



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**"Acciones tróficas de GABA: implicancias en la
diferenciación sexual del cerebro"**

por

Biól. Franco Rafael Mir

Directora: Dra. María Julia Cambiasso

Co-Director: Dr. Hugo Felipe Carrer



Laboratorio de Neurofisiología
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC - CONICET - UNC

Córdoba, Argentina

- 2014 -

COMISIÓN ASESORA

María Julia Cambiasso

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

Mónica Lidia Fiszman

Center for Drug Evaluation and Research, Maryland

Daniel Asmed García

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Mónica Lidia Fiszman

Firma:

Daniel Asmed García

Firma:

Mariela Perez

A la memoria del gordito Mir



AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Mónica Fiszman, Daniel García y Mariela Perez, mi tribunal de tesis. Por sus correcciones y aportes para mejorar mi trabajo, por su comprensión y el compromiso con el que llevaron adelante su tarea de asesoramiento científico. Gracias por su buena onda y cariño.

A la Dra. Julia Cambiasso, mi directora. Por su confianza, por creer en mí y en mis capacidades. Por aceptar mis limitaciones y ayudarme a superarlas. Gracias por todo lo que me ha enseñado sobre el quehacer del laboratorio, por su apoyo a mis intereses por fuera de lo estrictamente académico. Gracias por respetar mi opinión, a veces contraria a la opinión de las autoridades del Instituto e inclusive la de ella misma. Le agradezco su enorme ayuda en cuestiones que nada tenían que ver con el laboratorio o mi trabajo, por comportarse como una verdadera amiga. Porque admiro su capacidad para llevar adelante la difícil tarea de dirigir becarios, por su compromiso y empuje. Gracias por trabajar codo a codo en la mesada y por haberme hecho sentir útil para alcanzar los objetivos del laboratorio. Por su crítica, su cariño y consideración.

Al Dr. Hugo Carrer, mi co-director. Por compartir sin retaceos sus conocimientos, por enseñarme desde electrofisiología hasta cómo escribir la tesis. Por sus correcciones siempre acertadas, por su humildad y sencillez. Porque admiro enormemente su garra y compromiso con los proyectos que emprende, por ser uno de mis referentes académicos. Por su paciencia y comprensión. Porque junto a Julia han podido canalizar mi energía, mis delirios, mis ganas, mis ansias y capitalizarlas en esta tesis. Sin lugar a dudas, el resultado de mi trabajo hubiera sido distinto sin su activa participación. Muchas gracias a los dos por eso.

A mis amigos y compañeros del laboratorio. A Nora Isoardi, Paula Freites y en especial a Sole Lucci por quererme, por aceptarme como su amigo, por ser siempre dulce conmigo. Por supuesto, un gracias enorme a mi amiga Silvana Gorosito. Desde el momento en que llegué al laboratorio estuvo dispuesta a ayudarme desinteresadamente y por enseñarme a hacer los mejores cultivos. Por abrirme las puertas de su casa y disfrutar de su familia. Por convertirse en una persona inolvidable para mí. También quiero darles las gracias a Nahuel Peinetti, Leonie De Ruijter, Betina Gonzalez, Karina Tomé, Lucas Cabrera Zapata y muy especialmente a Carla Cisternas y Julia Scerbo, ellas me han ayudado enormemente en las últimas etapas de mi doctorado. Por su amistad y

buena onda, por sus palabras de aliento cuando mis ganas flaqueaban y por estar ahí siempre.

A todos ellos, muchísimas gracias por sus aportes y críticas a mi trabajo, por recibir y considerar los míos a sus proyectos. Por todos los mates, consejos y favores. He aprendido mucho de ustedes, gracias por hacer cada día en el laboratorio un día mejor.

A la Dra. Laura Vivas y a las chicas de su laboratorio, Ximena Caeiro, Andrea Godino, Fabiola Macchione y Carolina Dalmaso por tantos años de amistad y cariño. Verlas avanzar en lo personal y laboral me llena de dicha y les agradezco haberme hecho parte de su crecimiento y de sus vidas. Quiero darle las gracias especialmente a Florencia Dadam, por ser mi amiga, por toda su ayuda y por las hermosas canciones que musicalizaron mis días de escritura de tesis.

A la Dra. Mariana Bollo y a María José Virgolini. Por su ayuda, buena onda y los chistes de pasillo. Por los cafecitos pos-almuerzo y por su cariño sincero.

A la Dra. Gabriela Paglini, por ser mi amiga y permitirme conocer a su hermosa familia. Gracias por los consejos, los momentos dentro y fuera del laboratorio y por quererme tanto. Muy especialmente quiero agradecer a los chicos del Lab. A mi amigo Favio Krapacher, por su cariño y amistad, su ayuda en temas científicos y de los otros. A Soledad Ferreras, por quererme y aceptarme como su amigo, por hacerme sentir de su familia y por el cariño que ellos me han dado. A Viqui Pisano, por ser el pimpollo del Instituto, por su buena onda de siempre y por el amor de tantos años que ella y su familia me brindaron. Gracias por la ayuda con los test no paramétricos de esta tesis. A Evelin Cotella, por su amistad y cariño, por estar siempre y por abrirme las puertas de su casa y de su familia. A Cecilia Mlewski, por ser tan dulce, por su amistad, sus consejos y por pedir mi opinión, por presentarme a la Yola y quererme tanto. Gracias por su ayuda con las imágenes de los blots de esta tesis. Gracias a Carlos Arias, Damián Reville, Guillermo Fernández y Stefanía Castelló por su amistad y por su ayuda durante este tiempo.

Al Dr. Alfredo Lorenzo por su ayuda y confianza. A Anahí Bignante, Pablo Helguera y Emiliano Zamponi por su cariño y amistad. En especial a mi amiga Florencia Heredia, por todo el amor que me da, por tantas charlas y por la enorme confianza que tiene en mí. Gracias a Nacho Jausoro por su ayuda y cariño, y a Ema y Vera por quererme tanto.

A mis amigos y compañeros del Instituto Ferreyra, a todos ellos. Por todos los asados, picadas, tortas y demás festejos que compartimos. Por todas las risas y las broncas, la solidaridad entre nosotros y el compromiso con la institución y la ciencia. Por ser el recurso más valioso del Ferreyra, por su calidad humana y profesional. Por la ayuda que me brindaron para poder llevar a cabo mis experimentos. Por sus críticas y recomendaciones, por aportar sus conocimientos para mejorar mi trabajo, por apoyarme y alentarme. Gracias por hacerme divertir y disfrutar mis días en el Instituto. Porque se convirtieron en una pieza fundamental en mi formación científica y personal. Porque los quiero mucho y por permitirme ser su amigo. Gracias a Florencia Sanchez, Cecilia Vranych, Cecilia Merino, Nahuel Zamponi, Gonzalo Mayol, Silvana Miras, Constanza Feliziani, Iván Mestres, Soledad Coria, Gonzalo Quassollo, Mariano Bisbal, Nicolás Unsain, Gimena Farías, Ana Vivinetto, Sebastián Miranda, Marcela Culleré, Mariana Pueta, Luciano Ponce, Samanta March, Gabriela Kedikian, Daniel Raimunda, Christian Bender, Florencia Ghibaudo y a todos los nuevos becarios con los que he compartido buenos momentos e interesantes charlas. Gracias especialmente a José Wojnacki, Laura Gastaldi, Luján Masseroni, Anabela Palandri, Victoria Rozés y Cristina Arias por su amistad sincera y buena onda y los hermosos momentos que compartimos juntos.

A las autoridades del Instituto Ferreyra, por brindarme las condiciones necesarias para realizar mi tesis, por la contención, la confianza y el apoyo. También quiero agradecer a todos los Investigadores, en especial a los Dres. Juan Carlos Molina y Alfredo Cáceres por su ayuda y consejos. Particularmente al Dr. Alberto Díaz Añel, por su amistad.

Al personal técnico y administrativo del Instituto. A Susana Perez, Silvina Ferrer, Monica Remedi, Myriam Siravegna, Betty Haymal, Marcelo Perossio y la Dra. Soledad de Olmos por su ayuda con las imágenes de esta tesis. Muy especialmente, quiero agradecer a mis amigos del bioterio quienes me recibieron y aceptaron como compañero de trabajo. Gracias por todo el cariño, por comprenderme y apoyarme. Gracias Sergio Ohms, Adriana Blanco, Eliana Martinez, Roberto Ramallo, Nicolas Hanish, Romina Maiorano, Milagros Nigro y Patricio Pereyra por su amistad y todo lo que me enseñaron.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, CONICET y al Instituto Ferreyra por las becas otorgadas para realizar este trabajo de tesis.

A la Cátedra de Fisiología Animal, en especial a la Dra. Marta Suárez. Por confiar en mis capacidades como docente, por hinchar siempre por mí, por sus consejos y ayuda

incondicional. También quiero agradecer a Laura Vivas, María Angélica Rivarola, Patricia Durando, Gustavo Baiardi, Georgina Renard y Verónica Trujillo quienes me ayudaron a crecer como docente, por enseñarme a amar la profesión y por no permitir que me alejara de la facultad y los estudiantes. Muchas gracias por su cariño sincero y por alegrarse por cada uno de mis logros.

A la Universidad Nacional de Córdoba, pública y gratuita. Por brindarme las condiciones necesarias para que hoy alcance el segundo título de esta casa de estudios, por su compromiso social y su excelencia académica. En especial, quiero agradecer a sus Rectores, los Dres. Carolina Scotto y Francisco Tamarit por su invaluable apoyo y su entera confianza. Por todo su cariño y aliento, los admiro y los quiero profundamente. En particular quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, al Consejo Directivo y personal administrativo del Doctorado en Ciencias Biológicas por su acompañamiento en este camino. Gracias a Eugenia Haro, por su enorme ayuda para que pudiera rendir esta tesis en tiempo y forma.

A mis compañeros y amigos de la Universidad de Concepción, Chile. Porque me trataron de lo mejor, por incluirme en su grupo y hacerme sentir como en casa. Por preocuparse por mí, por mantenerme entretenido para que no extrañara tanto. Por toda su ayuda con mis experimentos y por dejarme participar en los suyos. Por las bienvenidas y las despedidas que organizaron en mi honor, por abrirme sus hogares y por ser realmente mis hermanos transcordilleros. En particular, quiero agradecer al Dr. Luis Aguayo por permitirme realizar en su laboratorio los experimentos de mi tesis cuando los cultivos del Ferreyra dejaron de funcionar. Es una ayuda que no olvidaré nunca y por lo que estaré siempre agradecido. Gracias por sus críticas y recomendaciones. A Claudia Lopez Toro, por su asistencia técnica, por su buena onda y cariño. A la Dra. Brigitte Van Zundert, por hacerme parte de su grupo y permitirme colaborar con los objetivos de su laboratorio. Muy especialmente quiero agradecer a mis amigos Gustavo Moraga Cid, Carola Muñoz Montesinos, Elena Molina LLanos, Magdalena Cuevas, Elsa Fritz, Andrés Guzmán, Camila Riquelme, Julián Toledo, Trinidad Mariqueo, Adolfo Agurto y Fernando Sepúlveda por sus aportes, por enseñarme algunas de las técnicas que hoy manejo, por su constante apoyo y por su sincera amistad, por todos los buenos carretes y copetes, por las hermosas e interminables reuniones. Los quiero un montón y les agradezco su afecto y contención.

A mi familia chilena. A Fernando Delgado y Luz Valda, por aceptarme como a un hijo en su familia, por compartir conmigo el amor, los buenos y malos momentos. Los

quiero muchísimo, gracias por la contención en mi estadía en Chile. A la abuela Rosalba y a la tía Nany, por las once, los juegos de cartas, los chocolates y todo el cariño que me han dado. A Alberto, Vania, Miguel y Mauricio, mis hermanos. Por aceptarme en su casa y compartir todo como una familia, por su cariño, las largas charlas, los inolvidables viajes y los karaokes. A Sofía, por recordarme todo el tiempo lo maravillosos que son los niños. Los quiero a montones. A mis amigos Danitza Torres, Fernanda Herrera Barrandeguy, Martín Refer, Jean-Pierre Molina y Alfredo Melo por su amistad y cariño, por los paseos y el mar.

A los Jóvenes Investigadores en Neurociencias. Por ser un grupo hermoso de gente comprometida, trabajadora y brillante. Por trabajar arduamente y codo a codo por la divulgación científica. Por darme la oportunidad de compartir con la sociedad lo que hacía en el laboratorio y por coparse con cada loca idea que llevaba al grupo. En especial quiero darles las gracias a mis hermosos amigos Laura Montroull, Lisandro Laurino y Federico Langer. Por alentarme y apoyarme, pero por sobre todas las cosas por quererme así como lo hacen. Aguanten los JINes!!

A la Asociación Civil Soles y al cuerpo de voluntarios, gracias por el trabajo de 365 días al año para que cada día en el Hospital sea un poquito más llevadero para los solcitos y sus familias. Por enseñarme el valor de ayudar al prójimo, por ser un ejemplo de juventud participativa y activa por el bienestar de los demás. Por todo el cariño y la contención. Muy especialmente, gracias a mi madrina Melina De Bernardo. Por su sinceridad, su amor y sus palabras de aliento. Te admiro y te quiero hasta el sol.

A mis amigos y compañeros de la Especialización en Comunicación Pública de la Ciencia y Periodismo Científico. Por todos los hermosos momentos que hemos compartido, por aprender juntos a contar la ciencia, por su respeto y cariño. Los admiro mucho, en especial quiero agradecer a Graciela Vega y Lisha Dávila. Un gracias enorme a mis amigos Lucas Gianre, Juan Pablo Dalmaso y Maru Lopez Cordero, por ser los locos más lindos de la Espe. Por su ayuda y amistad, por todo lo que aprendí de ustedes. Los quiero.

A La Vueltalperro teatro y Tacurú teatro. Gracias porque en el grupo encontré mi espacio de militancia política y social. Gracias por las larguísimas discusiones, por los arduos entrenamientos. Gracias por sensibilizarme ante las injusticias, por apoyar las luchas sociales, por ayudarme a interpretar la realidad y por creer conmigo que todo puede ser mejor, que nos merecemos una sociedad más justa e igualitaria. Pero por

sobre todo, gracias por pelear todos los días para alcanzar esos sueños. He aprendido mucho de ustedes. Particularmente muchas gracias a mi amigo Senón Sosa, por hacer que este cuerpo flaco pudiera decir y hacer cosas importantes. Gracias por confiar en mi capacidad actoral y explotarla, por ser mi amigo y compañero. Muchas gracias a Rubén Iturriaga, Ayelén Acuña, Memi Estrada, David Mecoli, Vreni Schindler y Jimena Ghisolfi amigos, compañeros, cómplices, hermanos. Por todas las juntadas, las obras, las risas y las peleas. Por acompañarme y promover mi crecimiento actoral y personal. Por quererme de tan loca manera y abrazarme el corazón en cada gesto. A Bernarda y Federica Solenopsis, sin ustedes Gregorio jamás hubiera salido de su cueva... un gracias infinito por aceptar los desafíos y permitirse soñar como insectos. Gracias a Eugenia Aravena, amiga y compañera y a las chicas de AMMAR-Córdoba. Siento un profundo respeto y admiración por su lucha. Por una Ley que reconozca el Trabajo Sexual en Argentina!!!

En especial quiero agradecer a mi hermano del alma, David Sitto. Por todo su amor, su sensibilidad, su fuerza y compromiso. Por compartir conmigo los momentos buenos y los difíciles. Por los miles de mates y millones de cigarrillos. Por abrir su corazón y aceptarme en él. Por regalarme momentos inolvidables, por ser mi maestro en tantas cuestiones y por su incondicionalidad absoluta. Te quiero mi bro.

A la Franidad, mis concubinos. A Catriel Ruiz, hermano y amigo. Nos elegimos hace mucho y lo seguimos haciendo cada día. Por su amistad imborrable, sus delirios y por hacerme sentir importante en su vida. A Enrique Frana, hermano y amigo. Nos elegimos hace poco y lo seguiremos haciendo por mucho tiempo más. Por su compañía y amistad, por su tranquilidad y franqueza. Por dejarme compartir su vida, hermanos los quiero. Gracias por su ayuda y confianza. Especialmente quiero agradecer a los amigos que siempre frecuentan Bobone: Paola Simbrón, Eugenia Sedeño, Natalia Ferreyra, Joaquín Oliva, Mauricio Mrakovich, Anita Gasparín, Natalia Drazile, Juan Domingo Martino, Damián Bergandi, Sebastián Di Prinzi, Diego Puente, Sebastián Cañadel, Mauro Luti, Luis Ayeros, Enrique de Goycoechea y Vicky Sarno por todo el cariño que me dan. Particularmente a Diego Gimenez y Cristian Lager, por su amistad desde las épocas de la facu, por incluirme en sus vidas y por quererme tanto.

A mi familia, a los que amo con locura. Gracias a mis viejos, Sergio y Cecilia por su ejemplo, por su amor, por sus enseñanzas. Pero por sobre todo, gracias por confiar en mí. A mi madre, gracias por la fuerza y el coraje. A mi padre, gracias por la resistencia hasta dar la vida. Los amo eternamente. En especial, gracias a mis hermosos hermanos. Gaspar, por tu locura y tu confianza, por abrirme los ojos a otras realidades. Brian, por tu

sensibilidad, por acompañarme y perdonar mis errores. Nacho, gracias por los abrazos y las bromas, por tu talento y por elegirme como hermano. Paula, gracias por los besos, por tu amor, por tenerme siempre en cuenta. Los amo, los amo.

A Nacho Gutierrez, por darle un nuevo significado a la palabra amor en mi vida. Por su generosidad y sus enojos, por cuidarme y quererme. Por aguantarme día a día, por nuestros planes y aventuras. Por el amor. Por ser el compañero que elijo para caminar juntos a la par. Gracias gordo, te amo.

A los profesores de la facu, profesores de los cursos, investigadores, colegas y alumnos que han contribuido a mi formación profesional y personal. A todos aquellos que de una manera u otra me han permitido llegar hasta acá. Muchas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **[Cl]_i**: concentración intracelular de Cl⁻
- **AR**: receptor de andrógenos
- **ATF-1**: factor de transcripción activador tipo 1
- **AVPV**: núcleo anteroventral periventricular
- **BDNF**: Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
- **BMI**: meta-yoduro de bicuculina
- **Brd**: 5-deoxibromouridina
- **BSA**: albúmina sérica bovina
- **CaM**: calmodulina quinasa
- **CAMKII**: calcio calmodulina quinasa 2
- **CAMKs**: calcio/calmodulina quinasas
- **CB-1**: receptor de cannabinoides tipo 1
- **CBP**: proteína de unión al CREB
- **CCDV**: canales de calcio dependientes de voltaje
- **CCK**: colecistoquinina
- **CLC2**: canal de cloruro dependiente de voltaje tipo 2
- **Coup TF**: factores de transcripción Coup 1 y 2
- **CP**: plato cortical
- **CREB**: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
- **DAB**: 3,3'-diamino benzidina
- **DIV**: días *in vitro*
- **D-MEM**: medio esencial mínimo modificado por Dulbeco
- **DMSO**: dimetil sulfóxido
- **E16**: 16 días de edad gestacional
- **EC50**: concentración de un agonista para obtener el 50% de la respuesta máxima
- **E_{Cl}**: potencial de reversión del ión Cl⁻
- **Enkep**: encefalina
- **ER α** : receptor de estrógeno α
- **F10**: D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino
- **F12**: D-MEM / mezcla de nutrientes Ham F12
- **GABA**: ácido gamma-amino butírico
- **GABA_A**, **GABA_B** y **GABA_C**: receptores de GABA tipo A, B y C
- **GABA-T**: GABA-transaminasa

- **GAD:** ácido glutámico decarboxilasa
- **GAT:** transportador de GABA de alta afinidad
- **GHSR:** receptor secretagogo de hormona de crecimiento
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia
- **HVM:** hipotálamo ventromedial
- **islet-1:** factor de transcripción islet-1
- **IZ:** zona intermedia
- **JNKs/SAPKs:** c-jun N-terminal quinasa/proteinquinasa activadas por estrés
- **KCC2:** cotransportador de K^+/Cl^-
- **KCC2:** cotransportador K^+/Cl^-
- **KO:** knock-out
- **LTP:** Potenciación a Largo Plazo
- **MAP2:** proteína asociada a microtúbulos tipo 2
- **MAPK:** MAP quinasa
- **MAPKK o MAP2K:** MAP quinasa quinasa
- **MAPKKK o MAP3K:** MAP quinasa quinasa quinasa
- **MAPKs:** vía de las quinasa activadas por mitógenos
- **MC:** medio condicionado por astrogliá
- **MT:** dominio transmembrana
- **NGF:** Factor de Crecimiento Nervioso
- **Ngn3:** neurogenina 3
- **NKCC1:** cotransportador de Na^+, K^+-2Cl^-
- **nkx2.1:** factor de transcripción nkx2.1
- **nNOS:** óxido nítrico sintetasa neuronal
- **NVM:** núcleo ventromediano del hipotálamo
- **OTR:** receptor de oxitocina
- **p38 MAPKs:** p38 proteinquinasa activadas por mitógenos
- **p42/44 MAPK - ERK1/2:** proteína quinasa activada por mitógenos 1 y 2 - *quinasa regulada por señales extracelulares*
- **PACAP:** polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
- **PAGE-SDS:** electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
- **PBS:** buffer salino fosfato
- **PMR:** potencial de membrana en reposo
- **Ser / Thr:** serina / treonina
- **SF-1:** Factor Esteroidogénico-1

- **slit3**: neuropéptido slit3
- **SNC**: sistema nervioso central
- **Sox14**: factor de transcripción Sox14
- **SST**: somatostatina
- **THIP**: gaboxadol
- **TTBS**: buffer Tris-salino con detergente Tween-20
- **VGAT**: transportador vesicular de GABA
- **ZSV**: zona subventricular
- **ZV**: zona ventricular

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Farmacología de los receptores GABA_A</i>	7
<i>Respuesta a GABA y receptores GABA_A durante el desarrollo</i>	10
<i>Acciones tróficas de GABA</i>	13
<i>Vías de señalización intracelular implicadas en la regulación del crecimiento por receptores GABA_A</i>	17
<i>GABA y diferenciación sexual del cerebro</i>	20
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
MÉTODOS UTILIZADOS	27
<i>Preparación de cultivos primarios de células disociadas</i>	27
<i>Disección</i>	27
<i>Disociación</i>	27
<i>Siembra y Mantenimiento</i>	28
<i>Esterilización de materiales y soluciones</i>	29
<i>Estudio electrofisiológico de neuronas hipotalámicas macho y hembra</i>	29
<i>Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para el análisis electrofisiológico</i>	29
<i>Electrofisiología</i>	31
<i>Análisis del efecto neuritogénico por activación de receptores GABA_A</i>	32
<i>Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para los estudios morfométricos</i>	32
<i>Fijación</i>	34
<i>Inmunocitoquímica</i>	34
<i>Morfometría</i>	35
<i>Estudio de la fosforilación de ERK1/2</i>	36
<i>Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para el análisis de proteínas</i>	36
<i>Western blot</i>	36
<i>Análisis estadístico</i>	37
MATERIALES UTILIZADOS	39
<i>Soluciones y buffers</i>	39

Medios de cultivo.....	39
Antibióticos.....	40
Inhibidores específicos.....	40
Antagonistas, agonistas y moduladores alostéricos.....	40
Anticuerpos.....	41
RESULTADOS	42
<i>CARACTERIZACIÓN DE CORRIENTES GABAÉRGICAS EN CULTIVOS DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE EMBRIONES DE RATA MACHO Y HEMBRA</i>	43
Caracterización de la respuesta a GABA y propiedades pasivas de la membrana.....	43
Determinación del potencial de reversión (E_{Cl}) y concentración intracelular del ión cloruro.....	45
Curva dosis-respuesta a GABA.....	46
Caracterización farmacológica de los receptores GABA _A	47
<i>ANÁLISIS DE LA PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES GABA_A EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE MACHO Y HEMBRA</i>	52
Efecto de la activación/bloqueo de los receptores GABA _A sobre el crecimiento y diferenciación neuronal.....	52
<i>ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INVOLUCRADAS EN EL CRECIMIENTO NEURONAL INDUCIDO POR ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_A</i>	56
Análisis de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol.....	56
Curva dosis-respuesta y curso temporal de la fosforilación de ERK1/2.....	56
Estudio del efecto del bloqueo de proteínquinasas y canales de calcio dependientes de voltaje sobre los cambios morfológicos inducidos por la activación de los receptores GABA _A	58
DISCUSIÓN	62
Caracterización electrofisiológica de neuronas hipotalámicas macho y hembra.....	64
La activación de los receptores GABA _A afecta el crecimiento de los procesos neuríticos de neuronas hipotalámicas.....	74
Calcio actúa como mensajero intracelular mediando el efecto de la activación de los receptores GABA _A sobre el crecimiento de axones y procesos menores de neuronas hipotalámicas.....	79
CAMKII y ERK1/2 participan parcialmente en la reducción de la longitud axonal mediada por activación de los receptores GABA _A de neuronas hipotalámicas.....	81
¿Y las diferencias sexuales qué?.....	86
CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	95

"Acciones tróficas de GABA: implicancias en la diferenciación sexual del cerebro"

RESUMEN

GABA ejerce acciones tróficas en neuronas inmaduras a través de sus receptores GABA_A. Con el objetivo de analizar diferencias sexuales en dicho efecto se estudiaron características distintivas de las neuronas hipotalámicas de machos y hembras a nivel de propiedades intrínsecas de la membrana, potencial de reversión y concentración intracelular de Cl⁻, sensibilidad al ligando, tipo de respuesta a moduladores específicos y la eficacia con la que éstos actúan en relación a las subunidades que componen los receptores. Algunas diferencias sexuales, como la mayor eficacia de propofol en hembras, nos habilitaron a hipotetizar la existencia de diferencias en el crecimiento y diferenciación entre machos y hembras en respuesta a la activación de los receptores GABA_A. La activación crónica de los mismos provoca una reducción de la longitud axonal y un aumento de la longitud de los procesos menores en ambos sexos. El análisis de las vías intracelulares involucradas en este efecto posiciona al calcio como actor principal ya que el bloqueo farmacológico de la entrada de dicho ión es capaz de revertir la reducción de la longitud axonal. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas evidencias sobre la participación de los receptores GABA_A en el crecimiento y fisiología de neuronas hipotalámicas macho y hembra.

"Trophic actions of GABA: implications in brain sexual differentiation"

ABSTRACT

GABA exerts trophic actions in immature neurons through GABA_A receptors. To analyze sex differences in that respect, intrinsic membrane properties, reversal potential and chloride intracellular concentration, ligand sensitivity, efficacy of allosteric modulators in relation to subunit composition of male and female hypothalamic neurons were studied. Some sex differences, such as the greater female propofol efficacy allow us to hypothesize the existence of differences in growth and differentiation in response to GABA_A receptor activation in male and female neurons. Chronic receptor activation decreased axonal length and increased minor processes length in both sexes. The analysis of the intracellular pathways involved in that effect pointed out calcium ions as the main actors. The pharmacological inhibition of calcium entry completely blocked the axonal length reduction. These results highlight the relevance of GABA_A receptors in growth and physiology of male and female hypothalamic neurons.

INTRODUCCIÓN

El ácido gamma-amino butírico (GABA), se localizó por primera vez en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos en 1971 (Bloom y Iversen, 1971) aunque sus funciones como neurotransmisor inhibitorio se conocían desde unos años antes (Purpura y col., 1957). Se encuentra en interneuronas en casi todas las regiones del cerebro, donde es usado para enviar señales que modulan negativamente la actividad neuronal (Maitre, 1997). Particularmente en el hipotálamo, alrededor del 50% de los botones presinápticos son inmunopositivos para GABA demostrando que es un neurotransmisor dominante en esa zona del cerebro (Decavel y van den Pol, 1992; Decavel y Van den Pol, 1990). También hay neuronas GABAérgicas de proyección, como las del prosencéfalo (Freund y Meskenaite, 1992), de la zona incierta (Nicoletti y col., 1992) y del neocórtex (Kawaguchi, 1993). El neurotransmisor es sintetizado en los terminales de neuronas GABAérgicas (figura 1. A) por remoción del grupo carboxilo del ácido glutámico (Roberts y Frankel, 1950). La enzima que cataliza la reacción es la ácido glutámico decarboxilasa (GAD), una enzima citosólica que requiere piridoxal fosfato (vitamina B) como cofactor para ser activa. Existen dos tipos de GAD, GAD65 y GAD67, que difieren en tamaño molecular, secuencia de aminoácidos, propiedades antigénicas, localización celular y están codificadas por genes diferentes (Erlander y col., 1991). Las vesículas presinápticas de secreción se cargan con el neurotransmisor mediante transportadores vesiculares y el mismo se libera en respuesta a calcio (Fon y Edwards, 2001); una vez en el espacio sináptico se une a receptores específicos para ejercer sus funciones y luego es recaptado en los terminales nerviosos o por células gliales por medio de sistemas de alta afinidad. El neurotransmisor es metabolizado a semialdehído succínico en el citoplasma por la enzima mitocondrial GABA-transaminasa (Cherubini y Conti, 2001).

Existen tres tipos de receptores para GABA, los ionotrópicos GABA_A y GABA_C y los metabotrópicos GABA_B (Luján y col., 2005; Watanabe y col., 2002).

Los receptores GABA_B son heterodímeros acoplados a proteína G y conformados por una de las dos subunidades R1a / R1b y una subunidad R2. La activación del receptor inhibe la adenilato ciclasa y afecta directamente canales de calcio y de potasio (Padgett y Slesinger, 2010; Pinard y col., 2010). Los receptores GABA_B se localizan en las membranas pre y postsinápticas. GABA ejerce la inhibición presináptica por medio de estos receptores reduciendo la corriente de calcio en el terminal nervioso con la consiguiente disminución de la liberación del neurotransmisor. La inhibición postsináptica mediada por dichos receptores involucra la activación de canales de potasio que hiperpolarizan la neurona (Bormann, 1988). Se ha sugerido que la inhibición pre y postsináptica se ejerce preferentemente a través de receptores GABA_B conformados por subunidades R1a y R1b respectivamente (Billinton y col., 1999; Huang, 2006). Son agonistas selectivos de los receptores GABA_B baclofen, ciclofen y el ácido 4-amino 3-(5-

clorotien 2-il) butírico, mientras que faclofen, saclofen, 2-OH-saclofen y CGP35348 son antagonistas selectivos (Ong y Kerr, 2000).

Los receptores GABA_C, son insensibles a bicuculina y baclofen. La respuesta del receptor es del tipo rápido, ya que el mismo es del tipo ionotrópico. Los efectos de este receptor son similares a los del receptor recombinante GABA_A compuesto por subunidades ρ , por lo que serían un subtipo del receptor GABA_A (Barnard y col., 1998).

Los receptores GABA_A (figura 1. B), son miembros de la familia de canales iónicos activados por ligando tales como los receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glicina y receptores de serotonina. Como los otros miembros de la familia, los receptores GABA_A están compuestos por cinco subunidades que conforman un poro central o canal selectivo permeable a iones cloruro (Cl⁻). Todas las subunidades presentan un gran dominio N-terminal extracelular, cuatro dominios transmembrana (MT) y un gran bucle intracelular entre MT3 y MT4 (Nys y col., 2013). Hay un total de 19 subunidades distintas (6 α , 3 β , 3 γ , 1 δ , 1 ϵ , 1 π , 1 θ y 3 ρ) clonadas y secuenciadas del sistema nervioso de mamíferos. Las variantes producidas por el corte y empalme alternativo del ARNm de algunas subunidades, por ejemplo la γ 2S y la γ 2L, aumentan la heterogeneidad. Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores GABA_A varían de acuerdo a su composición de subunidades. La mayoría de los receptores están compuestos de subunidades $\alpha\beta\gamma$. Su forma más estable sería 2 α , 2 β y 1 γ , dispuestas las cuatro subunidades α y β alternadas y conectadas por la γ . La distribución de los distintos tipos de receptores en el cerebro varía según la región y algunas presentan un franco predominio de un determinado tipo de receptor. Por ejemplo la subunidad α 6 está presente solamente en las células granulares del cerebelo y en el núcleo coclear, mientras que receptores con las subunidades ρ (conocidos también como receptores GABA_C) son predominantes en la retina (Barnard y col., 1998). El sitio de unión para GABA se encuentra en la interfase de las subunidades α y β , y se sabe que dos moléculas de dicho neurotransmisor son necesarias para la completa activación del receptor. La activación del canal resulta en un aumento en la conductancia al Cl⁻, el cual se mueve a uno u otro lado de la membrana dependiendo de su gradiente electroquímico (Baumann y col., 2003). La bicuculina es un antagonista competitivo del receptor, mientras que la picrotoxina es no competitivo. Son agonistas selectivos gaboxadol (THIP), isoguvacina, ácido isonipeptídico y muscimol. Muscimol es un alcaloide aislado del hongo *Amanita muscaria*, con propiedades alucinógenas, que actúa como un agonista total y puro del receptor GABA_A. La actividad de los receptores GABA_A puede ser modulada por una gran variedad de drogas farmacológica y clínicamente importantes, tales como benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides y anestésicos (Johnston, 1996). Esta característica, debida principalmente a la enorme heterogeneidad resultante de la

combinación de distintas subunidades en regiones específicas del cerebro, convierte a estos receptores en blancos propicios para el desarrollo de fármacos con efectos terapéuticos selectivos y pocos efectos secundarios adversos.

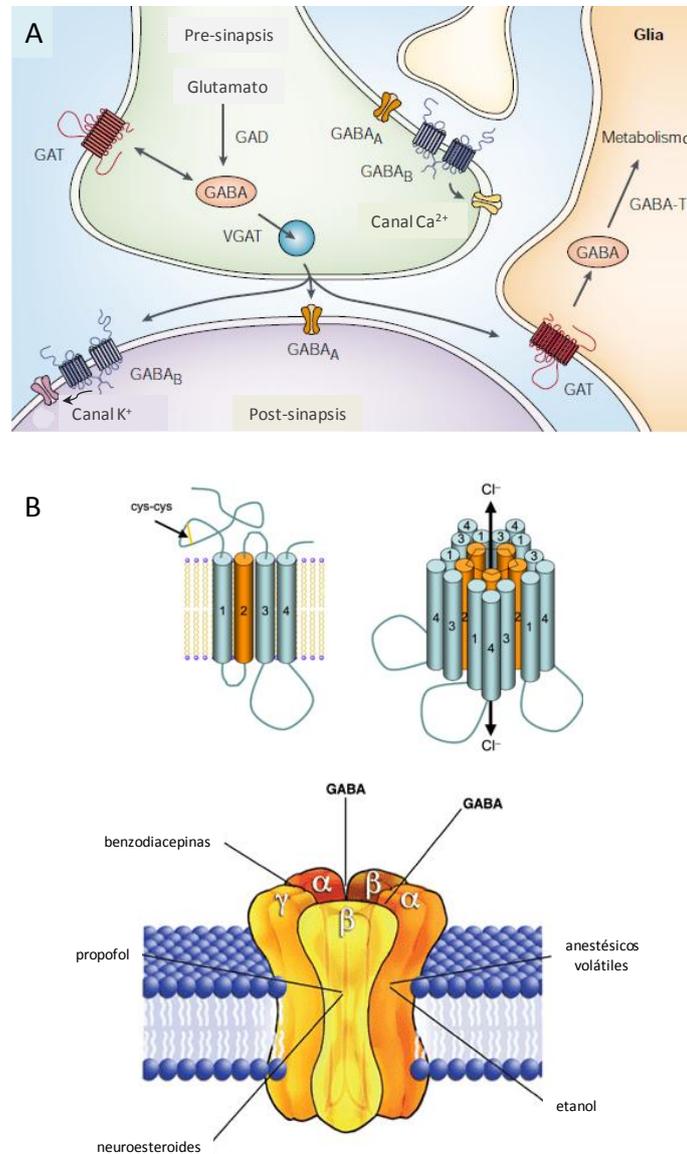


Figura 1. Componentes del sistema GABAérgico. **A** Esquema que muestra el sistema de síntesis, transporte, recaptación y metabolización de GABA en la sinapsis. **B** Estructura y moduladores del receptor GABA_A. Abreviaturas: GAD, ácido glutámico decarboxilasa; VGAT, transportador vesicular de GABA; GAT, transportador de GABA de alta afinidad; GABA-T, GABA-transaminasa (Adaptado de Owens y Kriegstein 2002).

Farmacología de los receptores GABA_A

La sensibilidad de los receptores GABA_A a su ligando natural es dependiente de la composición de subunidades que conforman el canal. Particularmente, se ha demostrado que está determinada por las subunidades α presentes en el receptor, siendo el orden de sensibilidad $\alpha 6 < \alpha 1 < \alpha 2 < \alpha 4 < \alpha 5 < \alpha 3$. Es más, se propone que cuatro aminoácidos del sitio de unión al ligando en la subunidad α son determinantes de la sensibilidad de los receptores al GABA (Böhme y col., 2004). La concentración efectiva 50 (EC50) es la concentración necesaria de un agonista para obtener la mitad de la respuesta máxima, y es el parámetro más utilizado en farmacología para comparar la afinidad de una sustancia por el receptor. El GABA posee un rango de valores de EC50 que va desde unos pocos nM hasta decenas de μ M dependiendo de las subunidades que conforman el canal. La subunidad δ le confiere al receptor una mayor sensibilidad (nM) que cuando lo hace con subunidades γ (μ M) (Belelli y col., 2009; Farrant y Nusser, 2005). Por su parte el coeficiente de Hill indica cuantos de los sitios activos del receptor afectan la afinidad de la unión del neurotransmisor / ligando exógeno a los restantes sitios activos. Es una medida de la cooperatividad de la unión de una molécula de sustrato al primer sitio activo de su receptor. Este coeficiente puede tomar valores mayores (cooperatividad positiva) o menores (cooperatividad negativa) que 1 (Purves y col 2001).

La composición de subunidades de los receptores GABA_A es determinante no sólo de la afinidad y eficacia o actividad intrínseca con la que actúan una enorme variedad de moduladores, agonistas y antagonistas, sino también de la dirección (positiva o negativa) de los efectos (Barnard y col., 1998; Johnston, 1996; Korpi y col., 2002). En base a rigurosos criterios estructurales, farmacológicos y de expresión, la Unión Internacional de Farmacología propone una lista de subtipos de receptores GABA_A nativos que: A) han sido identificados, B) su existencia es altamente probable y C) su existencia es presumible en el SNC de mamíferos (Olsen y Sieghart, 2008, 2009). Gracias al desarrollo de nuevos fármacos agonistas y antagonistas selectivos de ciertos subtipos de receptores y mediante estudios de electrofisiología se han podido establecer características distintivas en respuesta a los mismos. Más de 40 compuestos químicos han demostrado unirse a los receptores GABA_A y alterar su función o afinidad por otros ligandos. Entre ellos se destacan los moduladores alostéricos positivos o negativos, dependiendo si potencian o disminuyen respectivamente, la corriente inducida por GABA. Los moduladores alostéricos presentan sitios de unión distintos a los del ligando natural y modifican los estados o los tiempos de apertura del canal. Son agonistas aquellas sustancias que se unen al receptor en el sitio del neurotransmisor y producen la apertura del canal y el paso de iones Cl⁻ a favor de su gradiente electroquímico. Los agonistas

pueden ser puros, parciales o inversos. Los agonistas son puros o completos si activan al máximo la respuesta que es capaz de producir el receptor; parciales si la magnitud de la respuesta es menor a la respuesta máxima, e inversos si la respuesta es opuesta a la que producen los agonistas. También hay ligandos denominados antagonistas que se unen al receptor y no permiten que este funcione. Los antagonistas se clasifican en competitivos o no competitivos dependiendo si se unen al mismo sitio de unión de GABA o no, respectivamente. Además, existen compuestos que no producen efectos directos sobre el receptor, ya que no pueden activarlos en ausencia del agonista endógeno. Éstos ocupan otros sitios de unión en el receptor, afectando los efectos del ligando endógeno y son llamados moduladores alostéricos. La utilización de estas herramientas farmacológicas permite identificar funcionalmente la presencia de ciertas conformaciones en sistemas heterólogos y nativos (Barnard y col., 1998).

