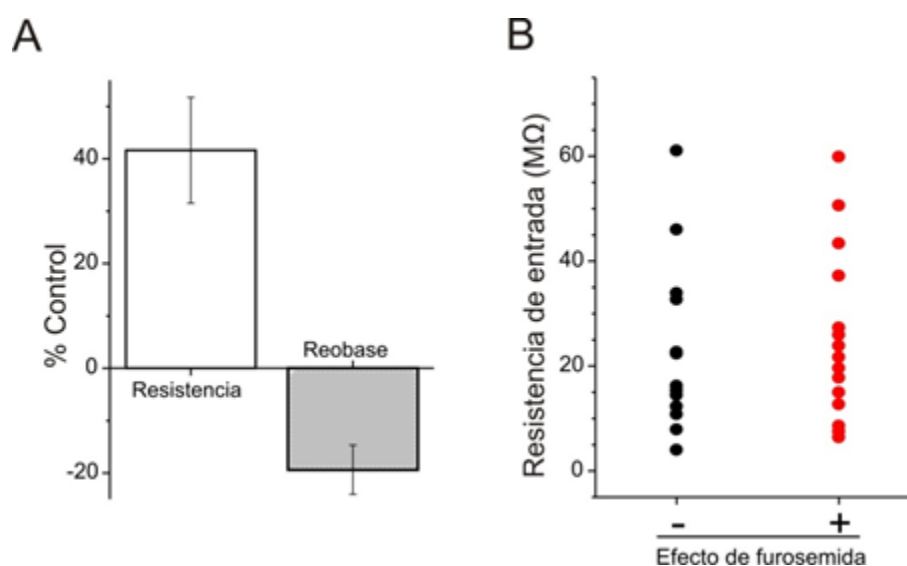


Figura 15. Resumen del efecto de furosemida sobre la resistencia de entrada. A. Gráfica que muestra el cambio en el porcentaje de la resistencia de entrada con respecto al control y de la reobase de las motoneuronas en presencia de furosemida (200 μ M). B. Gráfica de la resistencia de entrada de las motoneuronas que presentaron (+) o no (-) sensibilidad a la furosemida. El efecto del antagonista no está directamente relacionado con el tamaño de la célula, ya que neuronas con las misma resistencia de membrana pueden ser o no afectadas por la furosemida.

Tal y como lo mencioné con anterioridad, en correspondencia con los resultados de mi trabajo de Maestría, en estos estudios encontré un grupo de motoneuronas en las que la furosemida (a una concentración de 200 μ M) no modificó de manera significativa la

resistencia de entrada ni la excitabilidad neuronal ($n = 13$). Asimismo, como se muestra en la Fig. 15B, al graficar la resistencia de entrada en función de la sensibilidad a la furosemida, en esta serie de experimentos encontré que la expresión de la subunidad α_6 no está correlacionada con la resistencia de entrada de las células. Estos nuevos datos apoyan la hipótesis antes planteada de que probablemente la subunidad $\alpha_{4/6}$ se expresa de forma diferencial en las motoneuronas de la tortuga adulta.

Registro de motoneuronas mediante *patch clamp* visualizadas

En las rebanadas de médula espinal de la tortuga juvenil se visualiza el contorno de varias células (Fig. 16), que por su localización ventrolateral y tamaño se asumió que se trataban de motoneuronas. En esta preparación, la probabilidad de arrastrar residuos celulares con la punta de la pipeta se redujo considerablemente. Esto mejoró la obtención de los gigasellos durante los registros electrofisiológicos (acople pipeta-célula $> 3 \text{ G}\Omega$), se mantuvo una baja resistencia de acceso y, en consecuencia, se obtuvo un mayor número registros estables.

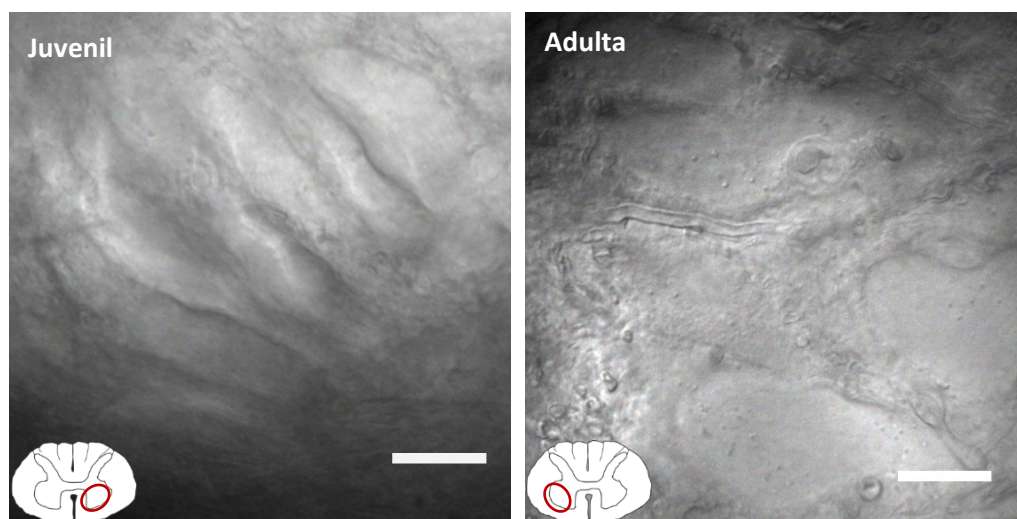


Figura 16. Rebanadas del engrosamiento lumbar de la tortuga juvenil y adulta. El panel izquierdo muestra una imagen del asta ventral de la médula espinal de la tortuga juvenil, en la cual se observa el contorno y profundidad de un grupo de neuronas, que por su localización ventrolateral (círculo rojo) y tamaño se consideran motoneuronas. El panel de la derecha, muestra una imagen de una rebanada de la médula espinal de tortuga adulta, donde se observan lo que parecen ser somas neuronales rodeados de residuos celulares. Nótese que en la preparación de tortuga adulta los somas no presentan una profundidad y textura suavizada, como la observada en la tortuga juvenil, sino cuerpos neuronales planos con una gran cantidad de detritus. Cortes transversales con un grosor de 250 μm . Barra de calibración = 30 μm .

En el tejido adulto la visualización de las neuronas se dificulta por la gran cantidad de detritus que rodea al cuerpo celular (Fig. 16). Esto último repercutió negativamente en la obtención de gigasellos ($<2 \text{ G}\Omega$), resistencias de acceso altas y en la obtención de un menor número de registros. Sin embargo, en las preparaciones de tortugas de ambas edades fue posible obtener registros que evidenciaron la presencia de la corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas.

Caracterización de motoneuronas y estabilidad del registro electrofisiológico

En las neuronas registradas mediante la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa y en el modo de fijación de corriente, en primer lugar se trató de determinar si de acuerdo con sus características electrofisiológicas eran motoneuronas. Con este fin, se evaluó la resistencia de entrada y el patrón de disparo de potenciales de acción en respuesta a un pulso de corriente despolarizante. En la figura 17B se muestra la imagen de una neurona registrada, que presentó el fenómeno de adaptación en el disparo de potenciales de acción evocados por la aplicación de un pulso de corriente despolarizante así como las fases de hiperpolarización postpotencial rápida y lenta (Fig. 17D). Estas

características son propias de las motoneuronas (Hounsgaard *et al.*, 1988; Delgado-Lezama *et al.*, 2004).

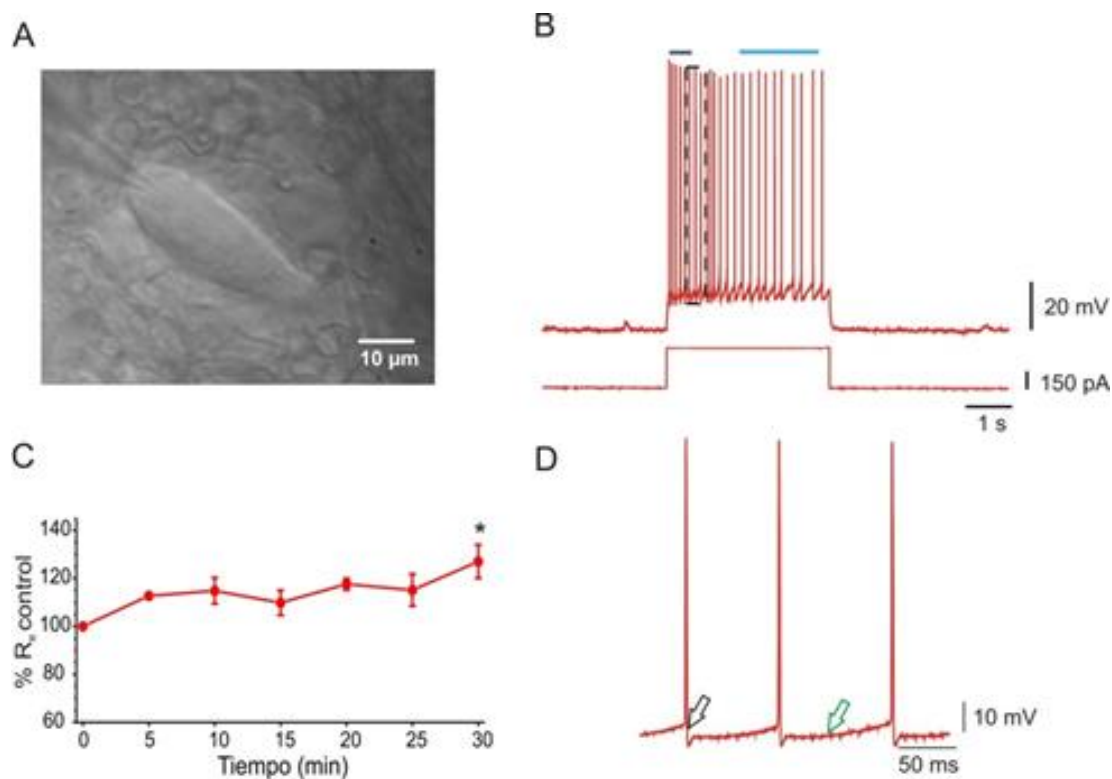


Figura 17. Caracterización de las motoneuronas. A. Imagen de una neurona localizada en el asta ventral en una rebanada de médula espinal de tortuga juvenil. B. Ráfaga de potenciales de acción que presentaron adaptación temprana (línea negra) y tardía (línea azul). C. Resistencia de entrada en 5 neuronas registradas durante 30 min (solo el punto marcado con * fue estadísticamente diferente de los restantes; prueba de *Bonferroni*; $n = 6$; $p < 0.04$). D. El potencial de acción presentó las fases de posthiperpolarización rápida (flecha negra) y lenta (flecha verde).

