



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

MODULACIÓN POR INSULINA DE LAS CORRIENTES GABA_A EN LA CORTEZA
PREFRONTAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OLIVIA SARAÍ TRUJEQUE RAMOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. SALVADOR LEONARDO HERNÁNDEZ LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO

DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ

FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Salvador L. Hernández López, Dra. Elvira Galarraga Palacio y Dra. Leticia Verdugo Díaz, miembros de mi comité tutor.

A los miembros de jurado de examen: Dra. Verónica Guarner Lans, Dr. José Bargas Díaz, Dr. Angel Zaráin Herzberg y Dra. Julieta Garduño Torres.

Al Biól. Dagoberto Tapia Ramirez por su apoyo técnico en el área de inmunohistoquímica.

A todos los miembros pasados y presentes del laboratorio de electrofisiología.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca no. 361981.

Para Leo

Índice General

I. Resumen	7
II. Abstract	8
III. Abreviaturas	9
IV. Introducción	10
IV.1. Corteza prefrontal	10
IV. 1. 1. Organización general de la CPF	10
IV. 1. 2. Subdivisiones de la CPF	12
IV. 1. 3. Conexiones en la CPF	14
IV. 1. 4. Aferencias	14
IV. 1. 5. Eferencias	15
IV. 1. 6. Funciones	16
IV. 2. 1. Receptores a GABA	19
IV. 2. 2. Receptores GABA _A	19
IV. 2. 3. Inhibición fásica	20
IV. 2. 4. Inhibición tónica	21
IV. 3. Insulina	24
IV. 3. 1. Vías de señalización de la insulina	25
IV. 3. 2. La insulina en el cerebro	29
IV. 3. 3. Funciones de la Insulina en el SNC	30
IV. 3. 3. 1. Ingesta de alimentos y balance energético	30
IV. 3. 3. 2. Glucorregulación	31
IV. 3. 3. 3. Reproducción	31
IV. 3. 3. 4. Memoria	32
V. Antecedentes	34
VII. Hipótesis	37
VIII. Objetivos	38
VIII. 1. Objetivo General	38
VIII. 2. Objetivos Particulares	38

IX. Metodología	39
IX. 1. Preparación del tejido	39
IX. 2. Registros electrofisiológicos	39
IX. 3. Inmunocitoquímica	40
IX. 3. 1. Densitometría	41
IX. 4. Western Blot	41
IX. 5. Incubación con fármacos	42
IX. 6. Aplicación de fármacos	42
IX. 7. Análisis estadístico	43
X. Resultados	45
X. 1. La insulina modula la corriente activada por receptores GABA _A en la CPF	45
X. 2. La insulina modula la corriente tónica inhibitoria a través de la activación de la enzima PI3K	49
X. 3. La corriente tónica inhibitoria es mediada por receptores GABA _A con las subunidades $\alpha 5$ y δ	50
X. 4. La insulina incrementa la expresión de receptores GABA _A extrasinápticos	53
X. 5. La insulina disminuye la excitabilidad neuronal	55
X. 6. La insulina disminuye la ganancia de las células piramidales de la corteza prefrontal	58
X. 7. La insulina promueve la translocación de receptores GABA _A extrasinápticos a la membrana celular	60
XI. Discusión	63
XIII. Referencias	74
XIV. Artículo	87

I. Resumen

La señalización por insulina en el cerebro es importante no solo para la homeostasis metabólica, la insulina también actúa como factor de crecimiento, activa el crecimiento dendrítico, participa en la regeneración celular así como en la proliferación y supervivencia de células madre. Aunque los receptores a insulina se encuentran distribuidos ampliamente en el cerebro, su proliferación es mayor en áreas como los plexos coroideos, hipotálamo, bulbo olfatorio, estriado y corteza cerebral. Estudios recientes han demostrado que la insulina regula la expresión de receptores GABA_A extrasinápticos en el hipocampo, ocasionando cambios permanentes en los circuitos neuronales. Este efecto podría explicar las alteraciones en procesos cognitivos asociados a cambios en la señalización de la insulina previamente reportados. Otra estructura que presenta una importante densidad de receptores a insulina y que a su vez participa en diversos procesos cognitivos es la corteza prefrontal. El objetivo de este trabajo es examinar el efecto de la insulina sobre la corriente tónica inhibitoria mediada por receptores GABA_A en la corteza prefrontal (capa V-VI) en rebanadas de cerebro de rata. Hemos observado que la insulina (20-500 nM) no solamente modula los receptores GABA_A sinápticos sino que también promueve la translocación de receptores GABA_A extrasinápticos a la membrana celular, incrementando la corriente tónica inhibitoria. También se ha encontrado que estos receptores poseen las subunidades $\alpha 5$ y δ . Nuestros datos sugieren que un incremento en el número de receptores GABA_A extrasinápticos también modifica el disparo neuronal decrementando la excitabilidad neuronal. Esta modulación depende de la activación de la enzima PI3K por activación del receptor a insulina como se ha observado en trabajos previos en hipocampo. Conjuntamente estos resultados sugieren que la modulación por insulina de los receptores a GABA pueden modificar la actividad de los circuitos neuronales.