Sin lugar a dudas los moduladores alostéricos de los receptores GABA_A más estudiados son las benzodiazepinas. Se han catalogado más de 20 clases químicas de ligandos que se unen al sitio de unión de benzodiazepinas en estos receptores (Barnard y col., 1998). El sitio de unión para benzodiazepinas se encuentra en la interfase de las subunidades α y γ (Sigel y Buhr, 1997); recientemente se ha propuesto un modelo que unifica las relaciones entre el sitio de unión al ligando y al de las benzodiazepinas (Bergmann y col., 2013). La modulación por benzodiazepinas, como el diazepam está sujeta a la presencia de la subunidad $\gamma 2$ y una de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ en el receptor, siendo más potente sobre los receptores que contienen $\alpha 3$ (Pritchett y col., 1989). Los receptores $\alpha 4\beta\gamma 2$ y $\alpha 6\beta\gamma 2$ son insensibles a diazepam, por el contrario tienen gran afinidad por las imidazobenzodiazepinas como flumazenil y Ro 15-4513 (Knoflach y col., 1996; Korpi y col., 2002). Un residuo de histidina presente en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, pero no en $\alpha 4$ y $\alpha 6$ sería el responsable de la sensibilidad al modulador (Wieland y col., 1992). Se ha sugerido que la subunidad ϵ otorga insensibilidad a benzodiazepinas a los receptores GABA_A (Kasparov y col., 2001). Ro 15-4513 se comporta como un agonista inverso al sitio de unión de benzodiazepinas en receptores $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$ y $\alpha 5\beta\gamma 2$, mientras que actúa como un modulador alostérico positivo en receptores $\alpha 4\beta\gamma 2$ / $\alpha 6\beta\gamma 2$ (Korpi y col., 2002). Existen evidencias que demuestran que este compuesto modula positivamente las corrientes mediadas por receptores $\alpha 4\beta\gamma 2$ / $\alpha 6\beta\gamma 2$ con una gran afinidad y eficacia (Knoflach y col., 1996; Wafford y col., 1996). También se une y modula la corriente de receptores $\alpha 6\beta\delta$ y $\alpha 4\beta\delta$, sobre los que actúa como un antagonista competitivo en el sitio de unión de etanol en sistemas nativos y heterólogos (Hancher y col., 2006; Liang y col., 2006; Olsen y col., 2007; Wallner y col., 2003, 2006). El uso de ratones knock-out (KO) para subunidades específicas de los receptores GABA_A ha permitido disecar la contribución relativa de cada subtipo de

receptor en los efectos hipnóticos, sedantes, analgésicos, amnésicos y anticonvulsivantes de numerosas benzodicepinas y compuestos relacionados (Olsen y Sieghart, 2008).

Otra familia de compuestos que modulan la actividad de los receptores GABA_A son los esteroides sintéticos y naturales (Lambert y col., 1990; Olsen y Sapp, 1995). Particularmente los niveles de neuroesteroides activos han sido implicados en desórdenes psiquiátricos que incluyen depresión mayor y posparto, ansiedad y ataques de pánico, entre otros (Rupprecht, 2003). El sitio de unión para los neuroesteroides se ubica entre la subunidad α y β de los receptores GABA_A (Hosie y col., 2006; Puia y col., 1992). La efectividad del neuroesteroide sintético alfaxalona es mayor cuando se expresa la subunidad $\alpha 2$ en el receptor y actúa con mayor potencia en receptores que contienen $\gamma 1$ y $\gamma 3$ que en aquellos con $\gamma 2L$ (Maitra y Reynolds, 1999). Si bien los receptores GABA_A con las subunidades $\gamma 2$ y δ presentan una sensibilidad similar a la alfaxolona, la eficacia del fármaco es mayor en aquellos que contienen la subunidad δ (Brown y col., 2002). Es más, la sensibilidad a esteroides neuroactivos, entre ellos alfaxalona, está disminuída en ratones KO para la subunidad δ (Mihalek y col., 1999).

Moléculas simples como etanol y ciertos anestésicos, como isoflurano y propofol también modulan la actividad de los receptores GABA_A. Se ha propuesto que el alcohol produce sus efectos analgésicos y anestésicos a través de receptores GABA_A (Johnston, 1996; Korpi y col., 2002). El etanol a concentraciones bajas (<50 mM) produce la potenciación de la respuesta a GABA en receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\delta$, mientras que lo hace a concentraciones mayores (>50 mM) en receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\gamma 2$ (Hancher y col., 2006; Olsen y col., 2007; Wallner y col., 2003, 2006). La presencia de la subunidad $\beta 3$ en su composición les confiere mayor sensibilidad a etanol (~3 mM). Por su parte, receptores formados sólo por subunidades $\alpha 4/6\beta 2/3$ son insensibles al alcohol (Wallner y col., 2003). El anestésico general propofol puede potenciar e incluso producir (a altas concentraciones) la activación directa de receptores GABA_A (Korpi y col., 2002). Se ha demostrado la participación de las subunidades β en la efectividad del modulador, ya que las mutaciones puntuales en la subunidad producen una marcada reducción de la efectividad de propofol a nivel celular y comportamental (Jurd y col., 2003; Krasowski y col., 1998). Particularmente, la incorporación de la subunidad ϵ otorga a los receptores recombinantes resistencia a los anestésicos intravenosos (Belujon y col., 2009; Davies y col., 1997, 2001; Sergeeva y col., 2005).

Furosemida es un diurético que produce una fuerte inhibición de la corriente evocada por GABA en receptores $\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ (EC₅₀ μ M), y es prácticamente insensible (EC₅₀ mM) en conformaciones $\alpha 1/2/3/5\beta 2/3\gamma 2$ (Fisher y col., 1997; Knoflach y col., 1996; Korpi y col., 1995; Thompson y col., 1999; Wafford y col., 1996). Es más, la presencia de la subunidad $\beta 1$ torna insensible a los receptores que contienen la

subunidad $\alpha 6$ (Korpi y col., 1995). Experimentos realizados en sistemas heterólogos demostraron que el residuo de isoleucina 228 de la subunidad $\alpha 6$ y el de asparagina 265 de la subunidad $\beta 3$ son los responsables de otorgarle sensibilidad al diurético (Thompson y col., 1999).

Ciertos cationes como Lantano (La^{3+}) y Zinc (Zn^{2+}), son capaces de modular las corrientes GABAérgicas (Korpi y col., 2002). La^{3+} provoca la potenciación de las corrientes en receptores $\alpha 1\beta 3\gamma 2\text{L}$ mientras que produce una inhibición débil en receptores $\alpha 6\beta 3\gamma 2\text{L}$ y fuerte en $\alpha 6\beta 3\delta$ (Saxena y col., 1997). Además inhibe con mayor potencia receptores $\alpha 4\beta 3\delta$ que $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ (Brown y col., 2002). Por su parte, Zn^{2+} se comporta como un antagonista no competitivo del GABA sobre receptores que no expresan subunidades γ ni δ (Draguhn y col., 1990; Saxena y Macdonald, 1994, 1996). Cuando la subunidad γ forma parte del receptor, éstos se tornan prácticamente insensibles a la inhibición por el catión, siendo la EC_{50} del $\text{Zn}^{2+} > 100 \mu\text{M}$ comparados con la alta afinidad del ligando por los receptores $\alpha\beta$ ($\text{EC}_{50} < 1 \mu\text{M}$), sin embargo cuando las subunidades $\alpha 4$ o $\alpha 6$ participan en la conformación del receptor la afinidad y la eficacia del ión es mayor ($\text{EC}_{50} < 100 \mu\text{M}$) (Fisher y col., 1997; Knoflach y col., 1996; Thompson y col., 1999). Esta afinidad aumenta aún más en receptores que contienen la subunidad δ ($\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) (Brown y col., 2002; Kaur y col., 2009; Saxena y Macdonald, 1994; Stórustovu y Ebert, 2006; You y Dunn, 2007).

Gaboxadol o THIP es un isoxazol bicíclico, análogo estructural del muscimol con cualidades hipnóticas y analgésicas (Johnston, 1996). Se comporta como un agonista parcial en receptores $\alpha 4\beta \gamma 2$ y como un agonista puro en receptores $\alpha 4\beta \delta$ en los que GABA actúa como agonista parcial (Brown y col., 2002; Jia y col., 2005; Liang y col., 2006; You y Dunn, 2007). La sensibilidad y la eficacia al agonista es aún mayor en receptores $\alpha 6\beta \delta$ que en $\alpha 4\beta \delta$ (Stórustovu y Ebert, 2006).

Respuesta a GABA y receptores GABA_A durante el desarrollo

La composición de subunidades de los receptores GABA_A y el tipo de respuesta a GABA atraviesan un drástico cambio durante el desarrollo del cerebro. Los mecanismos por los cuales éste se lleva a cabo no están del todo dilucidados. Sin embargo, las evidencias acumuladas a lo largo de los años han permitido no sólo identificar ciertos actores clave en el fenómeno, sino también las consecuencias funcionales y morfológicas de este cambio para el crecimiento, diferenciación y conectividad sináptica de las neuronas.

Los aniones se distribuyen diferencialmente a través de la membrana plasmática de las células. La mayoría de los aniones del fluido intracelular son moléculas orgánicas tales como aminoácidos cargados negativamente, proteínas y ácidos nucleicos, mientras que el ión Cl^- es el principal anión del medio extracelular. En un organismo adulto, el gradiente de concentración del Cl^- , es decir la diferencia entre la concentración del medio externo e interno, es de 140 mM – 7 mM respectivamente; es decir que bajo condiciones fisiológicas de reposo hay un ingreso del ión cuando los canales permeables a éste se encuentran abiertos. La dirección y la magnitud de la difusión del Cl^- está determinada tanto por su gradiente de concentración como por el potencial de membrana que fuerza a los iones a moverse en una dirección particular de acuerdo a su carga. El potencial de equilibrio electroquímico (también conocido como potencial reverso) para un ión dado (E_i), es el potencial de membrana al cual la fuerza del gradiente de concentración que tiende a mover un ión en una dirección es exactamente balanceada por la fuerza eléctrica que tiende a mover al mismo ión en la dirección contraria (Ben-Ari, 2002). Las relaciones cuantitativas entre el potencial de membrana y las concentraciones del ión fueron desarrolladas por Nernst (Purves y col 2001). En el SNC adulto el GABA es un neurotransmisor inhibitorio, capaz de producir la hiperpolarización del potencial de membrana.

Sin embargo en varias regiones del cerebro **en desarrollo**, entre ellas el hipotálamo, **el GABA es excitatorio**. Su acción se traduce en despolarización neuronal, pudiendo incluso generar potenciales de acción (Gao y van den Pol, 2001; Wang y col., 2001) y causar la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Obrietan y van den Pol, 1995). En estas regiones el cambio de excitatorio a inhibitorio se produce alrededor de la segunda semana de vida posnatal en la rata (Chen y col., 1996), momento en el que la respuesta a GABA se vuelve hiperpolarizante. Este cambio en la respuesta al neurotransmisor se debe a que temprano en el desarrollo, la concentración intracelular de Cl^- es alta respecto al medio extracelular, por lo que en reposo el potencial de equilibrio de Cl^- es más positivo que el potencial de membrana. Esto determina que al unirse GABA a su receptor, el Cl^- sale de la neurona con la consiguiente despolarización de la célula (Chen y col., 1996; Obrietan y van den Pol, 1995). La alta concentración intracelular del ión es mantenida principalmente por la elevada expresión de un cotransportador de Na^+ , K^+ - 2Cl^- , *NKCC1* que introduce Cl^- a la célula (Yamada y col., 2004). Numerosas evidencias han demostrado que, en etapas más tardías del desarrollo, el cambio en la respuesta al neurotransmisor es atribuible a que el potencial de equilibrio de Cl^- se hace más negativo como consecuencia de una disminución del Cl^- intracelular. Esta disminución se debe principalmente al aumento en la expresión del cotransportador

K^+/Cl^- , *KCC2* que extruye iones Cl^- del interior de la célula (Ganguly y col., 2001; Ludwig y col., 2003; Rivera y col., 1999) y a la disminución de la expresión de *NKCC1* (Yamada y col., 2004). En consecuencia, la concentración intracelular de este ión y la respuesta a GABA, se encuentran en estrecha relación con los niveles de expresión de cada cotransportador (figura 2). Las acciones excitatorias de GABA en neuronas inmaduras son importantes reguladores del desarrollo normal del SNC. La sobreexpresión de *KCC2* en neuronas inmaduras elimina el gradiente de Cl^- y afecta dramáticamente la maduración de las neuronas a nivel morfológico (Cancedda y col., 2007; Reynolds y col., 2008), como así también la conectividad sináptica (Chudotvorova y col., 2005).

El cerebro adulto presenta una distribución particular para los ARNm de cada subunidad de los receptores GABA_A. Algunas subunidades, como la $\alpha 1$ tienen una distribución ubicua en el cerebro, mientras que otras como $\alpha 6$ se expresa sólo en neuronas granulares del cerebelo y ϵ y θ en ciertos núcleos hipotalámicos y el *locus coeruleus*. En algunas regiones se expresan una gran cantidad de subunidades, en otras sólo se expresan unas cuantas de ellas. La combinación de subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ es la más abundante en el cerebro. $\alpha 1\beta 2$ predominan en bulbo olfatorio, globo pálido, sustancia nigra *pars reticulata*, zona incierta, núcleo subtalámico, septum medial y cerebelo; mientras que la combinación $\alpha 2\beta 3$ está enriquecida en áreas como la amígdala y el hipotálamo. Las subunidades $\alpha 4$ y δ co-localizan en el prosencéfalo al igual que $\alpha 5\beta 1$ lo hacen en el hipocampo. Por su parte, la subunidad $\alpha 3$ predomina en la neocorteza y en el núcleo talámico reticular (Laurie y col., 1992a; Moragues y col., 2000, 2002; Wisden y col., 1992). Se ha demostrado que este patrón de expresión es distinto durante el desarrollo. Cada transcripto para las subunidades de los receptores GABA_A exhibe un perfil temporal y regional de expresión único. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario y posnatal temprano $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 3$ se expresan fuertemente en corteza y tálamo. A medida que el desarrollo transcurre los niveles de dichas subunidades disminuyen dando lugar a la expresión de $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y δ , características del cerebro adulto. De igual manera las subunidades $\gamma 1$ y $\gamma 3$ presentan una expresión abundante en el cerebro inmaduro que va disminuyendo con el desarrollo. Por el contrario, $\gamma 2$ se expresa ubicuamente durante la vida intrauterina, posnatal y adulta. Las subunidades ϵ y θ se expresan en el tálamo embrionario, mientras que la subunidad $\alpha 3$ aparece el día del nacimiento y sus niveles aumentan posnatalmente. El septum medial y el globo pálido expresan unas pocas subunidades durante el desarrollo ($\alpha 2/\alpha 3\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 2/\alpha 3\beta 2\gamma 1$ respectivamente) que luego son reemplazadas por otras en el cerebro adulto ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 1\beta 2\gamma 1/\gamma 2$ respectivamente). Sin embargo algunas subunidades no muestran un cambio temporal de expresión, como $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ que se expresan en células de Purkinje del cerebelo y $\alpha 3$, ϵ y θ en neuronas hipotalámicas y de los núcleos pontino y tegmental

durante todo el proceso de desarrollo (Laurie y col., 1992b; Pape y col., 2009; Poulter y col., 1992). Los cambios en la expresión de subunidades de los receptores GABA_A durante el desarrollo sugieren que la composición y propiedades de los receptores embrionarios / posnatales difieren de aquellas de los receptores adultos. El cambio de la subunidad $\alpha 2$ por la subunidad $\alpha 1$ (ambas distribuidas ubicuamente) durante la maduración del sistema nervioso estaría relacionada con la formación de las sinapsis inhibitorias (Fritschy y col., 1994). Se ha demostrado que el patrón de expresión de subunidades de los receptores GABA_A en neuronas mantenidas *in vitro* recapitula el patrón observado *in vivo* en algunos sistemas experimentales (Gao y Fritschy, 1995; Holopainen y Lauren, 2003).

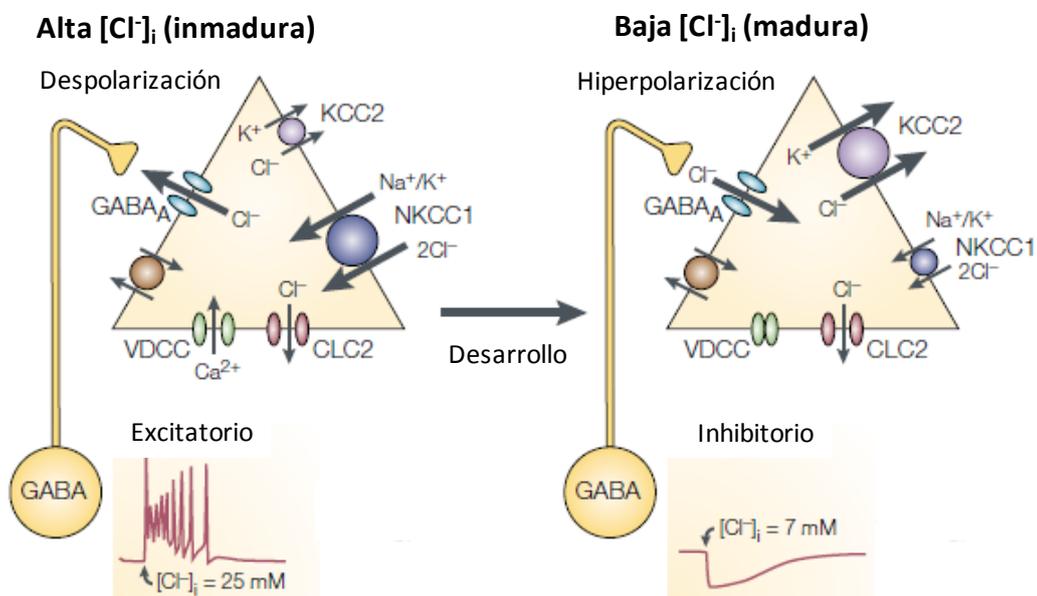


Figura 2. Respuesta a GABA durante el desarrollo. Abreviaturas: NKCC1, cotransportador de Na⁺/K⁺/Cl que introduce iones Cl al citoplasma; KCC2, cotransportador de K⁺/Cl que extruye iones Cl del citoplasma; CLC2, canal de cloruro dependiente de voltaje tipo 2; VDCC, canales de calcio dependiente de voltaje (Adaptado de Ben-Ari 2002).

Acciones tróficas de GABA

Como consecuencia de la despolarización neuronal ejercida por GABA en neuronas inmaduras se produce el ingreso de calcio al interior de la célula, por activación de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes. El aumento de este ión en el citoplasma desencadena la activación de una serie de efectores que regulan distintos procesos celulares. De esta manera GABA pueda influenciar varios procesos en el desarrollo del

cerebro, desde la proliferación celular a la sinaptogénesis y la formación de circuitos neuronales (figura 3). Una característica sobresaliente del desarrollo es que los receptores GABA_A, pero también de glutamato, se expresan ya en células progenitoras de los epitelios ventriculares mucho antes de la formación de las primeras sinapsis. Esto sugiere que el GABA ambiental podría ejercer un papel modulador en la maduración neuronal (LoTurco y col., 1995). La participación de GABA en la regulación de la formación de conexiones sinápticas durante el desarrollo ha sido extensamente

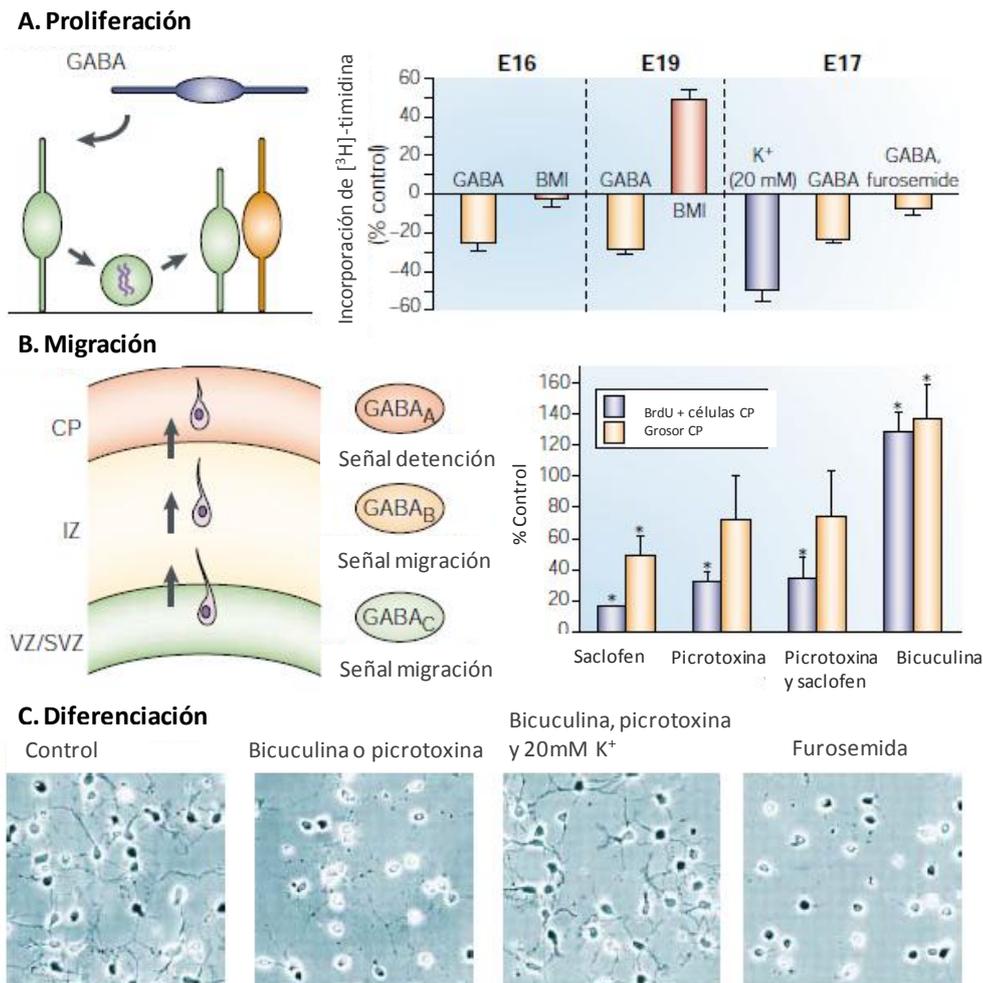


Figura 3. Acciones tróficas de GABA durante el desarrollo. **A.** Efectos de GABA sobre la proliferación de progenitores. **B.** Efectos de GABA sobre la migración neuronal. **C.** Efectos de GABA sobre la diferenciación neuronal. Abreviaturas: BMI, meta-yoduro de bicuculina; CP, plato cortical; IZ, zona intermedia; VZ/SVZ, zona ventricular y zona subventricular; BrdU, 5-deoxibromouridina (Adaptado de Owens y Kriegstein 2002).

estudiada en sistemas neuronales de dos estructuras cerebrales como el hipocampo (Ben-Ari, 2002) y la corteza (Owens y Kriegstein, 2002). Ambos sistemas muestran un

ajustado patrón temporal en el establecimiento de conexiones sinápticas. Una vez originadas en las zonas generativas, las neuronas posmitóticas migran a sus posiciones finales en ambas regiones del cerebro. Registros electrofisiológicos de estas neuronas demostraron la ausencia de potenciales postsinápticos, lo que sugiere que GABA actuaría de manera parácrina. Los primeros potenciales postsinápticos en aparecer son excitatorios y mediados por receptores GABA_A, de acuerdo con las acciones despolarizantes en neuronas inmaduras. Entonces, las sinapsis GABAérgicas son las primeras en establecerse durante el desarrollo, siendo responsables de brindar todo el componente excitatorio de la red en formación. Luego, cuando las neuronas comienzan a adquirir sinapsis glutamatérgicas a medida que maduran, emergen potenciales postsinápticos inhibitorios mediados por receptores GABA_A. Así, una vez que glutamato toma el control de la fuerza excitatoria de la red, GABA adopta sus acciones inhibitorias características de neuronas maduras (Khazipov y col., 2001; Luhmann y Prince, 1991; Owens y col., 1999; Tyzio y col., 1999).

Numerosos estudios demuestran que GABA modula la proliferación de progenitores, la migración neuronal y la diferenciación y elaboración del árbol neuronal (Represa y Ben-Ari, 2005; Wang y Kriegstein, 2009). Según las evidencias obtenidas, GABA inhibe la proliferación de células madre (figura 3. A). En rebanadas de corteza, el agregado de GABA disminuye la síntesis de ADN y la cantidad de células que incorporan bromo de-oxi-uridina (BrdU), mientras que la incubación con bicuculina aumenta los niveles de ADN (LoTurco y col., 1995). GABA promueve la división celular en células de la zona ventricular (ZV), mientras que la inhibe en células de la zona subventricular (ZSV) en cultivos organotípicos de corteza (Haydar y col., 2000). Se ha demostrado que en cultivos organotípicos de estriado, la activación de los receptores GABA_A inhibe la progresión del ciclo celular de los precursores de este sistema (Nguyen y col., 2003). Estos mismos efectos, mediados por receptores GABA_A se han reportado en otras células madre y células de la cresta neural (Andäng y col., 2008). Sin embargo, la activación de estos receptores promueve la proliferación de células granulares de cerebelo *in vitro* (Fiszman y col., 1999).

Por otra parte, GABA es capaz de regular la migración celular en varias regiones del cerebro (figura 3. B). Utilizando cultivos organotípicos de hipocampo, Manent y colaboradores demostraron que el bloqueo de los receptores GABA_A reduce la migración de neuroblastos (Manent y col., 2005). Contrariamente, el tratamiento con bicuculina aumenta la cantidad de células migrando en el núcleo ventromediano del hipotálamo (NVM). La adición de bicuculina o muscimol altera la orientación de la migración de neuronas de subregiones de dicho núcleo en cultivos organotípicos. La diferente

expresión de subunidades en esas subregiones sugiere una modulación dependiente del tipo de receptores GABA_A que poseen las neuronas. La localización y distribución de ciertos grupos neuronales del hipotálamo está alterada en ratones KO para la subunidad $\beta 3$ (Dellovade y col., 2001). En concordancia con este trabajo, la activación de distintos subtipos de receptores para GABA ejerce efectos diferentes en la migración de neuronas corticales. La activación de receptores GABA_A y GABA_C promueve la migración de neuroblastos desde las ZV/ZSV a la zona intermedia (ZI), la activación de receptores GABA_B promueve la entrada desde la ZI hacia el plato cortical (PC) mientras que GABA_A provee de una señal de detención para la migración una vez alcanzado el PC (Behar y col., 2000). Estudios *in vivo* e *in vitro*, demostraron la importancia de los receptores GABA_A para detener la migración de neuronas corticales, ya que el bloqueo de los mismos produjo una alteración de la ubicación de las mismas en las capas corticales. Este efecto en la migración es altamente dependiente de la concentración de GABA y de la locación, sugiriendo que dicha dependencia se debe a la expresión de distintos subtipo de receptores GABA_A (Heck y col., 2007).

El primer trabajo que demostró que GABA promueve el crecimiento de neuritas en neuronas de mamíferos fue publicado en el año 1983 (Baloyannis y col., 1983). Desde entonces hasta nuestro días, mucha evidencia sugiere que este neurotransmisor regula la neuritogénesis de neuronas inmaduras a través de la despolarización neuronal mediada por sus receptores GABA_A (figura 3. C) (Sernagor y col., 2010). Experimentos realizados *in vivo* mostraron que la sobreexpresión del co-transportador KCC2, que convierte las acciones de GABA de despolarizantes a inhibitorias, provoca una reducción del largo y de la ramificación de las dendritas en neuronas corticales (Cancedda y col., 2007). Estudios *in vitro*, han demostrado que la diferenciación de interneuronas corticales es altamente dependiente de a cada uno de los componentes del sistema GABAérgico; particularmente el bloqueo de receptores GABA_A, CCDV tipo-L o el gradiente de Cl⁻ producen una marcada reducción de la longitud de las neuritas (Maric y col., 2001). En cultivos de neuronas de hipocampo el agregado de muscimol al medio de cultivo promueve el crecimiento y el número de dendritas primarias en neuronas inhibitorias inmaduras. Estas acciones son dependientes de la despolarización, ya que el agregado del agonista GABA_A a cultivos de neuronas maduras (15 DIV) produjo la reducción del crecimiento dendrítico. Este estudio propone que los efectos dendritogénicos de GABA podrían estar mediados por el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) (Marty y col., 1996). Otros autores han demostrado que cuando se agrega al medio un agonista inverso con preferencia por receptores con la subunidad $\alpha 5$ (RY-080) se produce la disminución de las ramificaciones y la longitud de las dendritas, a la vez que también disminuye la producción de BDNF en neuronas hipocampales (Giusi y col., 2009). El crecimiento de

interneuronas de bulbo olfatorio *in vitro*, también está regulado por receptores GABA_A. La activación de los mismos provoca el aumento de la cantidad y el largo total de dendritas, mientras que el bloqueo con bicuculina los reduce (Gascon y col., 2006). El agregado de GABA al medio de cultivo de neuronas granulares de cerebelo promueve la complejización del árbol dendrítico (Borodinsky y col., 2003). Las acciones tróficas de GABA sobre el crecimiento axonal también son dependientes de la despolarización neuronal. Experimentos *in vivo* en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), demostraron que la alteración del gradiente de Cl⁻ mediante la sobreexpresión del co-transportador KCC2, desde el comienzo del desarrollo del embrión produce una reducción de la maduración y elaboración de las redes y tractos axonales (Reynolds y col., 2008). Chattopadhyaya y colaboradores demostraron que GABA, a través de receptores GABA_A y en menor medida GABA_B, promueve la ramificación de axones de interneuronas corticales tanto *in vitro* como *in vivo* (Chattopadhyaya y col., 2007). En este mismo sistema experimental la activación de los receptores GABA_A provoca la elongación de axones, mientras que el tratamiento con bicuculina disminuye la longitud de los mismos (Ageta-Ishihara y col., 2009). Se ha observado también que GABA promueve específicamente el crecimiento y la ramificación del axón, pero no de otras neuritas, en neuronas granulares de cultivos organotípicos de hipocampo (Lee y col., 2012). Esta diferencia en los efectos de GABA entre axones y procesos menores puede deberse a la composición de subunidades de los receptores GABA_A. En cultivos de neuronas hipocampales, la adición de un modulador alostérico positivo con preferencia por receptores $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$ al medio provocó la reducción de la longitud y de la cantidad de axones, mientras que un agonista selectivo de receptores $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$ no tuvo efecto (Giusi y col., 2009).

Vías de señalización intracelular implicadas en la regulación del crecimiento por receptores GABA_A

La despolarización neuronal y la consiguiente entrada de calcio a través de CCDV son pasos claves en los efectos mediados por la activación de los receptores GABA_A en neuronas inmaduras. Este aumento del calcio intracelular actúa como segundo mensajero modulando la actividad de varias quinasas. Algunas de éstas, como la calcio calmodulina quinasa 2 (CAMKII) y la proteína quinasa activada por mitógenos 1 y 2 (p42/44 MAPK - ERK1/2), están involucradas en el crecimiento neurítico inducido por

GABA en una gran variedad de sistemas (Fizman y Schousboe, 2004; Sernagor y col., 2010).

El crecimiento de los procesos neuronales en respuesta a la activación de receptores GABA_A en varios sistemas experimentales, parece ser regulado por el ingreso de calcio a través de CCDV tipo-L (Borodinsky y col., 2003; Gascon y col., 2006; Lee y col., 2012; Maric y col., 2001). En neuronas espinales, GABA y glicina ejercen despolarización neuronal e ingreso de calcio. Sin embargo, el bloqueo de las corrientes glicinérgicas aumenta el crecimiento neurítico de estas neuronas. Se demostró que este efecto es dependiente de la activación de CCDV tipo-L a través de la despolarización inducida por receptores GABA_A. Estos resultados sugieren que la estimulación glicinérgica fija los niveles de calcio en un nivel subóptimo (comparada con GABA) para estimular el crecimiento neurítico (Tapia y col., 2001). El crecimiento de los procesos neuronales es estrechamente dependiente de niveles óptimos de calcio intracelular, de la frecuencia de las ondas transitorias de calcio y de la localización subcelular; sin embargo, éste se reduce o se detiene cuando el nivel de calcio no cumple tales características espacio-temporales (Enes y col., 2010; Gomez y Zheng, 2006; Hutchins y Kalil, 2008; Tang y col., 2003).

Para ejercer sus efectos sobre el crecimiento de los procesos neuronales, el flujo de calcio al interior celular tiene como blancos principales a dos de las vías de señalización más representadas en el cerebro: la vía de las calcio/calmodulina quinasas (CAMKs) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (figura 4) (Konur y Ghosh, 2005).

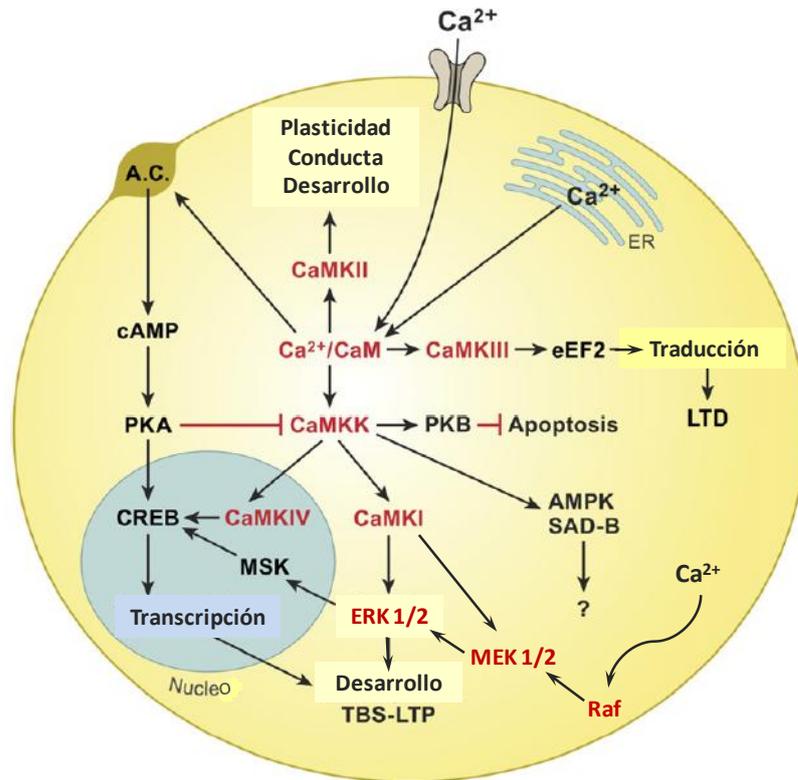


Figura 4. Vía de las calcio/calmodulina quininas (CAMKs) y vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), involucradas en el crecimiento neurítico de neuronas (resaltadas en rojo). Por referencias ver el texto (Adaptado de Wayman y col. 2008).

La calmodulina quinasa (CaM) es una proteína que une Ca^{2+} con gran afinidad, al hacerlo se produce un cambio conformacional que expone un residuo hidrofóbico que promueve la interacción de $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$ con numerosas vías de señalización intracelular. Una de estas vías, es una familia de serina / treonina (Ser / Thr) quinasas conocidas como CAMKs cuyos miembros difieren en la cantidad de sustratos que pueden activar, en su localización subcelular y en los mecanismos de activación. Dentro de esta familia algunas quinasas fosforilan exclusivamente un sustrato / proteína en particular, como la quinasa de la cadena liviana de miosina, la fosforilasa quinasa y CAMKIII. Esta última no posee los motivos Ser / Thr clásicos de la familia por lo que pertenece a una familia distinta de protein quinasas. Por su parte, otros miembros de las CAMKs como la CAMKII y la cascada de las CaM quinasas (CAMKK, CAMKI y CAMKIV), regulan la activación de numerosos sustratos proteicos jugando un papel crítico tanto en el desarrollo y plasticidad neuronal como en el comportamiento. CAMKII es un dodecámero heteromérico compuesto por subunidades α , β , δ y γ . La activación de esta quinasa por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ permite la autofosforilación de numerosos sitios (Thr286, Thr305 y Thr306). Como

característica, CAMKII retiene un 30%-60% de su actividad incluso después de la disociación total de Ca^{2+} / CaM, por lo que aumentos transitorios de calcio cortos pueden resultar en una activación prolongada de CAMKII. Esta quinasa está presente en todo el citoplasma como una proteína soluble, aunque se encuentra altamente enriquecida en la densidad postsináptica de espinas dendríticas de neuronas excitatorias. Los miembros de la cascada de las CaM quininas, CAMKK (isoformas α y β), CAMKI (isoformas α , β , δ y γ) y CAMKIV, a diferencia de CAMKII, tienen un sitio de fosforilación en un bucle de activación. La unión de Ca^{2+} / CaM a CAMKI y CAMKIV expone este bucle permitiendo la fosforilación por CAMKK, su quinasa aguas arriba. En neuronas, la activación de CAMKI por CAMKK suele ser transitoria (pocos minutos) mientras que la de CAMKIV es más prolongada (hasta una hora). CAMKK se distribuye en todo el cerebro; la isoforma α es citoplasmática, mientras que la β tiene ubicación preferentemente nuclear. CAMKI es predominantemente citoplásmica aunque una variante por corte y empalme alternativo de la isoforma β está enriquecida en el núcleo y la isoforma γ se localiza en Golgi y membrana plasmática. Por otro lado, CAMKIV tiene una distribución predominante en el núcleo. La activación de la vía de las CAMKs produce la fosforilación de numerosos factores de transcripción tales como la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), el factor de transcripción activador tipo 1 (ATF-1), la proteína de unión al CREB (CBP), etc. para ejercer sus efectos en el desarrollo neuronal y plasticidad sináptica (Colbran, 2004; Soderling y col., 2001; Wayman y col., 2008, 2011).