Para conocer la viabilidad de las rebanadas de 250 μm de espesor, se determinó la estabilidad de la resistencia de entrada y la corriente de mantenimiento. En la figura 17C se muestra que la resistencia de entrada no se modificó significativamente durante los primeros 25 min de registro en 5 neuronas.

Asimismo, la estabilidad de la corriente de mantenimiento se estudió en motoneuronas registradas con la técnica de *patch clamp* a un voltaje de -70 mV durante 30 min en Ringer control (Fig. 18). El valor de la corriente de mantenimiento se determinó cada 5 min después de aplicar un filtro pasa bajas que eliminó las corrientes sinápticas (Fig. 18A). El valor de la corriente se tomó como la media de 3×10^5 puntos graficados en histogramas, a los que se les ajustó una curva normal (Fig. 18B).

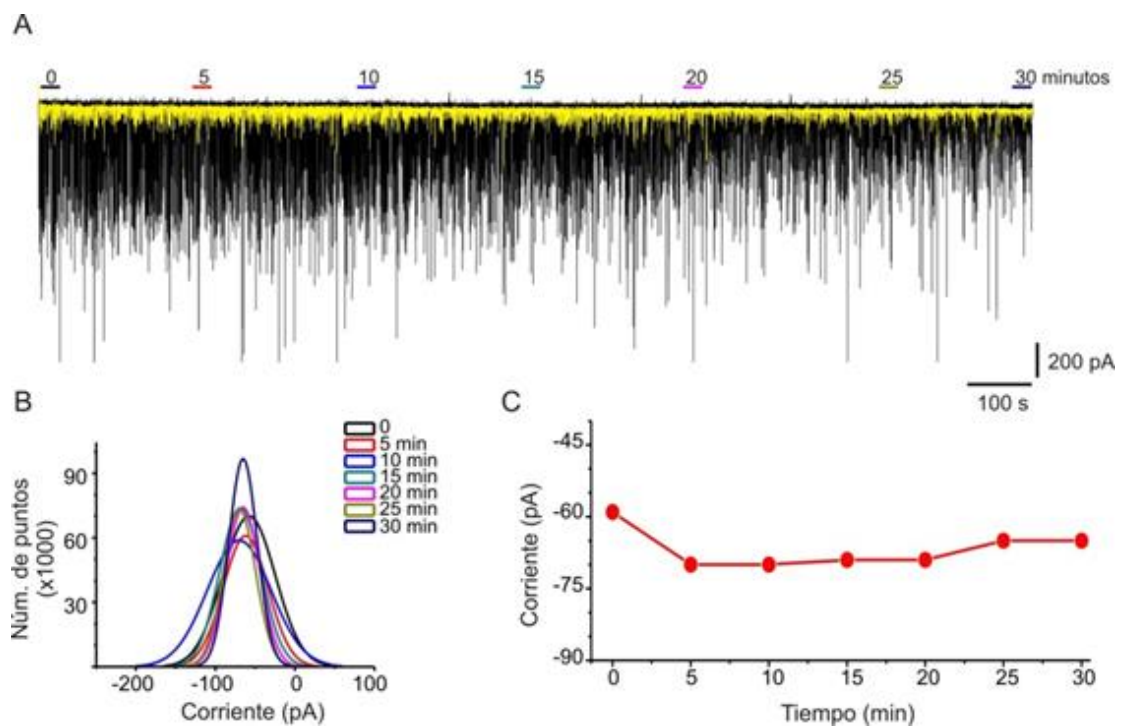


Figura 18. Registro de la corriente de mantenimiento de una motoneurona representativa. A. Corriente de mantenimiento registrada a -70 mV en Ringer control. Se aprecian corrientes sinápticas entrantes. El trazo amarillo muestra la corriente después de aplicar un filtro Bessel de 8 de polos. B. Curvas ajustadas a la distribución de los puntos tomados durante 30 s cada 5 min. C. Gráfica de los valores promedio de la corriente de mantenimiento medida cada 5 min. Nótese que solo el primer valor resultó estadísticamente diferente (prueba de *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0.05$).

Si bien estadísticamente no se obtuvo una variación significativa entre las distribuciones de puntos, al graficar los promedios (Fig. 18C) se encontró que solo en los primeros 5 min de registro la corriente de mantenimiento es diferente de los valores restantes, manteniéndose estable los siguientes 25 min. El comportamiento inicial podría deberse a la diálisis de los componentes del citosol que normalmente ocurre durante los registros de *patch clamp*, y probablemente en estos primeros 5 min se compensen los cambios del medio intracelular. Este resultado sugirió que durante los 25 min restantes se podrían realizar las maniobras farmacológicas propuestas con confiabilidad.

Activación de receptores GABA_A

Primero determinamos la magnitud de la corriente en presencia de una agonista de los receptores GABA_A. Las mediciones tomadas ~10 min después de aplicar muscimol (10 μM), muestran que se activó una corriente entrante de -721 ± 139 pA ($n=11$), que se inactivó rápidamente dando lugar a una corriente estacionaria de -456 ± 132 pA (Fig. 19; control: -212 ± 63 pA; $n = 11$; $p<0.014$, prueba de rangos con signos de Wilcoxon). Asimismo, la aplicación de muscimol incrementó el ruido basal y disminuyó la resistencia de entrada en $\sim 42 \pm 7\%$ (control: 290 ± 94 MΩ; muscimol: 123 ± 32 MΩ; $n= 11$; $p < 0.004$, prueba de rangos con signos de Wilcoxon). En la figura 19 se muestra un trazo representativo de la acción del muscimol sobre la corriente de mantenimiento registrada en una motoneurona cuyo voltaje de membrana fue fijado a -70 mV.

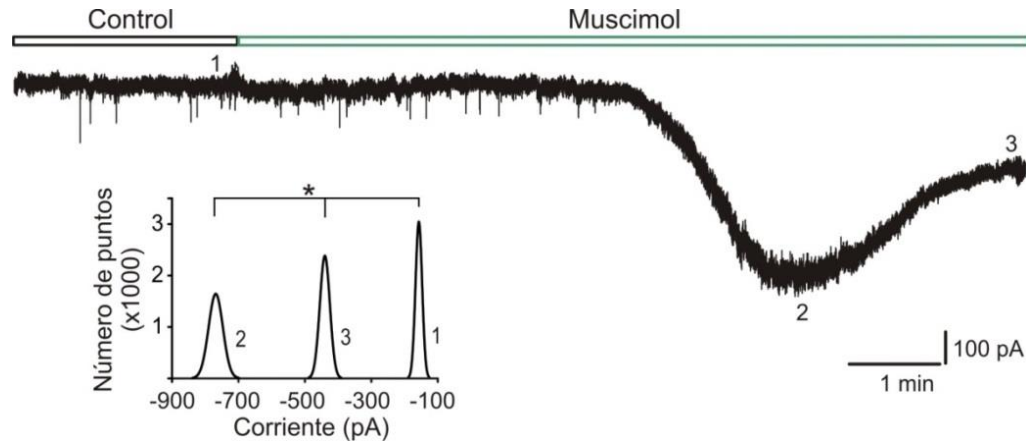


Figura 19. Corriente GABAérgica en una motoneurona. Trazo representativo de la corriente de mantenimiento de una motoneurona a -70 mV en Ringer control y en presencia de muscimol ($10 \mu\text{M}$). Nótese la presencia de una corriente entrante transitoria (2) y estacionaria (3) saliente generada por activación de los receptores GABA_A . Los valores de la corriente a los tiempos indicados por los números 1, 2 y 3, se calcularon como la media de las curvas normales ajustadas a los histogramas mostrados en la gráfica. El asterisco denota valores estadísticamente diferentes; prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, $p < 0.05$.

En resumen, este resultado indica que en las rebanadas de $250 \mu\text{m}$ de espesor de la médula espinal de la tortuga, las motoneuronas presentan receptores GABA_A funcionales que median tanto corrientes fásicas como tónicas. Por tanto, a continuación estudiamos si los receptores GABA_A que median la corriente tónica podrían estar conformados por la subunidad α_6 que es sensible a furosemida.