II. Abstract

Insulin signaling in the brain is important not only for metabolic homeostasis, insulin also acts as a growth factor, activates dendritic growth, participates in cell regeneration as well as in the proliferation and survival of stem cells. Although insulin receptors are widely distributed in the brain, their proliferation is greater in areas such as the choroid plexus, hypothalamus, olfactory bulb, striatum, and cerebral cortex. Recent studies have shown that insulin regulates the expression of extrasynaptic GABA_A receptors in the hippocampus, promoting permanent changes in neuronal circuits. This effect could explain alterations in cognitive processes associated with previously reported changes in insulin signaling. Another structure that presents an important density of insulin receptors and that in turn participates in various cognitive processes is the prefrontal cortex. The aim of this work is to examine the effect of insulin on the inhibitory tonic current mediated by GABA_A receptors in the prefrontal cortex (layer V-VI) in slices of rat brain. We have observed that insulin (20-500 nM) not only modulates synaptic GABA_A receptors but also promotes the translocation of extrasynaptic GABA_A receptors to the cell membrane, increasing the tonic inhibitory current. It has also been found that these receptors contain the $\alpha 5$ and δ subunits. Our data suggest that an increase in the number of extrasynaptic GABA_A receptors also modifies neuronal firing by decreasing neuronal excitability. This modulation depends on the activation of the PI3K enzyme by activation of the insulin receptor as has been observed in previous works in the hippocampus. Together these results suggest that the insulin modulation of GABA receptors can modify the activity of neuronal circuits.

III. Abreviaturas

PFC	corteza prefrontal
GABA	ácido gama amino-butírico
GAD	enzima glutamato descarboxilaza
IPSP	potencial postsináptico inhibitorio
5-HT3	receptor a serotonina tipo 3
IPSCs	corrientes postsinápticas inhibitorias
MAPK	vía de señalización de las MAP cinasa
IR	receptor a insulina
IRS	substrato del receptor a insulina
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
Akt	proteína cinasa B (PKB)
GLUT	transportador de glucosa
SNC	sistema nervioso central
NPY	neuropéptido Y
NIRKO	neuronal insulin receptor-knock-out
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina-1
HEK	células embrionarias de riñón
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
TTX	tetrodotoxina
PA	potencial de acción
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
PRIP	phospholipase-C-related catalytically inactive protein
LTP	potenciación a largo plazo

IV. Introducción

IV.1. Corteza prefrontal

La corteza de la parte región en el cerebro de mamíferos es comunmente llamada corteza prefrontal (CPF). Filogenéticamente, es una de las cortezas que está más desarrollada teniendo su máxima expresión en el cerebro humano (Fuster, 2001). La CPF es una corteza de asociación que recibe información de la mayoría de las estructuras del cerebro y las procesa de una forma compleja. Los criterios principales para definirla así como para establecer su homología con otras especies son la topología, topografía, citoarquitectura así como sus conexiones. Estos mismos criterios también se han utilizado para elucidar su desarrollo evolutivo (Fuster, 2001).

IV. 1. 1. Organización general de la CPF

En su mayoría, la corteza cerebral, incluyendo la corteza prefrontal posee al menos 6 capas celulares, esta corteza se conoce como isocorteza. Dado que la isocorteza predomina en la corteza cerebral de los vertebrados filogenéticamente superiores, se denomina también neocorteza (Martin, 1998). Asimismo, cada una de las capas corticales posee diferentes grupos de poblaciones celulares, mismas que se distinguen entre ellas por su tamaño y forma, sus aferentes y eferentes, así como por características fisiológicas como su patrón de disparo.