Las MAPKs presentes en mamíferos comprenden diferentes proteínas que pueden clasificarse en 5 familias: 1) *Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)*, como las ERK1 y ERK2 (también llamadas p42/44 MAPK); 2) *c-jun N-terminal quinasa / proteinquininas activadas por estrés (JNKs/SAPKs)*, que incluye a las JNK1, JNK2 y JNK3; 3) *p38 proteinquininas activadas por mitógenos (p38 MAPKs)*, con 4 isoformas descritas α , β , δ y γ ; 4) *Quinasas reguladas por señales extracelulares atípicas*, que incluye a las ERK3 y ERK4 y 5) *ERK5*, quinasa poco conocida que se activa por distintas señales extracelulares. Cada familia está compuesta por al menos 3 proteinquininas que se activan secuencialmente mediante fosforilación. En forma general, estas proteínas quininas se denominan MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK o MAP3K), MAP quinasa quinasa (MAPKK o MAP2K) y MAP quinasa (MAPK). En el caso de las ERKs, las MAPKKKs son las Raf (A-Raf, B-Raf y C-Raf/Raf-1), las MAPKKs son MEK1 y MEK2 y las MAPK son ERK1 y ERK2. Raf activada une y fosforila las quininas MEK1 / 2. MEK es una quinasa específica que une ERK en su forma inactiva y la retiene en el citoplasma. Una vez activada, MEK1 / 2 fosforila ERK1/2 (pERK1/2) lo que induce su liberación y posterior dimerización y traslocación al núcleo. En el núcleo pERK1/2 fosforila una gran cantidad de sustratos que incluyen varios

factores de transcripción (CREB, SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, c-Fos, c-Myc y STAT3) (Cargnello y Roux, 2011; Roux y Blenis, 2004; Shiryayev y Moens, 2010).

Particularmente, se ha demostrado que la activación de ERK1/2 en respuesta a Ca^{2+} está mediada por CAMKI (Schmitt y col., 2004). Dicha interacción entre ambas vías está implicada en la generación de Potenciación a Largo Plazo (LTP) (Schmitt y col., 2005) y la arborización dendrítica (Wayman y col., 2006) en neuronas hipocampales.

GABA y diferenciación sexual del cerebro

Durante el desarrollo perinatal los receptores GABA_A atraviesan por un cambio drástico en la expresión de subunidades y en la respuesta a GABA (de despolarizante a hiperpolarizante). Durante esta misma ventana temporal se produce la diferenciación sexual del SNC mediada por hormonas gonadales, evento clave en el establecimiento de diferencias funcionales, morfológicas y estructurales en el cerebro de machos y hembras. Como detallaremos a continuación, la interacción entre cromosomas sexuales, hormonas gonadales y el sistema GABAérgico imprime características sexo-específicas en el cerebro y en especial en el hipotálamo (McCarthy y col., 2002).

La hipótesis clásica de la diferenciación sexual del cerebro fue formulada a partir de los experimentos pioneros de Phoenix y colaboradores a finales de la década del 50 (Phoenix y col., 1959), y sostuvo que el dimorfismo sexual del cerebro de los vertebrados es consecuencia de la acción de los esteroides gonadales. Según esta hipótesis, la organización de los circuitos cerebrales del tipo masculino es el resultado de las *acciones organizadoras* de los andrógenos segregados por el testículo durante el “periodo crítico” del desarrollo cerebral, que en la rata se extiende desde el día embrionario 18 (E18) hasta el día pos natal 10 (PN10). Por el contrario, la organización del cerebro femenino se produce en ausencia de las secreciones gonadales, cualquiera sea el sexo cromosómico. En la adultez los esteroides sexuales tienen *efectos activadores* sobre los circuitos organizados de manera sexualmente dimórfica durante el desarrollo (Arnold y Gorski, 1984). Muchas de las acciones masculinizantes de los andrógenos son consecuencia de su aromatización a estrógeno (McEwen y Alves, 1999). La enzima aromatasa P450 es la responsable de la conversión de testosterona a estradiol y su actividad es uno de los factores claves en la determinación de las diferencias sexuales del cerebro (Negri-Cesi y col., 2004). Estradiol ejerce sus acciones en neuronas en desarrollo afectando diferencialmente en cada sexo una gran variedad de parámetros tales como neurogénesis, apoptosis, diferenciación celular, migración, sinaptogénesis, entre otros. Los mecanismos por los cuales esta hormona actúa sobre el SNC en

desarrollo son específicos del sexo, región y edad de los sistemas en estudio (McCarthy, 2010; Schwarz y McCarthy, 2008a, 2008b; Tobet y col., 2009; Wright y col., 2010). Se cree que el fin último del establecimiento de dichas diferencias es la expresión de conductas típicas de uno u otro sexo, sin embargo las diferencias sexuales en la estructura o conectividad cerebral pueden producir e incluso eliminar diferencias sexuales en el comportamiento (de Vries y Södersten, 2009). Las evidencias acumuladas en más de 50 años de investigación en el tema demuestran que la hipótesis de la masculinización / feminización del cerebro mediada por hormonas es un proceso más complejo del que se presumía anteriormente (McCarthy y col., 2009a). Aunque no hay dudas que la mayoría de las diferencias sexuales son determinadas por la acción de los esteroides sexuales durante el desarrollo, una importante cantidad de evidencias ha demostrado la existencia de diferencias sexuales independientes de la acción hormonal (Arnold, 2004; Arnold y col., 2004; De Vries, 2004). A partir de estas observaciones surgió la necesaria revisión del concepto clásico. La nueva visión del fenómeno propone que las neuronas portadoras del complemento cromosómico XY son intrínsecamente diferentes de las portadoras de XX, lo cual necesariamente implica que el cerebro de machos y hembras es distinto antes de la acción organizadora de los esteroides gonadales. De esta manera, los cromosomas sexuales son una variable importante que regula el establecimiento de diferencias sexuales en la estructura del cerebro y en el comportamiento (Arnold, 2009; Büdefeld y col., 2010; Ngun y col., 2011). Sin embargo, en la última década el foco de los estudios sobre la diferenciación sexual del cerebro apunta a la participación de una tercera variable, el ambiente. El término epigenética se refiere a cambios en el genoma que pueden afectar la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN subyacente. Se ha propuesto que los procesos epigenéticos son importantes para coordinar el impacto de factores ambientales durante periodos sensitivos del desarrollo. Algunas de estas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y plamitoilación de histonas y metilación del ADN (Roth y Sweatt, 2011). Evidencias de diversos laboratorios alrededor del mundo han comprobado que algunos de estos de procesos epigenéticos juegan un rol importante en la diferenciación sexual del cerebro (Auger y Auger, 2011; Chung y Auger, 2013; McCarthy y col., 2009b; Menger y col., 2010; Nugent y McCarthy, 2011). En base a toda esta evidencia, y con más y nuevos interrogantes, la comunidad científica especializada en el tema propone una hipótesis unificadora para la diferenciación sexual del cerebro de los vertebrados. Esta nueva hipótesis plantea que *"hormonas, genes de los cromosomas sexuales y ambientes sexo-específicos tienen efectos diferenciadores paralelos e independientes que pueden interaccionar unos con otros, a menudo de manera sinérgica, para producir diferencias sexuales en el cerebro. Sin embargo, también existen variables compensatorias sexo-*

específicas que actúan para reducir diferencias sexuales más que para inducir las. El resultado es que en algunos aspectos del cerebro, el comportamiento y la fisiología de machos y hembras son únicos en uno u otro sexo, mientras que en otros son sumamente similares" (McCarthy y Arnold, 2011).

El hipotálamo es la región del cerebro con el mayor número de diferencias sexuales. Durante el desarrollo y la vida adulta expresa altos niveles de receptores para hormonas gonadales, lo que lo convierte en una región clave para la diferenciación sexual mediada por esteroides sexuales (Lenz y McCarthy, 2010). Sin embargo, los cromosomas sexuales también aportan al establecimiento de algunas diferencias entre machos y hembras (Majdic y Tobet, 2011). GABA ha demostrado ser un actor fundamental en la diferenciación sexual del hipotálamo. En particular, el hipotálamo ventromedial (HVM) posee diferencias sexuales en varios parámetros de la señalización GABAérgica. El decaimiento de la corriente generada por la aplicación de GABA es más rápido en hembras que en machos, respuesta que se profundiza durante el desarrollo posnatal (Smith y col., 1996). Los niveles de GABA también aumentan con el desarrollo y los machos tienen mayores niveles que las hembras, sin embargo el tratamiento de las hembras con testosterona en el día P_{N0} aumenta los niveles del neurotransmisor, sugiriendo una regulación sexualmente dimórfica por esteroides sexuales (Davis y col., 1999). El tratamiento de hembras preñadas con diazepam durante los últimos días de gestación provoca una reducción del 20% de los niveles del ARNm de BDNF sólo en machos a P_{N20} y se mantiene incluso en la edad adulta. Esto sugiere que la manipulación de la transmisión GABAérgica durante el desarrollo cerebral produce cambios en los machos que duran hasta la adultez (Kellogg y col., 2000). En este sentido, el período crítico de la diferenciación sexual mediada por hormonas parece ser decisivo en el tipo de respuesta a GABA. La administración de muscimol a machos y hembras en el día P_{N0} provoca el aumento del número de neuronas inmunomarcadas con pCREB en los machos mientras que lo reduce en hembras. Esto sugiere que GABA ejerce acciones excitatorias en machos e inhibitorias en hembras en el HVM a P_{N0} (Auger y col., 2001). Es más, la fosforilación de CREB es mediada por CCDV tipo-L ya que el bloqueo farmacológico de los canales reduce este efecto. Por el contrario, la administración de muscimol en machos y hembras juveniles no produce la activación del factor de transcripción, otra evidencia a favor de que dicha diferencia sexual se debe a las acciones despolarizantes de los receptores GABA_A en los machos (Perrot-Sinal y col., 2003). En línea con esta hipótesis los niveles de NKCC1 son mayores en machos que en hembras a E₂₀ y P_{N0}, sugiriendo que podrían ser la causa de un mayor nivel de despolarización en los primeros. Los niveles de pNKCC1 a P_{N2} fueron mayores en hembras tratadas con una dosis masculinizante de estradiol respecto a las hembras

tratadas con vehículo. Por el contrario, KCC2 no se detectó a E20 o PN0, sin embargo a PN2 los niveles de dicha proteína son menores en machos que en hembras (Perrot-Sinal y col., 2007). Estudios en neuronas hipotalámicas *in vitro* muestran que el tratamiento con estradiol produce un aumento del 60% en los niveles de calcio en respuesta a muscimol respecto a los controles. Además el estradiol es capaz de aumentar el tiempo durante el cual muscimol ejerce efectos de despolarización y entrada de Ca^{2+} en neuronas maduras. El 75% de las células registradas a 7 DIV presentaron aumentos en los niveles de Ca^{2+} en respuesta al agonista GABAérgico, mientras que sólo el 35% de las neuronas no tratadas presentaron dicha respuesta (Perrot-Sinal y col., 2001). En este mismo sistema experimental, el tratamiento con estradiol produce un aumento en la amplitud y la frecuencia de los potenciales postsinápticos inhibitorios mediados por GABA de cultivos provenientes de embriones macho mientras que produce una disminución de los mismos en los cultivos de hembra (Zhou y col., 2005). Todo este cuerpo de evidencias indica que la señalización mediada por GABA mantiene una estrecha interrelación con la diferenciación sexual del cerebro mediada por hormonas (McCarthy y col., 2002).

Desde la década de los 90 nuestro laboratorio ha aportado numerosas evidencias sobre la existencia de diferencias sexuales en el crecimiento y diferenciación de neuronas hipotalámicas. Se ha demostrado que cultivos derivados de embriones hembra diferencian sus axones más tarde, tienen menos neuritas primarias y dendritas más cortas que los cultivos de macho. Además estradiol produce el aumento de la longitud de los axones en estas neuronas (Díaz y col., 1992). Particularmente se demostró que sólo las neuronas provenientes del HVM de fetos de rata macho de E16 responden con un crecimiento axonal al agregado de estrógeno al medio de cultivo y que dicho efecto es dependiente de factores tróficos liberados al medio por astrocitos de regiones blanco (Cambiasso y col., 1995, 2000). Estos efectos sobre neuronas hipotalámicas de macho y hembra son independientes de la acción organizadora de los esteroides sexuales, ya que fueron obtenidos de embriones que aún no han estado expuestos al pico fetal de testosterona que se produce en ratas macho a E18-E19 (Huhtaniemi, 1994). Es más, un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio (Scerbo y col., 2014) demuestra que neuronas hipotalámicas de embriones de ratones hembra de E14 presentan un grado de desarrollo mayor que en los machos cuando son cultivadas *in vitro*. Estas diferencias incluyen un mayor número de neuronas en estadios avanzados del desarrollo neuronal, una mayor cantidad de neuronas con ramificaciones en las neuritas y una mayor longitud axonal en hembras. Estos efectos son mediados por la mayor expresión de neurogenina 3 (Ngn3 - una proteína involucrada en la neuritogénesis) en hembras que está regulada por los cromosomas sexuales. Se demostró también que el agregado de estradiol al medio de cultivo promueve la diferenciación de neuronas de machos mediante el

aumento de Ngn3, eliminando la diferencia sexual observada en los cultivos controles. Nuestro grupo propone que los cromosomas sexuales aumentan la diferenciación de neuronas de hembras mediante la regulación de los niveles de Ngn3. Mientras tanto, el mantenimiento de una expresión reducida de la proteína en neuronas de macho por parte de los cromosomas sexuales puede contribuir dotando a estas neuronas con una sensibilidad aumentada a estradiol, facilitando así la acción neuritogénica de la hormona a través del aumento de Ngn3 (Scerbo y col., 2014). Este mecanismo puede explicar el hecho de que neuronas del HVM de machos adultos posean dendritas más largas, mayor superficie dendrítica y un mayor número de conexiones sinápticas que las hembras (Flanagan-Cato, 2011; Griffin y Flanagan-Cato, 2009). Se ha demostrado que los cromosomas sexuales afectan la conducta sexual de hembras, comportamiento que es modulado por el HVM (Grgurevic y col., 2012). Otro grupo de experimentos llevados a cabo en neuronas hipotalámicas *in vitro* demostraron que la respuesta a muscimol (10 μ M) es mayor en machos que en hembras en neuronas hipotalámicas después de 9 DIV (Mir, 2007). Teniendo en cuenta las acciones tróficas de GABA sobre neuronas en desarrollo (Represa y Ben-Ari, 2005), es posible hipotetizar que la activación de los receptores GABA_A ejercerían un efecto diferencial en el crecimiento de los procesos neuríticos de machos y hembras en nuestro sistema experimental.

Por todo lo expuesto y teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, en este trabajo de tesis nos propusimos analizar la participación relativa de GABA en la determinación de diferencias sexuales en el cerebro antes de la acción organizadora de los esteroides gonadales.

Objetivo general

Analizar la participación de los receptores GABA_A en el establecimiento de diferencias sexuales en neuronas hipotalámicas provenientes de embriones macho y hembra de E16 que son independientes de la acción organizadora de las hormonas sexuales.

Objetivos específicos

- I) Caracterizar la respuesta a GABA en cultivos de neuronas de hipotálamo obtenidos de fetos macho y hembra antes de la acción organizadora de los esteroides gonadales.
- II) Identificar la composición de subunidades del receptor GABA_A en neuronas hipotalámicas de E16 sexualmente discriminadas.
- III) Estudiar la acción neuritogénica mediada por receptores GABA_A en neuronas de hipotálamo provenientes de macho y hembra de E16.
- IV) Analizar las vías de señalización intracelulares involucradas en el crecimiento neurítico inducido por la activación de los receptores GABA_A en neuronas de hipotálamo provenientes de macho y hembra de E16.

MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODOS UTILIZADOS

1. Preparación de cultivos primarios de células disociadas

El tejido nervioso utilizado para la preparación de los cultivos de células disociadas se extrajo de embriones de rata de 16 días de edad gestacional (E16). Para ello se utilizaron ratas hembras albinas adultas, las que a partir del día del proestro (E0) permanecieron en contacto con el macho durante 24 hs. La fase del ciclo sexual se estableció por el examen del extendido vaginal. Las ratas preñadas fueron deprimidas con CO₂ y luego se procedió a la dislocación cervical. Sus embriones fueron extraídos asépticamente de la cavidad uterina y separados según el sexo. La identificación del sexo se realizó mediante visualización, bajo lupa binocular, de la arteria espermática sobre la gónada masculina en desarrollo.

1. 1. Disección

Los encéfalos extraídos fueron colocados en cápsulas de Petri con solución salina Hanks que contiene en mM: HEPES 10, NaCl 136,9, KCl 5,36, Glucosa, 5,55, KH₂PO₄ 0,44, Na₂HPO₄ 0,33 para ser disecados bajo observación con una lupa binocular a un aumento de 20X. Previa remoción de las meninges se disecaron: a) el HVM delimitado por el quiasma óptico, los surcos hipotalámicos laterales y los cuerpos mamilares para los cultivos neuronales y b) el mesencéfalo ventral para los cultivos gliales.

1. 2. Disociación

Las porciones de tejido se agruparon de acuerdo al sexo y área, y se incubaron a 37° C en una solución de tripsina al 0,25% en Hanks durante 15 minutos, luego de lo cual se realizaron dos lavados de 5 minutos con solución Hanks fresca. La disociación definitiva se realizó en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (F10), pasando el material sucesivas veces a través de pipetas Pasteur de distintos calibres. Las células disociadas fueron resuspendidas en F10 para su siembra.

1. 3. Siembra y Mantenimiento

Cultivos gliales

La siembra se realizó en el fondo de botellas estériles (25 cm², Corning) sin ningún tratamiento previo y conteniendo 4 ml de F10. La densidad inicial de siembra fue alta. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ y a las 24 hs se les cambió el medio; esto se repitió cada 5 días. A los 5 días de sembradas se las agitó manualmente para desprender las células superficiales (oligodendrocitos y microglía) y obtener un cultivo compuesto por astrocitos. Se las incubó hasta llegar a formar una monocapa confluyente (alrededor de 15 días). Éstas monocapas fueron utilizadas para condicionar 6,5 ml de medio D-MEM / mezcla de nutrientes Ham F12 (F12) con factores solubles de secreción de las células astrogiales, durante 48 hs. Este medio condicionado por astroglia fue utilizado para cultivar las neuronas hipotalámicas.

Cultivos neuronales

Para los estudios morfométricos y de electrofisiología, las células disociadas y separadas por sexo fueron sembradas en discos de vidrio (12 mm, Assistent) cubiertos con poly-L-lisina (1 µg/µl) en cápsulas de Petri estériles (60 mm x 10 mm, Corning) conteniendo 1 ml de F10. La densidad final de siembra fue de 10⁴-20⁴ células/cm² para los estudios morfométricos y de 10⁶ células/cm² en el caso de los experimentos de electrofisiología. Las neuronas se incubaron durante 2 hs a 37°C en una atmósfera saturada de humedad conteniendo aire y 5% de CO₂. Luego los vidrios con las células ya adheridas fueron transferidos a otra cápsula de Petri (35 mm x 10 mm, Corning) conteniendo 1,5 ml de medio condicionado (MC) por astroglia del mismo sexo. Para los experimentos de análisis de proteínas, las células se sembraron directamente sobre el fondo de cápsulas de Petri estériles (60 mm x 10 mm, Corning) cubiertas con poly-L-lisina conteniendo 3 ml de F10, a una densidad final de siembra de 10⁶ células/cm². Se incubaron durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad conteniendo aire y 5% de CO₂ y luego se reemplazó el F10 por MC del sexo correspondiente. Todos los cultivos neuronales se mantuvieron en incubador a 37 °C y 5% de CO₂ durante 2 días *in vitro* (DIV) sin el agregado posterior de medio de cultivo.

1. 4. Esterilización de materiales y soluciones

Todas las soluciones y medios de cultivo empleados se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles con un diámetro de poro de 0,22 μm (Millipore). El material de cirugía al igual que el de vidrio fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atm de presión.

Los discos utilizados para el cultivo de neuronas fueron cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (Assistent). Los mismos fueron sumergidos en un vaso de precipitación con ácido nítrico puro por dos días, luego sometidos a una serie de lavados sucesivos en agua estéril (2 lavados de 1 hora y 2 de media hora cada uno) y por último esterilizados en estufa por calor seco a 225°C por 6 horas.

2. Estudio electrofisiológico de neuronas hipotalámicas macho y hembra

2. 1. Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para el análisis electrofisiológico

Con el propósito de analizar la existencia de diferencias sexuales en el perfil electrofisiológico de neuronas hipotalámicas se realizaron diferentes experimentos de electrofisiología. Las neuronas provenientes de embriones macho y hembra no fueron tratadas farmacológicamente durante el cultivo y luego de 48hs de sembradas fueron sometidas a los siguientes paradigmas experimentales.

Caracterización de la respuesta a GABA: con el objetivo de caracterizar la respuesta al neurotransmisor, neuronas hipotalámicas de macho y hembra fueron perfundidas con GABA 10 μM . Se registró, en configuración de célula entera y en voltaje fijo (-50 mV), la corriente de respuesta de al menos 5 pulsos consecutivos del ligando, separados por 1 min entre uno y otro. Esto permitió establecer que en algunas neuronas (50%) la corriente disminuye con las aplicaciones del ligando. Por ello, sólo se utilizaron para los siguientes experimentos aquellas células cuya variación de la corriente en tres aplicaciones de GABA no se modificara en más de un 10%. En estas neuronas se midieron además, parámetros relacionadas a las propiedades pasivas de la mismas tales como el potencial de membrana en reposo (mV), capacitancia (pF) y resistencia ($\text{M}\Omega$) de la membrana y densidad de corriente (pA/pF). La densidad de corriente GABAérgica (δ_i), se determinó dividiendo la corriente evocada por un pulso de GABA 10 μM por la capacitancia de la misma neurona.

Determinación del potencial de reversión (E_{Cl}) y concentración intracelular del ión

Cl⁻: con el objeto de analizar la existencia de diferencias sexuales en dichos parámetros, cultivos neuronales de macho y hembra fueron sometidos a registros electrofisiológicos en configuración de parche perforado y voltaje fijo. Esta variante de la técnica de patch clamp consiste en añadir a la pipeta de registro una pequeña cantidad de antibiótico (gramicidina 100 µg/µl). A medida que el antibiótico difunde en la membrana del parche forma pequeñas perforaciones brindando acceso eléctrico al interior de la neurona. Los canales o perforaciones producidas por gramicidina son impermeables al cloruro, permitiendo realizar registros electrofisiológicos sin alterar la concentración intracelular del ión y haciendo posible el registro del potencial de reversión. Para ello se registraron las corrientes en respuesta a GABA 10 µM a varios potenciales de membrana (de -60 a 20 mV - rampa corriente/voltaje - I/V). Con dichos valores se ajustó una función polinómica de segundo orden y, de manera analítica, utilizando la ecuación de la curva ($y = c + bx + ax^2$) se obtuvo el E_{Cl} para cada neurona cuando $y = 0$. Por medio de la ecuación de Nerst se obtuvo la concentración intracelular de Cl⁻ para cada neurona. También se registró en algunas neuronas la respuesta a GABA 10 µM en configuración de parche perforado y corriente fija para evaluar si el ligando produce despolarización del potencial de membrana.

Curva dosis-respuesta a GABA: con la finalidad de establecer la sensibilidad al neurotransmisor en cultivos neuronales de macho y hembra, se registró la corriente en respuesta a dosis crecientes de GABA 1, 5, 10, 50, 100 y 500 µM en configuración de célula entera y en voltaje fijo (-50 mV). Se esperó 1 min. entre aplicaciones sucesivas de las diferentes dosis del ligando. Las corrientes fueron transformadas en porcentajes respecto a la corriente máxima y graficados sobre el log 10 de las concentraciones, se ajustó luego una función exponencial de la que se obtuvo el EC50 para el neurotransmisor y el coeficiente de Hill para cada neurona.

Caracterización farmacológica de los receptores GABA_A: con el objetivo de analizar las subunidades presentes en los receptores GABA_A de neuronas macho y hembra, se procedió a registrar la respuesta eléctrica de las mismas en configuración de célula entera y en voltaje fijo (-50 mV). Para ello se midió la corriente evocada por GABA 10 µM y un minuto después la respuesta a la co-aplicación del ligando + un modulador alostérico de los receptores GABA_A. Se analizó la respuesta a diazepam 1 µM, propofol 5 µM, alfaxalona 50 µM, ZnCl₂ 1 µM, furosemida 500 µM, THIP 1 µM, Ro 15-4513 0.3 µM, LaCl₃ 100 µM, etanol 100 mM y a muscimol 10 µM, agonista del sitio al GABA. Las respuestas se expresaron como porcentajes de potenciación/inhibición respecto a la

corriente evocada por la aplicación del neurotransmisor solo. Se consideró modulación positiva o negativa si la corriente en presencia del fármaco varía en más de un 10% respecto a la respuesta a GABA aplicado solo. Las soluciones con la concentración final de las drogas se prepararon el día del experimento a partir de soluciones stock 10 mM en DMSO o agua destilada según correspondiera.

2.2. Electrofisiología

Los experimentos de electrofisiología se realizaron después de 2 DIV, usando la técnica de registro de voltaje fijo en configuración de célula entera o en parche perforado (perforated patch clamp). Los discos con las células se colocaron en una cámara de 2 ml fijada a un microscopio BX50WI (Olympus Optical, Tokyo, Japón) dotado de una videocámara. Las neuronas fueron perfundidas a 2 ml/min con una solución extracelular a temperatura ambiente (21 - 23°C). Luego de 10 minutos de estabilización en la cámara se comenzó con los experimentos. Para esto se utilizaron micropipetas de borosilicato (WPI) de 1,5 mm, con filamento interno estiradas en un estirador o "puller" horizontal (Model P-97, Sutter Instrument Co, USA). La micropipeta de registro (5-7 M Ω) se llenó con una solución interna a temperatura ambiente.

Las células a registrar se seleccionaron teniendo en cuenta las siguientes características: células birrefringentes, de forma más o menos elíptica, con procesos enteros, sin agregaciones en el citoplasma y sin contacto soma-soma con otra neurona. La pipeta se posicionó sobre la célula elegida por medio de micromanipuladores. La misma estuvo conectada a un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) y los datos se adquirieron a través de una tarjeta de conversión A/D Digidata 1000 utilizando los programas del sistema pClamp (Axon Instruments) filtrados a 2 KHz, y muestreados a 10 KHz.

Para los registros en configuración de célula entera, luego de formar el sello giga óhmico se aplicó una pequeña presión negativa con la boca para romper el parche de membrana, si la corriente de pérdida no superaba los 100 pA se continuó con el experimento. En el caso de los registros en parche perforado a la solución interna se le agregó 100 μ g/ml de gramicidina, un ionóforo que no permite el paso de iones Cl⁻ (Ebihara y col., 1995) por lo que la concentración intracelular del mismo no se vio afectada en el transcurso de los experimentos. Se esperó al menos 20 min para que el antibiótico se inserte en la membrana. Una vez obtenido el acceso al interior celular, - manifestado por la aparición de los transientes capacitivos en la respuesta a un pulso hiperpolarizante - , por medio de protocolos en voltaje fijo se midió la respuesta neuronal.

En algunos casos la respuesta neuronal fue registrada por medio de protocolos en corriente fija.

Se utilizaron viales de 10 ml para contener la solución externa y las distintas drogas se aplicaron disueltas en ella. Para administrarlas se utilizó un sistema de flujo por gravedad conectado a un capilar de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para permitir la salida controlada de la solución. El capilar fue situado a ~50 μm de la célula blanco, a través del cual se administraron las drogas por ~1 seg. Se registró la respuesta neuronal y fue grabada luego en el disco rígido de la computadora para su posterior análisis.

3. Análisis del efecto neuritogénico por activación de receptores GABA_A

3.1. Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para los estudios morfométricos

Con el propósito de estudiar la participación de los receptores GABA_A en el crecimiento y diferenciación de neuronas hipotalámicas según el sexo, se realizaron los siguientes tratamientos experimentales y mediante inmunocitoquímica y morfometría se analizaron distintos parámetros de la morfología neuronal.

Efecto de la activación/bloqueo de los receptores GABA_A sobre el crecimiento y diferenciación neuronal: las neuronas hipotalámicas separadas según el sexo fueron tratadas durante por 48hs con muscimol 100 μM , un agonista específico de los receptores GABA_A, o con bicuculina 100 μM , un antagonista específico de dichos receptores (figura 5). Para esto se preparó una solución 10 mM de cada fármaco en agua MiliQ estéril y se agregó 10 μl de esta solución por cada 1 ml de medio de cultivo, alcanzando la concentración final deseada. En forma paralela se mantuvieron neuronas hipotalámicas de cada sexo durante 48 horas en presencia de MC (condición control).

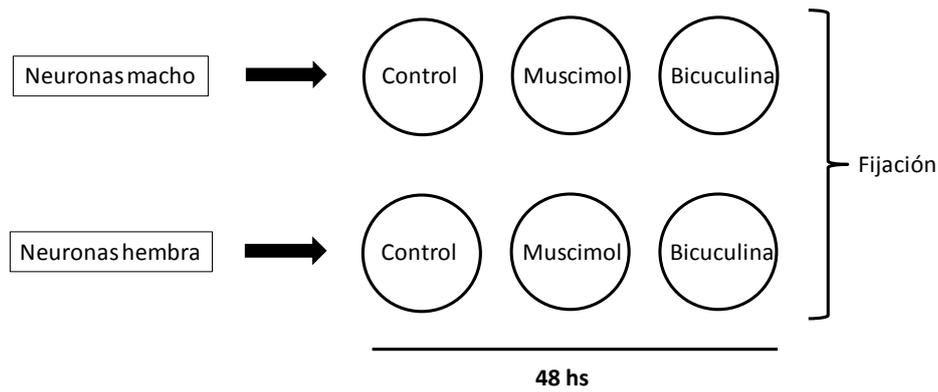


Figura 5. Esquema que muestra las condiciones de cultivo utilizadas para el análisis de la participación de los receptores GABA_A en el crecimiento y diferenciación neuronal.

Efecto del bloqueo de proteínquinasas y canales de calcio dependientes de voltaje sobre los cambios morfológicos inducidos por la activación de los receptores GABA_A: las neuronas hipotalámicas fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de medio condicionado por astrogliá de mesencéfalo ventral, con y sin el agregado de muscimol 100 μ M. Luego de este periodo se realizó un lavado de 3 horas, en el que se usó medio F12 y se agregaron inhibidores específicos para distintas cascadas de señalización intracelular involucradas en los efectos neuritogénicos de los receptores GABA_A, diluidos a la concentración deseada en MC durante una hora. Seguidamente algunos discos fueron tratados con muscimol (condición musc + inhibidores) mientras otros crecieron solo en presencia de MC (condición control + inhibidores) durante 24 horas adicionales (figura 6). Los compuestos utilizados fueron: KN-62; 5 μ M, un inhibidor de la calcio calmodulina quinasa 2 (CAMKII), UO126; 10 y 25 μ M un inhibidor específico de la proteína quinasa activada por mitógenos 1 y 2 (ERK1/2) y nifedipina 2 μ M un bloqueante específico de CCDV tipo-L. En forma paralela se mantuvieron neuronas hipotalámicas durante 48 horas en presencia de MC (condición control) sin el agregado de los inhibidores.

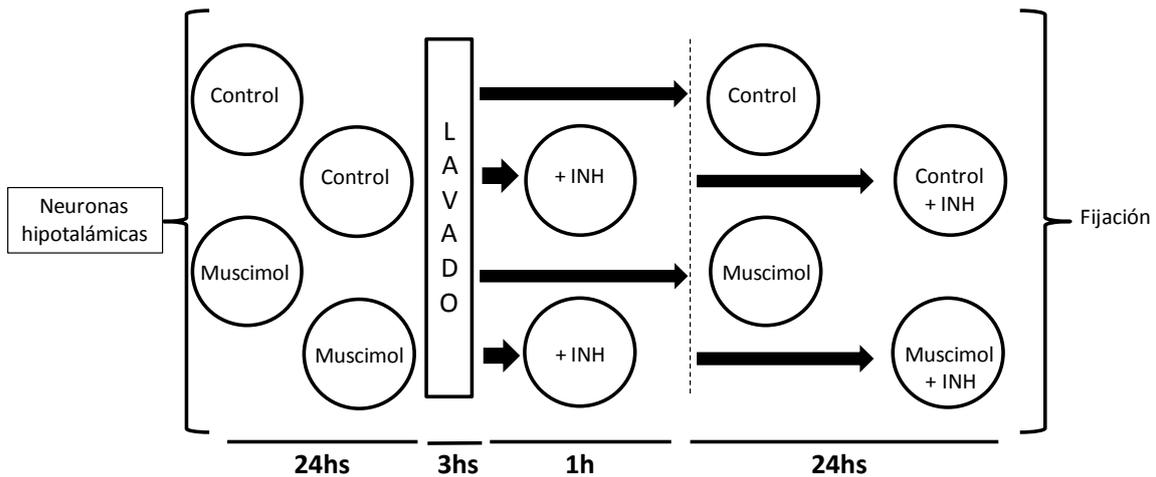


Figura 6. Esquema que muestra las condiciones de cultivo de neuronas hipotálamicas de cada sexo utilizadas para el análisis de las vías de señalización involucradas en el crecimiento de los procesos neuríticos mediado por los receptores GABA_A. INH: inhibidores.

3.2. Fijación

Luego del tratamiento experimental, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 20 minutos a 37 °C y mantenidas en PBS a 4 °C hasta el momento de la inmunorreacción.

3.3. Inmunocitoquímica

Los cultivos de neuronas hipotálamicas fueron marcados inmunocitoquímicamente con anticuerpo monoclonal contra la proteína β -tubulina clase III. La concentración utilizada se determinó luego de realizar la curva de dilución correspondiente. Tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron diluidos en albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS.

Las células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X100 al 0.2% en PBS durante 6 minutos, lavadas por 5 minutos con PBS y luego incubadas a temperatura ambiente con BSA al 5% en PBS durante 60 minutos. Tras eliminar el exceso de BSA los cultivos se incubaron con el anticuerpo primario durante 12 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS, los discos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 45 minutos a temperatura ambiente. El lavado del anticuerpo secundario se realizó con PBS durante 5 minutos y se

incubó con extravidina conjugada con peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. La visualización de la reacción inmunocitoquímica se realizó utilizando una solución 1,4 mM de 3,3'-diamino benzidina (DAB) en PBS con el agregado de 8 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por cada 10 ml de solución. El tiempo de reacción con DAB fue el mismo para todos los discos de una misma serie, deteniéndose la reacción por el agregado de PBS.

Seguidamente, los discos fueron deshidratados colocándolos en soluciones crecientes de etanol (50, 70, 90, 100%), sumergidos en xileno y montados en medio de montaje Entellan (Merck). El procesamiento inmunocitoquímico, la deshidratación y el montaje se realizaron simultáneamente para todos los preparados de un mismo experimento.

3. 4. Morfometría

El análisis de los cultivos neuronales teñidos se realizó sobre imágenes de video digitalizadas utilizando el procesador de imágenes JAVA (Jandel Inc., Chicago, USA), controlado por una computadora. Las imágenes fueron adquiridas a través de un microscopio de campo claro Zeiss. Se midieron todas las células inmuno marcadas que pudieron ser identificadas como una neurona individual en campos seleccionados al azar a 40 X de magnificación. Se estudiaron distintos parámetros relacionados con la morfología neuronal (longitud neurítica total, longitud media de procesos menores, área del soma, número de neuritas primarias, longitud de axón, cantidad de ramificaciones del axón y de las neuritas). Utilizando el cursor de la computadora se siguió el recorrido del proceso neurítico desde que emerge del soma neuronal hasta su porción más distal; esto se define como longitud de un proceso. Mediante criterios morfológicos (Dotti y col., 1988, Díaz y col., 1992) se define la identidad de dicho proceso: procesos menores, son 2 ó 3 neuritas cortas que emergen del cuerpo celular; axón, es una neurita única, de al menos 100 µm y 3 veces más larga que el resto de las neuritas, delgada y de diámetro relativamente uniforme. Para cada grupo experimental se midieron 60 células pertenecientes a no menos de tres cultivos. Las observaciones se realizaron sin que el operador conozca el grupo experimental analizado. Solamente se cuantificaron células cuyas neuritas pudieron ser identificadas en toda su extensión.

4. Estudio de la fosforilación de ERK1/2

4.1. Tratamientos experimentales de los cultivos neuronales utilizados para el análisis de proteínas

Con el propósito de estudiar si la activación de los receptores GABA_A produce la fosforilación de ERK1/2 en neuronas hipotalámicas de cada sexo, se realizaron los siguientes tratamientos experimentales.

Curva dosis-respuesta de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol: con el objetivo de evaluar si muscimol induce activación de esta quinasa se realizó una curva dosis respuesta de la fosforilación de la misma inducida por el agonista. Con este fin, cultivos neuronales hipotalámicos de cada sexo que crecieron en presencia de MC durante 48 horas fueron lavados durante 3 horas con medio F12 y estimulados con 1, 10 y 100 μ M de muscimol por 5 minutos. En forma paralela, se utilizaron como condición basal cultivos neuronales sin estimulación. Luego las células fueron homogenizadas y procesadas para la inmunodetección de las formas fosforiladas de ERK1/2 (pERK1/2) mediante la técnica de Western blot como se describe más abajo.

Curso temporal de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol: para analizar el curso temporal de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol, cultivos neuronales hipotalámicos de macho y hembra que crecieron en presencia de MC durante 48 horas fueron lavados durante 3 horas con medio F12 y estimulados con 100 μ M de muscimol por 1, 5 y 15 minutos. Se utilizaron cultivos neuronales sin estimulación como condición basal (tiempo 0). Luego los cultivos fueron homogenizados y procesados para la inmunodetección de pERK1/2 mediante la técnica de Western blot.

4.2. Western blot

Para la inmunodetección de las distintas proteínas analizadas, se obtuvieron homogenatos celulares totales de cultivos neuronales sometidos a los diferentes tratamientos experimentales (3.1.). Para ello los cultivos fueron lavados con PBS a 37 °C y raspados con espátula de goma en buffer de lisis Ripa con el agregado de inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 μ g/ml aprotinina, 100 μ g/ml PMSF, 10 μ M NaVO₄, NaPP_i 10 μ M y NaF 50 μ M) sobre hielo. El material obtenido fue disgregado en homogenizador de vidrio y centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C. Finalizada la

centrifugación el sedimento fue descartado y el sobrenadante fue diluido con igual volumen de buffer Laemmli 2X y desnaturalizado a 95 °C durante 5 minutos. Se utilizaron alícuotas en Ripa de cada muestra para determinar la concentración de proteínas de acuerdo a la técnica de Lowry (Lowry y col., 1951). Las proteínas presentes en los extractos celulares (20 µg/ línea) fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (PAGE-SDS). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 80 mV. Las proteínas separadas por PAGE-SDS fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante la técnica de transferencia húmeda a corriente constante de 270 mA durante 90 minutos. Una vez realizada la transferencia, las proteínas presentes en la membrana se tiñeron con solución de rojo Ponceau con el objeto de saber si se habían resuelto y transferido en forma correcta. Los pasos subsiguientes se realizaron en agitación. Las membranas conteniendo las proteínas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en buffer TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, se realizaron 3 lavados con TTBS de 5 minutos y a continuación se procedió a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TTBS, las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando placas de Rayos X (Agfa). Posteriormente se procedió a la determinación de las proteínas totales correspondientes para lo cual las membranas fueron lavadas con TTBS y se eliminaron los anticuerpos primario y secundario de la primera incubación sumergiéndolas en Buffer de "Stripping" durante 10 minutos a 55 °C. Luego de 10 lavados de 5 minutos con TTBS, se reinició el proceso de la inmunorreacción desde el bloqueo utilizando anticuerpo primario contra la proteína total, para confirmar la siembra de la misma cantidad de proteínas en cada línea. Las bandas obtenidas fueron escaneadas y analizadas utilizando un programa de análisis de imágenes (Fiji, Image J). Se estableció como unidad densitométrica arbitraria al producto del área por la intensidad de la banda y se calculó el cociente de las lecturas de las bandas correspondientes a la proteína fosforilada/proteína total de al menos 3 experimentos independientes.