Efecto de la furosemida sobre las motoneuronas en presencia de GABA endógeno

Si bien muscimol produjo una corriente tónica en todas las neuronas registradas, cuando se estudió el efecto de la furosemida sobre la corriente de mantenimiento en presencia de GABA endógeno, se observó un cambio en la corriente de algunas pocas neuronas registradas en presencia de los antagonistas glutamatérgicos y glicinérgicos (Fig. 20). En promedio, la furosemida produjo un cambio en la corriente de mantenimiento de

$\sim 12 \pm 5\%$, que no fue estadísticamente significativo (control: -154 ± 52 pA y furosemida: -135 ± 46 pA; $n = 4$; $p > 0.125$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon). Sin embargo, la aplicación adicional de picrotoxina (a una concentración de $100 \mu\text{M}$), un antagonista competitivo de los receptores GABA_A , produjo un cambio en la corriente de mantenimiento de $\sim 40\%$ que fue estadísticamente significativo (Fig. 20; control: -175 ± 22 pA y picrotoxina: -107 ± 15 pA; $n = 6$; $p < 0.03$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon).

Es muy probable que el bajo número de neuronas que fueron sensibles a la aplicación de furosemida pudiera deberse al lavado del GABA y la acción conjunta de los co-transportadores de GABA (Glykys & Mody, 2007; Grasshoff *et al.*, 2008; Numata *et al.*, 2012). Por tanto, para poder evidenciar la corriente tónica de GABA con una alta relación señal a ruido se requirió de la aplicación de GABA exógeno.

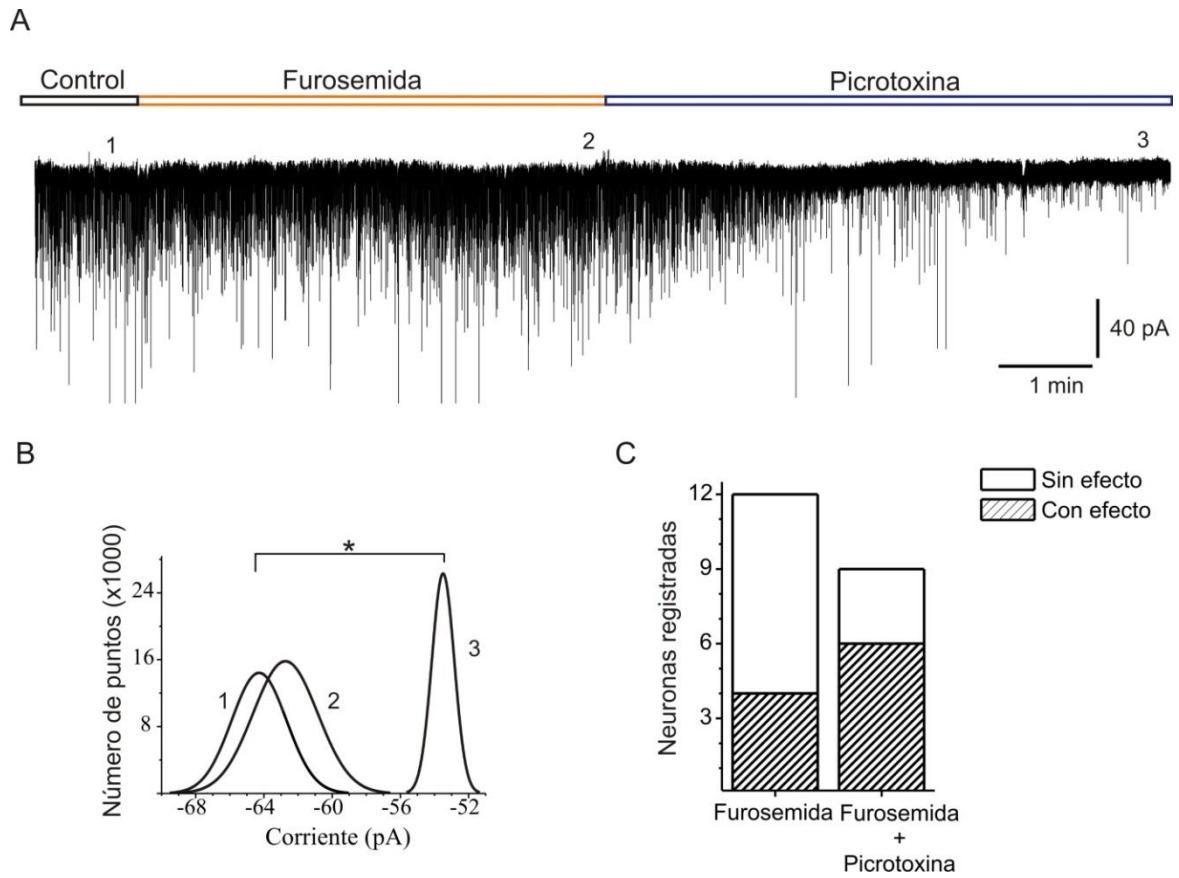


Figura 20. La furosemida no afectó la corriente de mantenimiento. A. Corriente de mantenimiento de una motoneurona fijada a -70 mV en medio control y en presencia de furosemida ($200 \mu\text{M}$) más picrotoxina ($100 \mu\text{M}$). B. Histogramas de la corriente de mantenimiento que muestra diferencia estadísticamente significativa en presencia de picrotoxina con respecto al control ($p < 0.05$; prueba de *Kolmogorov-Smirnov*). C. Comparación del número de neuronas sensibles a furosemida y furosemida más picrotoxina en presencia de GABA endógeno.

Activación de los receptores GABA_A por GABA exógeno

Para determinar la concentración de GABA exógeno que se requiere para activar la corriente tónica en las motoneuronas registradas en fijación de voltaje, se aplicó GABA en concentraciones crecientes iniciando con una concentración de $10 \mu\text{M}$ (Fig. 21). En 13 motoneuronas se encontró que la concentración de $30 \mu\text{M}$ activó una corriente de entrante rápida que alcanzó un valor promedio de -764 ± 190 pA ($n = 13$), seguida de una

inactivación rápida que llegó a un valor estacionario de -373 ± 58 pA, y que resultó estadísticamente diferente de la corriente basal (control: -281 ± 61 pA; $p < 0.0002$; $n = 13$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon). La figura 21 muestra un trazo representativo de la acción del GABA exógeno sobre la corriente de mantenimiento en una motoneurona fijada a -70 mV.

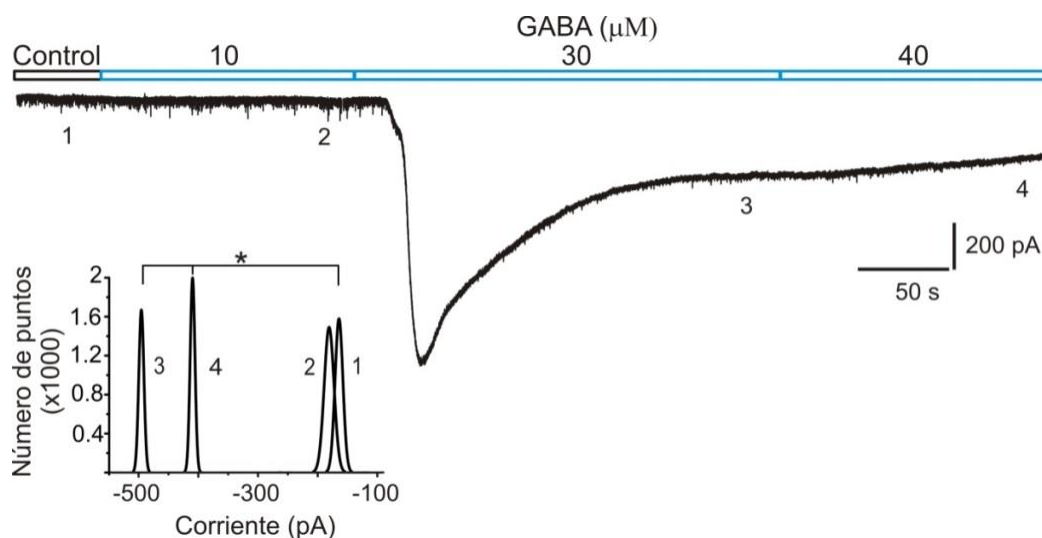


Figura 21. Registro de la corriente tónica en las motoneuronas activada con GABA exógeno. Registro de la corriente de mantenimiento de una motoneurona fijada a -70 mV en Ringer control y en presencia de concentraciones crecientes de GABA según se indica en la barra sobre el trazo. La activación de los receptores $GABA_A$ se hace aparente a una concentración de $30 \mu\text{M}$ seguida de una desensibilización de dichos receptores que origina una corriente que alcanza un valor estacionario diferente al control, que estaría mediada por receptores $GABA_A$ extrasinápticos. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa; prueba de *Kolmogorov-Smirnov* con una $p < 0.05$.

Efecto de furosemida sobre las motoneuronas en presencia de GABA exógeno

En las motoneuronas registradas en presencia de GABA exógeno ($40 \mu\text{M}$), la furosemida disminuyó la corriente de mantenimiento en $26 \pm 5\%$ (control: -173 ± 37 pA y furosemida: -127 ± 23 pA; $n = 8$; $p < 0.02$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon) que

resultó mayor al observado cuando se registró en presencia de GABA endógeno (Fig. 22). Por su parte, picrotoxina (100 μ M) disminuyó la corriente de mantenimiento en $49 \pm 4\%$ (control: -268 ± 35 pA y picrotoxina: -137 ± 25 pA; $n = 12$; $p < 5 \times 10^{-4}$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon). En la figura 22 se muestra el registro de la corriente de mantenimiento de una motoneurona en Ringer control y en presencia de furosemida y picrotoxina. Las corrientes medidas en cada situación resultaron estadísticamente diferentes.