Cada una de las capas celulares en la neocorteza posee diferentes características anatómicas y funcionales. La capa I o capa molecular, contiene escasas células, numerosas fibras horizontales y las terminales de las células piramidales de capas subyacentes. La capa II o capa granular externa, la conforman pequeñas células granulares (GABAérgicas) y pequeñas neuronas piramidales (glutamatérgicas). Las dendritas apicales de estas neuronas piramidales se extienden hacia la capa I y sus axones descienden a capas inferiores, manteniendo principalmente conexiones cortico-corticales. La capa III o capa piramidal externa,

alberga principalmente una gradación de células piramidales de tamaño pequeño a mediano, las neuronas piramidales pequeñas se encuentran en la parte superficial de la capa III, mientras que las de mayor tamaño en la parte más profunda de esta capa. La capa IV o capa granular interna, la conforman casi exclusivamente células estrelladas espinosas y no espinosas, ambas categorizadas como células granulares. Esta capa es el estrato fundamental de la información sensorial ascendente del tálamo. La capa V o capa piramidal interna, alberga predominantemente células piramidales medianas y grandes. Las dendritas apicales de las piramidales medianas pueden llegar a extenderse hasta 2 capas hacia arriba, mientras que las dendritas de las piramidales grandes se extienden hasta la capa I. Estas mismas piramidales grandes son la principal fuente de eferentes corticales hacia el tálamo, la médula espinal, el estriado, etc. La capa VI o capa multiforme, aloja variedades de células de forma irregular, fusiformes o polimorfas y algunas células piramidales. Las dendritas de las células más grandes pueden extenderse hasta la capa I y aquéllas de células más pequeñas no llegan más allá de la capa IV. Los axones de las células de esta capa proyectan a blancos subcorticales como el tálamo y a otras regiones corticales como conexiones cortico-corticales. Figura 1. (Lynch, 2013; Valverde, 2002).