5 . Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, seguido de comparaciones post-hoc de las medias usando el test de Tukey. En el caso de comparación de dos medias estadísticas se utilizó el análisis de "t" de Student. Cuando las variables no tuvieron distribución normal, se utilizaron test no paramétricos tales como Chi^2 y KRUSKALL-WALLIS. Para establecer el coeficiente de relación entre dos variables se utilizaron protocolos de regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Statistica de Statsoft. La diferencia se consideró significativa cuando las medias mostraron una $p < 0.05$.

MATERIALES UTILIZADOS

Si no se especifica, los reactivos y drogas utilizados en este trabajo de tesis fueron Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA.

1. Soluciones y buffers

- Solución salina Hanks: HEPES 10 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, Glucosa, 5,55 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, Na_2HPO_4 0,33 mM.
- GlutaMAX® 100X - Invitrogen.
- Solución Buffer Borato : Borax 12 mM, Acido Bórico 50 mM, pH 8,5
- PBS: NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 90 mM, NaH_2PO_4 13 mM, pH 7,4.
- Buffer de lisis Ripa: 150 mM NaCl, 0,1% nonidet P40, 0,5 % deoxicolato de sodio, 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 mM Tris, pH 7,5.
- Solución de rojo Ponceau: 0,1 % en ácido acético al 5 %.
- Buffer Laemmli 2X: 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β - mercaptoetanol, 125 mM Tris, pH 6,8.
- Buffer Tris-salino (TBS): 20 mM Tris-HCl, 150 mM ClNa, pH 7,5.
- Buffer TTBS: buffer Tris-salino (TBS) conteniendo 0,1 % Tween-20
- Buffer de "Stripping": 62,5 mM Tris-Hcl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol
- Solución externa: NaCl 150 mM, KCl 5,4 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 10 mM, Glucosa 10 mM, Sacarosa 10 mM, pH 7,4.
- Solución interna: KCl 120 mM, MgCl_2 4 mM, HEPES 10 mM, BAPTA 10 mM, Mg-ATP 2 mM, Na_2 -GTP 0,5 mM, pH 7,3.

2. Medios de cultivo

- F10: Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco sin rojo fenol (DMEM) con el agregado de glucosa al 2,2 %, 1 ml de GlutaMAX®, 1 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ de penicilina-estreptomicina y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), pH 7,4.
- F12: Medio basal DMEM/mezcla de nutrientes Ham F-12 (1:1), con el agregado de glucosa al 4 %, 1 ml de GlutaMAX® 100X y 1 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ penicilina-estreptomicina.

3. Antibióticos

- Gramicidina de *Bacillus aneurinolyticus* (*Bacillus brevis*). Mezcla de gramicidinas A, B, C, y D (**gramicidina**, antibiótico perforante de membranas biológicas impermeable a iones Cl⁻)
- Penicilina (5000 µl/ml)-Streptomycin (5000 U/ml) - Gibco.

4. Inhibidores específicos

- UO126 (inhibidor de MEK 1 / 2)
- KN-62 (inhibidor de CaM quinasa II)

5. Antagonistas, agonistas y moduladores alostéricos

- Ácido γ-aminobutírico (**GABA**, ligando endógeno de receptores GABA_A)
- 1(S),9(R)-(-)-Metayoduro de Bicuculina (**bicuculina**, antagonista específico de receptores GABA_A, Tocris Bioscience)
- 3-Hidroxi-5-aminometil-isoxazol (**muscimol**, agonista específico de receptores GABA_A)
- Ácido 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridindicarboxílico dimetil éster (**nifedipina**, bloqueante específico de canales de calcio dependientes de voltaje tipo- L)
- 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona (**diazepam**, modulador alostérico de receptores GABA_A, Duncan Laboratorios)
- 2,6-Bis(isopropil)fenol (**propofol**, modulador alostérico de receptores GABA_A)
- 3-Hidroxi-5α-pregnano-11,20-diona (**alfaxalona**, modulador alostérico de receptores GABA_A)
- Ácido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoylantranílico (**furosemida**, modulador alostérico de receptores GABA_A)
- Clorhidrato de 4,5,6,7-Tetrahidroisoxazol[5,4-c]piridin-3-ol (**THIP**, modulador alostérico de receptores GABA_A, Tocris Bioscience)
- Ácido 8-azido-5,6-dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-carboxílico etil éster (**Ro 15-4513**, modulador alostérico de receptores GABA_A, Tocris Bioscience)

- Cloruro de Lantano(III) heptahidratado (**LaCl₃**, modulador alostérico de receptores GABA_A)

6. Anticuerpos

Anticuerpos primarios

- Anti-β-tubulina isotipo III, clon SDL.3D10, en una dilución 1:200 (Sigma-Aldrich).
- Anti-fosfo-p44/42 MAPK, en una dilución de 1:1000 (Cell Signaling Technology).
- Anti- p44/42 MAPK, en una dilución de 1:2000 (Cell Signaling Technology).

Anticuerpos secundarios

- Anti-ratón IgG (H+L) conjugado con peroxidasa, en una dilución 1:2500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc).
- Extravidina-peroxidasa, en una dilución 1:100 (Sigma-Aldrich).
- Anti-conejo IgG (H+L) Alexa fluo-800, en una dilución 1:10000 (Oddyssey).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE CORRIENTES GABAÉRGICAS EN CULTIVOS DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE EMBRIONES DE RATA MACHO Y HEMBRA

Caracterización de la respuesta a GABA y propiedades pasivas de la membrana

Con el propósito de caracterizar las propiedades electrofisiológicas de neuronas hipotalámicas se evaluó la respuesta GABAérgica en cultivos sexualmente diferenciados mantenidos durante 48hs. Neuronas hipotalámicas de machos y hembras fueron perfundidas con GABA a una concentración de 10 μM . En configuración de célula entera y en voltaje fijo (-50 mV), se registró la corriente de respuesta al ligando aplicado en forma de 5 pulsos consecutivos separados por 1 min entre uno y otro. En el 50% de las neuronas la corriente disminuye con las sucesivas aplicaciones del ligando (figura 7. A y B), por ello para los siguientes experimentos sólo se utilizaron aquellas células cuya variación de la corriente en tres aplicaciones de GABA no se modificara en más de un 10%.

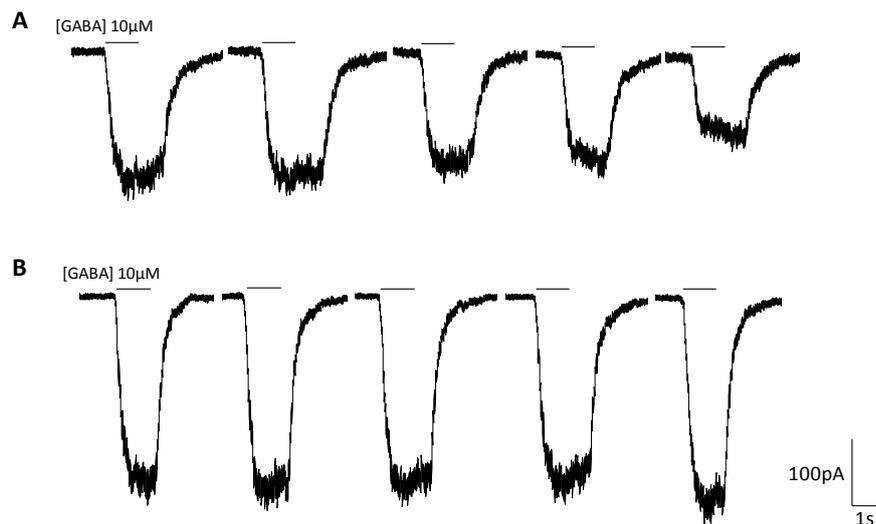


Figura 7. Corriente (pA) evocada por la aplicación de pulsos consecutivos de GABA 10 μM en neuronas hipotalámicas de 2DIV. **A** Neurona que muestra una disminución progresiva de la amplitud de la corriente y **B** neurona que mantiene constante la amplitud de la corriente. La barra representa el tiempo de exposición al ligando.

La amplitud de la corriente evocada por el ligando endógeno a una concentración de 10 μM presenta una gran variabilidad de célula a célula. En la figura 8 podemos observar la corriente evocada por GABA en varias neuronas de 2 DIV. Como puede verse, la exposición al agonista produce una corriente entrante de amplitud variable que

finaliza completamente ante la remoción del ligando. Cabe mencionar que el componente de inactivación de la corriente por desensibilización aunque visible, no se registra completo durante 1 segundo de exposición a GABA 10 μ M. No se encontraron diferencias sexuales en la magnitud de la corriente GABAérgica (macho: 233 ± 30 pA, $n = 7$, hembra 155 ± 31 pA, $n = 9$). El análisis de la amplitud de la corriente evocada por la aplicación de una concentración 10 μ M de un agonista de los receptores GABA_A como el muscimol tampoco mostró diferencias significativas entre machos y hembras (macho: 300 ± 47 pA, $n = 7$, hembra 218 ± 32 pA, $n = 9$). Al igual que la respuesta al ligando natural, muscimol produce una respuesta altamente variable de neurona a neurona. En estos resultados es conveniente destacar que muscimol actúa sobre los receptores GABA_A con una potencia mayor que el ligando natural, alrededor de un 40%, y aunque se observa la tendencia a una mayor respuesta en las hembras, la diferencia no alcanza significancia estadística (macho: $26,6 \pm 4,3$ %, $n = 7$, hembra: $55 \pm 12,1$ %, $n = 9$; Test "T" 2,03, $p=0,06$).

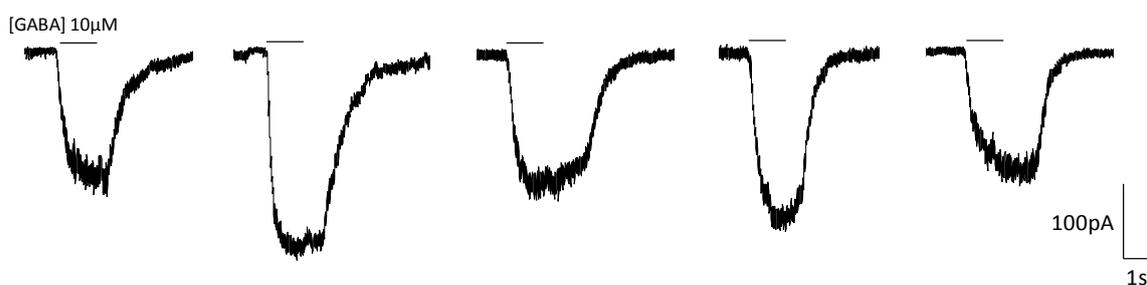


Figura 8. Corriente (pA) evocada por la aplicación de GABA 10 μ M en 5 diferentes neuronas hipotalámicas de macho y hembra de 2DIV mostrando la variabilidad en la amplitud de la respuesta.

Se analizaron también otros parámetros relacionados con las propiedades pasivas de la membrana tales como potencial de membrana en reposo (PMR), capacitancia (C) y resistencia (R). Se determinó además la densidad de corriente GABAérgica (δ_i), dividiendo la corriente evocada por un pulso de GABA 10 μ M por la capacitancia de la misma neurona. Esta medida permite comparar de manera indirecta la existencia de diferencias en la cantidad de receptores en machos y hembras. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. No se encontraron diferencias sexuales significativas en ninguno de los parámetros mencionados.

Tabla 1. Propiedades pasivas de la membrana (PMR: Potencial de membrana en reposo, C: Capacitancia, y R: Resistencia) y densidad de corriente (δ_i) de neuronas hipotalámicas de macho y hembra de 2 DIV.

SEXO	PMR (mV)	C (pF)	R (M Ω)	δ_i (pA/pF)
Macho	-40,5 \pm 2,31 (11)	10,4 \pm 0,71 (10)	35,3 \pm 15,8 (9)	19,36 \pm 2,85 (10)
Hembra	-42,4 \pm 2,68 (9)	10,02 \pm 1,38 (10)	26,2 \pm 10,68 (7)	36,08 \pm 8,75 (10)

Valores representan la media \pm error estándar; (n) número de neuronas

Determinación del potencial de reversión (E_{Cl}) y concentración intracelular del ión cloruro

Con el objetivo de determinar el potencial de reversión y la concentración intracelular del ión Cl^- , neuronas hipotalámicas de embriones macho y hembra cultivadas por 2 DIV fueron sometidas a experimentos de electrofisiología en configuración de parche perforado. Para ello se registraron las corrientes en respuesta a GABA 10 μ M a varios potenciales de membrana (de -60 a -20 mV - rampa corriente/voltaje - I/V). La figura 9. A muestra que la aplicación del ligando en voltaje fijo produce una corriente entrante a -60 mV y -50 mV, mientras que a los -30 mV se revierte la polaridad de la misma por lo que produce una corriente saliente. Los valores obtenidos para el E_{Cl} de macho y hembra fueron -39,45 \pm 3,78 mV (n = 6) y -42,65 \pm 2,26 mV (n = 6) respectivamente. La concentración intracelular del ión fue de 35,49 \pm 5,49 mM (n = 6) para los machos y 30,21 \pm 2,46 mM (n = 6) para las hembras. Ninguno de estos parámetros mostró diferencias significativas debidas al sexo. Es importante notar que cuando se registra la respuesta en configuración de parche perforado en corriente fija la aplicación del ligando en estas neuronas produce despolarización neuronal (figura 9. B).

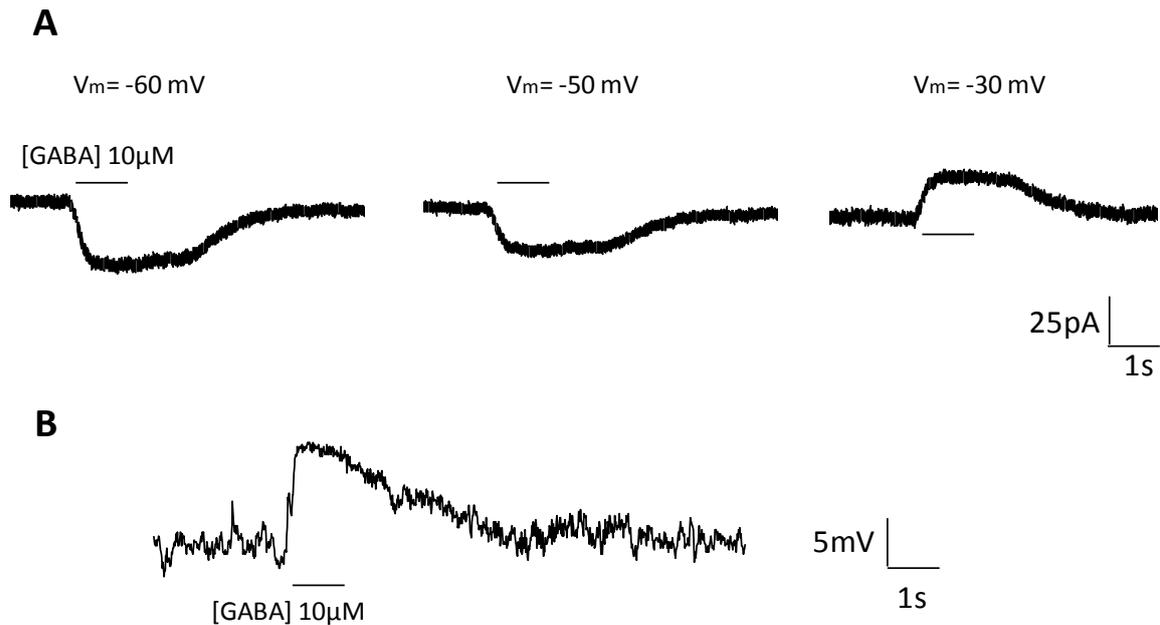


Figura 9. **A** Registros en configuración de parche perforado y voltaje fijo comparando las corrientes (pA) evocadas por la aplicación de GABA $10 \mu\text{M}$ en neuronas hipotalámicas de 2DIV a diferentes voltajes de membrana (V_m). **B** Registro en configuración de parche perforado y corriente fija mostrando la despolarización del potencial de membrana (mV) de una neurona hipotalámica de 2DIV en respuesta a la aplicación de GABA $10 \mu\text{M}$. $V_m = -50 \text{ mV}$.

Curva dosis-respuesta a GABA

Con el objetivo de analizar la existencia de diferencias sexuales en la sensibilidad al GABA se realizó una curva dosis-respuesta en neuronas macho y hembra mantenidas por 2 DIV. En la figura 10. A se observan las corrientes evocadas por la aplicación de dosis crecientes del neurotransmisor en una neurona hembra. Como puede observarse, el incremento de la concentración de GABA aplicada produce un aumento en la amplitud de la respuesta reflejando el mayor reclutamiento de receptores involucrados. La concentración más baja evaluada, GABA $1 \mu\text{M}$, produjo una respuesta marginal, mientras que la dosis más elevada, GABA $500 \mu\text{M}$ produce una respuesta máxima de rápida desensibilización. En la figura 10. B se muestran las curvas obtenidas para neuronas macho y hembra. Dichas curvas tienen gran similitud, el análisis del EC50 y del coeficiente de Hill para macho y hembra arrojó los siguientes valores: $24,89 \pm 3,24 \text{ mM}$ y $1,45 \pm 0,19$; $n = 14$ y $19,76 \pm 5,18 \text{ mM}$ y $2,94 \pm 1,98$; $n = 11$ respectivamente. Dichos valores no difieren estadísticamente.

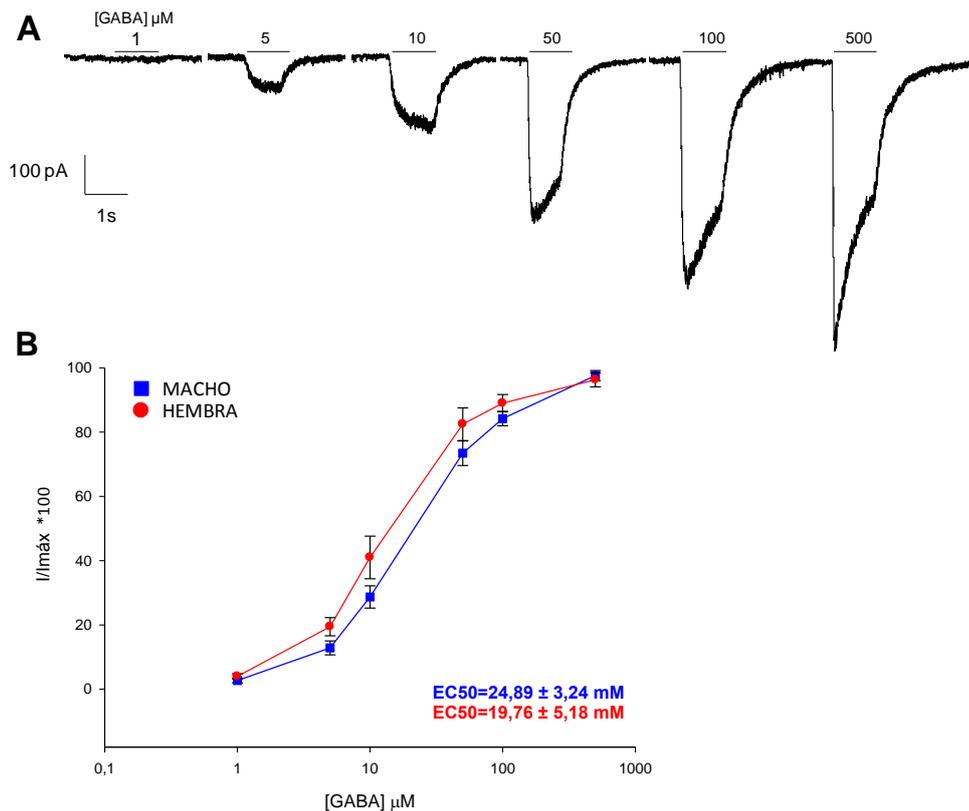


Figura 10. **A** Corriente (pA) evocada por diferentes concentraciones de GABA (μM) de una neurona hipotalámica hembra de 2DIV. **B** Curva dosis-respuesta a GABA de neuronas hipotalámicas de 2DIV de ■ macho (n=14) y ● hembra (n=11). I/I_{máx}*100: Porcentaje de corriente respecto a la corriente máxima.

Caracterización farmacológica de los receptores GABA_A

Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores GABA_A varían de acuerdo a la composición de las subunidades que los conforman. Para comprobar si las subunidades de los receptores GABA_A son diferentes en machos y hembras se utilizó una amplia batería de fármacos moduladores de los receptores que se co-aplicaron con GABA 10 μM. Esta estrategia de caracterización farmacológica permite establecer diferencias en la composición de subunidades en base a características distintivas de la respuesta neuronal al fármaco. La figura 11. A muestra ejemplos de la modulación de la corriente GABAérgica en respuesta a la presencia de algunos moduladores alostéricos de los receptores GABA_A. Se puede observar que la co-aplicación de GABA 10 μM y diazepam, propofol o alfaxalona produce una potenciación de la corriente respecto a GABA aplicado solo, mientras que la co-aplicación con furosemida o ZnCl₂ produce una inhibición de la misma, manifestada por la reducción de la amplitud respecto a la aplicación de GABA solo.

Se encontró que diazepam 1 μM potenció las corrientes en 15/16 neuronas en los machos y en 16/17 neuronas en las hembras; propofol 5 μM potenció 16, no tuvo efecto en 5 e inhibió la respuesta en 1 neurona en los machos y potenció 18, no tuvo efecto en 5 e inhibió la respuesta en 5 neuronas en las hembras; alfaxalona 50 μM potenció 11/12 neuronas en machos y 7/7 en hembras; ZnCl_2 1 μM inhibió 4/9 neuronas en machos y 4/7 en hembras; furosemida 500 μM inhibió 3/7 neuronas en los machos y 5/8 en hembras, LaCl_3 100 μM potenció 5/5 neuronas en machos y 11/17 en hembras; THIP 1 μM y Ro 15-4513 0,3 μM no modularon la respuesta significativamente en machos ni hembras. El análisis estadístico mediante Chi^2 demostró que no existen diferencias significativas en cuanto al sexo en la cantidad de células que responden / no responden a ninguno de los moduladores evaluados. En la figura 11. B se grafican los porcentajes de potenciación e inhibición de los moduladores alostéricos sobre las corrientes GABAérgicas de neuronas macho y hembra. Se puede observar que diazepam produce la potenciación de la corriente en un $152,80 \pm 8,45 \%$ para el caso de los machos y en $166,25 \pm 8,43 \%$ para las hembras. Por su parte alfaxalona actúa sobre los receptores, alcanzando valores de $193,55 \pm 13,10 \%$ en machos y de $197,00 \pm 20,01 \%$ en hembras. Los porcentajes de potenciación de las corrientes GABAérgicas evocados por LaCl_3 fueron de $126,20 \pm 6,47 \%$ en machos y $121,72 \pm 6,04 \%$ en hembras. La co-aplicación de furosemida mostró una inhibición de la corriente, $76,33 \pm 9,68 \%$ en machos y $76,80 \pm 3,49 \%$ en hembras. Por otro lado ZnCl_2 produjo la inhibición de la corriente en respuesta a GABA cuando fue co-aplicado con el ligando, los valores para macho y hembra fueron $70,25 \pm 9,13 \%$ y $78,25 \pm 3,04 \%$ respectivamente. Particularmente THIP y Ro 15-4513 no produjeron modulación significativa de la corriente comparado con GABA aplicado solo. Los valores obtenidos en macho y hembra fueron $96,80 \pm 3,40 \%$ y $95,73 \pm 2,08 \%$ respectivamente para THIP, y $85,33 \pm 6,96 \%$ y $94,00 \pm 2,75 \%$ para Ro 15-4513.

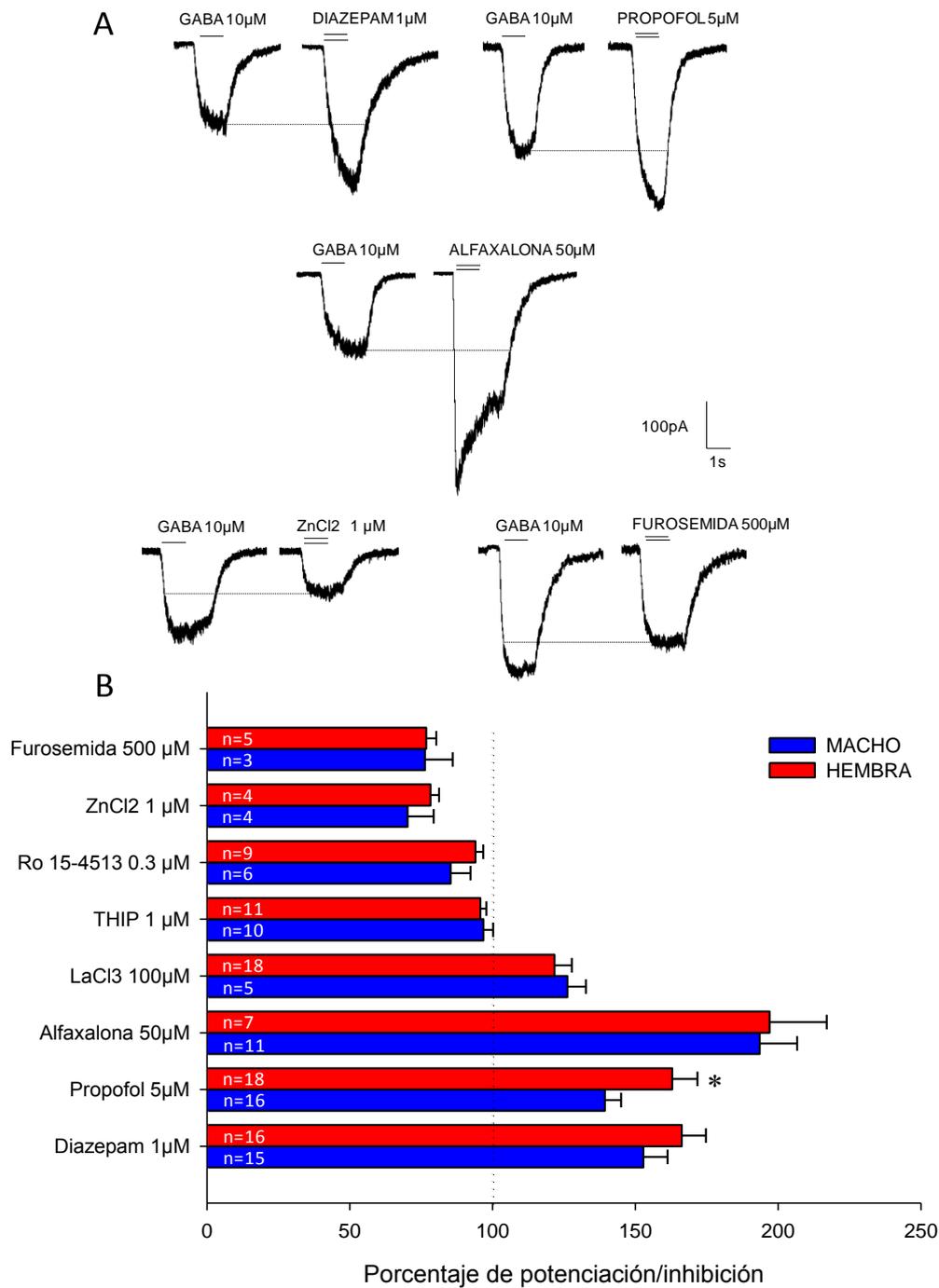


Figura 11. A Modulación y **B** porcentajes de potenciación e inhibición de corrientes evocadas por GABA 10 μ M en presencia de diazepam 1 μ M, propofol 5 μ M, alfaxalona 50 μ M, LaCl₃ 100 μ M, THIP 1 μ M, Ro 15-4513 0.3 μ M, ZnCl₂ 1 μ M y furosemida 500 μ M de neuronas hipotalámicas de embriones de rata crecidas *in vitro*. La línea punteada representa a GABA 10 μ M aplicado solo. * $p < 0,05$ según Test "t"

La mayoría de estas drogas no mostró diferencias sexuales en los porcentajes de potenciación / inhibición de las corrientes GABAérgicas brindándonos evidencia fisiológica de que tanto machos como hembras comparten, aparentemente, la misma composición de subunidades en dichos receptores. Sin embargo, el porcentaje de potenciación por parte de propofol 5 μM es mayor en hembras que en machos: $162,39 \pm 8,86$ ($n = 18$) vs. $139,31 \pm 5,72$ ($n = 16$); Test "t" = 2,13, $p < 0,05$.

Para saber si la sensibilidad a GABA tiene alguna relación con la modulación de las corrientes GABAérgicas por parte de furosemida 500 μM y ZnCl_2 1 μM , se realizó una regresión lineal comparando el EC_{50} de GABA y el porcentaje de modulación de dichos fármacos en cada neurona de macho y hembra de 2DIV. La figura 12. A muestra que el EC_{50} tiene una correlación positiva con el porcentaje de modulación por parte de furosemida ($R= 0,83$; $p<0,01$), mientras que la figura 12. B muestra que no existe una relación entre la sensibilidad al GABA y el porcentaje de modulación de ZnCl_2 ($R= 0,08$; $p>0,05$).

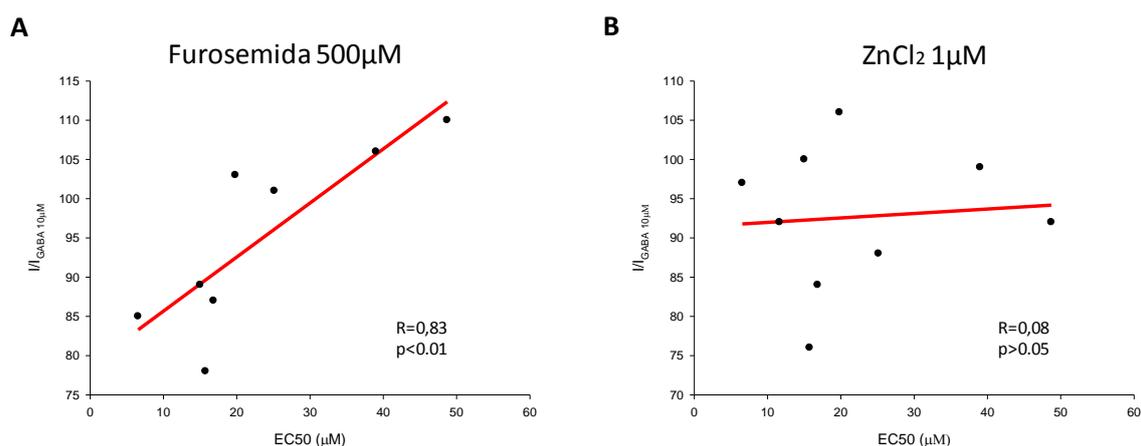


Figura 12. Regresión lineal entre el EC_{50} de GABA (μM) y el porcentaje de modulación de la respuesta a GABA 10 μM ($I/I_{\text{GABA } 10\mu\text{M}}$) por parte de **A** furosemida 500 μM y **B** ZnCl_2 1 μM de neuronas hipotalámicas macho y hembra de 2DIV. $R=$ Coeficiente de regresión lineal.

Dependiendo del tipo neuronal, etanol puede potenciar, inhibir o incluso no modular la corriente de GABA. Los mecanismos por los cuales el alcohol ejerce su modulación sobre los receptores GABA_A son actualmente objeto de intenso debate e investigación. A fin de aportar evidencias sobre el tipo de modulación producido por etanol en neuronas hipotalámicas, realizamos un análisis más detallado de la respuesta a GABA en presencia de etanol en nuestro sistema experimental. La co-aplicación de etanol 100 mM provocó la potenciación de las corrientes GABAérgicas en 5, no moduló

en 12 e inhibió la respuesta en 9 neuronas en los machos y potenció en 5, no moduló en 13 e inhibió en 20 neuronas en las hembras. El análisis estadístico demostró que no existen diferencias debidas al sexo en la cantidad de células que responden / no responden a etanol. Los porcentajes de inhibición (macho: $80,89 \pm 3,88 \%$; hembra: $72,65 \pm 3,12 \%$) y potenciación (macho: $125,60 \pm 6,55 \%$; hembra: $122,20 \pm 1,49 \%$) en respuesta al alcohol no muestran diferencias sexuales significativas (figura 13).

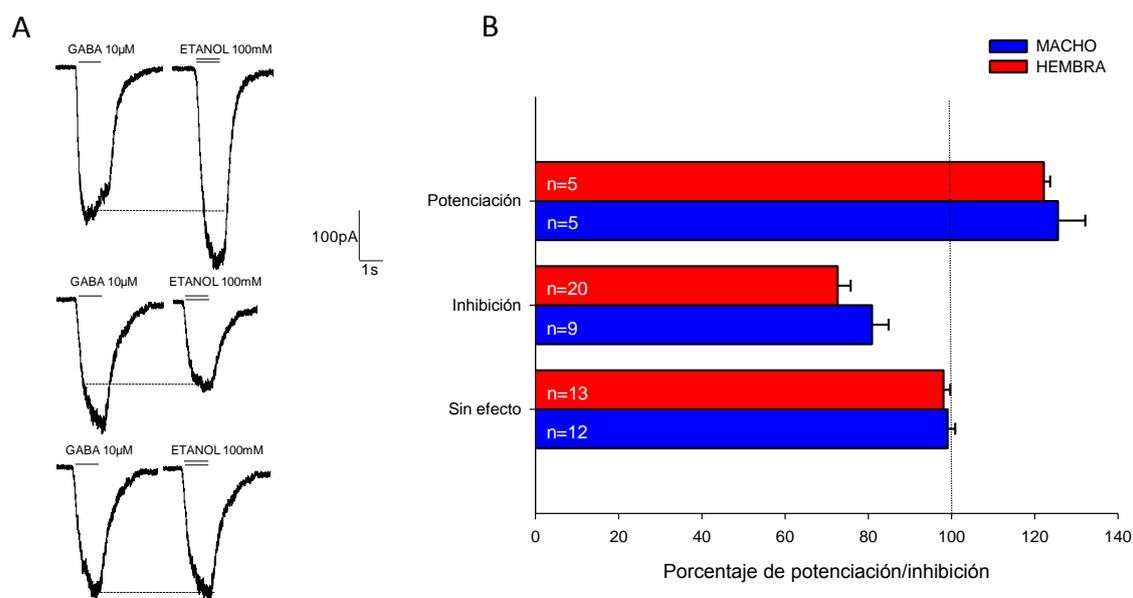


Figura 13. **A** Modulación y **B** porcentaje de potenciación e inhibición de corrientes evocadas por GABA 10µM en presencia de etanol 100mM de neuronas hipotalámicas de macho y hembra crecidas in vitro. La línea punteada representa a GABA 10µM aplicado solo.

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES GABA_A EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS DE MACHO Y HEMBRA

Efecto de la activación/bloqueo de los receptores GABA_A sobre el crecimiento y diferenciación neuronal

Los experimentos de electrofisiología de este trabajo de tesis muestran que machos y hembras se asemejan en numerosos parámetros de la respuesta GABAérgica. Sin embargo el porcentaje de potenciación de propofol, modulador alostérico de los receptores GABA_A, fue mayor en neuronas hembra. Esto nos movilizó a estudiar la

participación de los receptores GABA_A en el crecimiento y diferenciación neuronal en busca de diferencias sexuales en dichos parámetros. Para ello las neuronas hipotalámicas separadas según el sexo fueron tratadas por 48hs con muscimol 100µM o bicuculina 100µM, un antagonista específico de los receptores GABA_A.

Después de 48hs *in vitro* las neuronas hipotalámicas desarrollan en promedio 4 neuritas que emergen del soma. En los cultivos tratados con vehículo (CONTROL) alrededor del 60% de las células analizadas presentan neuritas cortas de longitud similar, características del estadio II de diferenciación neuronal, mientras que el 40% restante presenta una neurita de mayor longitud que las restantes, de diámetro constante, que presenta ramificaciones en ángulo recto (denominada axón - figura 14), característica distintiva del estadio III de diferenciación neuronal. El agregado de muscimol o bicuculina 100 µM al medio cultivo no alteró los porcentajes de neuronas en estadios II y III respecto a los controles. Tampoco se encontraron diferencias debidas al sexo (Kruskall-Wallis; H: 5,26, $p > 0,05$).

La evaluación estadística del análisis morfométrico de los cultivos neuronales separados según el sexo reveló que la exposición a muscimol 100 µM durante 2 DIV provoca alteraciones en el crecimiento de los procesos neuronales en cultivos de ambos sexos. El ANOVA realizado arrojó un efecto principal por el tratamiento con muscimol ($F_{(2)}= 6,62$; $p < 0,01$) para la longitud axonal. No hubo efecto del sexo ni de la interacción entre estas variables. Las neuronas tratadas con muscimol poseen axones más cortos que los controles y que aquellas tratadas con bicuculina, independientemente del sexo de las mismas ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente). Por el contrario, el tratamiento crónico (48hs) con bicuculina 100 µM, un antagonista específico de los receptores GABA_A, no tuvo efecto en la longitud de los axones de ambos sexos (figura 15. A).