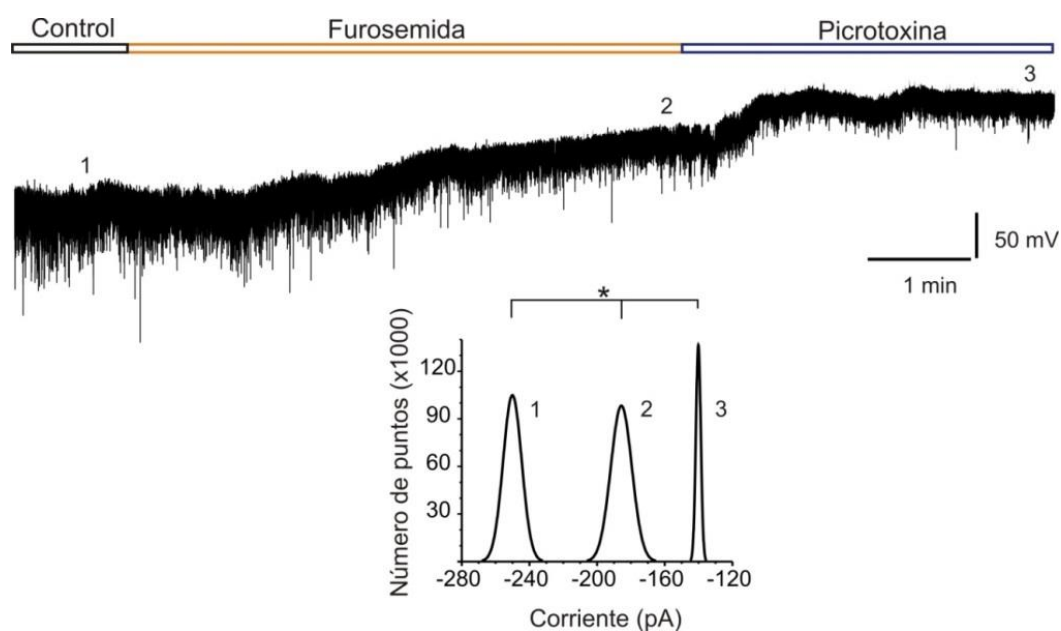


Figura 22. Efecto de la furosemida en presencia de GABA exógeno. El panel superior muestra el registro de la corriente de mantenimiento en una motoneurona representativa registrada a un voltaje de fijación de -70 mV en Ringer control y en presencia de furosemida más picrotoxina. En la gráfica debajo del trazo se muestran las curvas normales ajustadas a los histogramas obtenidos de los valores de la corriente tomados a los tiempos marcados con los números. Prueba de *Kolmogorov-Smirnov* con una $p < 0.05$.

En la figura 23 se muestra un resumen del número de neuronas y del porcentaje en el que disminuyó la corriente de mantenimiento, causado por aplicación de furosemida más

microtoxina, en presencia de GABA endógeno y exógeno a una concentración de 40 μ M. El efecto de la furosemida se facilitó en presencia de GABA exógeno, lo que sugiere que el GABA endógeno probablemente se lava por la perfusión del baño.

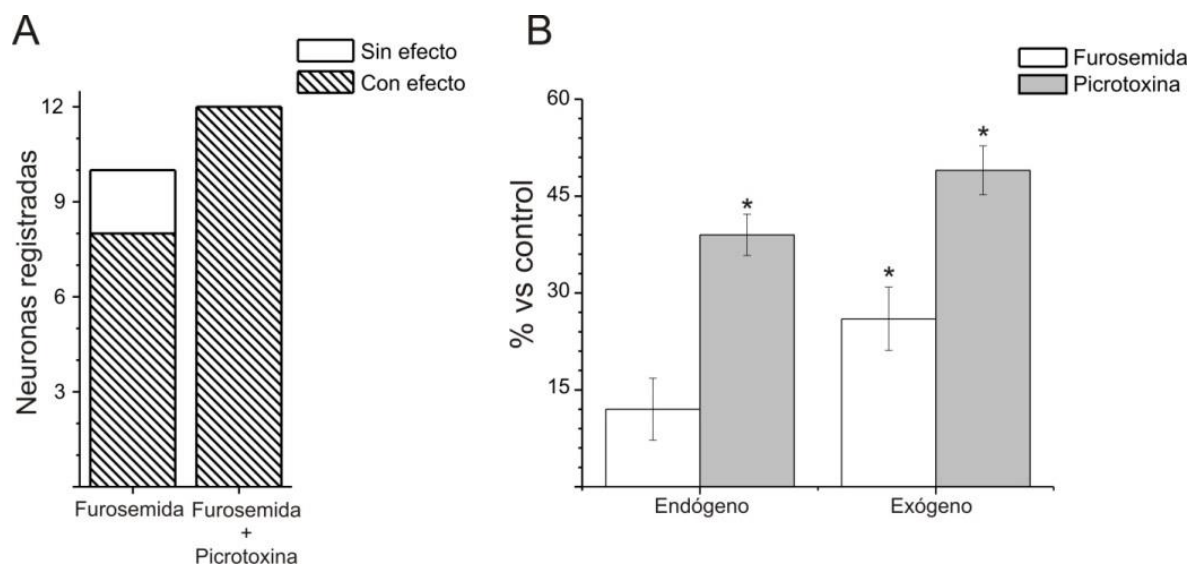


Figura 23. Acción de la furosemida en presencia de GABA endógeno y exógeno. A. Comparación del número de neuronas que presentaron sensibilidad a furosemida y a picrotoxina en presencia de GABA exógeno. B. Porcentaje de efecto de la furosemida más picrotoxina sobre la corriente de mantenimiento en presencia de GABA endógeno y exógeno.

Estos resultados muestran que la corriente tónica activada al aplicar GABA (40 μ M) en las motoneuronas está mediada por receptores GABA_A que contienen las subunidades $\alpha_{4/6}$.

Efecto de furosemida en las motoneuronas de la tortuga adulta

Primero se estudió el efecto de los antagonistas furosemida y picrotoxina sobre la corriente de mantenimiento en presencia de GABA endógeno. La figura 24 muestra que la corriente de mantenimiento registrada en una motoneurona fijada a -70 mV no es afectada

por la aplicación de la furosemida, pero se produce una corriente saliente cuando se añade picrotoxina. En promedio la furosemida disminuyó la corriente de mantenimiento en $15 \pm 6\%$ (control: -222 ± 72 pA y furosemida: -189 ± 70 pA; $n = 4$; $p > 0.25$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon), que no fue estadísticamente diferente del control. La perfusión de picrotoxina activó una corriente saliente ($26 \pm 6\%$) diferente estadísticamente que el control (control: -135 ± 34 y picrotoxina: -100 ± 27 pA; $n = 8$; $p < 0.02$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon).

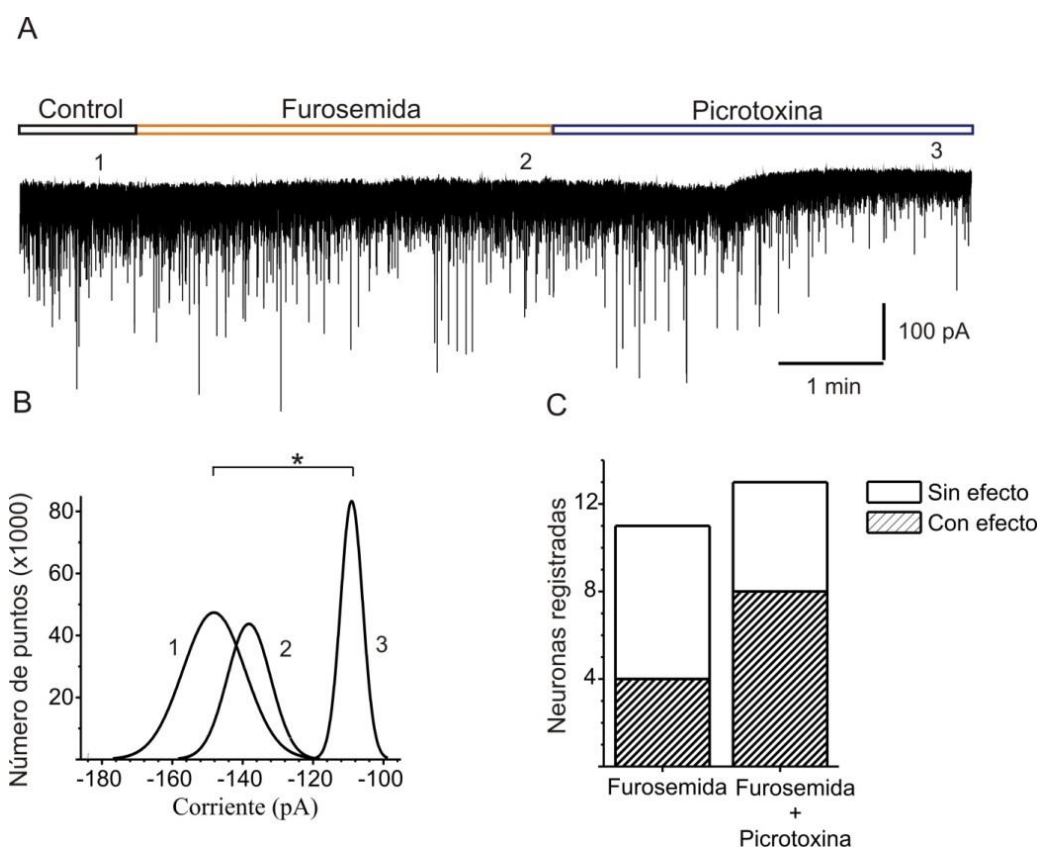


Figura 24. Efecto de la furosemida sobre la corriente de mantenimiento en presencia de GABA endógeno. A. Corriente de mantenimiento en una motoneurona representativa registrada a un potencial de fijación de -70 mV en Ringer control y en presencia de furosemida más picrotoxina. B. Gráfica de las curvas normales ajustadas a los histogramas de los valores de la corriente tomados en los tiempos indicados por los números. Nótese que la corriente en presencia de furosemida más picrotoxina es estadísticamente diferente

del control (*; prueba de *Kolmogorov-Smirnov*; $p < 0.05$). C. Gráfica de barras del número de neuronas registradas con o sin efecto de furosemida y picrotoxina.