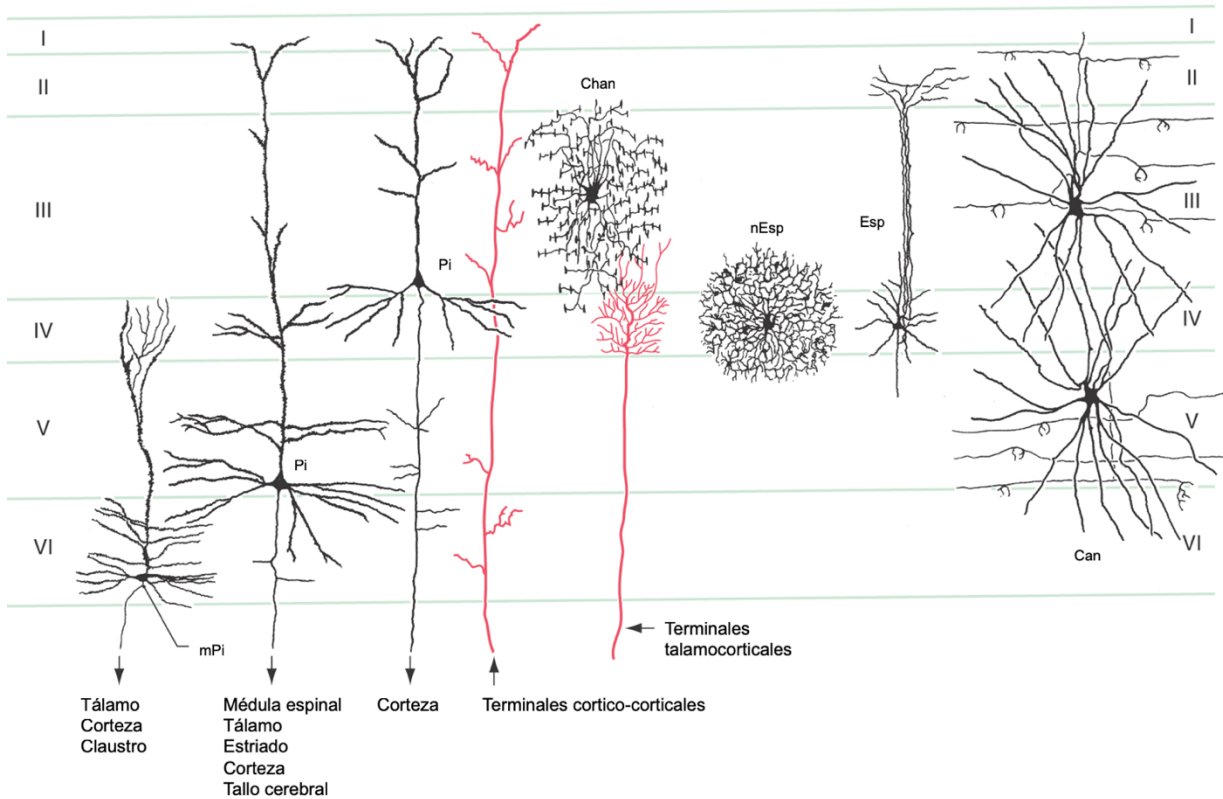


Figura 1. Tipos celulares y su distribución en las capas de la corteza cerebral. Las dendritas de las células piramidales (Pi) de las capas II, III y V se extienden hasta la capa I. Las dendritas de las células piramidales modificadas (mPi) en la capa VI se extienden solo hasta la capa IV. Las células en candelabro (Chan) se encuentran solo en la capa III. El soma de las neuronas estrelladas espinosas y no espinosas (Esp y nEsp, respectivamente) se encuentran en la capa IV, sin embargo, sus procesos se extienden hacia otras capas. Las células en canasto (Can) poseen procesos que se extienden hacia todas las capas desde sus somas que se encuentran en las capas III y V (Modificado de Lynch, 2013).

IV. 1. 2. Subdivisiones de la CPF

La CPF en primates ha sido subdividida en 3 principales áreas: orbital (CPFo), relacionada a funciones emocionales; medial (CPFm) de carácter visceral-motor y un área dorsolateral (CPFdl) de carácter cognitivo. Esta última es la más desarrollada en humanos, aporta un apoyo a la organización temporal del comportamiento, el habla y el razonamiento. A su vez esta organización temporal

se sirve de otras funciones que también están estrechamente relacionadas como la memoria de trabajo (Amodio y Frith, 2006; Fuster, 2001).

Por otra parte, con base en los estudios de Rose y Woolsey (1948) donde se define a la corteza prefrontal por sus conexiones recíprocas del tálamo mediodorsal, se pueden identificar diferentes regiones de la corteza prefrontal en la rata (Figura 2). La primera, es una división medio frontal, misma que puede subdividirse en una región dorsal que incluye a la corteza cingulada precentral (PrC) y anterior (ACg), así como un componente ventral que incluye a las cortezas prelímbica (PrL), infralímbica (IL) y orbital media (MO). La segunda es una región lateral que incluye las cortezas insular dorsal y ventral (AID, AIV respectivamente) y la corteza orbital lateral (LO). Finalmente, se puede delimitar una región ventral que comprende las cortezas orbital ventral y orbital ventrolateral (VLO) (Dalley et al., 2004).