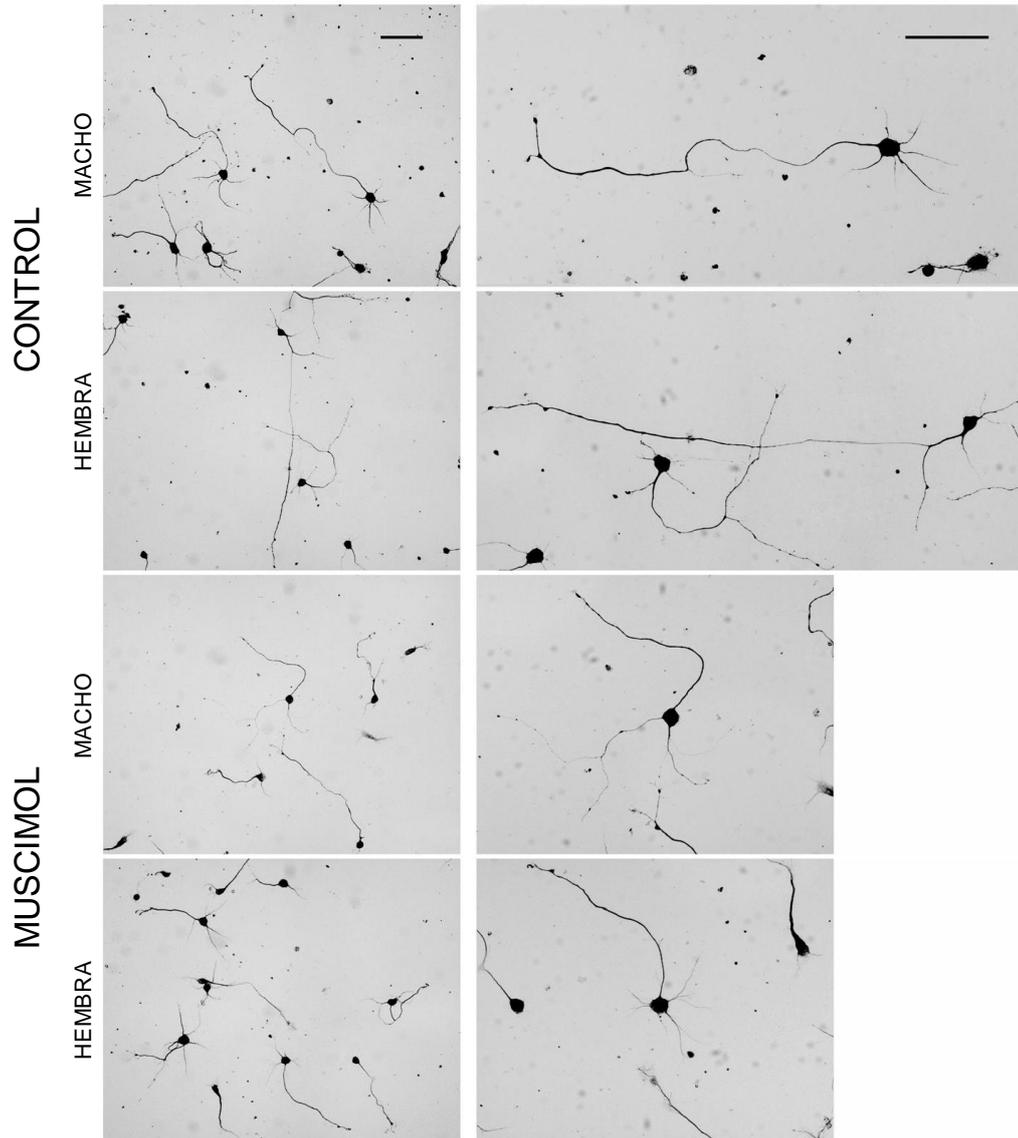


Figura 14 Microfotografías mostrando neuronas hipotálamicas cultivadas por 48 hs. El panel de la izquierda muestra neuronas de embriones macho y hembra tratadas con vehículo (CONTROL) o MUSCIMOL 100 μ M, a una magnificación de 20X. El panel de la derecha muestra el detalle de una neurona de cada condición a una magnificación de 40X. La barra de calibración representa 50 μ m

También se observó un efecto principal de muscimol en la longitud media de los procesos menores (ANOVA; $F_{(2)}= 5,55$; $p < 0,01$), mientras que no hubo efecto del sexo ni de la interacción entre las variables. El tratamiento con el agonista GABAérgico produce un aumento en la longitud de los procesos menores respecto a aquellos tratados con bicuculina ($p < 0,01$, figura 15. B). No se observaron diferencias significativas debidas al sexo.

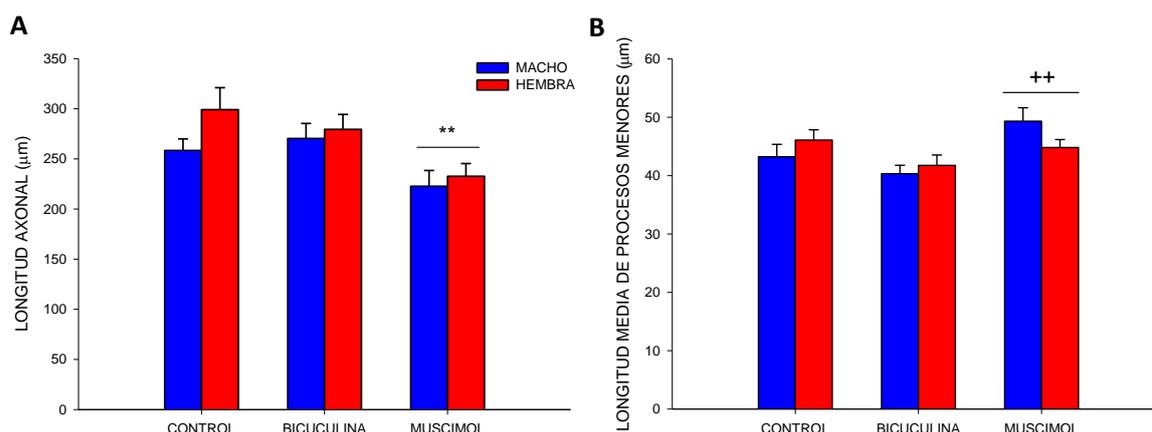


Figura 15. **A** Longitud axonal y **B** longitud media de procesos menores de cultivos neuronales de macho y hembra tratados con bicuculina 100 µM o muscimol 100 µM. Las barras representan la media ± error estándar de 5 cultivos diferentes para cada condición. ** $p < 0,01$; MUSCIMOL vs. CONTROL; ++ $p < 0,01$; MUSCIMOL vs. BICUCULINA según Test de Tukey.

Por otro lado, el tratamiento de los cultivos de neuronas hipotalámicas de macho y hembra con muscimol o bicuculina no afectaron parámetros morfológicos tales como el número de neuritas, el número de ramificaciones del axón o de procesos menores, ni el área del soma (Tabla 2).

Tabla 2. Número de neuritas, número de ramificaciones del axón, número de ramificaciones de procesos menores y área del soma (µm²).

	SEXO	NEURITAS	RAMIFICACIONES AXÓN	RAMIFICACIONES PROCESOS MENORES	ÁREA DEL SOMA (µm ²)
Control	Macho	4,21 ± 0,25	2,69 ± 0,33	2,68 ± 0,24	111,64 ± 6,28
	Hembra	4,05 ± 0,32	2,99 ± 0,38	2,88 ± 0,31	109,78 ± 4,44
Bicuculina 100µM	Macho	4,31 ± 0,47	2,47 ± 0,28	2,76 ± 0,33	108,98 ± 3,82
	Hembra	3,88 ± 0,29	2,74 ± 0,19	2,61 ± 0,30	106,54 ± 7,20
Muscimol 100µM	Macho	4,22 ± 0,08	2,63 ± 0,19	2,75 ± 0,19	104,92 ± 5,94
	Hembra	3,95 ± 0,18	3,04 ± 0,36	2,92 ± 0,19	101,02 ± 4,64

Los valores representan la media ± error estándar de 5 cultivos independientes por cada condición. No hay diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros evaluados.

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INVOLUCRADAS EN EL CRECIMIENTO NEURONAL INDUCIDO POR ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABA_A

Análisis de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol

La despolarización causada por GABA en neuronas inmaduras causa la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de iones calcio. Este aumento del calcio intracelular actúa como segundo mensajero modulando la actividad de varias quinasas. Algunas de éstas, como CAMKII y ERK1/2, están involucradas en la regulación del crecimiento neurítico inducido por GABA en neuronas en desarrollo. Los experimentos anteriores demostraron que la activación de los receptores GABA_A afecta el crecimiento y diferenciación de neuronas hipotalámicas de macho y hembra. Es necesario entonces evaluar si muscimol induce la activación de dichas quinasas en nuestro sistema experimental. Para ello cultivos neuronales hipotalámicos de cada sexo fueron estimulados con muscimol para realizar una curva dosis-respuesta y un curso temporal de fosforilación de ERK1/2. Luego de 48 hs de sembrados, los cultivos de cada sexo fueron estimulados con 1, 10 y 100 μ M de muscimol por 5 minutos en el caso de la dosis respuesta y para el curso temporal los cultivos fueron estimulados con 100 μ M de muscimol por 1, 5 y 15 minutos. Se utilizaron cultivos neuronales sin estimulación como condición basal (tiempo 0). Luego las células fueron homogenizadas y procesadas para la inmunodetección de las formas fosforiladas de ambas quinasas mediante la técnica de Western blot.

Curva dosis-respuesta y curso temporal de la fosforilación de ERK1/2

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con muscimol produjo un aumento de la fosforilación de ERK1/2 en todas las concentraciones estudiadas (figura 16. A). El análisis estadístico de los resultados no demostró diferencias sexuales significativas. Tampoco reveló diferencias atribuibles a la concentración utilizada, sin embargo la concentración de 100 μ M fue elegida para los experimentos subsiguientes por tratarse de la misma usada para los experimentos de análisis morfométrico.

En cuanto al curso temporal, el tratamiento con muscimol produjo una rápida activación de ERK1/2 (figura 16. B). La evaluación estadística de la densidad óptica de las bandas mostró diferencias significativas en la fosforilación de la quinasa debidas al tratamiento (ANOVA; F: 22,3; $p < 0,001$). El análisis post hoc de Tukey indicó un incremento significativo a los 5 ($p < 0,05$) y máximo a los 15 minutos ($p < 0,001$). No se observaron diferencias sexuales (figura 16. C).

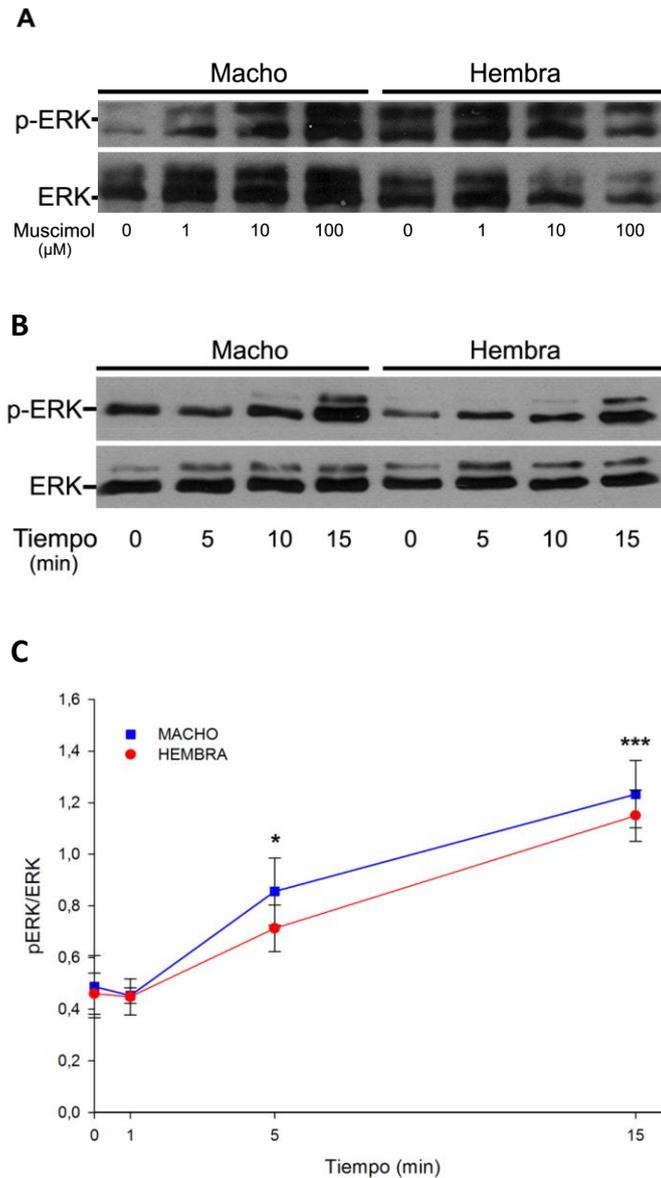


Figura 16. Dosis-respuesta y curso temporal de la fosforilación de ERK1/2 inducida por muscimol. Inmunoblot representativo mostrando el efecto de **A** diferentes concentraciones de muscimol y **B** diferentes tiempos de estimulación sobre la fosforilación de ERK1/2 (p-ERK) en cultivos de neuronas hipotalámicas macho y hembra. ERK: expresión de ERK1/2 obtenida a partir de la misma membrana. **C** Cociente (pERK/ERK) de las lecturas correspondientes a bandas expresadas en unidades densitométricas arbitrarias. Las medidas fueron realizadas en bandas obtenidas en la misma membrana. Los cocientes representan la media \pm error estándar de 4 cultivos independientes. El análisis post hoc de Tukey indica: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. tiempo 0.

Estudio del efecto del bloqueo de proteínquinasas y canales de calcio dependientes de voltaje sobre los cambios morfológicos inducidos por la activación de los receptores GABA_A

Los experimentos anteriores demostraron que muscimol 100 μM es capaz de activar la quinasa ERK1/2. El mecanismo propuesto para la activación de quinasas intracelulares en respuesta a la despolarización causada por receptores GABA_A es la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje. El aumento intracelular de este ión es un paso inicial clave en la señalización citoplasmática para los efectos sobre el crecimiento y diferenciación de neuritas en muchos sistemas experimentales. Para saber si calcio, ERK1/2 y CAMKII participan en los cambios morfológicos inducidos por muscimol, neuronas hipotalámicas fueron cultivadas durante 24 horas con y sin el agregado de muscimol 100 μM . En algunos cultivos se agregaron: un inhibidor de CaMKII (KN-62; 5 μM), un inhibidor específico de la activación de ERK1/2 (UO126; 10 y 25 μM) o un bloqueante específico de CCDV tipo-L (nifedipina 2 μM) durante 24 horas adicionales. Se determinó entonces el efecto de estos inhibidores sobre el desarrollo de los procesos neuronales.

El análisis morfométrico reveló que el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo-L afecta drásticamente la longitud de procesos menores y axones de neuronas hipotalámicas de machos y hembras (figura 17). El ANOVA realizado mostró una interacción entre el tratamiento con muscimol y nifedipina (F: 10,67; $p < 0,01$). El análisis post hoc (Tukey) indicó que la longitud axonal promedio de las neuronas que crecieron en presencia de muscimol y tratadas con el bloqueante era significativamente mayor respecto a los cultivos tratados con muscimol (figura 18. A). Esto demuestra que el bloqueante previene la disminución de la longitud axonal producida por la activación crónica de los receptores GABA_A, señalando la importancia de los canales de calcio dependientes de voltaje en los efectos mediados por activación de dichos receptores.

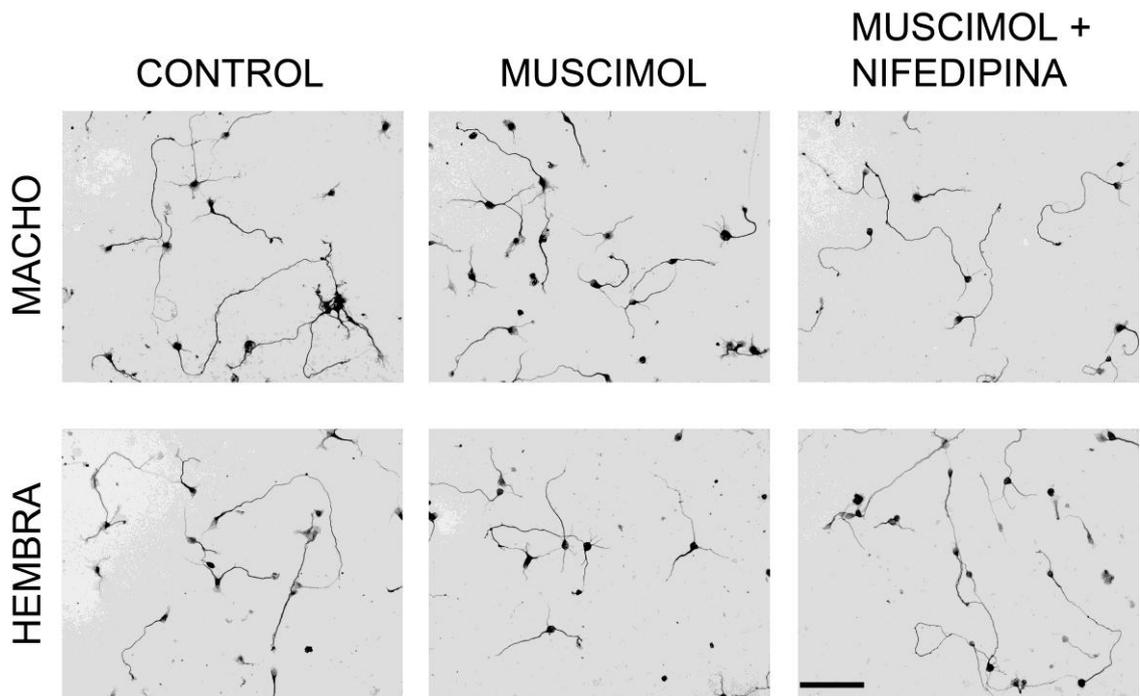


Figura 17 Microfotografías mostrando neuronas hipotálamicas cultivadas por 48 hs. El panel de la izquierda muestra neuronas de embriones macho y hembra tratadas con vehículo (CONTROL), el panel del medio con MUSCIMOL 100 μM y el panel de la derecha cultivos tratados con muscimol y NIFEDIPINA 2 μM , a una magnificación de 20X. La barra de calibración representa 50 μm

Por otro lado el tratamiento con nifedepina 2 μM afectó el crecimiento de los procesos menores en neuronas de ambos sexos. El análisis estadístico muestra un efecto principal del tratamiento (ANOVA; F: 4,83, $p < 0,05$); según el test de Tukey la longitud media de los procesos menores disminuye en los cultivos tratados con el bloqueante ($p < 0,05$). Una vez más queda en evidencia la relevancia de la señalización intracelular mediada por calcio para el crecimiento normal de los procesos neuríticos (Figura 18. B).

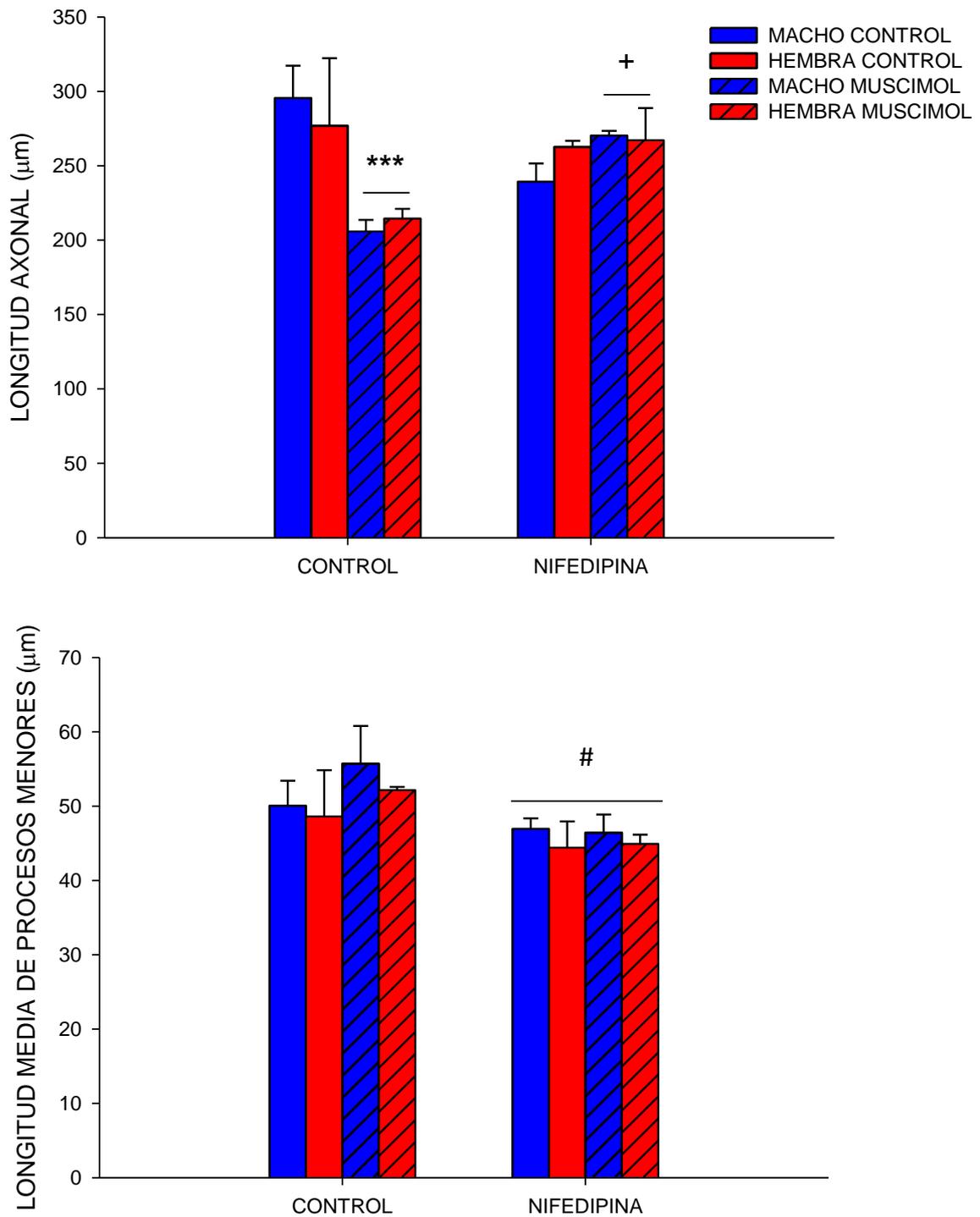


Figura 18. A Longitud axonal y **B** longitud media de procesos menores de cultivos neuronales de macho y hembra tratados con muscimol 100 μ M y nifedipina 2 μ M. Las barras representan la media \pm error estándar de 3 cultivos diferentes para cada condición. *** $p < 0,001$ vs. CONTROL; + $p < 0,05$ vs. MUSCIMOL; # $p < 0,05$ vs. CONTROL según Tukey.

El tratamiento con UO126 y KN-62, inhibidores específicos de MEK y CAMKII respectivamente, no alteró la longitud de las neuritas de cultivos neuronales separados según el sexo. El análisis estadístico de los resultados obtenidos indica que ninguno de los inhibidores es capaz de revertir completamente la disminución de la longitud de los axones causada por el tratamiento con muscimol. El tratamiento con los inhibidores tampoco afecta la longitud media de los procesos menores de machos ni hembras (tabla 3).

Tabla 3. Longitud axonal y longitud media de procesos menores (μm) de neuronas macho y hembra de 2 DIV tratadas con muscimol e inhibidores específicos de CAMKII y MEK.

	SEXO	LONGITU AXONAL (μm)	LONGITUD MEDIA DE PROCESOS MENORES (μm)
Control	Macho	295,45 \pm 21,8	50,04 \pm 3,37
	Hembra	276,79 \pm 45,51	48,62 \pm 6,21
Muscimol 100μM**	Macho	205,79 \pm 7,81	55,7 \pm 5,09
	Hembra	214,47 \pm 6,49	52,17 \pm 0,45
Muscimol + UO126 10μM	Macho	251,06 \pm 15,58	49,58 \pm 3,49
	Hembra	257,72 \pm 4,99	52,55 \pm 3,03
Muscimol + UO126 25μM	Macho	248,76 \pm 2,69	53,81 \pm 1,84
	Hembra	266,92 \pm 14,66	47,72 \pm 1,52
Muscimol + KN-62 5μM	Macho	229,47 \pm 10,69	48,61 \pm 1,62
	Hembra	218,56 \pm 3,0	51,08 \pm 1,55

Valores medios \pm error estándar de 3 cultivos independientes por cada condición. ** $p < 0,01$; Tukey - muscimol vs. todas las condiciones. Efecto principal de muscimol para longitud axonal ($\text{ANOVA}_{\text{UO126}}$; $F: 8,98$, $p < 0,01$; $\text{ANOVA}_{\text{KN-62}}$; $F: 14,34$, $p < 0,01$). No hay diferencias sexuales en ninguno de los parámetros evaluados.

DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta de los receptores GABA_A se realizó en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas sexualmente diferenciadas (figura 14). Este modelo experimental *in vitro* es ampliamente utilizado para estudiar de manera controlada diferentes parámetros de la biología celular de neuronas hipotalámicas (Cambiasso y col., 2000; Gao y van den Pol, 2001; Gorosito y Cambiasso, 2008; Obrietan y col., 2002; Perrot-Sinal y col., 2001; Scerbo y col., 2014). En el caso particular de esta tesis se vuelve especialmente valioso al permitir la manipulación estricta de las condiciones de cultivo y una gran libertad de acceso a las células para realizar los registros electrofisiológicos. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas evidencias sobre la participación de los receptores GABA_A en el crecimiento, diferenciación y fisiología de neuronas hipotalámicas de embriones macho y hembra.

Particularmente importante es la caracterización electrofisiológica realizada en este sistema ya que nos permitió conocer características distintivas de las neuronas hipotalámicas a nivel de propiedades intrínsecas de la membrana, potencial de reversión y concentración intracelular de Cl⁻, sensibilidad al ligando, tipo de respuesta a moduladores específicos y la eficacia con la que éstos actúan en relación a las subunidades que componen los receptores. Si bien no se hallaron diferencias sexuales significativas en dichos parámetros, algunas diferencias como la mayor eficacia de propofol sobre corrientes GABAérgicas de hembra, nos habilitaron a hipotetizar la existencia de diferencias en el crecimiento y diferenciación entre machos y hembras en respuesta a la activación de los receptores GABA_A. Nuestros resultados mostraron que la activación crónica de los receptores GABA_A provoca una reducción de la longitud axonal y un aumento de la longitud de los procesos menores en ambos sexos. No se hallaron diferencias sexuales en ninguno de los parámetros morfológicos estudiados, por lo que podemos suponer que las diferencias sexuales en la modulación de corrientes GABAérgicas por propofol al parecer no afectan de manera sexo-específica el crecimiento de las neuritas. El análisis de las vías intracelulares involucradas en este efecto posiciona al calcio como actor principal ya que el bloqueo farmacológico de la entrada de dicho ión es capaz de revertir la reducción de la longitud axonal causada por la activación crónica de los receptores GABA_A. Es conveniente reiterar que nuestro modelo experimental permite estudiar en todos los casos las diferencias sexuales dependientes de la constitución cromosomal (XY versus XX) de las neuronas, ya que el material para realizar los cultivos se obtuvo de fetos de E16, que por lo tanto no estuvieron expuestos a las secreciones gonadales. Tampoco se agregaron hormonas *in vitro*.

Caracterización electrofisiológica de neuronas hipotalámicas macho y hembra

Los valores obtenidos para las propiedades pasivas de la membrana de neuronas hipotalámicas de macho y hembra no mostraron diferencias sexuales significativas (tabla 1). El potencial de membrana en reposo (PMR) varió entre -30 y -57 mV en neuronas de ambos sexos. El valor promedio para machos fue $-40,54 \pm 2,31$ mV y $-42,44 \pm 2,68$ mV para las hembras, estos valores se encuentran dentro del rango observado en la literatura para neuronas hipotalámicas de embriones de ratón de la misma edad *in vitro* (Chen y col., 1996; Wang y col., 2001). Para facilitar las comparaciones, se fijó el voltaje de membrana neuronal en -50 mV para todos los experimentos subsiguientes.

La respuesta a aplicaciones sucesivas de GABA 10 μ M desenmascaró dos subpoblaciones neuronales, una caracterizada por mantener constante y otra por presentar una progresiva disminución de la corriente en respuesta a los distintos pulsos del ligando (figura 7). Está ampliamente documentada en la literatura la desensibilización de receptores ionotrópicos mediada por la exposición prolongada o a dosis altas del ligando. En consecuencia los receptores entran en estado de inactivación con el consiguiente cese del flujo iónico. Es más, se propone que ciertos parámetros cinéticos de las corrientes GABAérgicas, tales como una rápida desensibilización, aumentan con los días en neuronas mantenidas *in vitro*. Este cambio estaría asociado al desarrollo de conexiones sinápticas (Hutcheon y col., 2000). También se ha visto una disminución de la corriente por internalización (Brünig y col., 2001; Chapell y col., 1998) o de la sensibilidad a GABA por desagregación de "clusters" (Chen y col., 2000; Petrini y col., 2003) de los receptores de membrana. Dichos procesos se manifiestan luego de 15 min o más. Las aplicaciones del ligando en nuestros experimentos duraron 1 segundo y fueron separadas por 1 minuto entre una y otra, por lo que la hipótesis de la internalización parece poco probable. Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de neuronas que podrían estar sujetas a una rápida desensibilización. Es por eso que aquellas neuronas que sufrieron una modificación de la corriente superior al 10% en tres aplicaciones sucesivas de GABA 10 μ M se eliminaron de los análisis posteriores.

El potencial de reversión del ión Cl⁻ (E_{Cl^-}) para neuronas de macho y hembra fue $-39,45 \pm 3,78$ mV y $-42,65 \pm 2,26$ mV respectivamente. La concentración intracelular de Cl⁻ ($[Cl^-]_i$) para machos fue $35,49 \pm 5,49$ mM y $30,21 \pm 2,46$ mM para las hembras. Los valores de E_{Cl^-} reportados en otros sistemas experimentales tales como neuronas de hipotálamo de rata (Chen y col., 1996), hipocampo (Ganguly y col., 2001) y cerebelo (Borodinsky y col., 2003), se asemejan a los encontrados en este estudio. Sin embargo son ligeramente diferentes de los reportados para neuronas hipotalámicas de ratón de la misma edad *in vitro*, E_{Cl^-} entre -24 a -31 mV y $[Cl^-]_i$ de 45 mM (Gao y van den Pol, 2001;

Wang y col., 2001). Por otro lado es bien sabido que las mediciones del PMR en células inmaduras conllevan un cierto grado de artificio experimental debido a su pequeño tamaño. Esto provoca una subestimación del valor real de PMR (Barry y Lynch, 1991; Tyzio y col., 2003), lo que podría responder a ciertas incongruencias con la literatura. En nuestro sistema, los valores de E_{Cl^-} son prácticamente iguales al PMR registrado para estas neuronas lo que significa que la activación de los receptores GABA_A no produciría una despolarización neuronal significativa. Este no parece ser el caso ya que con nuestros experimentos bloqueando canales de calcio dependientes de voltaje demostramos que la entrada de este ión es necesaria para los efectos de muscimol sobre el crecimiento neuronal (figura 18). Por lo que necesariamente la activación de los receptores GABA_A produce despolarización neuronal. De todas formas, en configuración de parche perforado y corriente fija, la aplicación de GABA 10 μ M provocó la despolarización del potencial de membrana en las neuronas hipotalámicas de nuestro sistema experimental (figura 9. B). Como ha sido demostrado en otros sistemas experimentales (Ben-Ari, 2002), nuestros resultados indican que la despolarización del PMR es la vía común de las acciones excitatorias de GABA en neuronas hipotalámicas macho y hembra de 2DIV.

Los resultados obtenidos de las curvas dosis-respuesta a GABA para neuronas hipotalámicas crecidas *in vitro* no mostraron diferencias sexuales significativas (figura 10. B). Los valores de EC₅₀ de neuronas macho y hembra presentaron gran variabilidad. Los mismos oscilaron entre 6,09 y 66,74 μ M, con un valor promedio de 24,89 μ M para los machos y de 19,76 μ M para el caso de las hembras. Si bien estos valores promedio de EC₅₀ son similares a los valores obtenidos en neuronas hipotalámicas de rata neonatas *ex vivo* (Huang y Dillon, 2002), nuestros resultados sugieren que las neuronas hipotalámicas de macho y hembra mantenidas por 2DIV son una población neuronal heterogénea en cuanto a la sensibilidad a GABA. La sensibilidad al neurotransmisor está determinada por las subunidades α presentes en el receptor, siendo el orden de sensibilidad $\alpha_6 < \alpha_1 < \alpha_2 < \alpha_4 < \alpha_5 < \alpha_3$. Es más, se propone que cuatro aminoácidos del sitio de unión al ligando de la subunidad α son los responsables de otorgarle la sensibilidad al GABA a los receptores (Böhme y col., 2004). No obstante, cuando la subunidad δ forma receptores funcionales, por lo general junto a las subunidades α_4 y α_6 en receptores extrasinápticos, la sensibilidad del receptor al neurotransmisor es un orden de magnitud mayor (nM) que cuando lo hace con subunidades γ (μ M) (Belelli y col., 2009; Farrant y Nusser, 2005). El dominio S338-V264 de la subunidad δ parece conferir la alta sensibilidad a los receptores $\alpha_4\beta_3\delta$ (You y Dunn, 2007). Los valores de EC₅₀ obtenidos en este trabajo fueron del orden de los μ M en todas las neuronas registradas. Estos

resultados sugieren que ninguna neurona hipotalámica de macho o hembra posee exclusivamente receptores GABA_A con la subunidad δ en su conformación.

La composición de subunidades de los receptores GABA_A es un parámetro fundamental en la sensibilidad a GABA y a una gran variedad de drogas farmacológica y clínicamente importantes (Johnston, 1996). La función y distribución de las mismas varía según el estadio del desarrollo, la región y según el tipo celular estudiado (Barnard y col., 1998; Olsen y Sieghart, 2008). Es por esto que para analizar la existencia de distintas subpoblaciones celulares en neuronas hipotalámicas de macho y hembra, se realizaron experimentos con moduladores alostéricos de los receptores GABA_A a fin de identificar las subunidades presentes en dichos receptores. La utilización de una gran batería de moduladores alostéricos de los receptores GABA_A, nos permitió caracterizar farmacológicamente la respuesta de los mismos. A partir de este perfil farmacológico pudimos inferir la composición de subunidades de los receptores funcionales en la membrana neuronal. Esto puso en evidencia la existencia de distintas poblaciones celulares en cuanto a la presencia de subunidades específicas.

El sitio de unión para benzodiazepinas se encuentra en la interfase de las subunidades α y γ (Sigel y Buhr, 1997) por lo que cabe esperar que dichas subunidades le confieran a los receptores distinta sensibilidad al modulador. Es así que la modulación por benzodiazepinas, como el diazepam está sujeta a la presencia de la subunidad $\gamma 2$ y una de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ en el receptor, siendo más potente sobre aquellos que contienen $\alpha 3$ (Pritchett y col., 1989). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 6\beta 2$ son insensibles a diazepam (Knoflach y col., 1996; Korpi y col., 2002). Un residuo de histidina presente en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, pero no en $\alpha 4$ y $\alpha 6$ sería el responsable de la sensibilidad al modulador (Wieland y col., 1992). Los resultados de este trabajo muestran que prácticamente todas las neuronas fueron sensibles a diazepam 1 μ M, provocando una potenciación de la corriente en respuesta a GABA de $152,80 \pm 8,45$ % para el caso de los machos y $166,25 \pm 8,43$ % para las hembras. No se observaron diferencias sexuales en dicho parámetro, lo que sugiere que ambos sexos comparten una sensibilidad similar al fármaco. Esta evidencia muestra además que las neuronas hipotalámicas de ambos sexos poseen receptores GABA_A funcionales que estarían conformados por las subunidades $\gamma 2$ y $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$. Es posible que la exposición a los esteroides gonadales juegue un rol importante en este aspecto de la diferenciación sexual.

Al igual que diazepam, el esteroide sintético alfaxalona 50 μ M produce la potenciación de la totalidad de las neuronas registradas. Los porcentajes de potenciación fueron de $193,55 \pm 13,10$ % en machos y de $197,00 \pm 20,01$ % en hembras, dichos valores no difieren significativamente entre los sexos. El sitio de unión para los

neuroesteroides se ubica entre la subunidad α y β de los receptores GABA_A (Hosie y col., 2006). Maitra y colaboradores han sugerido que la ausencia de la subunidad α afecta la eficacia, pero no la potencia de alfaxolona para modular a los receptores GABAérgicos, y que la efectividad es mayor cuando se expresa la subunidad $\alpha 2$ en el receptor. Más aún, sus resultados muestran que la afinidad del receptor por el esteroide sintético depende también del tipo de subunidad γ , ya que actúan con mayor potencia en receptores que contienen $\gamma 1$ y $\gamma 3$ que en aquellos con $\gamma 2L$ (Maitra y Reynolds, 1999). Si bien los receptores GABA_A con las subunidades $\gamma 2$ y δ presentan una sensibilidad similar a la alfaxolona, la eficacia del fármaco es mayor en aquellos que contienen la subunidad δ (Brown y col., 2002). Es más, la sensibilidad a esteroides neuroactivos, entre ellos alfaxolona, está disminuída en ratones KO para la subunidad δ (Mihalek y col., 1999). Los resultados obtenidos con alfaxolona sugieren que las neuronas hipotalámicas de macho y hembra que no han sido expuestas a esteroides gonadales compartían una composición similar de subunidades en sus receptores GABA_A y que este modulador ejercería sus acciones a través de receptores que contienen la subunidad $\gamma 2$ y no δ ya que, a su vez, la gran mayoría de las neuronas respondieron a diazepam.

Los experimentos realizados con el catión trivalente Lantano (La^{+3}) proveen otra línea de evidencia a favor de la hipótesis de que las neuronas hipotalámicas, tanto de sujetos XX como XY, no presentan receptores con la subunidad δ en su conformación. La co-aplicación de $LaCl_3$ 100 μM y GABA 10 μM , produjo una potenciación de la corriente respecto a la evocada por el neurotransmisor aplicado solo en la mayoría de las neuronas. Particularmente, la modulación ejercida por el catión puede ser positiva o negativa dependiendo de las subunidades presentes en el receptor (Korpi y col., 2002). Saxena y colaboradores demostraron en un sistema de expresión heterólogo que La^{+3} provoca la potenciación de las corrientes de receptores $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ mientras que produce una inhibición débil en receptores $\alpha 6\beta 3\gamma 2L$ y fuerte en $\alpha 6\beta 3\delta$ (Saxena y col., 1997). Por su parte Brown y colaboradores ampliaron estas observaciones revelando que La^{+3} inhibe con mayor potencia y eficacia receptores $\alpha 4\beta 3\delta$ que $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ (Brown y col., 2002). En nuestro sistema La^{+3} potenció en un $126,20 \pm 6,47$ % las corrientes en machos y en un $121,72 \pm 6,04$ % en hembras. Estos valores son similares a la potenciación ejercida por $LaCl_3$ 100 μM en receptores $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ (Saxena y col., 1997). Algunas neuronas de este estudio no respondieron a la aplicación del catión (neuronas hembras 6/17). La inhibición de receptores $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 3\gamma 2L$ por la misma concentración de La^{+3} , es bastante débil y de alrededor del 19% (Brown y col., 2002; Saxena y col., 1997). Teniendo en cuenta estos datos podemos pensar que las neuronas XX que no respondieron en nuestro sistema al La^{+3} tendrían receptores con dicha conformación. De todas maneras ninguna mostró inhibición de las corrientes GABAérgicas en presencia del modulador sugiriendo

fuertemente que los receptores GABA_A de neuronas hipotalámicas están conformados por subunidades $\alpha 1\beta\gamma 2$ y quizás $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 3\gamma 2$.