El bajo número de neuronas registradas en rebanadas de tortuga adulta sensibles a la furosemida en presencia de GABA endógeno, fue muy similar al que se obtuvo en las rebanadas de la tortuga juvenil. Por lo tanto, para descartar que esto se debiera a la baja concentración de GABA endógeno, se realizaron los experimentos siguientes en presencia de 40 μM de GABA exógeno.

Receptores $\alpha_6\text{GABA}_A$ y corriente tónica en motoneuronas

En la figura 25 se muestra un registro típico de la corriente de mantenimiento en una motoneurona fijada a -70 mV en presencia de GABA 40 μM . En estas condiciones experimentales, la furosemida (200 μM) redujo la corriente de mantenimiento en 94 ± 36 pA en promedio (control: -256 ± 50 pA; furosemida: -162 ± 27 pA; $n = 22$; $p < 0.001$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon) y un incremento en la resistencia de entrada del $34 \pm 16\%$ (control: 257 ± 81 M Ω ; furosemida: 345 ± 90 M Ω ; $n = 10$; $p < 0.002$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon) (Fig. 25A), similar al producido en las motoneuronas registradas intracelularmente. Por su parte, la picrotoxina a una concentración de 100 μM , disminuyó la corriente de mantenimiento en un $50 \pm 6\%$ (control: -286 ± 62 y picrotoxina: -143 ± 42 ; $n = 21$; $p < 4.8 \times 10^{-7}$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon) (Fig. 25B).

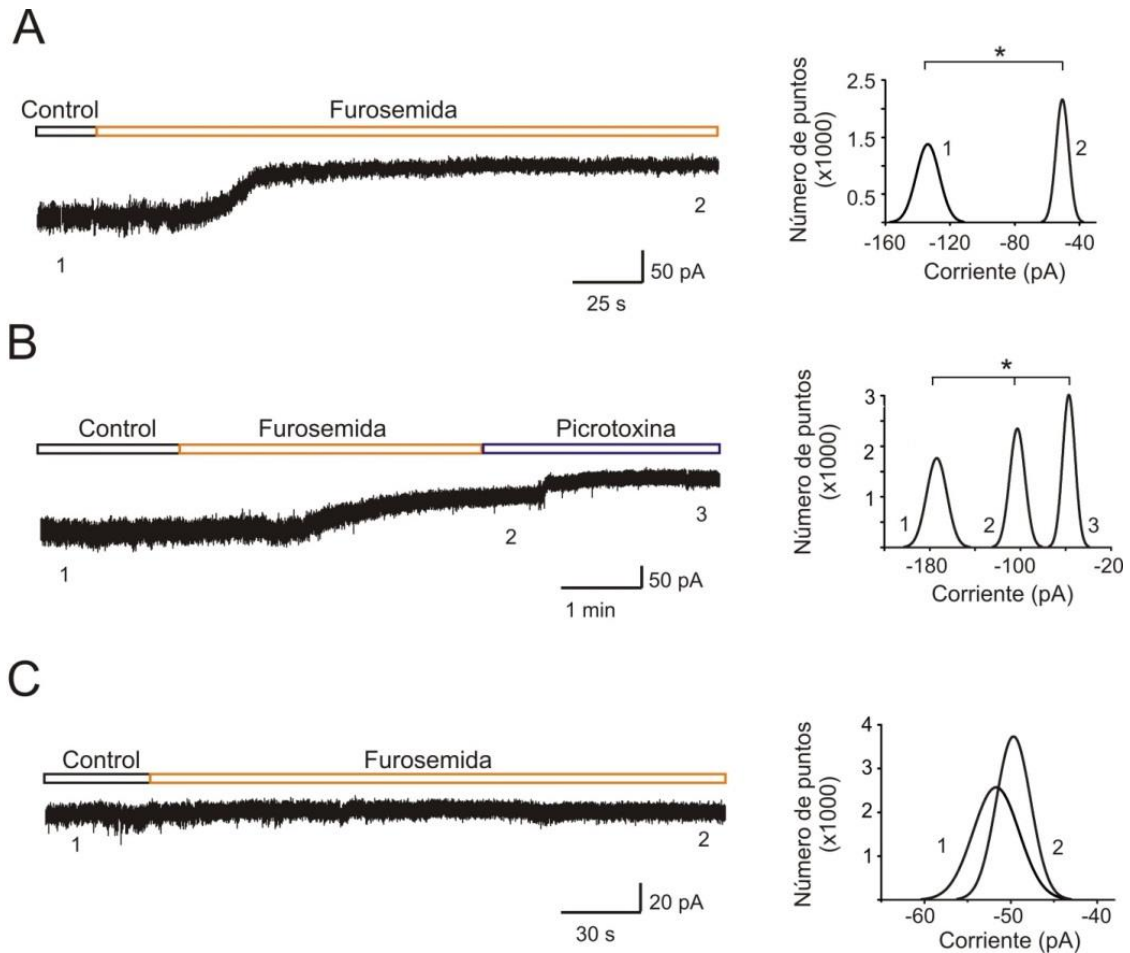


Figura 25. Corriente tónica en las motoneuronas de animales adultos en presencia de GABA exógeno. Los paneles A-C muestran corrientes de mantenimiento representativas registrada en motoneuronas fijadas a -70 mV en presencia de furosemida ($200 \mu\text{M}$) y de furosemida más picrotoxina ($100 \mu\text{M}$) según se indica. A la derecha de cada trazo, se muestran las gráficas de las curvas normales ajustadas a los histogramas de los 3×10^5 valores de la corriente, tomados a los tiempos indicados por los números. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes; prueba de *Kolmogorov-Smirnov*; $p < 0.05$).

El número de neuronas sensibles a la furosemida se incrementó al añadir GABA al baño (Fig. 26A), así como el porcentaje en la corriente de mantenimiento disminuyó con respecto al control (Fig. 26B).

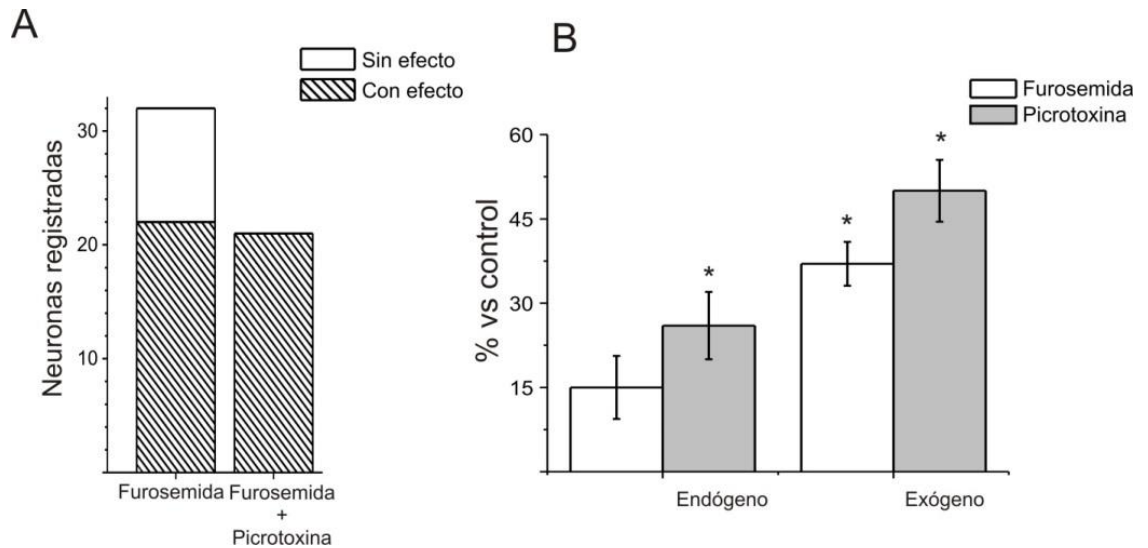


Figura 26. Acción de la furosemida en presencia de GABA endógeno y exógeno. A. Comparación del número de neuronas que presentaron sensibilidad a furosemida y furosemida más picrotoxina. B. Gráfica de barras del porcentaje de efecto de furosemida y furosemida más picrotoxina sobre la corriente de mantenimiento en presencia con GABA endógeno y exógeno.

En las motoneuronas la aplicación de picrotoxina (100 μM) después de la furosemida produjo una corriente saliente adicional promedio de 69 ± 22 pA (furosemida: -163 ± 28 pA; picrotoxina: -94 ± 13 pA; $p < 3.8 \times 10^{-6}$, $n = 18$; prueba de rangos con signo de Wilcoxon). Esto sugiere que las motoneuronas podrían estar expresando al menos dos tipos de subunidades α .