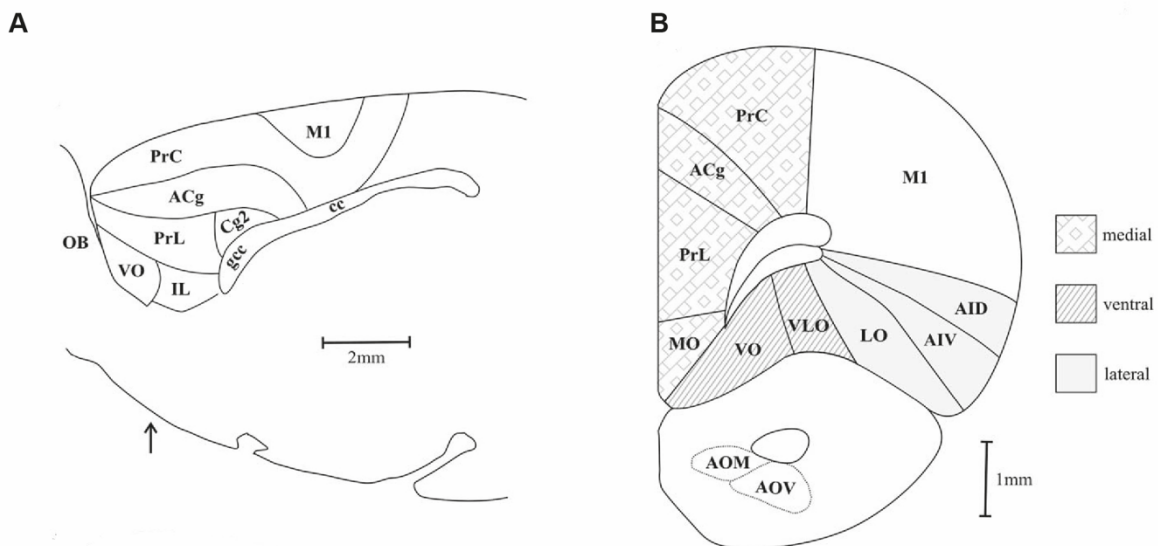


Figura 2. Diagrama de la PFC en rata. A) Sección sagital (tomada a 0.9 mm de la línea media). B) Sección coronal unilateral, -3.5 AP rostral a bregma (tomado de la zona representada por la flecha vertical en A). Los diferentes sombreados muestran tres subdivisiones de la corteza prefrontal (medial, ventral y lateral). AID y AIV, corteza insular dorsal y ventral; AOM y AOV, núcleo olfatorio anterior medial y ventral; cc, cuerpo calloso; ACg, corteza cingulada anterior; gcc, genu del cuerpo calloso; MO, LO, VLO y VO corteza orbital medial, lateral, ventrolateral y ventral; M1, área motora primaria; PrC, corteza precentral; OB, bulbo olfatorio; PrL, corteza prelímbica (Tomado de Dalley et al., 2004)

IV. 1. 3. Conexiones en la CPF

La CPF está fuertemente interconectada con muchas estructuras tanto corticales como subcorticales y por lo general se trata de conexiones recíprocas (Vázquez-Borsetti, 2008). Algunos autores han propuesto que esta característica de la CPF es la base de la memoria de trabajo ya que podría generar un sistema reverberante que mantendría activa la información por cortos periodos de tiempo, sobre todo teniendo en cuenta su relación con áreas corticales de asociación sensoriales y otras áreas tales como el hipocampo y la corteza entorrinal (Funahashi, 1989; Goldman-Rakic, 1995).

IV. 1. 4. Aferencias

A diferencia de las regiones temporal y posterior de la neocorteza, la PFC (así como las áreas premotoras) recibe aferentes altamente organizadas de los ganglios basales a través de las proyecciones estriatopalidales y estriatonigrales, y subsecuentemente proyecciones palidotálámicas y nigrotálámicas, mismas que a su vez proyectan a diferentes áreas de la corteza prefrontal (Groenewegen et al., 1997). Además de las conexiones talámicas, la PFC también recibe aferentes cortico-corticales, por ejemplo, de la corteza parietal posterior y de las áreas corticales sensoriales, así como también de la sustancia nigra, del área ventral tegmental, de la amígdala, del hipotálamo lateral y del hipocampo (Kolb, 1984; Groenewegen et al., 1997). Por otra parte, también hay conexiones recíprocas entre la CPF y las estructuras antes mencionadas, así como también, proyecciones directas del septum lateral, el mesencéfalo y regiones autonómicas del tallo cerebral (Groenewegen et al., 1997).

La mayoría de las estructuras cerebrales reciben proyecciones desde los núcleos aminérgicos del mesencéfalo, por su parte, la CPF recibe aferencias serotoninérgicas de los núcleos del rafé, noradrenérgicas del locus coeruleus, así como dopaminérgicas y GABAérgicas del área ventral tegmental (Carr y Sesack,

2000). Estos sistemas actúan en conjunto modulando en las redes corticales la transmisión sináptica inhibitoria y excitatoria.

IV. 1. 5. Eferencias

La información procesada por la CPF es transmitida a las estructuras corticales a través de las poblaciones de neuronas situadas en capas profundas, principalmente las neuronas piramidales de la capa V. En general, la mayoría de las eferencias de CPFm proceden de esta capa, una excepción son las proyecciones al tálamo (que se encuentran mayoritariamente en la capa VI), a la amígdala basolateral, al estriado y al núcleo accumbens que, además de recibir proyecciones de la capa V, también reciben proyecciones de la capa II (Gabbott et al., 2005).