Furosemida es un diurético que produce una fuerte inhibición de la corriente evocada por GABA en receptores $\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ (EC50 en el orden de μM), y es prácticamente insensible (EC50 en el orden de mM) en conformaciones $\alpha 1/2/3/5\beta 2/3\gamma 2$ (Fisher y col., 1997; Knoflach y col., 1996; Korpi y col., 1995; Thompson y col., 1999; Wafford y col., 1996). Es más, la presencia de la subunidad $\beta 1$ torna insensible a los receptores que contienen la subunidad $\alpha 6$ (Korpi y col., 1995). Experimentos realizados en sistemas heterólogos demostraron que el residuo de isoleucina 228 de la subunidad $\alpha 6$ y el de aspargina 265 de la subunidad $\beta 3$ son los responsables de otorgarle sensibilidad al diurético (Thompson y col., 1999). Furosemida 500 μM provocó la inhibición de la corriente en respuesta a GABA 10 μM en el 50% de las neuronas hipotalámicas de macho y hembra. El porcentaje de inhibición entre los sexos, $76,33 \pm 9,68 \%$ en machos y $76,80 \pm 3,49 \%$ en hembras, no difiere estadísticamente. En base a estos resultados podemos decir que la mitad de las neuronas hipotalámicas fueron sensibles a modulación por parte del fármaco y por lo tanto poseerían receptores con las conformaciones $\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$. Como hemos discutido anteriormente la presencia de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ otorga gran sensibilidad al GABA (Böhme y col., 2004) como así también a furosemida (Knoflach y col., 1996; Wafford y col., 1996). Cuando comparamos la variación del porcentaje de inhibición por furosemida respecto al EC50 de las neuronas hipotalámicas de macho y hembra encontramos que entre ambos parámetros existe un alto grado de correlación positiva (figura 12. A). Esta evidencia nos permite suponer la existencia de receptores con subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ en su conformación.

Hasta aquí los resultados obtenidos con moduladores alostéricos de los receptores GABA_A sugieren que todas las neuronas hipotalámicas registradas, independientemente de su complemento cromosómico sexual (XX o XY) poseen receptores con alguna de las siguientes conformaciones: $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$, $\alpha 5\beta\gamma 2$ y probablemente existe una subpoblación (de aproximadamente el 50%) que también expresa $\alpha 4\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$. Estos resultados también sugieren que no hay o son muy pocos los receptores conformados por la subunidad δ .

El etanol es una de las drogas de abuso más ampliamente usadas en el mundo. Se ha propuesto que el alcohol produce sus efectos analgésicos y anestésicos a través de la modulación de receptores GABA_A (Johnston, 1996; Korpi y col., 2002). Sin embargo etanol puede potenciar, inhibir o no tener efecto sobre las corrientes GABAérgicas (Aguayo, 1990; Roberto y col., 2003). Los distintos tipos de respuesta al etanol en diferentes células, es decir potenciación, inhibición o no efecto, pueden deberse a

diferencias en la composición de subunidades de los receptores GABA_A. Sin embargo, no debe descartarse la hipótesis de que una distinta regulación intracelular de los receptores GABA_A en los distintos tipos neuronales genere respuestas diferenciales al etanol. Dicha regulación es objeto de intensa investigación (Choi y col., 2008; Nie y col., 2004; Xiao y Ye, 2008) y numerosos debates acerca de los mecanismos de modulación por etanol se presentan en la actualidad (Aguayo y col., 2002; Jia y col., 2007; Korpi y col., 2007; Lobo y Harris, 2008; Olsen y col., 2007; Santhakumar y col., 2007). A pesar de las controversias, un gran número de evidencia demuestra que el etanol a concentraciones bajas (<50 mM) produce la potenciación de la respuesta a GABA en receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\delta$, mientras que lo hace a concentraciones mayores (>50 mM) en receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\gamma 2$ (Hancher y col., 2006; Olsen y col., 2007; Wallner y col., 2003). Es más, cuando estos receptores presentan la subunidad $\beta 3$ en su composición, ésta les confiere mayor sensibilidad a etanol (~3 mM). Por su parte, receptores formados sólo por subunidades $\alpha 4/6\beta 2/3$ son insensibles al alcohol (Wallner y col., 2003). Se ha demostrado que etanol a concentraciones <50 mM potencia la corriente tónica de neuronas de tálamo e hipocampo, mediada por receptores que contienen la subunidad δ formando el canal (Glykys y col., 2007; Jia y col., 2008; Liang y col., 2006). Nuestros resultados muestran que la respuesta a GABA 10 μ M puede ser potenciada, inhibida o no ser modulada por una concentración 100 mM del alcohol (figura 13). En el reducido número de neuronas que potenciaron sus corrientes en respuesta a etanol, el porcentaje de potenciación fue $125,60 \pm 6,55$ % en machos y $122,20 \pm 1,49$ % en hembras. En sistemas de expresión heterólogos los receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\gamma 2$ presentan un valor de potenciación similar a una concentración equimolar del alcohol (Wallner y col., 2003) sugiriendo la existencia de receptores con dicha conformación. En nuestro sistema etanol potenció la corriente a GABA con una eficacia menor a la potenciación descrita para los receptores $\alpha 4/6\beta 2/3\delta$ (>250%) (Wallner y col., 2003) en todas las neuronas, lo que sugiere que la subunidad δ no integraría mayormente la conformación de receptores de neuronas hipotalámicas. Por otro lado, en un importante número de neuronas etanol inhibió o no tuvo efecto sobre las corrientes en respuesta a GABA. Este tipo de respuesta se corresponde con la insensibilidad al alcohol de receptores que no poseen subunidades δ o γ en su conformación (Wallner y col., 2003).

En este sentido los experimentos realizados con TIHP y Ro 15-4513 apoyan la hipótesis de la ausencia de receptores $\alpha 4\beta \delta$ y $\alpha 6\beta \delta$, sin embargo tampoco parecen apoyar la presencia de receptores $\alpha 4\beta \gamma 2$ y $\alpha 6\beta \gamma 2$ en nuestro sistema. THIP es un isoxazol bicíclico, análogo estructural del muscimol con cualidades hipnóticas y analgésicas (Johnston, 1996). Se comporta como un agonista parcial en receptores $\alpha 4\beta \gamma 2$ y como un agonista total en receptores $\alpha 4\beta \delta$, donde GABA se comporta como un

agonista parcial (Brown y col., 2002; Jia y col., 2005; You y Dunn, 2007). La afinidad o potencia y la eficacia al agonista es aún mayor en receptores $\alpha 6\beta\delta$ que en $\alpha 4\beta\delta$ (Stórustovu y Ebert, 2006). La concentración del fármaco utilizada en este estudio demostró potenciar fuertemente la corriente tónica mediada por receptores $\alpha 4\beta\delta$ y en menor medida la corriente fásica de receptores $\alpha 4\beta\gamma 2$ en neuronas de hipocampo (Liang y col., 2006). Cuando THIP 1 μM fue coaplicado con GABA 10 μM no produjo una modulación significativa de la corriente de neuronas de macho o hembra ($96,80 \pm 3,40\%$ y $95,73 \pm 2,08\%$ respectivamente). Esta evidencia sugiere que las neuronas hipotalámicas no expresarían receptores funcionales del tipo $\alpha 4/6\beta\delta$ ni $\alpha 4/6\beta\gamma 2$ y que otra subunidad, estaría sustituyendo las subunidades γ y δ en dichos receptores. Los resultados obtenidos con los experimentos con Ro 15-4513 apoyan esta hipótesis. Ro 15-4513 es una imidazobenzodiazepina que se comporta como un agonista inverso en el sitio a etanol en receptores $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$ y $\alpha 5\beta\gamma 2$, mientras que actúa como un agonista en receptores $\alpha 4\beta\gamma 2/ \alpha 6\beta\gamma 2$ (Korpi y col., 2002). Existen evidencias que demuestran que este fármaco modula positivamente las corrientes mediadas por receptores $\alpha 4\beta\gamma 2/ \alpha 6\beta\gamma 2$ con una gran afinidad y eficacia (Knoflach y col., 1996; Wafford y col., 1996; Zhou y Smith, 2009). También es afín y modula la corriente de receptores $\alpha 6\beta\delta$ y $\alpha 4\beta\delta$, sobre los que actúa como un antagonista competitivo del sitio a etanol en sistemas nativos y heterólogos (Hancher y col., 2006; Liang y col., 2006; Olsen y col., 2007; Wallner y col., 2003). Nuestros resultados muestran que Ro 15-4513 0,3 μM no produjo una modulación significativa de la corriente en respuesta a GABA en machos ni en hembras, $85,33 \pm 6,96\%$ y $94,00 \pm 2,75\%$ respectivamente.

Todo este conjunto de evidencias sugiere fuertemente que las subunidades γ y δ no estarían formando parte de los receptores $\alpha 4\beta x$ y $\alpha 6\beta x$ en células XX y XY.

Existe evidencia sobre la distribución de las subunidades de los receptores a través del desarrollo en distintas áreas cerebrales. Estudios pioneros demostraron que en hipotálamo de embriones de rata de E14/E17 existe una gran expresión del ARNm de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, mientras que el de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$ es prácticamente inexistente. De igual manera, $\beta 2$ y $\beta 3$ se expresan ampliamente, pero no así $\beta 1$. Dicho estudio demuestra que la subunidad $\gamma 2$ se expresa en mayor medida que $\gamma 1$ y $\gamma 3$, pero que la subunidad δ no se expresa en el hipotálamo embrionario (Laurie y col., 1992b). Teniendo en cuenta este perfil de expresión, nuestros resultados apoyan la existencia de receptores funcionales del tipo $\alpha 2\beta 2/3\gamma$, $\alpha 3\beta 2/3\gamma$ y $\alpha 5\beta 2/3\gamma$. Sin embargo los resultados de electrofisiología sugieren la existencia de receptores del tipo $\alpha 4\beta 2/3x$ y $\alpha 6\beta 2/3x$ en neuronas hipotalámicas embrionarias. El hipotálamo adulto parece expresar bajos niveles del ARNm de la subunidad $\alpha 4$, mientras que la subunidad $\alpha 6$ es prácticamente inexistente (Wisden y col., 1992). El análisis de la hibridización *in situ* en

embriones de rata ha demostrado que el ARNm de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$ no se detecta en el hipotálamo de embriones de E14/E17, no obstante la subunidad $\alpha 4$ comienza a expresarse entre E17/E19 y alcanza los valores de adulto a P0 (Laurie y col., 1992b). Estas discrepancias quedan resueltas si consideramos que las neuronas de este trabajo fueron tomadas de embriones de E16 y, si la expresión de subunidades *in vitro* se asemeja al patrón observado *in vivo* como en otros sistemas experimentales (Gao y Fritschy, 1995), a 2 DIV cuando los registros fueron llevados a cabo, la subunidad $\alpha 4$ estaría presente en nuestras neuronas. Sin embargo, con las evidencias obtenidas hasta aquí no sabemos qué subunidad acompaña a los receptores $\alpha 4\beta 2/3x$.

Si bien la subunidad $\alpha 4$ constituye preferentemente receptores GABA_A con la subunidad δ y en menor medida con la γ , existe evidencia a favor de que una parte significativa de los receptores $\alpha 4$ no lo hace con ninguna de las dos subunidades (Bencsits y col., 1999). En 1997 se descubrió ϵ , una nueva subunidad de los receptores GABA_A con una gran homología con las subunidades γ (Davies y col., 1997; Whiting y col., 1997). Su expresión es alta en el giro dentado del hipocampo y en hipotálamo de primates (Davies y col., 1997; Whiting y col., 1997) y en el hipotálamo y núcleos monoaminérgicos de rata (Moragues y col., 2000, 2002). Estas observaciones fueron confirmadas en el cerebro en desarrollo de embriones de rata y en ciertos núcleos de la médula espinal. Particularmente, la subunidad ϵ tiene una expresión temprana, desde E14 y aumenta con el desarrollo en núcleos definidos del hipotálamo tales como el área anterior y área pre óptica, como así también en el núcleo arcuato, dorsomedial, ventromedial y núcleos mamilares (Pape y col., 2009). La subunidad ϵ puede constituir receptores funcionales y con una farmacología distintiva cuando es co-expresada con subunidades $\alpha\beta$ (Davies y col., 1997; Whiting y col., 1997), características que también poseen los receptores nativos con dicha subunidad en neuronas hipotalámicas (Sergeeva y col., 2005). Nuestros experimentos con el catión Zinc (Zn^{+2}) apoyan la presencia de la subunidad ϵ formando canales funcionales en una subpoblación de neuronas hipotalámicas *in vitro*. Zn^{+2} se comporta como un antagonista no competitivo sobre receptores que no expresan subunidades γ ni δ (Draguhn y col., 1990; Saxena y Macdonald, 1994). Cuando la subunidad γ forma parte del canal, éstos se tornan prácticamente insensibles al antagonismo por el catión ($EC_{50} > 100 \mu M$) comparados con la alta sensibilidad de receptores $\alpha\beta$ ($EC_{50} < 1 \mu M$), sin embargo cuando las subunidades $\alpha 4$ o $\alpha 6$ participan en la conformación del receptor la afinidad y la eficacia del ión es mayor ($EC_{50} < 100 \mu M$) (Fisher y col., 1997; Knoflach y col., 1996; Thompson y col., 1999). Esta afinidad aumenta aún más en receptores que contienen la subunidad δ ($EC_{50} < 10 \mu M$) (Brown y col., 2002; Kaur y col., 2009; Saxena y Macdonald, 1994; Stórustovu y Ebert, 2006; You y Dunn, 2007). En nuestro sistema, cuando una

concentración baja de Zn^{+2} (1 μM) fue co-aplicada con GABA produjo la inhibición de la corriente en el 50% de las neuronas registradas en ambos sexos. Los valores para macho y hembra fueron $70,25 \pm 9,13 \%$ y $78,25 \pm 3,04 \%$ respectivamente. Estos resultados demuestran la existencia de una subpoblación neuronal que expresa una subunidad distinta a γ o δ , cuya presencia le confiere al receptor una gran sensibilidad al anión. Se ha demostrado que receptores $\alpha\beta\epsilon$ son sensibles a la inhibición por parte de Zn^{+2} con un $EC_{50} \sim 50 \mu M$ (Davies y col., 2001; Whiting y col., 1997), la población de neuronas con receptores sensibles al ión en nuestro estudio demuestra la existencia de receptores de este tipo. La incorporación de la subunidad ϵ en receptores GABAérgicos confiere una mayor sensibilidad al ión, sin afectar la sensibilidad al GABA (Davies y col., 2001). Esto nos permite predecir que la sensibilidad al Zn^{+2} no tendrá relación con la sensibilidad al neurotransmisor en nuestro sistema. Efectivamente el porcentaje de inhibición por parte de Zn^{+2} no muestra relación con el EC_{50} de neuronas hipotalámicas de macho y hembra (figura 12. B).

Los resultados de nuestros experimentos con propofol aportan evidencia funcional sobre la existencia de receptores con la subunidad ϵ insertos en la membrana neuronal. Anestésicos generales, como el propofol, han demostrado potenciar e incluso producir (a altas concentraciones) la activación directa de receptores $GABA_A$ (Korpi y col., 2002). Es más, mutaciones puntuales en las subunidades β producen una marcada reducción de la efectividad de propofol a nivel celular y comportamental (Jurd y col., 2003; Krasowski y col., 1998). Particularmente, la incorporación de la subunidad ϵ otorga a los receptores recombinantes resistencia a los anestésicos generales (Davies y col., 1997, 2001). Si bien se sugiere que dicha insensibilidad puede deberse a un artefacto de la sobreexpresión de la subunidad en sistemas heterólogos (Thompson y col., 2002), experimentos con receptores nativos en neuronas de hipotálamo (Sergeeva y col., 2005) y del *locus coeruleus* (Belujon y col., 2009) demuestran que la subunidad ϵ provoca resistencia al propofol. Cuando propofol 5 μM fue co-aplicado con GABA provocó la potenciación de la respuesta en la mayoría de las neuronas hipotalámicas de ambos sexos, mientras que no tuvo efecto o provocó una leve inhibición ($\sim 85\%$) en algunas neuronas. Estos resultados están de acuerdo con la insensibilidad causada por receptores $\alpha\beta\epsilon$, confirmando que la subunidad ϵ forma receptores funcionales en la membrana de neuronas hipotalámicas. Sin embargo, los experimentos con propofol revelaron otro hallazgo sorprendente. En aquellas neuronas que potenciaron sus corrientes en respuesta al anestésico, el porcentaje de potenciación es mayor en hembras que en machos: $162,39 \pm 8,86$ vs. $139,31 \pm 5,72$. Estos valores se encuentran dentro del rango de potenciación observado por una concentración equimolar de propofol en receptores recombinantes $\alpha 1\beta 3\epsilon$ (163%) (Davies y col., 2001) y en neuronas

hipotalámicas $\epsilon^{(+)}$ y $\epsilon^{(-)}$ (180% y 190% respectivamente) que co-expresan subunidades $\alpha 2$ y $\beta 3$ (Sergeeva y col., 2005). Esta diferencia sexual se vuelve especialmente intrigante en el contexto de los experimentos de electrofisiología de este trabajo. La afinidad de GABA y la eficacia con la que actuaron todos los moduladores alostéricos en neuronas hipotalámicas de machos y hembras, indican que ambos sexos comparten el mismo repertorio de subunidades. No obstante la diferencia sexual encontrada en la eficacia de propofol sugiere la expresión diferencial de alguna subunidad. Podemos considerar que la subunidad ϵ podría estar formando una mayor cantidad de receptores en los machos y consecuentemente disminuyendo la eficacia del propofol en los mismos, o bien podría deberse a una diferencia en otras subunidades. Nuestros resultados sugieren también que dicha subunidad estaría acompañada de subunidades $\alpha 4\beta 2/3$ en la conformación del receptor. Se ha demostrado que propofol provoca la potenciación de corrientes mediadas por receptores $\alpha 4\beta \gamma 2$, $\alpha 6\beta \gamma 2$, $\alpha 4\beta \delta$ y $\alpha 6\beta \delta$ (Brown y col., 2002; Feng y Macdonald, 2004; Wafford y col., 1996), sin embargo hasta el momento no se han estudiado las características electrofisiológicas de receptores del tipo $\alpha 4\beta \epsilon$ o $\alpha 6\beta \epsilon$.

Bonnert y colaboradores aislaron en 1999 una nueva subunidad llamada θ , homóloga a las subunidades β (Bonnert y col., 1999) cuya expresión está restringida a núcleos discretos del cerebro, entre los que se encuentran varias regiones del hipotálamo adulto donde se co-expresa con la subunidad ϵ (Moragues y col., 2002; Sinkkonen y col., 2000). De especial interés resulta que el cluster de genes para la subunidades $\alpha 3/\theta/\epsilon$ se encuentra ubicado en el cromosoma Xq28 (Korpi y col., 2002) sin embargo aún no se ha estudiado si la expresión de dichas subunidades es diferente entre individuos XX (hembra) y XY (macho). Pape y colaboradores (2009) confirmaron y ampliaron las observaciones realizadas en el cerebro adulto demostrando que las tres subunidades presentan un llamativo patrón espacio temporal de co-expresión durante el desarrollo. A partir de E14, varios núcleos hipotalámicos co-expresan $\alpha 3$, ϵ y θ , entre los que podemos nombrar el área hipotalámica anterior y el área preóptica, como así también los núcleos arcuato, dorsomedial, ventromedial y mamilares (Pape y col., 2009). Este ajustado patrón de expresión sugiere la posibilidad de que algunos receptores en nuestro sistema posean $\alpha 3$, ϵ y θ en su conformación. Las propiedades funcionales de dichos receptores fueron estudiadas en comparación a receptores $\alpha 3\beta 1\gamma 2$ (Ranna y col., 2006). Al igual que en estudios previos (Bonnert y col., 1999), los hallazgos de Ranna y colaboradores sugieren que θ no puede sustituir completamente las funciones de las subunidades β . Sin embargo demuestran que propofol potencia con mayor eficacia las corrientes de receptores $\alpha 3\beta 1\theta \epsilon$ (161%) que $\alpha 3\beta 1\epsilon$ (126%) (Ranna y col., 2006). Estos valores son similares a los obtenidos en el presente estudio para neuronas hipotalámicas de hembras y machos respectivamente, sugiriendo que receptores con dichas conformaciones en cada sexo

podrían contribuir a las diferencias sexuales encontradas. Es más, teniendo en cuenta que la potenciación ejercida por propofol en receptores $\alpha\beta\epsilon$ es de igual magnitud a pesar de la variación en las subunidades α ($\alpha 1$ en Davies y col 2001; $\alpha 2$ en Sergeeva y col 2005 y $\alpha 3$ en Ranna y col 2006) podemos hipotetizar que lo mismo sucedería en receptores $\alpha 4\beta 2/3\epsilon$. En este sentido, se ha demostrado que las características de la modulación por propofol son similares en receptores que expresan $\alpha 1$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$, y que dependen en un mayor grado de la inclusión de las subunidades γ o δ (Feng y Macdonald, 2004; Wafford y col., 1996).

Es claro que la gran mayoría de las neuronas hipotalámicas de nuestro sistema presentan receptores, integrados y funcionales en la membrana celular, del tipo $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$. Sin embargo existe una subpoblación neuronal que además posee receptores funcionales del tipo $\alpha 4\beta 2/3\epsilon$ (aunque no podemos descartar las posibles combinaciones $\alpha 4\beta 2/3\epsilon$, $\alpha 3\beta 1/2/3\theta\epsilon$ o $\alpha 3\beta 1/2/3\epsilon$). Nuestros resultados además sugieren que machos y hembras podrían diferir en: a) la cantidad de dichos receptores; b) la incorporación de θ sólo en las hembras ($\alpha 4\beta 2/3\theta\epsilon$) o c) la proporción entre receptores $\alpha 3\beta 1/2/3\theta\epsilon$ / $\alpha 3\beta 1/2/3\epsilon$. La co-localización inmunocitoquímica y cuantificación relativa de las subunidades $\alpha 4$ y ϵ sólo en algunas neuronas de nuestros cultivos hipotalámicos sexualmente diferenciados, serían necesarios para comprobar la existencia de la subpoblación neuronal que exprese dichas subunidades, revelada mediante experimentos de farmacología funcional. Particularmente, la realización de experimentos de electrofisiología con agonistas y moduladores específicos de distintos subtipos de receptores GABA_A combinados con RT-PCR de cada célula registrada ayudaría a relacionar la expresión de ciertas combinaciones de subunidades con su funcionamiento en neuronas hipotalámicas.

Alrededor del 50% de las neuronas hipotalámicas son GABAérgicas y existen diferencias sexuales tanto en la expresión de GAD65 como en el recambio de GABA en varios núcleos hipotalámicos (Searles y col., 2000). Particularmente, se ha demostrado que en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo todas las neuronas $\epsilon^{(+)}$ son también GAD65⁽⁺⁾, lo que sugiere que si liberan GABA y no son inhibidas por los anestésicos generales pueden proveer de una cascada de retroalimentación positiva para las acciones de propofol (Sergeeva y col., 2005). La identificación en nuestro sistema del tipo neuronal que expresa dichas conformaciones arrojaría importantes claves acerca de la relevancia funcional de los receptores en el contexto del hipotálamo en desarrollo de machos y hembras.

La activación de los receptores GABA_A afecta el crecimiento de los procesos neuríticos de neuronas hipotalámicas

GABA ejerce sus acciones tróficas durante el desarrollo neuronal a través de sus receptores específicos (Represa y Ben-Ari, 2005). Aunque se ha demostrado que los receptores GABA_B juegan un papel de importancia en algunos sistemas (Bony y col., 2013; Priest y Puche, 2004), los efectos tróficos de GABA están mediados principalmente por su acción sobre receptores GABA_A. Esto se debe a que los receptores GABA_A son canales iónicos permeables al ión cloruro, a diferencia de los receptores metabotrópicos GABA_B que están asociados a proteína G. El tipo de respuesta mediada por receptores ionotrópicos está estrechamente ligada al gradiente electroquímico del ión. En neuronas inmaduras el potencial de reversión del ión cloruro es mayor que el potencial de reposo, por lo tanto la unión del ligando provoca la apertura del canal permitiendo la salida del ión cloruro con la consiguiente despolarización neuronal (Ben-Ari, 2002; Owens y Kriegstein, 2002). Para el caso particular de la regulación del crecimiento neurítico, la despolarización causada por GABA produce la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje provocando un aumento intracelular del ión. Calcio actúa como segundo mensajero mediando la activación de diferentes quinasas, las cuales fosforilando sustratos específicos actúan a nivel nuclear y citoplasmático para producir sus efectos sobre el crecimiento de axones y dendritas (Fizman y Schousboe, 2004; Sernagor y col., 2010).

Nuestros resultados indican que el tratamiento con muscimol 100 μ M durante 48hs provocó una reducción significativa de la longitud de los axones de neuronas hipotalámicas tanto macho como hembra (figura 15. A). Mientras que el bloqueo de las corrientes GABAérgicas con bicuculina 100 μ M no afectó la longitud de los axones en ambos sexos. No existen en la literatura muchas evidencias que demuestren efectos directos del sistema GABAérgico en la regulación del crecimiento de axones. Chattopadhyaya y colaboradores demostraron que GABA, a través de receptores GABA_A y en menor medida GABA_B, promueve la ramificación de axones de interneuronas corticales tanto *in vitro* como *in vivo* (Chattopadhyaya y col., 2007). Se ha observado también que GABA promueve específicamente el crecimiento y la ramificación del axón, no de otras neuritas, en neuronas granulares de cultivos organotípicos de hipocampo. Este estudio demuestra que dicho efecto es mediado por receptores GABA_A, y dependiente de calcio a través de CCDV tipo-L. La despolarización causada por GABA produce transitorios de calcio no sólo en el soma neuronal sino también en el cono de crecimiento del axón de estas neuronas (Lee y col., 2012). La ubicación de los receptores GABA_A no se restringe a la membrana post-sináptica de la sinapsis, sino que están

presentes en regiones extrasinápticas en dendritas, axones y somas de neuronas de distintas estructuras cerebrales (Kullmann y col., 2005; Scotti y Reuter, 2001; Trigo y col., 2008). Es más, los conos de crecimiento de neuronas hipotalámicas (Obrietan y van den Pol, 1996) y espinales (Bouzigues y col., 2007) poseen receptores GABA_A que pueden detectar gradientes de GABA. Se demostró la existencia de un bucle de retroalimentación positiva donde el gradiente de GABA produce una distribución asimétrica de la señal de calcio provocando una elongación asimétrica de los microtúbulos. Esto promueve la redistribución de los receptores GABA_A lo que aumenta la asimetría de la respuesta de calcio y del citoesqueleto orientando el crecimiento en favor del gradiente (Bouzigues y col., 2007). Además, Ageta-Ishihara y colaboradores, en un sistema de neuronas corticales *in vitro*, demostraron que la activación de los receptores GABA_A provoca la elongación de axones, mientras que el tratamiento con bicuculina disminuye la longitud de los mismos (Ageta-Ishihara y col., 2009). En otra línea de evidencia, experimentos *in vivo* en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), demostraron que las acciones tróficas de GABA sobre el crecimiento axonal son dependientes de la despolarización neuronal. La alteración del gradiente de Cl⁻ mediante la sobreexpresión del co-transportador KCC2, desde el comienzo del desarrollo del embrión produjo una reducción de la maduración y elaboración de las redes y tractos axonales (Reynolds y col., 2008). De todos estos trabajos se desprende que la activación de los receptores GABA_A puede promover la elongación y complejización del axón. Nuestros resultados parecen contradecir estos hallazgos, ya que la longitud axonal de neuronas hipotalámicas de ambos sexos es menor cuando se activan dichos receptores y la ramificación del axón no se ve afectada por el tratamiento con el agonista. Sin embargo, existen evidencias en la literatura que indican que la adición de un agonista de receptores $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$ al medio de cultivo de neuronas hipocámpales provoca la reducción de la longitud y de la cantidad de axones, mientras que un agonista selectivo de receptores $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$ no tuvo efecto sobre los axones en las mismas neuronas (Giusi y col., 2009). Teniendo en cuenta estos datos, sabiendo que los receptores GABA_A pueden tener una ubicación axonal y que nuestros cultivos presentan un amplio repertorio de subunidades podemos conjeturar algunas hipótesis. La reducción de la longitud axonal por activación de los receptores GABA_A observada en neuronas hipotalámicas *in vitro* puede estar mediada por receptores con una composición particular de subunidades. Sin embargo, la utilización de muscimol en nuestro estudio no permite discernir la contribución de distintas subpoblaciones de receptores al efecto. Queda así por determinar cuál es la/s combinación/es de subunidades del receptor GABA_A que podrían tener una localización preponderante en los axones de las neuronas hipotalámicas y mediar sus efectos en la reducción de la longitud axonal.

Nuestros resultados también indican que el tratamiento con muscimol 100 μ M provocó un aumento significativo de la longitud media de los procesos menores de neuronas hipotalámicas de macho y hembra (figura 15. B). Llamativamente, lo hizo respecto a aquellos cultivos tratados con bicuculina y no respecto a los controles. Al parecer el bloqueo de receptores GABA_A provoca una leve reducción de la longitud media de los procesos menores respecto a los controles que no alcanza a ser estadísticamente significativa. Sin embargo, el agregado de muscimol al medio de cultivo produce un aumento de la longitud de los procesos menores suficiente para evidenciar una diferencia estadística respecto a los cultivos tratados con bicuculina. Los mecanismos por los cuales se ejercen estos efectos no están del todo claros aún, sin embargo la despolarización del PMR y la entrada de calcio al citoplasma celular serían eventos esenciales para explicar estos resultados. La manipulación de diferentes componentes del sistema GABAérgico demostró la importancia del mismo en la regulación del crecimiento de procesos menores, dendritas y ramificación de las mismas en varios sistemas y condiciones (Sernagor y col., 2010). Por ejemplo, en cultivos de neuronas de hipocampo el agregado de muscimol 100 μ M al medio de cultivo promueve el crecimiento y el número de dendritas primarias en neuronas inhibitorias. Estas acciones son dependientes de la despolarización causada por activación de los receptores GABA_A en células inmaduras, ya que el agregado de muscimol a cultivos de 15 DIV produjo la reducción del crecimiento dendrítico. Este estudio propone que los efectos dendritogénicos de GABA podrían estar mediados por la neurotrofina BDNF actuando de manera parácrina para estimular el crecimiento (Marty y col., 1996). Otros autores utilizando el mismo sistema (cultivos de neuronas hipocámpales de 7DIV) han demostrado que cuando se agrega al medio un agonista inverso con preferencia por receptores con la subunidad α 5 (RY-080) se produce la disminución de las ramificaciones y la longitud de las dendritas, a la vez que disminuye la producción de BDNF (Giusi y col., 2009). Estudios en otro sistema, han demostrado que la diferenciación de interneuronas corticales es altamente dependiente de cada uno de los componentes del sistema GABAérgico; particularmente el bloqueo de receptores GABA_A, CCDV tipo-L o el gradiente de Cl⁻ producen una marcada reducción de la longitud de las neuritas (Maric y col., 2001). Otros estudios han demostrado que en interneuronas de bulbo olfatorio *in vitro*, el agregado de GABA 100 μ M provoca el aumento de la cantidad y el largo total de dendritas, mientras que el agregado de bicuculina los reduce. Se propone que GABA regula la dinámica de microtúbulos, estabilizando los lamelipodios. Se comprueba además, que en estas neuronas GABA ejerce la despolarización y entrada de calcio a través de CCDV tipo-L (Gascon y col., 2006). Experimentos realizados *in vivo* muestran que la despolarización mediada por GABA es esencial para la maduración morfológica de neuronas corticales, sin afectar su

migración. La sobreexpresión del co-transportador KCC2, que convierte las acciones de GABA de despolarizantes a inhibitorias, provocó una reducción del largo de las dendritas y de su ramificación (Cancedda y col., 2007). Estos ejemplos comprueban que la despolarización mediada por GABA es necesaria para los efectos sobre la regulación del crecimiento de las dendritas. Notablemente, los efectos de la activación de receptores GABA_A se presentan exclusivamente en subpoblaciones neuronales particulares tales como interneuronas de varias regiones cerebrales o neuronas que expresan específicamente la subunidad $\alpha 5$ del receptor, resaltando la importancia de la fenotipificación neuronal para la evaluación de los mismos. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis apoyan las evidencias de la literatura, demostrando efectos dendritogénicos de GABA sobre neuronas hipotalámicas *in vitro*.

Según nuestros experimentos de electrofisiología, la activación de receptores GABA_A produce la despolarización neuronal. Dicha despolarización provocaría la apertura de CCDV y la consiguiente entrada de calcio al interior celular. Cabe destacar que este mecanismo ha sido comprobado en neuronas hipotalámicas inmaduras *in vitro* hace varios años atrás (Chen y col., 1996; Obrietan y van den Pol, 1995). Como hemos expuesto, muchos trabajos han comprobado la participación de calcio y la activación de las vías de señalización cascada abajo en los efectos sobre el crecimiento de axones y dendritas mediados por receptores GABA_A. Los resultados sobre la participación de los distintos componentes intracelulares de señalización sobre el crecimiento de los procesos neuronales en nuestro sistema experimental serán discutidos en las siguientes secciones.

Hasta aquí podemos decir que la activación de los receptores GABA_A produce efectos antagónicos en axones y procesos menores de neuronas hipotalámicas macho y hembra. El agregado de muscimol al medio de cultivo provoca la reducción de la longitud axonal, mientras que aumenta la longitud de procesos menores. Los mecanismos por los cuales muscimol ejerce estas acciones contrarias en ambos procesos no están del todo claros. No podemos olvidar que el crecimiento de alguno de los procesos en desmedro de otros, ocurre en un contexto de competencia por una cantidad limitada de recursos y señales intra y extracelulares para hacerlo (Hjorth y col., 2014; Hutchins, 2010; Van Ooyen, 2005; Shelly y col., 2010, 2011; Singh y Miller, 2005). En nuestro modelo, el reclutamiento de recursos para aumentar la longitud de los procesos menores, puede producir que menos recursos celulares queden disponibles para el crecimiento del axón, brindando así una posible explicación para los efectos antagónicos de la activación de los receptores GABA_A sobre los procesos neuronales.

La activación crónica de receptores GABA_A parece regular exclusivamente el crecimiento de los procesos neuronales de neuronas hipotalámicas macho y hembra, ya que ninguno de los otros parámetros morfológicos estudiados fue afectado por el

tratamiento con muscimol (tabla 2). Tampoco parece afectar la diferenciación de estas neuronas, ya que la proporción de células en estadio II (sólo procesos menores) y estadio III (con axón definido) no se vio alterada por el tratamiento con el agonista.

Particularmente intrigante es el hecho que el bloqueo de los receptores GABA_A por medio de su antagonista específico, bicuculina, no produjo efectos sobre ninguno de los parámetros morfológicos estudiados. Esto sugiere que los niveles basales de activación de dichos receptores no son necesarios para el normal desarrollo y diferenciación de las neuronas hipotalámicas. Sin embargo debe tenerse en cuenta que los presentes experimentos se llevaron a cabo en cultivos de muy baja densidad (20.000 células/cm²) para evitar los contactos entre los procesos neuronales y permitir su clara identificación y medición. En estas condiciones, probablemente la concentración ambiental de GABA sea despreciable, por lo que el bloqueo de los receptores GABA_A no producen ningún efecto relevante a diferencia de la activación mediada por muscimol.

Nuestros resultados cobran una gran relevancia al demostrar por primera vez que GABA, a través de sus receptores GABA_A puede regular el crecimiento neurítico de neuronas hipotalámicas de macho y hembra *in vitro*. Esta evidencia apoya los resultados obtenidos en una gran variedad de sistemas (Sernagor y col., 2010), remarcando la importancia de GABA sobre la regulación del crecimiento de procesos neuronales de neuronas inmaduras.

Calcio actúa como mensajero intracelular mediando el efecto de la activación de los receptores GABA_A sobre el crecimiento de axones y procesos menores de neuronas hipotalámicas

La reducción de la longitud axonal producida por la activación crónica de los receptores GABA_A fue totalmente contrarrestada por la inhibición farmacológica de CCDV tipo-L, mediante el agregado de nifedipina al medio de cultivo de neuronas hipotalámicas de macho y hembra (figura 18 A). Esto demuestra que el ingreso de calcio al interior neuronal a través de CCDV tipo-L es necesario para mediar los efectos de muscimol sobre el crecimiento axonal. Obrietan y van den Pol han demostrado que el ingreso de calcio disparado por activación de receptores GABA_A es mediado por CCDV tipo-L en neuronas hipotalámicas de embriones de rata *in vitro* (Obrietan y van den Pol, 1995). El crecimiento axonal ocurre dentro de niveles óptimos de calcio intracelular, sin embargo decrece o se detiene cuando calcio está por encima o debajo de dichos niveles, o si el aumento de los mismos es sostenido en el tiempo (Gomez y Zheng, 2006). Es más, se ha propuesto que el crecimiento del axón es inversamente proporcional a la amplitud y

frecuencia de los transitorios de calcio totales de neuronas corticales. Este estudio indica que transitorios de calcio de alta frecuencia y amplitud se presentan en conos de crecimiento expandidos que van a dar origen a una ramificación, mientras que transitorios de baja frecuencia y amplitud son característicos de conos de crecimiento en avance y elongación del axón. En concordancia con nuestros resultados, el bloqueo de CCDV tipo-L provoca un aumento de la longitud axonal (Tang y col., 2003). El crecimiento del axón o de sus ramificaciones depende de la frecuencia de transitorios de calcio, pero también de su localización específica en el axón o en toda la célula. A diferencia del estudio de Tang y colaboradores donde se analizaban los transitorios totales de la neurona, Hutchins y Kalil demostraron que transitorios de calcio de alta frecuencia estrictamente localizados en las ramificaciones o en porciones discretas del axón principal provocan un crecimiento del proceso, mientras que transitorios de baja frecuencia provocan la detención del crecimiento o incluso la retracción del axón o de las ramificaciones. Así, el crecimiento de un proceso en particular se hace en detrimento del crecimiento de otros, quizás por la competencia por recursos limitados. Una vez más se demostró la participación de CCDV tipo-L en dicho efecto, ya que al activarlos farmacológicamente se redujo el crecimiento axonal (Hutchins y Kalil, 2008). Estos estudios demuestran que el crecimiento axonal es estrictamente regulado por un fino mecanismo que involucra transitorios de calcio con una ubicación espacio temporal específica. Algunos trabajos demuestran que CCDV tipo-L tienen ubicación axonal (Sargoy y col., 2014; Tippens y col., 2008). Puede que los CCDV tipo-L posean esta distribución subcelular en neuronas hipotalámicas y, al activarse en respuesta a la despolarización mediada por muscimol, provocar el ingreso y elevación de los niveles de calcio en el axón produciendo la disminución del crecimiento. No obstante, así tengan los CCDV tipo-L una ubicación axonal o no, la activación crónica de los receptores $GABA_A$ en nuestro sistema experimental, puede promover una entrada sostenida de calcio (en lugar de transitoria) y elevar los niveles del ión a concentraciones no óptimas para promover el crecimiento del axón y su ramificación. En concordancia con este razonamiento, la despolarización crónica de neuronas sensitivas de ganglio de la raíz dorsal provoca la reducción de la longitud axonal. Este efecto es mediado por el ingreso masivo de calcio a través de CCDV tipo-L. En este estudio se demuestra que la regeneración axonal, es inversamente proporcional a la actividad de CCDV tipo-L (Enes y col., 2010). En base a estas evidencias, podemos hipotetizar que en nuestro sistema experimental la entrada sostenida de calcio a través de CCDV tipo-L en respuesta a la despolarización causada por la activación de los receptores $GABA_A$ es la responsable de la reducción de la longitud axonal. Experimentos en los que el régimen de estimulación con muscimol no sea crónico sino agudo u otros, en los que se utilicen dosis menores del

agonista en combinación con técnicas de medición de niveles de calcio mediante sondas fluorescentes ayudarían a esclarecer este mecanismo.