Por otro lado, en 10 de las 37 motoneuronas registradas, furosemida no disminuyó significativamente la corriente de mantenimiento (control: -70 ± 15 M Ω ; furosemida: 71 ± 15 M Ω ; $p > 0.06$, $n = 10$; prueba de rangos con signos de Wilcoxon), ni la resistencia de entrada (Fig. 25C). Este resultado concuerda con lo observado en las motoneuronas registradas intracelularmente (Fig. 13).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se muestra, mediante el empleo de la técnica de *patch clamp*, que las motoneuronas expresan receptores $\alpha_{4/6}$ -GABA_A sensibles a la furosemida. Su activación modula su excitabilidad mediante la activación de una corriente tónica inhibitoria. Los resultados electrofisiológicos son apoyados por los que muestran la presencia del ARNm y de la proteína de la subunidad α_6 , así como su localización mediante anticuerpos específicos. Estos resultados concuerdan con reportes previos que muestran que los receptores α_6 GABA_A median una corriente tónica inhibitoria que controla la excitabilidad en células granulares del cerebelo (Kaneda *et al.*, 1995; Hamann *et al.*, 2002; Farrant & Nusser, 2005).

La furosemida modula la excitabilidad de las motoneuronas

La investigación del efecto de la furosemida sobre la resistencia de entrada de las motoneuronas y su excitabilidad realizada con la técnica del registro intracelular, produjo resultados similares a los obtenidos en mi trabajo de Maestría (Andrés, 2010). Brevemente, la furosemida incrementó la resistencia de entrada en ~43%, disminuyó la reobase en un ~18% y se requirió menos corriente despolarizante para producir una descarga sostenida de potenciales de acción. Esto se evidenció más claramente por el corrimiento de la curva de excitabilidad a la izquierda en presencia del antagonista. El incremento en la resistencia de entrada y en la excitabilidad de las motoneuronas por la furosemida resultó semejante al observado en las neuronas granulares de la corteza cerebelosa, donde el bloqueo de las corrientes tónicas GABAérgicas con gabazina 500 μ M y furosemida 100 μ M incrementó la resistencia de entrada, disminuyó el umbral para la generación de potenciales de acción,

y cambió la corriente de mantenimiento produciendo un aumento en el número de potenciales de acción al aplicar pulsos de corriente despolarizante y el corrimiento de la curva de excitabilidad hacia la izquierda (Chadderton *et al.*, 2004; Farrant & Nusser, 2005; Hamann *et al.*, 2002). Estos datos en conjunto con los obtenidos en este trabajo mediante registros intracelulares sugieren: a) que las motoneuronas podrían estar expresando receptores GABA_A tónicamente activos por el GABA del medio extracelular sensibles a furosemida, b) que estos receptores serían los que al bloquearse producen la facilitación del reflejo monosináptico, que no afectó el potencial de la raíz dorsal reportado por Bautista y colaboradores (2010), y c) que los receptores GABA_A tónicamente activos podrían estar constituidos por la subunidad α_6 .

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis también sugieren que existe un grupo de motoneuronas en las que la furosemida no afecta significativamente su resistencia de entrada ni su excitabilidad. Esto podría indicar que probablemente hay una subpoblación de motoneuronas que podrían no expresar receptores GABA_A sensibles a furosemida, aunque podrían estar expresando otros receptores conformados por subunidades sensibles a otros antagonistas como el L-655,708 que bloquea receptores que contienen la subunidad α_5 , o no tan específicos como bicuculina y picrotoxina, como ocurre en células granulares del giro dentado (Herd *et al.*, 2008) y del cerebelo (Hamann *et al.*, 2002; Farrant & Nusser, 2005; Nusser *et al.*, 1996). Asimismo, no se encontró una relación entre la resistencia de entrada de las neuronas y la sensibilidad a la furosemida. Esto sugiere que la expresión de receptores GABA_A de alta afinidad, podría estarse expresando diferencialmente en las motoneuronas en función de alguna otra propiedad que no sería su tamaño.

Resistencia de entrada de las motoneuronas

Las neuronas registradas con la técnica de *patch clamp* visualizado se seleccionaron visualmente por su localización ventrolateral, donde se ha reportado se encuentran los grupos de motoneuronas que son las células de mayor tamaño presentes en esta región (Ruigrok *et al.*, 1985). Además, se corroboró que estas células presentaran las clásicas fases de adaptación temprana y tardía en el disparo de potenciales de acción evocados por la aplicación de corriente despolarizante descritas previamente por Hounsgaard *et al.* (1988) y Delgado-Lezama *et al.* (2004). Sin embargo, la resistencia de entrada de las neuronas identificadas como motoneuronas en los estudios de *patch clamp* fue más alta que la medida con la técnica del registro intracelular. Esta diferencia podría deberse a variaciones propias de la técnica de registro, lo cual se ha reportado que ocurre en células granulares del giro dentado, neuronas sensoriales olfatorias y neuronas corticales e interneuronas del asta dorsal de la tortuga juvenil (Pongracz *et al.*, 1991; Staley *et al.*, 1992; Reali & Russo, 2005; Blanton *et al.*, 1989; Svirskis *et al.*, 1997). La explicación es que podría haber un daño provocado por el microelectrodo al penetrar en la membrana celular, haciendo que se genere un corto circuito con el medio extracelular (Svirskis *et al.*, 1997; Reali & Russo, 2005); o bien, que las neuronas registradas sean más compactas electrotonicamente de lo que se había estimado con registros intracelulares (Blanton *et al.*, 1989). Independientemente de estas diferencias, en registros con la técnica de *patch clamp* siempre se ha obtenido una resistencia de entrada elevada (Major *et al.*, 1994).

Corriente tónica inhibitoria activada por muscimol y GABA

Al igual que en las células granulares del cerebelo (Kaneda *et al.*, 1995; Brickley *et al.*, 1996; Wall, 2003), la aplicación de muscimol y GABA generó una corriente entrante

rápida en las motoneuronas, seguida por una corriente estacionaria diferente a la basal. El requerimiento de una alta concentración de GABA (40 μM) para activar los receptores GABA_A, muy probablemente está relacionada con la presencia de tejido conectivo en las rebanadas de médula espinal de animales adultos que dificulta la difusión del neurotransmisor (Huang & Uusisaari, 2013). Otro factor muy importante es la presencia de los transportadores de GABA, tanto en las neuronas como en las células gliales, que capturan el GABA con una gran eficiencia manteniendo baja la concentración del neurotransmisor para prevenir la desensibilización de los receptores (Wall, 2003, Grasshoff *et al.* 2008). En las neuronas de algunos núcleos supraespinales como en las células granulares y en las motoneuronas hipoglosales, la caracterización de las subunidades que median la corriente tónica ha requerido, además de GABA, de la adición de bloqueadores de dichos transportadores (Farrant & Nusser, 2005; Nusser & Mody, 2002; Numata *et al.*, 2012).

La aplicación de 30 μM de GABA produjo una corriente rápida y una tónica que no se incrementaron aun con el aumento de la concentración. Esto podría estar asociado a que los receptores GABA_A que producen la corriente rápida son de tipo sináptico, y que se desensibilizan en presencia del neurotransmisor, mientras que la corriente tónica remanente podría ser producido por receptores GABA_A de tipo extrasináptico. Asimismo, a esa concentración de GABA exógeno, la actividad sináptica desapareció en la fase de activación rápida de la corriente entrante y se mantuvo reducida en la fase estacionaria. Este cambio probablemente se debe al corto circuito producido por la activación masiva de receptores GABA_A (Kaneda *et al.*, 1995; Wall, 2003).

Parte de esta corriente resultó sensible a la furosemida (100-300 μM), dato que concuerda con lo reportado en las células granulares del cerebelo (Nusser *et al.*, 1996 Rossi & Hamann, 1998; Hamann *et al.*, 2002; Wall, 2002 y 2003) y en las neuronas CA1 del hipocampo (Sinkkonen *et al.*, 2004), donde se demostró que los receptores GABA_A están conformados por la subunidad α_6 . Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que los receptores α_6 GABA_A podrían estar mediando parte de la corriente tónica en las motoneuronas.

La posibilidad de que furosemida pudiera estar bloqueando la corriente tónica GABAérgica vía los transportadores de Cl⁻, poder ser descartada debido a que su acción sobre los receptores GABA_A ocurre a concentraciones menores que las requeridas para ejercer su acción antidiurética (>1 mM; Hochman & Schwartzkroin, 2000). En apoyo a esta conclusión está el estudio realizado en sistemas heterólogos, donde se encontró que furosemida bloquea los receptores $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ con una IC₅₀ de ~ 10 μM (Korpi *et al.*, 1995), mientras que los que contienen las subunidades $\alpha_4\beta_3\gamma_2$ tuvieron una IC₅₀ ~ 234 -260 μM ; (Thompson *et al.*, 1999), los $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ y $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (IC₅₀ >3 mM; Korpi *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1999). Además, la furosemida aplicada a 200 μM no bloquea la corriente tónica en las neuronas del núcleo premotor que son sensibles a bicuculina (Castro *et al.*, 2011a).

El bloqueo adicional de la corriente tónica producida por la picrotoxina después de la acción de la furosemida sugiere que las motoneuronas podrían expresar alguna otra subunidad α , además de α_6 . En apoyo a esta hipótesis están los estudios realizados con las técnicas de hibridación *in situ* (Persohn *et al.*, 1991; Wisden *et al.*, 1991) e inmunohistoquímica (Bohlhalter *et al.*, 1996), que muestran la expresión de las subunidades α_2 y α_5 en las motoneuronas de la rata. Esta última subunidad media la corriente tónica en

las neuronas del núcleo premotor en la médula espinal (Castro *et al.*, 2011a) y forma parte de los receptores GABA_A extrasinápticos en las neuronas sensoriales que regulan la excitabilidad de los axones (Loeza-Alcocer *et al.*, 2013). Por lo tanto, es posible que la subunidad α_5 podría estar mediando parte de la corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas.