A nivel subcortical, la CPF proyecta a los ganglios basales, al tálamo, al hipotálamo, a la habénula, a los núcleos aminérgicos del mesencéfalo (rafé, locus coeruleus, área ventral tegmental, núcleo tegmental laterodorsal), a la amígdala y al hipocampo (Groenewegen et al., 1997; Groenewegen y Uylings, 2000). Por su parte, los ganglios basales y el cerebelo se especializan en secuenciar la información que permite la ejecución de diferentes acciones, como hábitos y lenguaje (Graybiel, 2008). De esta forma, los núcleos talámicos reciben información filtrada a través de los ganglios basales y el cerebelo para transmitirla a la corteza prefrontal. Estas vías facilitan la transmisión fluida de pensamientos y acciones en una amplia gama de operaciones, desde rutinas simples hasta procesos cognitivos complejos atribuidos a la corteza prefrontal (Barbas, 2015).

Por su parte, la CPFm presenta una amplia diversificación de proyecciones, por ejemplo, el área infralímbica proyecta al séptum lateral, al núcleo del lecho de la estría terminal, al núcleo preóptico lateral y medial, a la sustancia innominada y al núcleo endopiriforme del cerebro anterior, a los núcleos medial, basomedial y lateral de la amígdala, al hipotálamo y a los núcleos parabaraquial y solitario del tallo cerebral. En el caso del área prelímbica, ésta emite escasas proyecciones a

estas estructuras salvo en el caso de la amígdala basolateral. Los blancos más abundantes para las proyecciones desde el área prelímbica son la corteza agranular insular, el claustrum, el núcleo acumbens, el bulbo olfatorio, los núcleos paraventricular, mediodorsal y reuniens del tálamo, la parte capsular del núcleo central de la amígdala y los núcleos mediales y dorsales del rafe. De esta forma el patrón de proyecciones del área infralímbica sugiere una importante función en el control visceral de forma similar a lo observado para la corteza prefrontal orbitomedial de los primates, mientras que el área prelímbica proyecta a áreas más relacionadas con funciones cognitivas por lo que podría tener homología con la corteza dorsolateral de los primates (Hurley et al., 1991; Vertes, 2004).

IV. 1. 6. Funciones

Como se mencionó anteriormente, la CPF participa en una gran cantidad de procesos, principalmente cognitivos, como la memoria operativa o de trabajo, en las funciones ejecutivas, en la toma de decisiones, la planificación del comportamiento y el procesamiento de señales emocionales (Brown y Bowman, 2002; Passetti et al., 2002).

En particular se conoce que la capacidad de mantener la actividad sostenida de un grupo de neuronas es la base de la memoria a corto plazo o memoria de trabajo, misma que tiene la función de retener provisionalmente información durante periodos cortos de tiempo (del orden de segundos) para llevar a cabo una acción posterior (Grace et al., 2007).

Por otra parte, se ha visto que la CPF, en particular la región medial, participa tanto en procesos cognitivos como visceromotores (Uylings et al., 2003), estando estrechamente relacionada con el sistema de recompensa y la toma de decisiones comparativas (Groenewegen et al., 1997) así como en la organización temporal de la conducta. Ratas con lesiones en esta área se ven afectadas en las tareas que requieren varias respuestas conductuales para llevarse a cabo secuencialmente (Kolb, 1990).

La corteza orbitofrontal, por su parte, al estar estrechamente relacionada con el sistema límbico participa en la modulación de la intensidad de las respuestas emocionales. Se ha visto que las lesiones en esta zona producen desinhibición e impulsividad en los individuos (Winstanley et al., 2004).