El bloqueo de CCDV tipo-L afectó drásticamente el crecimiento de los procesos menores de neuronas hipotalámicas *in vitro* (figura 17). Tanto en cultivos macho como hembra, el agregado de nifedipina 2 μM provocó una disminución de la longitud media de los procesos menores, efecto que se mantiene en presencia de muscimol 100 μM (figura 18 B). Estos resultados demuestran que el ingreso de calcio a través de dichos canales participa en la regulación del crecimiento de las neuritas. Existe una amplia cantidad de evidencias en la literatura acerca de la participación de calcio en el crecimiento dendrítico de neuronas en distintos sistemas. Tapia y colaboradores demostraron que el crecimiento neurítico de neuronas espinales en cultivo aumenta cuando se bloquean las corrientes glicinérgicas. Sin embargo, este efecto es dependiente de la activación de CCDV tipo-L a través de receptores GABA_A . Si bien ambos neurotransmisores ejercen despolarización neuronal e ingreso de calcio en estas neuronas, la estimulación glicinérgica fija los niveles de calcio en un nivel subóptimo (comparada con GABA) para estimular el crecimiento neurítico (Tapia y col., 2001). Estos resultados demuestran la importancia de niveles adecuados de calcio para promover efectos dendritogénicos. Por su parte, GABA promueve el crecimiento neurítico de neuronas granulares de cerebelo a través de la activación de CCDV tipo-L. En su estudio, Borodinsky y colaboradores analizan la dimensión fractal como un índice de complejización del árbol dendrítico. Sus resultados demuestran que el agregado de nifedipina al medio de cultivo, bloquea completamente el aumento de la dimensión fractal producido por GABA (Borodinsky y col., 2003). Calcio es un actor clave en la señalización para inducir el crecimiento dendrítico. Los efectos neuritogénicos de GABA en neuronas corticales pueden ser simulados con la despolarización neuronal por KCl y la consiguiente entrada de Ca^{2+} a través de CCDV tipo-L (Maric y col., 2001). Nuestros resultados concuerdan con la literatura específica, demostrando la importancia de la señal de calcio para mediar los efectos tróficos de GABA sobre las neuritas de neuronas hipotalámicas de macho y hembra. La evidencia acumulada por otros grupos, apunta a que los efectos de la activación de los receptores GABA_A sobre el crecimiento de los procesos neuronales son mediados por las vías de CAMK y MAPK. La participación de dichas vías en los efectos de muscimol sobre el crecimiento de las neuritas en nuestro sistema es discutido en la siguiente sección.

CAMKII y ERK1/2 participan parcialmente en la reducción de la longitud axonal mediada por activación de los receptores GABA_A de neuronas hipotalámicas

Se ha propuesto que CAMKII y ERK1/2 son las quinasas responsables de mediar los efectos tróficos de la activación de receptores GABA_A sobre el crecimiento de procesos neuronales en neuronas en desarrollo (Fizman y Schousboe, 2004). Un requisito indispensable para que estas quinasas se tornen activas es su fosforilación. El tratamiento de los cultivos hipotalámicos separados según el sexo, con distintas dosis de muscimol y a distintos tiempos provocó el aumento de los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2 (figuras 16). Esto demuestra que la activación de los receptores GABA_A promueve la fosforilación de ERK1/2 en neuronas hipotalámicas *in vitro*. Si la activación de receptores GABA_A por muscimol es capaz de activar dicha quinasa, es probable que ésta participe en las vías de señalización intracelulares involucradas en los efectos del agonista GABAérgico sobre la longitud axonal. Nuestros resultados muestran que el bloqueo farmacológico de la activación de ERK1/2 mediante el agregado UO126 10 μ M y 25 μ M o el bloqueo de CAMKII con KN-62 5 μ M es incapaz de revertir completamente la disminución de la longitud de los axones causada por el tratamiento con muscimol. Si bien la longitud axonal de neuronas tratadas con UO126 y KN-62 (UO126 10 μ M macho: $251,06 \pm 15,58$ y hembra: $257,72 \pm 4,99$; 25 μ M macho: $248,76 \pm 2,69$ y hembra: $266,92 \pm 14,66$; KN-62 5 μ M macho: $229,47 \pm 10,69$ y hembra: $218,56 \pm 3,0$) es menor que los controles (macho: $295,45 \pm 21,8$ y hembra: $276,79 \pm 45,51$), es al mismo tiempo mayor que los valores de longitud axonal obtenidos con el tratamiento con muscimol (machos: $205,79 \pm 7,81$ y hembras $214,47 \pm 6,49$). Estos resultados sugieren que no solo ERK1/2 estaría mediando el efecto inhibitorio de muscimol sobre el crecimiento del axón, ya que otras quinasas como CAMKII y / u otras serían necesarias para producir la reducción de la longitud axonal. Sería interesante comprobar la hipótesis mediante el bloqueo simultáneo de ambas quinasas y averiguar si esto logra revertir completamente el efecto de la estimulación de los receptores GABA_A sobre el largo del axón en nuestro sistema. Contrariamente a lo observado en nuestro estudio, la convergencia de la activación de estas vías ha demostrado promover el crecimiento y ramificación axonal de neuronas simpáticas *in vitro*. La activación de ERK1/2, necesaria para el crecimiento del axón en estas neuronas, depende de activación de MEK en respuesta a la estimulación tanto con el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) como de la activación de CAMKII-MEK en respuesta a la despolarización localizada (Singh y Miller, 2005). Tang y Kalil, en concordancia con el trabajo anterior, demostraron que transitorios de calcio de alta frecuencia a través de CCDV tipo-L provocan la activación de α CAMKII y MEK para producir el crecimiento y ramificación del axón de neuronas corticales. Sin

embargo, las vías se activan independientemente y el rol de cada quinasa sobre estos procesos es diferente. La α CAMKII promueve el crecimiento y ramificación del axón, mientras que MEK lo hace solamente sobre la ramificación axonal (Tang y Kalil, 2005). Otros trabajos postulan que no es CAMKII, sino otros miembros de la familia de las CAMK los que regulan el crecimiento y ramificación axonal. Particularmente, la activación de CAMKK y su quinasa blanco cascada abajo CAMKI aumenta el crecimiento del axón, el tamaño y movilidad de los conos de crecimiento de axones de neuronas hipocámpales y corticales *in vitro* (Wayman y col., 2004). También se comprobó que la activación de ERK1/2 es necesaria para el crecimiento neurítico en células NG108 de neuroblastoma en respuesta a la despolarización del PMR. En este estudio, se demuestra que el crecimiento neurítico evocado por calcio es mediado por CAMKK y CAMKI actuando a través de la activación de MEK y ERK (Schmitt y col., 2004). En otro estudio se demostró la participación de ERK1/2, a través de la activación de la proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos (MAPKKK), en la regeneración axonal después de una injuria en motoneuronas GABAérgicas de *C. elegans in vivo* (Hammarlund y col., 2009). Por su parte, Ageta-Ishihara y colaboradores comprobaron que CAMKK a través de CAMKI α promueve el crecimiento exclusivamente del axón en respuesta a la activación de receptores GABA $_A$ en neuronas corticales *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario la activación de CAMKI γ / CL3, otra quinasa cascada abajo de CAMKK, promueve exclusivamente el crecimiento de dendritas. Este trabajo resalta la especificidad de distintos miembros de la misma familia de CAMK en la regulación del crecimiento de ambos procesos neuríticos (Ageta-Ishihara y col., 2009). Hemos expuesto anteriormente la estrecha dependencia entre los niveles y frecuencias de los transitorios de calcio en la activación de quinasas intracelulares que participan en la regulación del crecimiento de axones (Dudek y Fields, 2001; Parekh, 2011; Smedler y Uhlén, 2014; Tomida y col., 2003). Podemos considerar entonces que el régimen de estimulación impuesto en nuestro sistema, activación crónica de receptores GABA $_A$ y la consiguiente entrada sostenida de calcio, puede no ser óptimo para promover la fosforilación de quinasas que aumentan la longitud del axón y activar en cambio aquellas que la reducen. Quizás en estas condiciones las mismas quinasas sobreactivadas, CAMKII y MEK, producen la reducción de la longitud de los axones, mientras que en otras condiciones con un nivel óptimo de activación promuevan el crecimiento axonal. Además, en base a lo expuesto, la participación de una u otra vía de señalización para mediar estos efectos parece depender tanto del tipo celular estudiado como del tipo de estimulación. El tratamiento con dosis bajas de muscimol (1 μ M) (Ageta-Ishihara y col., 2009) o concentraciones fisiológicas de GABA (Chattopadhyaya y col., 2007; Lee y col., 2012) promueven el crecimiento del axón. En nuestro estudio se utilizó una dosis alta de muscimol (100 μ M), y

aunque una dosis equimolar de GABA demostró aumentar la dimensión fractal (medida del largo y ramificación de los procesos neuríticos) de neuronas corticales (Borodinsky y col., 2003) quizás en neuronas de hipotálamo dicha concentración de muscimol no sea óptima para promover la activación de quinasas para el crecimiento axonal. Diferentes frecuencias y patrones de transitorios de calcio pueden activar diferentes fosfatasa o quinasas en el citoplasma para producir distintas respuestas celulares (Dudek y Fields, 2001; Tomida y col., 2003), y eventos celulares específicos pueden ser regulados por transitorios de calcio de frecuencias óptimas (Eshete y Fields, 2001). Es probable que la magnitud de la señalización mediada por calcio en nuestros cultivos produzca la activación diferencial de fosfatasa, para producir sus efectos sobre el crecimiento axonal. En concordancia con esta hipótesis, se demostró que altos niveles de calcio localizados en el cono de crecimiento de axones de neuronas espinales, provocan la activación de CAMKII orientando el crecimiento del mismo en favor de la señal de calcio. Por el contrario, la estimulación con bajos niveles localizados de calcio provocan la activación de calcineurina y fosfatasa-1 para mediar la detención del crecimiento (Wen y col., 2004). Rohem y col (2008) han demostrado que la despolarización de neuronas ganglionares espirales *in vitro* produce la reducción de la longitud de las neuritas en un proceso que implica la entrada de calcio a través de diferentes tipos de CCDV. Llamativamente, si bien se produce la activación de CAMKII, ésta no participa en la inhibición del crecimiento neurítico por despolarización en estas neuronas. Este estudio demuestra que la activación de una fosfatasa sensible a calcio, calpaína y no calcineurina, es la responsable de mediar la reducción de la longitud de las neuritas, ya que su bloqueo farmacológico produjo el aumento del crecimiento de los procesos (Roehm y col., 2008). Similarmente a estos estudios, en nuestro sistema experimental algunas fosfatasa sensibles a calcio podrían estar jugando un rol importante en la reducción de la longitud axonal. Sin embargo, en base a las evidencias obtenidas en el presente trabajo, podemos sostener que CAMKII y ERK1/2 participan parcial e independientemente en la reducción del crecimiento axonal de neuronas hipotalámicas *in vitro*. Nuevos experimentos bloqueando ambas quinasas simultáneamente podrían aportar evidencia en favor de esta hipótesis. Sin embargo como hemos expuesto, no podemos descartar la regulación de dicho proceso por otras quinasas e incluso por fosfatasa sensibles a calcio.

La inhibición farmacológica de la activación de CAMKII y ERK1/2 no afectó el crecimiento de los procesos menores de neuronas hipotalámicas de ambos sexos (tabla 3). Este resultado sugiere que dichas quinasas no regulan el crecimiento de los procesos menores en este sistema. Por el contrario, Borodinsky y colaboradores demostraron que los efectos neuritogénicos de GABA en neuronas cerebelares inmaduras estaban

mediados por calcio, CAMKII y ERK1/2. El bloqueo farmacológico de cualquiera de estas vías eliminó por completo el aumento en la dimensión fractal producido por el tratamiento con GABA 100 μ M (Borodinsky y col., 2003). En neuronas hipocampales *in vitro*, CAMKII β promueve la ramificación de dendritas, la extensión y movilidad de filopodios a través de su unión a actina polimerizada. Este efecto es producido por una localización enriquecida de la quinasa en los procesos en crecimiento (Fink y col., 2003). En otro estudio se demostró que CAMKII a través del factor de transcripción Neuro-D promueve el crecimiento de dendritas en neuronas granulares de cerebelo en cultivos organotípicos (Gaudillière y col., 2004). Vaillant y colaboradores demostraron que la actividad neuronal produce la formación de dendritas en neuronas simpáticas. Dicho efecto es mediado por CAMKII y ERK1/2 a través de la fosforilación de la proteína MAP2 a nivel del sitio de unión a microtúbulos (Vaillant y col., 2002). Todos estos trabajos apuntan a que dichas quinasas son responsables del crecimiento dendrítico, sin embargo nuevas evidencias sugieren que otras calcio calmodulina quinasas podrían estar participando en este efecto (Wayman y col., 2008). En particular, el crecimiento dendrítico inducido por calcio a través de CCDV tipo-L es mediado por la activación de CAMKIV, MAPK y CREB en neuronas corticales. Por el contrario CAMKII, produce una marcada reducción del crecimiento dendrítico en este sistema (Redmond y col., 2002). En neuronas hipocampales CAMKI γ - una calmodulina quinasa que se encuentra anclada a dominios raft de la membrana dendrítica - produce el crecimiento de las dendritas en respuesta a calcio. Es más, los efectos dendritogénicos de BDNF son completamente eliminados si se bloquea la actividad de CAMKI γ (Takemoto-Kimura y col., 2007). Esta quinasa actúa exclusivamente sobre el crecimiento de dendritas mientras que otro miembro de la familia, CAMKI α de localización citoplásmica, regula exclusivamente el crecimiento axonal (Ageta-Ishihara y col., 2009). Estas evidencias nos llevan a proponer que quizás otras vías de señalización que involucran quinasas distintas a CAMKII y ERK1/2, podrían regular el crecimiento dendrítico en nuestro sistema. El bloqueo farmacológico de otras quinasas y experimentos de silenciamiento y sobreexpresión de las mismas ayudarían a comprobar dicha hipótesis. Sin embargo no podemos descartar que alguna neurotrofina, como BDNF pueda estar mediando los efectos de los receptores GABA_A sobre la regulación del crecimiento de los procesos menores de neuronas hipotalámicas. Se propone que muchos de los efectos dendritogénicos de calcio son producidos a través de la regulación de la producción y liberación de algunas neurotrofinas como BDNF y Wnt (Konur y Ghosh, 2005). La ramificación y crecimiento dendrítico en respuesta a calcio de neuronas hipocampales disociadas o en cultivos organotípicos es mediada por CAMKI γ . Los efectores cascada abajo son Ras / MEK / ERK y el factor de transcripción CREB. La actividad neuronal aumenta la transcripción de Wnt-2 dependiente de CREB promoviendo

el crecimiento de las dendritas en este sistema (Wayman y col., 2006). Por su parte, Marty y colaboradores habían demostrado en 1996 que interneuronas hipocampales pueden regular su propio crecimiento regulando la producción y liberación de BDNF de neuronas adyacentes. Este efecto es mediado a través de la activación de los receptores GABA_A de dichas neuronas (Marty y col., 1996). Ya hemos mencionado que el agregado de RY-080, un agonista inverso de receptores GABA_A que tienen la subunidad $\alpha 2$ en su conformación, provoca una reducción tanto de la longitud como de la cantidad de dendritas en neuronas hipocampales inmaduras. Sorprendentemente, el fármaco también produce la disminución de la liberación de BDNF en estos cultivos (Giusi y col., 2009). Es posible entonces que los efectos dendritogénicos de calcio en nuestro sistema, sean mediados por la liberación de BDNF. El bloqueo de CCDV tipo-L en neuronas hipotalámicas redujo la longitud de procesos menores en ambos sexos, quizás mediante la inhibición de la producción y/o liberación de BDNF. De hecho, se ha demostrado que neuronas hipotalámicas inmaduras poseen un circuito de retroalimentación positiva en donde la activación de receptores GABA_A promueve la producción y liberación de BDNF y este último aumenta las corrientes postsinápticas GABAérgicas. Este efecto es mediado a través de la activación de la vía de MAPK y requiere la fosforilación del factor de transcripción CREB (Obrietan y col., 2002). Este mismo bucle de retroalimentación positiva fue descrito también en neuronas corticales, aunque la vía de las MAPKs no estaría involucrada (Porcher y col., 2011). Estas evidencias hacen plausible nuestra hipótesis, aunque por supuesto debe ser sometida a prueba experimentalmente.

¿Y las diferencias sexuales qué?

A pesar de las muchas diferencias sexuales reportadas a lo largo de los años (no sólo a nivel de individuos si no también a nivel celular) la gran mayoría de los estudios se llevan a cabo sólo en machos o no se especifica el sexo de los individuos / células con los que se trabaja. Los especialistas en el área han reclamado una respuesta a este problema a la comunidad científica, la cual tiene el poder y la responsabilidad de dar (Arnold, 2010; Pollitzer, 2013; Schiebinger, 2014). Sin ir más lejos, mucha de la bibliografía consultada para discutir nuestros resultados sobre la fisiología, señalización intracelular, expresión de subunidades y regulación del crecimiento neurítico por receptores GABA_A no incluye la variable sexo en el diseño de sus experimentos. El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la existencia de diferencias sexuales en la fisiología, crecimiento y señalización intracelular mediada por receptores GABA_A en neuronas hipotalámicas *in vitro*. La importancia de nuestro trabajo radica en la exhaustiva

caracterización de estos parámetros en neuronas macho y hembra, aportando evidencia original al respecto. A pesar de haber realizado una gran cantidad de experimentos buscando tales diferencias, machos y hembras difieren sólo en la eficacia con la que propofol potencia las corrientes GABAérgicas. Resulta intrigante el hecho de que no se hayan observado diferencias sexuales en la regulación del crecimiento de axones y procesos menores. Particularmente, Mintz y colaboradores (2013) han demostrado que ciertos anestésicos que actúan sobre receptores GABA_A, como isoflurano y propofol, provocan alteraciones en la guía axonal y morfología de conos de crecimiento de neuronas corticales *in vitro* (Mintz y col., 2013). Por el contrario, propofol causa la disminución de espinas dendríticas en neuronas corticales *in vivo* sin afectar la disposición tridimensional, la longitud o la ramificación de las dendritas (Briner y col., 2011). El hecho de que propofol potencie en mayor medida las corrientes de cultivos de embriones hembra sugiere que la composición de subunidades de los receptores GABA_A es diferente en cada sexo. Si bien en el presente trabajo no hemos analizado el efecto del anestésico sobre el crecimiento de axones y procesos menores, las diferencias en la composición de subunidades puestas de manifiesto mediante los experimentos de electrofisiología nos llevaron a hipotetizar que éstas podrían ejercer efectos diferenciales en el crecimiento de las neuritas entre machos y hembras. Sin embargo, la activación crónica de receptores GABA_A no afecta de manera sexo específica el crecimiento de los procesos neuronales. Una característica sobresaliente de nuestros resultados, ya sea a nivel fisiológico o morfológico, es la enorme variabilidad que presentaron los distintos parámetros evaluados en las neuronas hipotalámicas. Esta variabilidad nos llevó a considerar que nuestros cultivos están formados por varios subtipos neuronales definidos. El tejido neural utilizado en este estudio corresponde al HVM de embriones de E16. Las neuronas que forman parte del HVM son generadas entre E13 y E17 en ratas, en una línea celular por debajo de la zona generatriz de las células de los núcleos supraóptico y paraventricular del epitelio ventricular. Las células destinadas a cada núcleo dejan su lugar un día después de ser generadas y migran durante el día siguiente. Las neuronas más maduras forman la punta de dos corrientes migratorias y se establecen primero, mientras que las más jóvenes lo hacen más tarde y cercanas al ventrículo. Las más viejas se establecen alrededor de E16 y las más jóvenes a E19 a más tardar. Durante la diferenciación neuronal posterior hay una muy pequeña redistribución de los somas neuronales (Altman y Bayer, 1978a, 1978b). El núcleo ventromediano (NVM) primordial, una estructura de gran tamaño en el HVM embrionario expresa distintos marcadores neuronales aún antes de aparecer como un núcleo definido mediante la tinción de Nissl (McClellan y col., 2006). Como se muestra en la figura 19, el NVM puede ser subdividido en varias regiones basándose en la expresión de varios

factores. Este esquema demuestra la heterogeneidad del núcleo durante el desarrollo y cómo algunos factores se relacionan por una superposición en su expresión. Existen subpoblaciones específicas dentro del núcleo para varios factores de transcripción, neuropéptidos y receptores de membrana. Llamativamente, el patrón de expresión de distintos componentes del sistema de señalización GABAérgico presenta características distintivas. A partir de E13, el NVM posee neuronas que expresan distintas subunidades de los receptores GABA_A y GABA_B, por el contrario las enzimas GAD65 / 67 se expresan fuertemente sólo en neuronas y fibras en la periferia del núcleo. Este patrón característico de distribución espacial sugiere que GABA podría actuar como una señal de delimitación de dicho núcleo (McClellan y col., 2006).

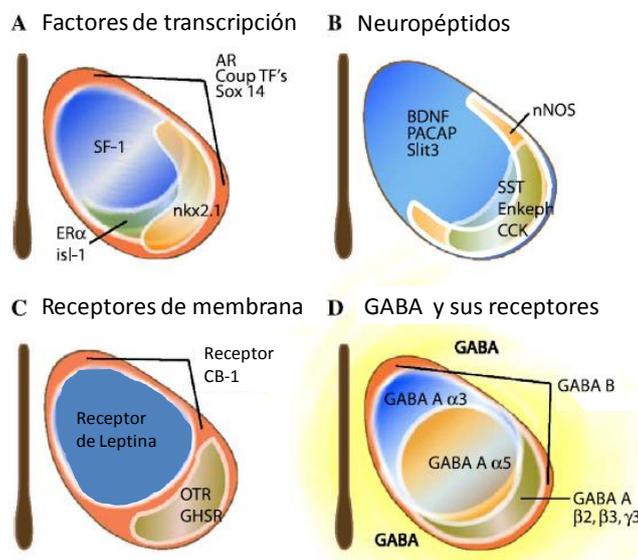


Figura 19. Esquema que muestra subpoblaciones específicas dentro del núcleo ventromediano (NVM) para varios factores de transcripción, neuropéptidos, receptores de membrana y componentes del sistema GABAérgico. Abreviaturas: AR, receptor de andrógenos; Coup TF, factores de transcripción Coup 1 y 2; Sox14, factor de transcripción Sox14; SF-1, factor esteroideogénico 1; ERα, receptor de estrógeno α; islet-1, factor de transcripción islet-1; nkx2.1, factor de transcripción nkx2.1; BDNF, factor de crecimiento derivado de cerebro; PACAP, polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria; slit3; neuropéptido slit3; nNOS, óxido nítrico sintetasa neuronal; SST, somatostatina; Enkeph, encefalina; CCK, colecistoquinina; CB-1, receptor de cannabinoides tipo 1; OTR, receptor de oxitocina; GHSR, receptor secretagogo de hormona de crecimiento (Adaptado de McClellan y col. 2006)

De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con bicuculina aumenta el número de células migrando al NVM en cultivos organotípicos de embriones de E15. Tanto el agregado de bicuculina como de muscimol al medio de cultivo alteró la orientación de la migración celular en este sistema, demostrando la relevancia de los receptores GABA_A en la formación del núcleo. Es más, la localización de las fibras y neuronas GABAérgicas y

la posición de neuronas inmunopositivas para el receptor de estrógeno α en el HVM están alteradas en el ratón KO para la subunidad $\beta 3$ del receptor $GABA_A$ (Dellovade y col., 2001). Estas características sugieren que el tejido obtenido para los cultivos neuronales de este trabajo de tesis posee neuronas que se encontraban migrando al momento de la disección, neuronas establecidas en la región que daría origen al NVM y neuronas $GABA_A$ que rodean al núcleo. Maric y colaboradores demostraron que el patrón de expresión de subunidades del receptor $GABA_A$ varía drásticamente a medida que las neuronas migran a través de la corteza hasta establecerse en su lugar definitivo. Es más, experimentos *in vitro* mostraron que el bloqueo de la actividad $GABA_A$ mediante el agregado de bicuculina al medio de cultivo disminuye el crecimiento de las neuritas en muchas, pero no en todas las neuronas corticales demostrando que el tipo de respuesta a $GABA$ depende de la combinación de subunidades del receptor expresadas según el estado de diferenciación neuronal (Maric y col., 2001). Esta evidencia sugiere que quizás la gran variabilidad observada en los distintos parámetros morfológicos y funcionales de las neuronas hipotálamicas puede deberse a distintos tipos neuronales. Se han reportado efectos facilitadores e inhibitorios de $GABA$ sobre el crecimiento de las neuritas. Al parecer la expresión de una u otra respuesta depende estrechamente del tipo neuronal estudiado. Por ejemplo, en cultivos neuronales de tallo cerebral embrionario el agregado de $GABA$ produce el aumento de la superficie cubierta por neuritas de neuronas serotoninérgicas, mientras que el agregado de bicuculina produce una disminución de dicha medida en neuronas dopaminérgicas. Estos resultados sugieren que los receptores $GABA_A$ ejercen acciones tróficas sobre los procesos neuríticos de dichas neuronas. Por el contrario, la activación de estos receptores ejerce acciones inhibitorias en neuronas $GABA_A$ ya que el tratamiento con bicuculina produce el aumento del área cubierta por neuritas en estas neuronas. Tales diferencias, pueden deberse a una distinta composición de subunidades, distinta cantidad o diferente localización celular (soma o neuritas) de los receptores en cada tipo neuronal (Liu y col., 1997). Al no haber realizado la identificación de los fenotipos neuronales de nuestro sistema, algunas diferencias sexuales en los parámetros analizados pueden haber quedado ocultas debido a efectos diferentes, incluso antagónicos, de los receptores $GABA_A$ en distintos tipos celulares. En consonancia con esta hipótesis, los resultados obtenidos mediante la caracterización electrofisiológica de estos cultivos indican que la mayoría de las neuronas hipotálamicas poseen receptores del tipo $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$. El NVM primordial expresa dichas subunidades en distintas subpoblaciones del mismo a E16. Las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2/3$ y $\gamma 2$ se expresan en células de todo el núcleo, mientras que la subunidad $\alpha 5$ se localiza en neuronas de la región central y la subunidad $\alpha 3$ en las porciones mediales y centrales del núcleo (Dellovade y col., 2001; McClellan y col., 2006; Tobet y col., 1999).

Estas poblaciones celulares, definidas en base a la composición de subunidades de los receptores GABA_A fueron confirmadas funcionalmente en nuestros cultivos de neuronas disociadas. En base a esta evidencia proponemos que muscimol podría producir efectos diferentes en el crecimiento de las neuritas en neuronas con distinta composición de receptores GABA_A. Sin embargo nuestros datos también indican la existencia de una subpoblación neuronal que además posee receptores del tipo $\alpha 4\beta 2/3\varepsilon$. Llamativamente, dicha subpoblación puso de manifiesto las diferencias sexuales al propofol. La identidad de dichas neuronas no puede ser esclarecida con las evidencias de este trabajo, no obstante podemos sugerir algunas opciones. Se ha demostrado que la subunidad $\alpha 4$ es expresada por neuronas corticales mientras migran desde las zonas proliferativas ventriculares y subventriculares hacia el plato y subplato cortical. Una vez alcanzada su ubicación, la subunidad que expresan dichas neuronas es la $\alpha 3$ (Maric y col., 2001). Esta evidencia nos sugiere que la subpoblación $\alpha 4\beta 2/3\varepsilon$ de nuestros cultivos corresponde a neuronas postmitóticas jóvenes que acaban de abandonar la línea germinativa ventricular, mientras que las poblaciones $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$ corresponden a células más diferenciadas que habían alcanzado su posición en el núcleo al momento de la disección. Sin embargo, otro grupo de evidencias postula la posibilidad de que las neuronas que expresan $\alpha 4\beta 2/3\varepsilon$ sean GABAérgicas. En nuestras manos, la disección del HVM de embriones de E16 abarca no sólo al NVM en desarrollo, sino también a las neuronas GABAérgicas que lo rodean. La disociación y posterior siembra de dichas células elimina la delicada estructura anatómica del HVM (McClellan y col., 2006), resultando en cultivos con poblaciones celulares heterogéneas. Es así, que posiblemente la población que contiene la subunidad ε (~50% de las neuronas) sea de neuronas inhibitorias de la periferia del NVM. Se demostró que en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo todas las neuronas $\varepsilon^{(+)}$ son también GAD65⁽⁺⁾ (Sergeeva y col., 2005), evidencia que apoya esta hipótesis. Se vuelve imperiosa la necesidad de la fenotipificación neuronal de nuestros cultivos macho y hembra. Por medio de experimentos funcionales y de expresión (electrofisiología con moduladores alostéricos específicos y RT-PCR de cada célula, doble marcación inmunocitoquímica con distintos marcadores neuronales) se podrá relacionar la composición de subunidades y el fenotipo neuronal. Es probable que al hacerlo, más diferencias sexuales emerjan en este punto. De igual manera, la identificación del tipo neuronal estudiado en los análisis de la regulación del crecimiento de las neuritas por receptores GABA_A podría revelar diferencias sexuales inadvertidas en los experimentos presentados en este trabajo. Estos experimentos permitirán relacionar la composición de receptores GABA_A con la regulación del crecimiento de las neuritas de neuronas de HVM en cada subtipo neuronal. Al hacerlo, nuevas hipótesis podrán ser

planteadas para estudiar la importancia de la señalización GABAérgica en el crecimiento y fisiología del hipotálamo en desarrollo de macho y hembras.

El hipotálamo es una de las estructuras cerebrales con el mayor número de diferencias sexuales. El NVM juega un rol importante en la regulación del balance energético, el comportamiento alimenticio y la conducta sexual de las hembras (McClellan y col., 2006), y presenta un gran número de diferencias sexuales. El NVM tiene un mayor tamaño en machos que en hembras (Matsumoto y Arai, 1983) como un mayor número de sinapsis (Matsumoto y Arai, 1986a, 1986b), mayor inervación serotoninérgica (Patisaul y col., 2008) y mayores niveles del ARNm del receptor de oxitocina (Bale y Dorsa, 1995). Mientras que las hembras poseen un mayor número de células y fibras inmunoreactivas para la enzima Óxido Nítrico Sintetasa neuronal en hembras neonatas (Edelmann y col., 2007), mayores niveles del ARNm de los RE α y β (Cao y Patisaul, 2011), del receptor de progesterona (Lauber y col., 1991) y de proencefalina (Romano y col., 1990). Particularmente, algunos componentes de la transmisión GABAérgica se expresan de manera sexo-específica en el HVM. Las corrientes GABAérgicas tienen un componente de decaimiento más rápido en hembras que en machos neonatos (Smith y col., 1996), mientras que la actividad GABAérgica medida a través del índice de recambio de GABA es mayor en machos (Grattan y Selmanoff, 1997; Searles y col., 2000). La mayoría de estas diferencias sexuales son consecuencia de los niveles perinatales de hormonas gonadales en machos y hembras, sin embargo nuevas evidencias mostraron un rol importante del complemento cromosómico sexual en el establecimiento de algunas de ellas. El ratón KO para el Factor Esteroidogénico-1 (SF-1) se caracteriza por la ausencia de gónadas y glándulas adrenales y presenta una marcada alteración en la citoarquitectura del HVM. La eliminación de la fuente gonadal de hormonas en este modelo produjo una alteración en la cantidad y orientación de las dendritas en el HVM y en la posición de los somas y fibras de neuronas que inervan al núcleo (Büdefeld y col., 2010). Las hembras de ratones salvajes poseen una mayor cantidad de neuronas calbindina⁽⁺⁾ que los machos en la porción lateral del NVM. En los individuos SF-1 KO tanto macho como hembra, las mismas toman una posición más medial. Sorprendentemente, la diferencia sexual se mantiene a pesar de no haber estado expuestos a la diferenciación sexual mediada por hormonas gonadales (Weisz y Ward, 1980). Esta evidencia sugiere que la diferencia sexual en la cantidad de neuronas calbindina⁽⁺⁾ está regulada por los cromosomas sexuales (Büdefeld y col., 2008). En este contexto, las diferencias sexuales en la eficacia de propofol y por ende la potencial diferencia en la composición de subunidades de los receptores GABA_A de machos y hembras, son otros de los puntos sobresalientes de este trabajo de tesis. Particularmente importante es que dichas diferencias fueron encontradas en neuronas hipotalámicas a

una edad gestacional (E16) previa al periodo crítico (E18-PN10) de diferenciación sexual mediada por hormonas gonadales, lo que sugiere que son debidas al complemento cromosómico sexual. Estos resultados aportan evidencia a favor de la importancia de la participación de los cromosomas sexuales en el establecimiento de diferencias sexuales en el hipotálamo (Büdefeld y col., 2010; Majdic y Tobet, 2011; Scerbo y col., 2014).

El NVM posee una exquisita citoarquitectura y conexiones sexualmente dimórficas que posibilitan la expresión del comportamiento sexual de la hembra (Flanagan-Cato, 2011). La hipótesis de que cada fenotipo neuronal presente en el HVM regula funciones específicas, encuentra apoyo experimental en el trabajo recientemente publicado por Yang y col. (2013). De manera elegante, este grupo identificó una subpoblación neuronal en el NVM que participa en el comportamiento sexual y agresivo de machos y en el comportamiento sexual de hembras. La ablación genética de una subpoblación sexualmente dimórfica de neuronas que expresa el receptor de progesterona en el NVM lateral produjo déficit severos en numerosos parámetros de las conductas sexuales y agresivas de machos y hembras, pero no de otros comportamientos sociales (Yang y col., 2013). Sorprendentemente, una misma población de alrededor de 2000 células del HVM controla de manera sexo específica la conducta sexual de ambos sexos y el comportamiento agresivo de machos. Este trabajo remarca la importancia de cada subpoblación neuronal para controlar funciones sexualmente dimórficas. Es por este motivo que nuestros resultados cobran gran relevancia al demostrar la existencia de subpoblaciones neuronales con distinta composición de subunidades de los receptores GABA_A en machos y hembras. Se han reportado también diferencias sexuales en los procesos neuronales de neuronas del NVM. Los machos tienen una mayor cantidad de dendritas y de mayor longitud que las hembras (Griffin y Flanagan-Cato, 2009). Por el contrario en una subpoblación neuronal del NVM que conecta con el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), las hembras poseen siete veces más fibras los machos (Yang y col., 2013). Sin embargo, ninguno de los trabajos profundiza sobre el mecanismo por el cual se establecen dichas diferencias sexuales en el crecimiento de los procesos neuronales. Por el contrario, un trabajo reciente de nuestro laboratorio (Scerbo y col., 2014) demostró que las neuronas hipotalámicas de ratones hembra presentan una diferenciación y neuritogénesis aumentada y una mayor expresión de neurogenina 3 (Ngn 3) respecto a los machos. El silenciamiento de la expresión de Ngn 3 eliminó esta diferencia sexual y los cromosomas sexuales parecen ser los responsables de la regulación de la expresión sexualmente dimórfica de Ngn 3. Mediante el uso del modelo de ratón de cuatro genotipos, en el cual la contribución de los cromosomas sexuales puede ser disecada de la contribución de las hormonas gonadales, se demuestra que los cultivos de neuronas XX presentan una mayor expresión de Ngn 3 que los XY

indistintamente si los embriones poseían testículos u ovarios. Se demuestra también que los machos, a diferencia de las hembras son sensibles a los efectos neuritogénicos de estradiol mediados por el aumento de Ngn 3. Dicha sensibilidad en los machos también parece estar regulada por el complemento cromosómico sexual, ya que las neuronas fueron tomadas de embriones de E14, mucho antes que tenga lugar la diferenciación sexual mediada por hormonas. Los resultados de este trabajo de tesis indican que GABA es una molécula que regula el crecimiento de las neuritas de neuronas hipotalámicas de embriones de rata macho y hembra. Una vez más, la correcta identificación del tipo neuronal estudiado en los efectos de la activación de los receptores GABA_A sobre el crecimiento de axones y dendritas podría desenmascarar diferencias sexuales inadvertidas en nuestro sistema. No obstante, hemos demostrado que las hembras poseen una respuesta mayor al propofol respecto a los machos, diferencia debida a la composición de subunidades de receptores GABA_A. Esta diferencia sexual se obtuvo de neuronas que no estuvieron expuestas a esteroides gonadales *in utero*, sugiriendo que estaría mediada por el complemento cromosómico sexual. Resulta impactante un artículo recientemente publicado, donde se demuestra la participación de los cromosomas sexuales en la regulación del comportamiento sexual femenino. Las hembras SF-1 KO exhiben un mayor número de lordosis, reciben mayor número de penetraciones y poseen un mayor número de neuronas inmunoreactivas para el receptor de progesterona que los machos a pesar de no haber estado expuestos a hormonas gonadales durante el desarrollo (Grgurevic y col., 2012). Este trabajo no sólo apoya los resultados obtenidos en esta tesis, sino que nos habilita a hipotetizar que las subpoblaciones encontradas en nuestro sistema podrían pertenecer a poblaciones neuronales del hipotálamo que controlan comportamientos específicos de machos y hembras. La importancia de estos hallazgos en el contexto del hipotálamo en desarrollo y posterior establecimiento de los circuitos que controlan conductas y/o funciones sexualmente dimórficas todavía debe ser establecida.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que:

- GABA, a través de sus receptores GABA_A, produce la despolarización de neuronas hipotalámicas inmaduras de macho y hembra.
- Los cultivos neuronales de HVM de embriones macho y hembra estarían formados por distintas subpoblaciones neuronales.
- Las neuronas provenientes de embriones hembra poseen una respuesta mayor a propofol respecto a los machos, efecto posiblemente mediado por la presencia de subunidad ϵ en los receptores GABA_A.
- La gran mayoría de las neuronas hipotalámicas de nuestro sistema presentan receptores del tipo $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2/3\gamma 2$. Sin embargo existe una subpoblación neuronal que además posee receptores funcionales del tipo $\alpha 4\beta 2/3\epsilon$.
- La activación crónica de receptores GABA_A produce la reducción de la longitud axonal y el aumento de la longitud de procesos menores en neuronas macho y hembra.
- Los efectos de la activación de receptores GABA_A sobre el crecimiento de las neuritas está mediado por calcio a través de CCDV tipo-L.
- La estimulación con muscimol provoca la fosforilación de ERK1/2 .
- CAMKII y ERK1/2 participan parcial e independientemente en la reducción de la longitud axonal, pero no en el crecimiento de procesos menores de neuronas hipotalámicas de macho y hembra.
- Las neuronas hipotalámicas provenientes de embriones macho y hembra a E16, presentan diferencias sexuales independientes de las hormonas gonadales sugiriendo que estarían reguladas por el complemento cromosómico sexual.