Expresión y localización de las subunidades α_6 en las motoneuronas

En paralelo con el trabajo electrofisiológico en el presente estudio se realizaron ensayos de biología molecular para determinar la presencia de transcritos de la subunidad α_6 y α_4 en el engrosamiento lumbar de la médula espinal y en cerebelo de la tortuga, la rata y el ratón. El cerebelo se seleccionó por ser las células granulares donde se ha observado la mayor expresión de la subunidad α_6 (Nusser *et al.*, 1998; Rossi & Hamann, 1998; Hamann *et al.* 2002; Pirker *et al.*, 2000). Por consiguiente, se extrajo el ARN total de esta región y por medio de la técnica de RT-PCR se logró amplificar únicamente el ARN mensajero para la subunidad α_6 de los receptores GABA_A, y no los transcritos de la subunidad α_4 , a pesar de que los oligonucleótidos empleados se diseñaron para amplificar específicamente regiones conservadas en α_4 .

Además, de observar la expresión del ARN mensajero de la subunidad α_6 , mediante el empleo de anticuerpos policlonales se consiguió obtener evidencia de su expresión a nivel de la proteína en la región lumbar y en el cerebelo de la tortuga. Igualmente, como ocurrió con el ARNm no fue posible observar la expresión de la proteína α_4 , tanto en la médula espinal como en el cerebro de la tortuga. Pese a ello, estos hallazgos no descartan la posible expresión de esta subunidad en la médula espinal de la tortuga, pudiendo existir la

posibilidad de que su expresión sea muy baja y por lo tanto difícil de detectar con las herramientas moleculares empleadas, diseñadas en principio para estudiar la expresión de α_4 en los mamíferos.

La expresión de la subunidad α_6 también se demostró por medio de experimentos inmunohistoquímicos. Los datos de microscopía de fluorescencia muestran que esta proteína se encuentra segregada por toda la sustancia gris, concentrándose particularmente en algunos cuerpos neuronales y extensiones dendríticas y axónicas. Las imágenes obtenidas con el doble marcaje con el anticuerpo contra ChAT, sugieren que la subunidad α_6 de los receptores GABA_A se expresa en las motoneuronas de la región lumbar de la médula espinal de la tortuga. Dichas imágenes también muestran señal específica para α_6 en otros tipos neuronales, que podrían corresponder a interneuronas. La confirmación de este hallazgo y el estudio de la posible función que estarían desempeñando los receptores α_6 GABA_A en estas interneuronas es un tópico interesante para trabajos futuros.

Tortugas juveniles como modelo de trabajo

En este trabajo además de utilizar tortugas adultas se emplearon también ejemplares juveniles. Las tortugas juveniles utilizadas fueron también de la especie *Trachemys scripta* y presentaban una longitud total del caparazón < 10 cm que indica una edad < 3 años (Chen, 2006; Pérez-Santigosa *et al.*, 2008), mientras que las tortugas adultas, maduras sexualmente, presentaron una longitud del caparazón de 15 a 30 cm en hembras y de 11 a 24 cm en machos por lo que serían mayores a 3.5 años de edad (Somma *et al.*, 2009; Ernst & Lovich 2009; Martínez-Silvestre *et al.*, 2011). Si bien, se ha descrito que el tejido nervioso de animales juveniles tienen ventajas sobre las provenientes de animales adultos,

como son una mayor resistencia a la anoxia y a daños mecánicos (Moyer & Brown, 1998); en este trabajo se observó que en las rebanadas de médula espinal de tortuga juvenil presentan una cantidad menor de matriz extracelular que envuelve al soma neuronal, así como también menos tejido vascular y mielinizante que comprometen la preparación al momento de hacer los cortes (Blanton *et al.*, 1989; Huang & Uusisaari, 2013).

Desde el punto de vista sensorial-motor las tortugas juveniles son considerados como maduras ya que se han encontrado propiedades intrínsecas de las respuestas somatosensoriales similares a las reportadas en el animal adulto, así como también propiedades electrofisiológicas similares a las ya descritas en la tortuga adulta (Russo & Hounsgaard, 1996a, 1996b; Reali & Russo, 2005).

A pesar que en ambas preparaciones, adulto y juvenil, se pudo encontrar neuronas viables y visualmente saludables, hubo algunas diferencias técnicas notables. En la tortuga adulta se encontraron más células dañadas, hinchadas, con el cuerpo celular transparente a través del cual se podía observar el núcleo y nucléolos, características que de acuerdo con reportes técnicos corresponden a las de células no saludables en las que, si bien se pueden hacer sellos, la estabilidad del registro se ve generalmente comprometida (Blanton *et al.*, 1989; Moyer & Brown, 1998; Huang & Uusisaari, 2013). Por otro lado, aunque la visibilidad fue buena, en las motoneuronas registradas en animales adultos resultó más difícil romper el parche de membrana que en las motoneuronas registradas de tortugas juveniles. Sin embargo, la corriente tónica registrada en las dos preparaciones fue similar, tal y como ocurre con otras propiedades electrofisiológicas intrínsecas (Russo & Hounsgaard, 1996a, 1996b; Reali & Russo, 2005).

Importancia funcional de la corriente tónica GABAérgica en las motoneuronas

Como se ha propuesto en las células granulares del cerebelo y en las interneuronas de la región CA1 del hipocampo, los receptores GABA_A conformados por la subunidad α_6 podrían estar produciendo una inhibición por corto circuito en la membrana de la motoneurona, disminuyendo la constante de tiempo, lo que reduciría la ventana temporal en la que se integran las entradas sinápticas excitadoras. Esto tendría como consecuencia que se requirieran más potenciales sinápticos excitadores para alcanzar el umbral de activación de potenciales de acción en las motoneuronas (Brickley *et al.*, 1996; Semyanov *et al.*, 2004). En consecuencia, la inhibición tónica estaría previendo la activación anómala de estas neuronas y explicaría la pérdida del control motriz que se observa al activarse el reflejo monosináptico en presencia de picrotoxina o furosemida (Bautista *et al.*, 2010). El reflejo monosináptico, que consiste en la activación de un único potencial de acción en un grupo de motoneuronas por un salva aferente, que generan una contracción simple del músculo que inervan, se convirtió en una respuesta de potenciales de acción sostenido cuando se bloquearon los receptores GABA_A con furosemida (Bautista *et al.*, 2010). Por lo tanto, este trabajo corrobora que el control del reflejo monosináptico mediado por los receptores α_6 GABA_A ocurre solo a nivel de las motoneuronas y no sobre las fibras aferentes primarias (Bautista *et al.*, 2010).

Conclusión y perspectivas

Los hallazgos que se obtuvieron por medio de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, de biología molecular e inmunohistoquímica sugieren la presencia de una corriente tónica en las motoneuronas de la tortuga mediada por los receptores GABA_A conformados con la subunidad α_6 , que modulan dinámicamente la excitabilidad de las motoneuronas modificando la resistencia de entrada así como la eficacia y la integración sináptica.

De este trabajo surgen una serie de preguntas que podrían ser tema de investigación relevante:

- 1) ¿Se expresan o no las subunidades α_4 y δ en la médula espinal de la tortuga adulta?

Este problema se podría abordar empleando otros oligonucleótidos y anticuerpos específicos contra dichas subunidades.

- 2) ¿Qué otra(s) subunidad(es) α conforma(n) los receptores GABA_A que no son sensible a furosemida? Una posibilidad sería α_5 , cuya expresión podría estudiarse empleando el antagonista inverso L-655,708.

- 3) ¿La expresión de la subunidad α_6 está segregada en los diferentes tipos de motoneuronas? Esto podría ser evaluado empleando la técnica de RT-PCR en célula única.

REFERENCIAS

- Álvarez FJ, Taylor-Blake B, Fyffe RE, De Blas AL, Light AR (1996). Distribution of immunoreactivity for the β_2 and β_3 subunits of the GABA_A receptor in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 365: 392- 412.
- Andrés C (2010). Expresión de receptores GABA_A extrasinápticos ($\alpha 6$) en la médula espinal de la tortuga: caracterización funcional e inmunolocalización. Tesis de Maestría. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav-IPN.
- Ataka T, Gu JG (2006). Relationship between tonic inhibitory currents and phasic inhibitory activity in the spinal cord lamina II region of adult mice. *Mol Pain* 2: 36.
- Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA (2001). Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by γ -aminobutyric acid A receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 59: 814-824.
- Bautista W, Aguilar J, Loeza-Alcocer JE, Delgado-Lezama R (2010). Pre- and postsynaptic modulation of monosynaptic reflex by GABA_A receptors on turtle spinal cord. *J Physiol* 588: 2621-2631.
- Betley JN, Wright CV, Kawaguchi Y, Erdélyi F, Szabó G, Jessell TM, Kaltschmidt JA (2009). Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit. *Cell* 139: 161-174.
- Blanton MG, Lo Turco JJ, Kriegstein AR (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 30: 203-210.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM (1996). Laminar compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 16: 283-297.

- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M (1996). Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors. *J Physiol* 497: 753-759.
- Brickley SG, Mody I (2012). Extrasynaptic GABA_A receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73: 23-34.
- Castro A, Aguilar J, González-Ramírez R, Loeza-Alcocer E, Canto-Bustos M, Felix R, Delgado-Lezama R (2011a). Tonic inhibition in spinal ventral horn interneurons mediated by $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 26-31.
- Castro A, Aguilar J, Andrés C, Félix R, Delgado- Lezama R (2011b). GABA_A receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord. *Neuroscience* 192: 74-80.
- Chadderton P, Margrie TW, Häusser M (2004). Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature* 428: 856-860.
- Chen TH. Distribution and status of the introduced red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Taiwan. National Museum of Marine Science and Technology. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan and IUCN, Gland, Switzerland, 2006. pp: 187 -195.
- Cullheim S, Kellerth JO (1981). Two kinds of recurrent inhibition of cat spinal α -motoneurons as differentiated pharmacologically. *J Physiol* 312: 209-324.
- Curtis DR, Phillis JW & Watkins JC (1959). The depression of spinal neurons by gamma-amino-n-butyric acid and f-alanine. *J Physiol* 146, 185-203.

- Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* 8: 1-19.
- Delgado-Lezama R, Aguilar J, Cueva-Rolon R (2004). Synaptic strength between motoneurons and terminals of the dorsolateral funiculus is regulated by GABA receptors in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol* 91: 40-47.
- Delgado-Lezama R, Loeza-Alcocer E, Andrés C, Aguilar J, Guertin PA, Felix R (2013). Extrasynaptic GABA_A receptors in the brainstem and spinal cord: structure and function. *Curr Pharm Des* 19: 4485-4497.
- Ernst CH, Lovich JE (2009). *Turtles of the United States and Canada. Second edition.* Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Farrant M, Nusser Z (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosci* 6: 215-229.
- Geiman EJ, Zheng W, Fritschy JM, Alvarez FJ (2002). Glycine and GABA_A receptor subunits on Renshaw cells: relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J Comp Neurol* 444: 275-289.
- Glykys J, Mody I (2007). Activation of GABA_A receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 5: 763-770.
- Glykys J, Mody I (2007). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 582.3: 1163-1178.
- Grasshoff C, Netzhammer N, Schweizer J, Antkowiak B, Hentschke H (2008). Depression of spinal network activity by thiopental: shift from phasic to tonic GABA_A receptor-mediated inhibition. *Neuropharmacology* 55: 793-802.

- Gutiérrez A, Khan ZU, De Blas AL (1996). Immunocytochemical localization of the $\alpha 6$ subunit of the γ -aminobutyric acid A receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol* 365: 504-510.
- Hamann M, Rossi DJ, Attwell D (2002). Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron* 33: 625-633.
- Herd MB, Haythornthwaite AR, Rosahl TW, Wafford KA, Homanics GE, Lambert JJ, Belelli D. (2008). The expression of GABA_A β subunit isoforms in synaptic and extrasynaptic receptor populations of mouse dentate gyrus granule cells. *J Physiol* 586: 989-1004.
- Hochman DW, Schwartzkroin PA (2000). Chloride-cotransport blockade desynchronizes neuronal discharge in the "epileptic" hippocampal slice. *J Neurophysiol* 83: 406-417.
- Hounsgaard J, Kiehn O, Mintz I (1988). Response properties of motoneurons in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 398: 575-589.
- Huang S, Uusisaari MY (2013). Physiological temperature during brain slicing enhances the quality of acute slice preparations. *Front Cell Neurosci* 7: 48.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008). GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9: 331- 343.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J (1998). Co-release of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419-424.
- Kaneda M, Farrant M, Cull-Candy SG (1995). Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J Physiol* 485: 419-435.

- Korpi ER, Kuner T, Seeburg PH, Lüddens, H (1995). Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific γ -aminobutyric acid type receptor. *Mol Pharmacol* 47: 283-289.
- Loeza-Alcocer E, Canto-Bustos M, Aguilar J, González-Ramírez R, Felix R, Delgado-Lezama R (2013). α_5 GABA_A receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol* 110: 2175-2184.
- Lüscher B, Kellera CA (2004). Regulation of GABA_A receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102: 195-221.
- Major G, Larkman AU, Jonas P, Sakmann B, Jack JJ (1994). Detailed passive cable models of whole-cell recorded CA3 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 14: 4613-4638.
- Martínez-Silvestre, A., Hidalgo-Vila, J., Pérez-Santigosa, N., Díaz-Paniagua, C. (2011). Galápagos de Florida –*Trachemys scripta* (Schoepff, 1792). En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>. pp: 1-39.
- Mody I, Pearce RA (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA_A receptors. *Trends Neurosci* 27: 569-575.
- Moyer JR Jr, Brown TH (1998). Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats. *J Neurosci Methods* 86: 35-54.

- Numata JM, van Brederode JF, Berger AJ (2012). Lack of an endogenous GABA_A receptor-mediated tonic current in hypoglossal motoneurons. *J Physiol* 590: 2965-2976.
- Nusser Z, Mody I (2002). Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87: 2624-2628.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998). Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18: 1693-1703.
- Nusser Z, Sieghart W, Stephenson FA, Somogyi P (1996). The $\alpha 6$ subunit of the GABA_A receptor is concentrated in both inhibitory and excitatory synapses on cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16: 103-114.
- Olsen RW, Sieghart W (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60: 243-260.
- Ornung G, Ottersen OP, Cullheim S, Ulfhake B (1998). Distribution of glutamate-, glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp Brain Res* 118: 517-532.
- Peng YY, Frank E (1989). Activation of GABA_A receptors causes presynaptic and postsynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *J Neurosci* 9: 1516-1522.
- Pérez-Santiagosa N, Díaz-Paniagua C, Hidalgo-Vila J (2008). The reproductive ecology of exotic *Trachemys scripta elegans* in an invaded area of southern Europe. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 10: 10-19.

- Persohn E, Malherbe P, Richards JG (1991). *In situ* hybridization histochemistry reveals a diversity of GABA-receptor subunit mRNAs in neurons of the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neuroscience* 42: 497-507.
- Petri S, Schmalbach S, Grosskreutz J, Krampfl K, Grothe C, Dengler R, Van Den Bosch L, Robberecht W, Bufler J. Robberecht W, Bufler J (2005). The cellular mRNA expression of GABA and glutamate receptors in spinal motor neurons of SOD1 mice. *J Neurol Sci* 238: 25-30.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 101(4):815-50.
- Pongracz F, Firestein S, Shepherd GM (1991). Electrotonic structure of olfactory sensory neurons analyzed by intracellular and whole cell patch techniques. *J Neurophysiol* 65: 747-758.
- Reali C, Russo RE (2005). An integrated spinal cord-hindlimbs preparation for studying the role of intrinsic properties in somatosensory information processing. *J Neurosci Methods* 142: 317-326.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000). Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80: 767-852.
- Rossi DJ, Hamann M (1998). Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity $\alpha 6$ subunit GABA_A receptors and glomerular geometry. *Neuron* 20: 783-795.
- Ruano D, Létang V, Biton B, Avenet P, Benavides J, Scatton B, Vitorica J (2000). Subunit composition of rat ventral spinal cord GABA_A receptors, assessed by single cell RTmultiplex PCR. *Neuroreport* 11: 3169-3173.

- Rudomín P, Jiménez I, Quevedo J, Solodkin M (1990). Pharmacologic analysis of inhibition produced by last-order intermediate nucleus interneurons mediating nonreciprocal inhibition of motoneurons in cat spinal cord. *J Neurophysiol* 63: 147-160.
- Ruigrok TJ, Crowe A, ten Donkelaar HJ (1985). Dendrite distribution of identified motoneurons in the lumbar spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J Comp Neurol* 238: 275-285.
- Russo RE, Hounsgaard J (1966a). Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an *in vitro* preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 493: 39-54.
- Russo RE, Hounsgaard J (1996b). Burst-generating neurones in the dorsal horn in an *in vitro* preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 493: 55-66.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004). Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27: 262-269.
- Sinkkonen ST, Vekovischeva OY, Möykkynen T, Ogris W, Sieghart W, Wisden W, Korpi ER (2004). Behavioural correlates of an altered balance between synaptic and extrasynaptic GABAergic inhibition in a mouse model. *Eur J Neurosci* 20: 2168-2178.
- Somma LA, Foster A, Fuller P (2009). *Trachemys scripta elegans*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL.
<http://www.issg.org/database/species/references.asp?si=71&fr=1&sts=&lang=EN>
- Staley KJ, Otis TS, Mody I (1992). Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol* 67: 1346-1358.

- Svirskis G, Gutman A, Hounsgaard J (1997). Detection of a membrane shunt by DC field polarization during intracellular and whole cell recording. *J Neurophysiol* 77: 579-586.
- Takahashi A, Mashimo T, Uchida I (2006). GABAergic tonic inhibition of substantia gelatinosa neurons in mouse spinal cord. *Neuroreport* 17: 1331-1335.
- Thompson SA, Arden SA, Marshall G, Wingrove PB, Whiting PJ & Wafford KA (1999). Residues in transmembrane domains I and II determine γ -aminobutyric acid type A receptor subtype-selective antagonism by furosemide. *Mol Pharmacol* 55: 993-999.
- Wall MJ (2002). Furosemide reveals heterogeneous GABA_A receptor expression at adult rat Golgi cell to granule cell synapses. *Neuropharmacology* 43: 737-49.
- Wall MJ (2003). Competitive GABA_A receptor antagonists increase the proportion of functional high-affinity $\alpha 6$ subunit-containing receptors in granule cells of adult rat cerebellum. *Neuropharmacology* 44: 56-69.
- Wisden W, Grundlach AL, Barnard EA, Seeburg PH, Hunt SP (1991). Distribution of GABA_A receptor subunit mRNAs in rat lumbar spinal cord. *Mol Brain Res* 10: 179-183.
- Yang J, Zorumski CF (1989). Trifluoperazine blocks GABA-gated chloride currents in cultured chick spinal cord neurons. *J Neurophysiol* 61: 363-373.