IV. 2. GABA

El ácido gama amino-butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso de vertebrados. El principal precursor de la síntesis de GABA es la glucosa, misma que es metabolizada a glutamato por enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sin embargo, tanto el piruvato como la glutamina pueden también actuar como precursores. La enzima glutamato descarboxilaza (GAD) se encuentra casi exclusivamente en las neuronas GABAérgicas y cataliza la conversión de glutamato a GABA (Purves et al., 2004). La GAD existe en 2 isoformas, GAD₆₅ y GAD₆₇ de acuerdo a su peso molecular (65 y 67 KDa), así como también a sus diferentes propiedades catalíticas, cinéticas y su diferente localización subcelular (Walls et al., 2010). Posteriormente, el GABA sintetizado es empaquetado en vesículas sinápticas por medio de un transportador vesicular. Estas proteínas participan en el transporte activo del GABA desde el citosol hacia las vesículas secretoras dentro de la célula (Martin y Olsen, 2000).

La liberación de GABA en el espacio sináptico es estimulada por la despolarización de la terminal presináptica y por un mecanismo dependiente de calcio. El GABA liberado difunde a través del espacio sináptico a los receptores en la membrana postsináptica. La acción del GABA en la sinapsis finaliza mediante su recaptura en las terminales presinápticas y en las células gliales vecinas. El GABA recapturado en las terminales nerviosas está disponible para su reutilización; por otra parte, el GABA que se recaptura por la glía es metabolizado a succinato semialdehído por la GABA-transaminasa (GABA-T) y no puede resintetizarse GABA ya que las células gliales no poseen GAD, por lo que el GABA en la glía entra al ciclo de Krebs para la formación de glutamina, misma que se transfiere de vuelta a la neurona, donde por acción de la glutaminasa es convertida a glutamato para iniciar nuevamente el ciclo (Siegel et al., 1999).

IV. 2. 1. Receptores a GABA

La inhibición sináptica en el sistema nervioso central es en gran parte debida a la señalización por GABA (Jacob et al., 2008), esta inhibición es la que modula cada una de las funciones cerebrales en los vertebrados.

La acción rápida inhibitoria del GABA en el cerebro es mediada por la activación de los receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_C, mientras que la señalización más lenta y prolongada es mediada a través de los receptores metabotrópicos GABA_B acoplados a proteínas G (Jacob et al., 2008). La principal acción del GABA (mediada por el receptor GABA_A) es aumentar la permeabilidad de la membrana a iones de cloro y bicarbonato. En la mayoría de las neuronas maduras ésto lleva a un flujo entrante de aniones y a una respuesta postsináptica hiperpolarizante o potencial postsináptico inhibitorio (IPSP) (Farrant y Nusser, 2005).

IV. 2. 2. Receptores GABA_A

Los receptores GABA_A pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando a la cual también pertenecen los receptores colinérgicos nicotínicos, los serotoninérgicos tipo 5-HT₃ y los receptores a glicina. Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia son heteropentámeros ensamblados por diferentes subunidades que comparten una estructura en común: un dominio extracelular amino terminal y 4 dominios transmembranales (TMs), con un largo dominio intracelular entre TM3 y TM4 (Jacob et al., 2008). Se han identificado hasta 19 subunidades del receptor a GABA_A agrupadas en 8 familias (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, ρ 1-3, π , ϵ , δ y θ) (McKernan y Whiting, 1996). Aun cuando la gran diversidad estructural de los receptores a GABA es determinada por splicing alternativo de algunos RNA mensajeros del receptor, la mayoría de los receptores GABA_A se componen principalmente por 2 subunidades α , 2 subunidades β y una γ o δ (Jacob et al., 2008).

La activación de los receptores GABA_A por altas concentraciones de GABA (1.5-3 mM, Jensen et al., 2003), liberado por vesículas presinápticas, promueve un incremento rápido en la conductancia de cloro a través de la membrana, lo que da lugar a una inhibición rápida o fásica (Glykys y Mody, 2007; Farrant y Nusser, 2005). Asimismo, el GABA liberado de las vesículas sinápticas puede difundir desde el espacio sináptico y activar receptores alejados de los sitios de liberación en la misma célula o en células vecinas. A la difusión del GABA hacia zonas alejadas de la sinápsis o extrasinápticas se le conoce como “spillover”. Los receptores GABA_A extrasinápticos se activan a concentraciones más bajas que aquellos que se encuentran en el espacio sináptico y dan lugar a corrientes inhibitorias tónicas o persistentes (Farrant y Nusser, 2005).