BIBLIOGRAFÍA

- Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Suzuki, K., Kamijo, S., Fujii, H., Mano, T., Blaeser, F., Chatila, T.A., y col. (2009). Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13720–13729.
- Aguayo, L.G. (1990). Ethanol potentiates the GABA_A-activated Cl⁻ current in mouse hippocampal and cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 187, 127–130.
- Aguayo, L.G., Peoples, R.W., Yeh, H.H., y Yevenes, G.E. (2002). GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 869–885.
- Altman, J., y Bayer, S.A. (1978a). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182, 945–971.
- Altman, J., y Bayer, S.A. (1978b). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 182, 973–993.
- Andäng, M., Hjerling-Leffler, J., Moliner, A., Lundgren, T.K., Castelo-Branco, G., Nanou, E., Pozas, E., Bryja, V., Halliez, S., Nishimaru, H., y col. (2008). Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451, 460–464.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739.
- Arnold, A.P. (2004). Sex chromosomes and brain gender. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 701–708.
- Arnold, A.P. (2009). Mouse models for evaluating sex chromosome effects that cause sex differences in non-gonadal tissues. *J. Neuroendocrinol.* 21, 377–386.
- Arnold, A.P. (2010). Promoting the understanding of sex differences to enhance equity and excellence in biomedical science. *Biol. Sex Differ.* 1, 1.
- Arnold, A.P., y Gorski, R.A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 413–442.
- Arnold, A.P., Xu, J., Grisham, W., Chen, X., Kim, Y.-H., y Itoh, Y. (2004). Minireview: Sex chromosomes and brain sexual differentiation. *Endocrinology* 145, 1057–1062.

- Auger, A.P., y Auger, C.J. (2011). Epigenetic turn ons and turn offs: chromatin reorganization and brain differentiation. *Endocrinology* 152, 349–353.
- Auger, A.P., Perrot-Sinal, T.S., y McCarthy, M.M. (2001). Excitatory versus inhibitory GABA as a divergence point in steroid-mediated sexual differentiation of the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8059–8064.
- Bale, T.L., y Dorsa, D.M. (1995). Sex differences in and effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the ventromedial hypothalamus. *Endocrinology* 136, 27–32.
- Baloyannis, S.J., Karakatsanis, K., Karathanasis, J., Apostolakis, M., y Diacoyannis, A. (1983). Effects of GABA, glycine, and sodium barbiturate on dendritic growth in vitro. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 59, 171–182.
- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., y Langer, S.Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313.
- Barry, P.H., y Lynch, J.W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Membr. Biol.* 121, 101–117.
- Baumann, S.W., Baur, R., y Sigel, E. (2003). Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 11158–11166.
- Behar, T.N., Schaffner, A.E., Scott, C.A., Greene, C.L., y Barker, J.L. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 10, 899–909.
- Belelli, D., Harrison, N.L., Maguire, J., Macdonald, R.L., Walker, M.C., y Cope, D.W. (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 12757–12763.
- Belujon, P., Baufreton, J., Grandoso, L., Boué-Grabot, E., Batten, T.F.C., Ugedo, L., Garret, M., y Taupignon, A.I. (2009). Inhibitory transmission in locus coeruleus neurons expressing GABAA receptor epsilon subunit has a number of unique properties. *J. Neurophysiol.* 102, 2312–2325.

- Bencsits, E., Ebert, V., Tretter, V., y Sieghart, W. (1999). A significant part of native gamma-aminobutyric AcidA receptors containing alpha4 subunits do not contain gamma or delta subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 19613–19616.
- Bergmann, R., Kongsbak, K., Sørensen, P.L., Sander, T., y Balle, T. (2013). A unified model of the GABA(A) receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. *PloS One* 8, e52323.
- Billinton, A., Upton, N., y Bowery, N.G. (1999). GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1387–1392.
- Bloom, F.E., y Iversen, L.L. (1971). Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 229, 628–630.
- Böhme, I., Rabe, H., y Lüddens, H. (2004). Four amino acids in the alpha subunits determine the gamma-aminobutyric acid sensitivities of GABAA receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 279, 35193–35200.
- Bonnert, T.P., McKernan, R.M., Farrar, S., le Bourdellès, B., Heavens, R.P., Smith, D.W., Hewson, L., Rigby, M.R., Sirinathsinghji, D.J., Brown, N., y col. (1999). theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9891–9896.
- Bony, G., Szczurkowska, J., Tamagno, I., Shelly, M., Contestabile, A., y Cancedda, L. (2013). Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat. Commun.* 4, 1800.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11, 112–116.
- Borodinsky, L.N., O'Leary, D., Neale, J.H., Vicini, S., Coso, O.A., y Fiszman, M.L. (2003). GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABA(A) receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *J. Neurochem.* 84, 1411–1420.
- Bouzigues, C., Morel, M., Triller, A., y Dahan, M. (2007). Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11251–11256.

- Briner, A., Nikonenko, I., De Roo, M., Dayer, A., Muller, D., y Vutskits, L. (2011). Developmental Stage-dependent persistent impact of propofol anesthesia on dendritic spines in the rat medial prefrontal cortex. *Anesthesiology* 115, 282–293.
- Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T.P., Whiting, P.J., y Wafford, K.A. (2002). Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 136, 965–974.
- Brüinig, I., Penschuck, S., Berninger, B., Benson, J., y Fritschy, J.M. (2001). BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA(A) receptor surface expression. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1320–1328.
- Büdefeld, T., Grgurevic, N., Tobet, S.A., y Majdic, G. (2008). Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev. Neurobiol.* 68, 981–995.
- Büdefeld, T., Tobet, S.A., y Majdič, G. (2010). GONADAL HORMONE INDEPENDENT SEX DIFFERENCES IN STEROIDOGENIC FACTOR 1 KNOCKOUT MICE BRAIN. *Slov. Vet. Zb. Slov. Vet. Res.* 47, 167–170.
- Cambiasso, M.J., Díaz, H., Cáceres, A., y Carrer, H.F. (1995). Neuritogenic effect of estradiol on rat ventromedial hypothalamic neurons co-cultured with homotopic or heterotopic glia. *J. Neurosci. Res.* 42, 700–709.
- Cambiasso, M.J., Colombo, J.A., y Carrer, H.F. (2000). Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2291–2298.
- Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., y Poo, M. (2007). Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5224–5235.
- Cao, J., y Patisaul, H.B. (2011). Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 519, 2954–2977.
- Cargnello, M., y Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 75, 50–83.

- Chapell, R., Bueno, O.F., Alvarez-Hernandez, X., Robinson, L.C., y Leidenheimer, N.J. (1998). Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 32595–32601.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C.Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R.D., y Huang, Z.J. (2007). GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 54, 889–903.
- Chen, G., Trombley, P.Q., y van den Pol, A.N. (1996). Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J. Physiol.* 494 (Pt 2), 451–464.
- Chen, L., Wang, H., Vicini, S., y Olsen, R.W. (2000). The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11557–11562.
- Cherubini, E., y Conti, F. (2001). Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24, 155–162.
- Choi, D.-S., Wei, W., Deitchman, J.K., Kharazia, V.N., Lesscher, H.M.B., McMahon, T., Wang, D., Qi, Z.-H., Sieghart, W., Zhang, C., y col. (2008). Protein kinase Cdelta regulates ethanol intoxication and enhancement of GABA-stimulated tonic current. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 11890–11899.
- Chudotvorova, I., Ivanov, A., Rama, S., Hübner, C.A., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., y Medina, I. (2005). Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *J. Physiol.* 566, 671–679.
- Chung, W.C.J., y Auger, A.P. (2013). Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 465, 573–584.
- Colbran, R.J. (2004). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 378, 1–16.
- Davies, P.A., Hanna, M.C., Hales, T.G., y Kirkness, E.F. (1997). Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature* 385, 820–823.
- Davies, P.A., Kirkness, E.F., y Hales, T.G. (2001). Evidence for the formation of functionally distinct alphabetaepsilon GABA(A) receptors. *J. Physiol.* 537, 101–113.

- Davis, A.M., Ward, S.C., Selmanoff, M., Herbison, A.E., y McCarthy, M.M. (1999). Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain. *Neuroscience* 90, 1471–1482.
- Decavel, C., y van den Pol, A.N. (1992). Converging GABA- and glutamate-immunoreactive axons make synaptic contact with identified hypothalamic neurosecretory neurons. *J. Comp. Neurol.* 316, 104–116.
- Decavel, C., y Van den Pol, A.N. (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 302, 1019–1037.
- Dellovade, T.L., Davis, A.M., Ferguson, C., Sieghart, W., Homanics, G.E., y Tobet, S.A. (2001). GABA influences the development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurobiol.* 49, 264–276.
- Díaz, H., Lorenzo, A., Carrer, H.F., y Cáceres, A. (1992). Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: sex differences and estrogen effects. *J. Neurosci. Res.* 33, 266–281.
- Draguhn, A., Verdorn, T.A., Ewert, M., Seeburg, P.H., y Sakmann, B. (1990). Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA_A receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron* 5, 781–788.
- Dudek, S.M., y Fields, R.D. (2001). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in somatodendritic compartments: roles of action potentials, frequency, and mode of calcium entry. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC122.
- Ebihara, S., Shirato, K., Harata, N., y Akaike, N. (1995). Gramicidin-perforated patch recording: GABA response in mammalian neurones with intact intracellular chloride. *J. Physiol.* 484 (Pt 1), 77–86.
- Edelmann, M., Wolfe, C., Scordalakes, E.M., Rissman, E.F., y Tobet, S. (2007). Neuronal nitric oxide synthase and calbindin delineate sex differences in the developing hypothalamus and preoptic area. *Dev. Neurobiol.* 67, 1371–1381.
- Enes, J., Langwieser, N., Ruschel, J., Carballosa-Gonzalez, M.M., Klug, A., Traut, M.H., Ylera, B., Tahirovic, S., Hofmann, F., Stein, V., y col. (2010). Electrical activity suppresses axon growth through Ca(v)1.2 channels in adult primary sensory neurons. *Curr. Biol. CB* 20, 1154–1164.

Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N., y Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91–100.

Eshete, F., y Fields, R.D. (2001). Spike frequency decoding and autonomous activation of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6694–6705.

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

Feng, H.-J., y Macdonald, R.L. (2004). Multiple actions of propofol on alphabeta gamma and alphabeta delta GABAA receptors. *Mol. Pharmacol.* 66, 1517–1524.

Fink, C.C., Bayer, K.-U., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Schulman, H., y Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39, 283–297.

Fisher, J.L., Zhang, J., y Macdonald, R.L. (1997). The role of alpha1 and alpha6 subtype amino-terminal domains in allosteric regulation of gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol. Pharmacol.* 52, 714–724.

Fiszman, M.L., y Schousboe, A. (2004). Role of calcium and kinases on the neurotrophic effect induced by gamma-aminobutyric acid. *J. Neurosci. Res.* 76, 435–441.

Fiszman, M.L., Borodinsky, L.N., y Neale, J.H. (1999). GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 115, 1–8.

Flanagan-Cato, L.M. (2011). Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 124–136.

Fon, E.A., y Edwards, R.H. (2001). Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve* 24, 581–601.

Freund, T.F., y Meskenaite, V. (1992). gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 738–742.

Fritschy, J.M., Paysan, J., Enna, A., y Mohler, H. (1994). Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 5302–5324.

- Ganguly, K., Schinder, A.F., Wong, S.T., y Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105, 521–532.
- Gao, B., y Fritschy, J.M. (1995). Cerebellar granule cells in vitro recapitulate the in vivo pattern of GABAA-receptor subunit expression. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 88, 1–16.
- Gao, X.B., y van den Pol, A.N. (2001). GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 85, 425–434.
- Gascon, E., Dayer, A.G., Sauvain, M.-O., Potter, G., Jenny, B., De Roo, M., Zraggen, E., Demaurex, N., Muller, D., y Kiss, J.Z. (2006). GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12956–12966.
- Gaudillière, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G. Ian, y Bonni, A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron* 41, 229–241.
- Giusi, G., Facciolo, R.M., Rende, M., Alò, R., Di Vito, A., Salerno, S., Morelli, S., De Bartolo, L., Drioli, E., y Canonaco, M. (2009). Distinct alpha subunits of the GABAA receptor are responsible for early hippocampal silent neuron-related activities. *Hippocampus* 19, 1103–1114.
- Glykys, J., Peng, Z., Chandra, D., Homanics, G.E., Houser, C.R., y Mody, I. (2007). A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat. Neurosci.* 10, 40–48.
- Gomez, T.M., y Zheng, J.Q. (2006). The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 115–125.
- Gorosito, S.V., y Cambiasso, M.J. (2008). Axogenic effect of estrogen in male rat hypothalamic neurons involves Ca(2+), protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase signaling. *J. Neurosci. Res.* 86, 145–157.
- Grattan, D.R., y Selmánoff, M. (1997). Sex differences in the activity of gamma-aminobutyric acidergic neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 775, 244–249.
- Grgurevic, N., Büdefeld, T., Spanic, T., Tobet, S.A., y Majdic, G. (2012). Evidence that sex chromosome genes affect sexual differentiation of female sexual behavior. *Horm. Behav.* 61, 719–724.

- Griffin, G.D., y Flanagan-Cato, L.M. (2009). Sex differences in the dendritic arbor of hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *Physiol. Behav.* 97, 151–156.
- Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E.M., y Bastiani, M. (2009). Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* 323, 802–806.
- Hanchar, H.J., Chutrinopkun, P., Meera, P., Supavilai, P., Sieghart, W., Wallner, M., y Olsen, R.W. (2006). Ethanol potently and competitively inhibits binding of the alcohol antagonist Ro15-4513 to alpha4/6beta3delta GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8546–8551.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., y Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 5764–5774.
- Heck, N., Kilb, W., Reiprich, P., Kubota, H., Furukawa, T., Fukuda, A., y Luhmann, H.J. (2007). GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 17, 138–148.
- Hjorth, J.J.J., van Pelt, J., Mansvelter, H.D., y van Ooyen, A. (2014). Competitive dynamics during resource-driven neurite outgrowth. *PloS One* 9, e86741.
- Holopainen, I.E., y Lauren, H.B. (2003). Neuronal activity regulates GABAA receptor subunit expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 118, 967–974.
- Hosie, A.M., Wilkins, M.E., da Silva, H.M.A., y Smart, T.G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486–489.
- Huang, Z.J. (2006). GABAB receptor isoforms caught in action at the scene. *Neuron* 50, 521–524.
- Huang, R.-Q., y Dillon, G.H. (2002). Functional characterization of GABA(A) receptors in neonatal hypothalamic brain slice. *J. Neurophysiol.* 88, 1655–1663.
- Huhtaniemi, I. (1994). Fetal testis--a very special endocrine organ. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 130, 25–31.

- Hutcheon, B., Morley, P., y Poulter, M.O. (2000). Developmental change in GABAA receptor desensitization kinetics and its role in synapse function in rat cortical neurons. *J. Physiol.* 522 Pt 1, 3–17.
- Hutchins, B.I. (2010). Competitive outgrowth of neural processes arising from long-distance cAMP signaling. *Sci. Signal.* 3, jc1.
- Hutchins, B.I., y Kalil, K. (2008). Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 143–153.
- Jia, F., Pignataro, L., Schofield, C.M., Yue, M., Harrison, N.L., y Goldstein, P.A. (2005). An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 4491–4501.
- Jia, F., Pignataro, L., y Harrison, N.L. (2007). GABAA receptors in the thalamus: alpha4 subunit expression and alcohol sensitivity. *Alcohol Fayettev. N* 41, 177–185.
- Jia, F., Chandra, D., Homanics, G.E., y Harrison, N.L. (2008). Ethanol modulates synaptic and extrasynaptic GABAA receptors in the thalamus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 475–482.
- Johnston, G.A. (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 69, 173–198.
- Jurd, R., Arras, M., Lambert, S., Drexler, B., Siegwart, R., Crestani, F., Zaugg, M., Vogt, K.E., Ledermann, B., Antkowiak, B., y col. (2003). General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 250–252.
- Kasparov, S., Davies, K.A., Patel, U.A., Boscan, P., Garret, M., y Paton, J.F. (2001). GABA(A) receptor epsilon-subunit may confer benzodiazepine insensitivity to the caudal aspect of the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.* 536, 785–796.
- Kaur, K.H., Baur, R., y Sigel, E. (2009). Unanticipated structural and functional properties of delta-subunit-containing GABAA receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 7889–7896.
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 4908–4923.

Kellogg, C.K., Yao, J., y Pleger, G.L. (2000). Sex-specific effects of in utero manipulation of GABA(A) receptors on pre- and postnatal expression of BDNF in rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 121, 157–167.

Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B., y Ben-Ari, Y. (2001). Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9770–9781.

Knoflach, F., Benke, D., Wang, Y., Scheurer, L., Lüddens, H., Hamilton, B.J., Carter, D.B., Mohler, H., y Benson, J.A. (1996). Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6 beta 2 gamma 2. *Mol. Pharmacol.* 50, 1253–1261.

Konur, S., y Ghosh, A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401–405.

Korpi, E.R., Kuner, T., Seeburg, P.H., y Lüddens, H. (1995). Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Mol. Pharmacol.* 47, 283–289.

Korpi, E.R., Gründer, G., y Lüddens, H. (2002). Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog. Neurobiol.* 67, 113–159.

Korpi, E.R., Debus, F., Linden, A.-M., Malécot, C., Leppä, E., Vekovischeva, O., Rabe, H., Böhme, I., Aller, M.I., Wisden, W., y col. (2007). Does ethanol act preferentially via selected brain GABAA receptor subtypes? the current evidence is ambiguous. *Alcohol Fayettev. N* 41, 163–176.

Krasowski, M.D., Koltchine, V.V., Rick, C.E., Ye, Q., Finn, S.E., y Harrison, N.L. (1998). Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol. Pharmacol.* 53, 530–538.

Kullmann, D.M., Ruiz, A., Rusakov, D.M., Scott, R., Semyanov, A., y Walker, M.C. (2005). Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87, 33–46.

Lambert, J.J., Peters, J.A., Sturgess, N.C., y Hales, T.G. (1990). Steroid modulation of the GABAA receptor complex: electrophysiological studies. *Ciba Found. Symp.* 153, 56–71; discussion 71–82.

- Lauber, A.H., Romano, G.J., y Pfaff, D.W. (1991). Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 53–62.
- Laurie, D.J., Seeburg, P.H., y Wisden, W. (1992a). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 1063–1076.
- Laurie, D.J., Wisden, W., y Seeburg, P.H. (1992b). The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4151–4172.
- Lee, H., Lee, D., Park, C.-H., Ho, W.-K., y Lee, S.-H. (2012). GABA mediates the network activity-dependent facilitation of axonal outgrowth from the newborn granule cells in the early postnatal rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2743–2752.
- Lenz, K.M., y McCarthy, M.M. (2010). Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 32, 2096–2104.
- Liang, J., Zhang, N., Cagetti, E., Houser, C.R., Olsen, R.W., y Spigelman, I. (2006). Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1749–1758.
- Liu, J., Morrow, A.L., Devaud, L., Grayson, D.R., y Lauder, J.M. (1997). GABAA receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 2420–2428.
- Lobo, I.A., y Harris, R.A. (2008). GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 90–94.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., y Kriegstein, A.R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287–1298.
- Ludwig, A., Li, H., Saarma, M., Kaila, K., y Rivera, C. (2003). Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3199–3206.

- Luhmann, H.J., y Prince, D.A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* *65*, 247–263.
- Luján, R., Shigemoto, R., y López-Bendito, G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* *130*, 567–580.
- Maitra, R., y Reynolds, J.N. (1999). Subunit dependent modulation of GABA_A receptor function by neuroactive steroids. *Brain Res.* *819*, 75–82.
- Maitre, M. (1997). The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog. Neurobiol.* *51*, 337–361.
- Majdic, G., y Tobet, S. (2011). Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Front. Neuroendocrinol.* *32*, 137–145.
- Manent, J.-B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., y Represa, A. (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 4755–4765.
- Maric, D., Liu, Q.Y., Maric, I., Chaudry, S., Chang, Y.H., Smith, S.V., Sieghart, W., Fritschy, J.M., y Barker, J.L. (2001). GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2343–2360.
- Marty, S., Berninger, B., Carroll, P., y Thoenen, H. (1996). GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* *16*, 565–570.
- Matsumoto, A., y Arai, Y. (1983). Sex difference in volume of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Endocrinol. Jpn.* *30*, 277–280.
- Matsumoto, A., y Arai, Y. (1986a). Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology* *42*, 232–236.
- Matsumoto, A., y Arai, Y. (1986b). Development of sexual dimorphism in synaptic organization in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rats. *Neurosci. Lett.* *68*, 165–168.
- McCarthy, M.M. (2010). How it's made: organisational effects of hormones on the developing brain. *J. Neuroendocrinol.* *22*, 736–742.

McCarthy, M.M., y Arnold, A.P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat. Neurosci.* 14, 677–683.

McCarthy, M.M., Auger, A.P., y Perrot-Sinal, T.S. (2002). Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends Neurosci.* 25, 307–312.

McCarthy, M.M., Wright, C.L., y Schwarz, J.M. (2009a). New tricks by an old dogma: mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior. *Horm. Behav.* 55, 655–665.

McCarthy, M.M., Auger, A.P., Bale, T.L., De Vries, G.J., Dunn, G.A., Forger, N.G., Murray, E.K., Nugent, B.M., Schwarz, J.M., y Wilson, M.E. (2009b). The epigenetics of sex differences in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 12815–12823.

McClellan, K.M., Parker, K.L., y Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 193–209.

McEwen, B.S., y Alves, S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20, 279–307.

Menger, Y., Bettscheider, M., Murgatroyd, C., y Spengler, D. (2010). Sex differences in brain epigenetics. *Epigenomics* 2, 807–821.

Mihalek, R.M., Banerjee, P.K., Korpi, E.R., Quinlan, J.J., Firestone, L.L., Mi, Z.P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S.G., y col. (1999). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12905–12910.

Mintz, C.D., Barrett, K.M.S., Smith, S.C., Benson, D.L., y Harrison, N.L. (2013). Anesthetics interfere with axon guidance in developing mouse neocortical neurons in vitro via a γ -aminobutyric acid type A receptor mechanism. *Anesthesiology* 118, 825–833.

Mir, F.R. (2007). Diferencias sexuales en respuesta a muscimol en neuronas de hipotálamo de embriones de rata. Tesina de grado, Carrera de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Moragues, N., Ciofi, P., Lafon, P., Odessa, M.F., Tramu, G., y Garret, M. (2000). cDNA cloning and expression of a gamma-aminobutyric acid A receptor epsilon-subunit in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4318–4330.

- Moragues, N., Ciofi, P., Tramu, G., y Garret, M. (2002). Localisation of GABA(A) receptor epsilon-subunit in cholinergic and aminergic neurones and evidence for co-distribution with the theta-subunit in rat brain. *Neuroscience* 111, 657–669.
- Negri-Cesi, P., Colciago, A., Celotti, F., y Motta, M. (2004). Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J. Endocrinol. Invest.* 27, 120–127.
- Ngun, T.C., Ghahramani, N., Sánchez, F.J., Bocklandt, S., y Vilain, E. (2011). The genetics of sex differences in brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 227–246.
- Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., Belachew, S., y Rigo, J.-M. (2003). Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3278–3294.
- Nicolelis, M.A., Chapin, J.K., y Lin, R.C. (1992). Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem. *Brain Res.* 577, 134–141.
- Nie, Z., Schweitzer, P., Roberts, A.J., Madamba, S.G., Moore, S.D., y Siggins, G.R. (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* 303, 1512–1514.
- Nugent, B.M., y McCarthy, M.M. (2011). Epigenetic underpinnings of developmental sex differences in the brain. *Neuroendocrinology* 93, 150–158.
- Nys, M., Kesters, D., y Ulens, C. (2013). Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1042–1053.
- Obrietan, K., y van den Pol, A.N. (1995). GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5065–5077.
- Obrietan, K., y van den Pol, A.N. (1996). Growth cone calcium elevation by GABA. *J. Comp. Neurol.* 372, 167–175.
- Obrietan, K., Gao, X.-B., y Van Den Pol, A.N. (2002). Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism--a positive feedback circuit in developing neurons. *J. Neurophysiol.* 88, 1005–1015.

Olsen, R.W., y Sapp, D.W. (1995). Neuroactive steroid modulation of GABA_A receptors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 48, 57–74.

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

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

Olsen, R.W., Hanchar, H.J., Meera, P., y Wallner, M. (2007). GABA_A receptor subtypes: the “one glass of wine” receptors. *Alcohol Fayettev. N* 41, 201–209.

Ong, J., y Kerr, D.I. (2000). Recent advances in GABA_B receptors: from pharmacology to molecular biology. *Acta Pharmacol. Sin.* 21, 111–123.

Van Ooyen, A. (2005). Competition in neurite outgrowth and the development of nerve connections. *Prog. Brain Res.* 147, 81–99.

Owens, D.F., y Kriegstein, A.R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715–727.

Owens, D.F., Liu, X., y Kriegstein, A.R. (1999). Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development. *J. Neurophysiol.* 82, 570–583.

Padgett, C.L., y Slesinger, P.A. (2010). GABA_B receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 58, 123–147.

Pape, J.-R., Bertrand, S.S., Lafon, P., Odessa, M.-F., Chaigniau, M., Stiles, J.K., y Garret, M. (2009). Expression of GABA(A) receptor alpha3-, theta-, and epsilon-subunit mRNAs during rat CNS development and immunolocalization of the epsilon subunit in developing postnatal spinal cord. *Neuroscience* 160, 85–96.

Parekh, A.B. (2011). Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends Biochem. Sci.* 36, 78–87.

Patisaul, H.B., Fortino, A.E., y Polston, E.K. (2008). Sex differences in serotonergic but not gamma-aminobutyric acidergic (GABA) projections to the rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 149, 397–408.

Perrot-Sinal, T.S., Davis, A.M., Gregerson, K.A., Kao, J.P., y McCarthy, M.M. (2001). Estradiol enhances excitatory gamma-aminobutyric [corrected] acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology* 142, 2238–2243.

Perrot-Sinal, T.S., Auger, A.P., y McCarthy, M.M. (2003). Excitatory actions of GABA in developing brain are mediated by I-type Ca²⁺ channels and dependent on age, sex, and brain region. *Neuroscience* 116, 995–1003.

Perrot-Sinal, T.S., Sinal, C.J., Reader, J.C., Speert, D.B., y McCarthy, M.M. (2007). Sex differences in the chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, in the developing hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 19, 302–308.

Petrini, E.M., Zacchi, P., Barberis, A., Mozrzymas, J.W., y Cherubini, E. (2003). Declusterization of GABA_A receptors affects the kinetic properties of GABAergic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 16271–16279.

Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., y Young, W.C. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369–382.

Pinard, A., Seddik, R., y Bettler, B. (2010). GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 58, 231–255.

Pollitzer, E. (2013). Biology: Cell sex matters. *Nature* 500, 23–24.

Porcher, C., Hatchett, C., Longbottom, R.E., McAinch, K., Sihra, T.S., Moss, S.J., Thomson, A.M., y Jovanovic, J.N. (2011). Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J. Biol. Chem.* 286, 21667–21677.

Poulter, M.O., Barker, J.L., O'Carroll, A.M., Lolait, S.J., y Mahan, L.C. (1992). Differential and transient expression of GABA_A receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 2888–2900.

Priest, C.A., y Puche, A.C. (2004). GABAB receptor expression and function in olfactory receptor neuron axon growth. *J. Neurobiol.* 60, 154–165.

Pritchett, D.B., Lüddens, H., y Seeburg, P.H. (1989). Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* 245, 1389–1392.

- Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P.H., y Costa, E. (1992). Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABAA receptors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* *47*, 103–110.
- Purpura, D.P., Girado, M., y Grundfest, H. (1957). Selective blockade of excitatory synapses in the cat brain by gamma-aminobutyric acid. *Science* *125*, 1200–1202.
- Ranna, M., Sinkkonen, S.T., Möykkynen, T., Uusi-Oukari, M., y Korpi, E.R. (2006). Impact of epsilon and theta subunits on pharmacological properties of alpha3beta1 GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Pharmacol.* *6*, 1.
- Redmond, L., Kashani, A.H., y Ghosh, A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* *34*, 999–1010.
- Represa, A., y Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* *28*, 278–283.
- Reynolds, A., Brustein, E., Liao, M., Mercado, A., Babilonia, E., Mount, D.B., y Drapeau, P. (2008). Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 1588–1597.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., y Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* *397*, 251–255.
- Roberto, M., Madamba, S.G., Moore, S.D., Tallent, M.K., y Siggins, G.R. (2003). Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2053–2058.
- Roberts, E., y Frankel, S. (1950). gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* *187*, 55–63.
- Roehm, P.C., Xu, N., Woodson, E.A., Green, S.H., y Hansen, M.R. (2008). Membrane depolarization inhibits spiral ganglion neurite growth via activation of multiple types of voltage sensitive calcium channels and calpain. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 376–387.
- Romano, G.J., Mobbs, C.V., Lauber, A., Howells, R.D., y Pfaff, D.W. (1990). Differential regulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial

hypothalamus of male y female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. *Brain Res.* 536, 63–68.

Roth, T.L., y Sweatt, J.D. (2011). Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J. Child Psychol. Psychiatry* 52, 398–408.

Roux, P.P., y Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 68, 320–344.

Rupprecht, R. (2003). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 28, 139–168.

Santhakumar, V., Wallner, M., y Otis, T.S. (2007). Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol Fayettev. N* 41, 211–221.

Sargoy, A., Sun, X., Barnes, S., y Brecha, N.C. (2014). Differential calcium signaling mediated by voltage-gated calcium channels in rat retinal ganglion cells and their unmyelinated axons. *PLoS One* 9, e84507.

Saxena, N.C., y Macdonald, R.L. (1994). Assembly of GABAA receptor subunits: role of the delta subunit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 7077–7086.

Saxena, N.C., y Macdonald, R.L. (1996). Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol. Pharmacol.* 49, 567–579.

Saxena, N.C., Neelands, T.R., y MacDonald, R.L. (1997). Contrasting actions of lanthanum on different recombinant gamma-aminobutyric acid receptor isoforms expressed in L929 fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 51, 328–335.

Scerbo, M.J., Freire-Regatillo, A., Cisternas, C.D., Brunotto, M., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M., y Cambiasso, M.J. (2014). Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 188.

Schiebinger, L. (2014). Scientific research must take gender into account. *Nature* 507, 9.

Schmitt, J.M., Wayman, G.A., Nozaki, N., y Soderling, T.R. (2004). Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J. Biol. Chem.* 279, 24064–24072.

Schmitt, J.M., Guire, E.S., Saneyoshi, T., y Soderling, T.R. (2005). Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1281–1290.

Schwarz, J.M., y McCarthy, M.M. (2008a). Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J. Neurochem.* 105, 1561–1572.

Schwarz, J.M., y McCarthy, M.M. (2008b). Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 300–306.

Scotti, A.L., y Reuter, H. (2001). Synaptic and extrasynaptic gamma -aminobutyric acid type A receptor clusters in rat hippocampal cultures during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3489–3494.

Searles, R.V., Yoo, M.J., He, J.R., Shen, W.B., y Selmánoff, M. (2000). Sex differences in GABA turnover and glutamic acid decarboxylase (GAD(65) and GAD(67)) mRNA in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 878, 11–19.

Sergeeva, O.A., Andreeva, N., Garret, M., Scherer, A., y Haas, H.L. (2005). Pharmacological properties of GABAA receptors in rat hypothalamic neurons expressing the epsilon-subunit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 88–95.

Sernagor, E., Chabrol, F., Bony, G., y Cancedda, L. (2010). GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front. Cell. Neurosci.* 4, 11.

Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., y Poo, M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* 327, 547–552.

Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P., Gao, H., y Poo, M. (2011). Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71, 433–446.

Shiryaev, A., y Moens, U. (2010). Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: ménage à trois or ménage à quatre? *Cell. Signal.* 22, 1185–1192.

Sigel, E., y Buhr, A. (1997). The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 425–429.

Singh, K.K., y Miller, F.D. (2005). Activity regulates positive and negative neurotrophin-derived signals to determine axon competition. *Neuron* 45, 837–845.

Sinkkonen, S.T., Hanna, M.C., Kirkness, E.F., y Korpi, E.R. (2000). GABA(A) receptor epsilon and theta subunits display unusual structural variation between species and are enriched in the rat locus ceruleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3588–3595.

Smedler, E., y Uhlén, P. (2014). Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 964–969.

Smith, S.T., Brennan, C., Clark, A.S., y Henderson, L.P. (1996). GABA_A receptor-mediated responses in the ventromedial nucleus of the hypothalamus of female and male neonatal rats. *Neuroendocrinology* 64, 103–113.

Soderling, T.R., Chang, B., y Brickey, D. (2001). Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 276, 3719–3722.

Stórustovu, S.I., y Ebert, B. (2006). Pharmacological characterization of agonists at delta-containing GABA_A receptors: Functional selectivity for extrasynaptic receptors is dependent on the absence of gamma2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1351–1359.

Takemoto-Kimura, S., Ageta-Ishihara, N., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Mano, T., Okamura, M., Fujii, H., Fuse, T., Hoshino, M., Suzuki, S., y col. (2007). Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ . *Neuron* 54, 755–770.

Tang, F., y Kalil, K. (2005). Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6702–6715.

Tang, F., Dent, E.W., y Kalil, K. (2003). Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 927–936.

Tapia, J.C., Mentis, G.Z., Navarrete, R., Nualart, F., Figueroa, E., Sánchez, A., y Aguayo, L.G. (2001). Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth. *Neuroscience* 108, 493–506.

Thompson, S.A., Arden, S.A., Marshall, G., Wingrove, P.B., Whiting, P.J., y Wafford, K.A. (1999). Residues in transmembrane domains I and II determine gamma-aminobutyric acid

type AA receptor subtype-selective antagonism by furosemide. *Mol. Pharmacol.* 55, 993–999.

Thompson, S.A., Bonnert, T.P., Cagetti, E., Whiting, P.J., y Wafford, K.A. (2002). Overexpression of the GABA(A) receptor epsilon subunit results in insensitivity to anaesthetics. *Neuropharmacology* 43, 662–668.

Tippens, A.L., Pare, J.-F., Langwieser, N., Moosmang, S., Milner, T.A., Smith, Y., y Lee, A. (2008). Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 506, 569–583.

Tobet, S., Knoll, J.G., Hartshorn, C., Aurand, E., Stratton, M., Kumar, P., Searcy, B., y McClellan, K. (2009). Brain sex differences and hormone influences: a moving experience? *J. Neuroendocrinol.* 21, 387–392.

Tobet, S.A., Henderson, R.G., Whiting, P.J., y Sieghart, W. (1999). Special relationship of gamma-aminobutyric acid to the ventromedial nucleus of the hypothalamus during embryonic development. *J. Comp. Neurol.* 405, 88–98.

Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F., y Iino, M. (2003). NFAT functions as a working memory of Ca²⁺ signals in decoding Ca²⁺ oscillation. *EMBO J.* 22, 3825–3832.

Trigo, F.F., Marty, A., y Stell, B.M. (2008). Axonal GABA_A receptors. *Eur. J. Neurosci.* 28, 841–848.

Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., y Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 10372–10382.

Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y., y Khazipov, R. (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J. Neurophysiol.* 90, 2964–2972.

Vaillant, A.R., Zanassi, P., Walsh, G.S., Aumont, A., Alonso, A., y Miller, F.D. (2002). Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron* 34, 985–998.

De Vries, G.J., y Södersten, P. (2009). Sex differences in the brain: the relation between structure and function. *Horm. Behav.* 55, 589–596.

De Vries, G.J. (2004). Minireview: Sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation. *Endocrinology* 145, 1063–1068.

Wafford, K.A., Thompson, S.A., Thomas, D., Sikela, J., Wilcox, A.S., y Whiting, P.J. (1996). Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol. Pharmacol.* 50, 670–678.

Wallner, M., Hanchar, H.J., y Olsen, R.W. (2003). Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15218–15223.

Wallner, M., Hanchar, H.J., y Olsen, R.W. (2006). Low-dose alcohol actions on alpha4beta3delta GABAA receptors are reversed by the behavioral alcohol antagonist Ro15-4513. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8540–8545.

Wang, D.D., y Kriegstein, A.R. (2009). Defining the role of GABA in cortical development. *J. Physiol.* 587, 1873–1879.

Wang, Y.F., Gao, X.B., y van den Pol, A.N. (2001). Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1252–1265.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., y Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* 213, 1–47.

Wayman, G.A., Kaech, S., Grant, W.F., Davare, M., Impey, S., Tokumitsu, H., Nozaki, N., Banker, G., y Soderling, T.R. (2004). Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 3786–3794.

Wayman, G.A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W.F., Derkach, V., y Soderling, T.R. (2006). Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50, 897–909.

Wayman, G.A., Lee, Y.-S., Tokumitsu, H., Silva, A.J., Silva, A., y Soderling, T.R. (2008). Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59, 914–931.

- Wayman, G.A., Tokumitsu, H., Davare, M.A., y Soderling, T.R. (2011). Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50, 1–8.
- Weisz, J., y Ward, I.L. (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106, 306–316.
- Wen, Z., Guirland, C., Ming, G.-L., y Zheng, J.Q. (2004). A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance. *Neuron* 43, 835–846.
- Whiting, P.J., McAllister, G., Vassilatis, D., Bonnert, T.P., Heavens, R.P., Smith, D.W., Hewson, L., O'Donnell, R., Rigby, M.R., Sirinathsinghji, D.J., y col. (1997). Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABAA receptor subunit conferring atypical functional properties [corrected; erratum to be published]. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5027–5037.
- Wieland, H.A., Lüddens, H., y Seeburg, P.H. (1992). A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J. Biol. Chem.* 267, 1426–1429.
- Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H., y Seeburg, P.H. (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 1040–1062.
- Wright, C.L., Schwarz, J.S., Dean, S.L., y McCarthy, M.M. (2010). Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 21, 553–561.
- Xiao, C., y Ye, J.-H. (2008). Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: role of mu-opioid receptors. *Neuroscience* 153, 240–248.
- Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H.J., y Fukuda, A. (2004). Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 557, 829–841.
- Yang, C.F., Chiang, M.C., Gray, D.C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S.A., Unger, E.K., Wells, J.A., y Shah, N.M. (2013). Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 153, 896–909.

You, H., y Dunn, S.M.J. (2007). Identification of a domain in the delta subunit (S238-V264) of the alpha4beta3delta GABAA receptor that confers high agonist sensitivity. *J. Neurochem.* 103, 1092–1101.

Zhou, X., y Smith, S.S. (2009). Expression levels of the alpha4 subunit of the GABA(A) receptor in differentiated neuroblastoma cells are correlated with GABA-gated current. *Neuropharmacology* 56, 1041–1053.

Zhou, J., Pfaff, D.W., y Chen, G. (2005). Sex differences in estrogenic regulation of neuronal activity in neonatal cultures of ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14907–14912.