IV. 2. 3. Inhibición fásica

La inhibición fásica (sináptica) mediada por receptores GABA_A sinápticos es producida por altas concentraciones de GABA (0.3–1.0 mM) mismas que tienen un lapso de vida corto en el espacio sináptico (<1 ms) (Mody y Pearce, 2004). Este incremento en la concentración de GABA en el espacio sináptico y la unión a sus receptores dispara la apertura de los canales iónicos. La activación de receptores a GABA produce corrientes inhibitorias rápidas y de corta duración que se conocen como IPSCs (Pouille and Scanziani, 2001). Posteriormente, el GABA es recapturado por la glía o las propias terminales o difunde rápidamente fuera del espacio sináptico (Farrant y Nusser, 2005).

Una de las principales funciones de la inhibición fásica es la de prevenir la sobreexcitación neuronal y por lo tanto, evitar el desarrollo de estados patológicos en la actividad de las redes neuronales. Otra de las principales funciones de la inhibición fásica es la de generar y regular la actividad sincrónica de diferentes poblaciones neuronales, principalmente en el hipocampo (Jonas et al, 2004).

Los receptores GABA_A sinápticos poseen comúnmente en su conformación subunidades γ . En particular, la subunidad $\gamma 2$ le confiere al receptor sensibilidad a las benzodiazepinas (Mody y Pearce, 2004). En el receptor GABA_A sináptico, las subunidades γ están asociadas con subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) y β . Figura 3. (Brünig et al., 2002).

IV. 2. 4. Inhibición tónica

Los receptores GABA_A que median la corriente tónica inhibitoria, contienen las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ o δ ($\alpha 6\beta\gamma\delta$, $\alpha 4\beta\gamma\delta$ and $\alpha 5\beta\gamma 2$) y se encuentran predominante o exclusivamente en espacios extrasinápticos (Figura 3), (Farrant y Nusser, 2005). Estos receptores GABA_A extrasinápticos poseen una alta afinidad ya que son activados por concentraciones ambientales de GABA muy bajas (en el rango nanomolar). El GABA ambiental se define como el remanente de GABA presente en el espacio extracelular después de que la mayor parte ha difundido o ha sido recapturado por la glía y las terminales axónicas (Nyitrai et al., 2006).

Al activar a los receptores de GABA_A extrasinápticos, el GABA ambiental genera una corriente inhibitoria tónica o persistente (Isaacson et al., 1993) que puede actuar como un mecanismo homeostático, permitiendo el incremento de la inhibición durante periodos de sincronización en la actividad de las redes neuronales (Farrant y Nusser, 2005). Esta corriente tónica es escasa durante el desarrollo, volviéndose más evidente en el animal adulto (Brickley et al., 1996). De hecho, en el animal desarrollado, la corriente tónica representa una mayor proporción del total de la corriente activada por el receptor GABA_A en comparación con aquella mediada por la actividad sináptica espontánea (Brickley et al., 1996; Walker y Semyanov, 2007). Ésto debido principalmente a las diferencias en la expresión del receptor a GABA durante el desarrollo así como también a los cambios en su conformación, mecanismos de liberación de GABA y recaptura (Walker y Semyanov, 2007).

Usualmente, la corriente tónica presenta baja amplitud y una fase de decaimiento mucho más lenta que aquella mediada a través de los receptores GABA_A sinápticos. Asimismo, se ha observado que muestra poca o nula desensibilización (Farrant y Nusser, 2005). Estas propiedades biofísicas de los receptores GABA_A extrasinápticos proveen a la neurona de un persistente control inhibitorio que a su vez permite la regulación de la excitabilidad de las redes neuronales y del procesamiento de la información (Semyanov et al., 2003; Scimemi et al., 2005).

La corriente tónica participa en diferentes procesos fisiológicos tanto a nivel de neuronas individuales como a nivel de redes neuronales. Los efectos de la activación tónica de receptores GABA_A depende del lugar donde estos se sitúen en la neurona. La activación tónica de receptores GABA_A en la presinapsis puede regular la liberación del neurotransmisor, a nivel axonal puede cambiar el umbral del potencial de acción (Kullmann et al. 2005) y a nivel somático pueden regular el procesamiento de la información (Chance et al. 2002). Por otra parte, la corriente tónica promueve un incremento de la inhibición por corto-circuito “shunting inhibition”, así como también disminuye la constante de tiempo de la membrana e incrementa el ruido basal (Mitchell and Silver 2003).

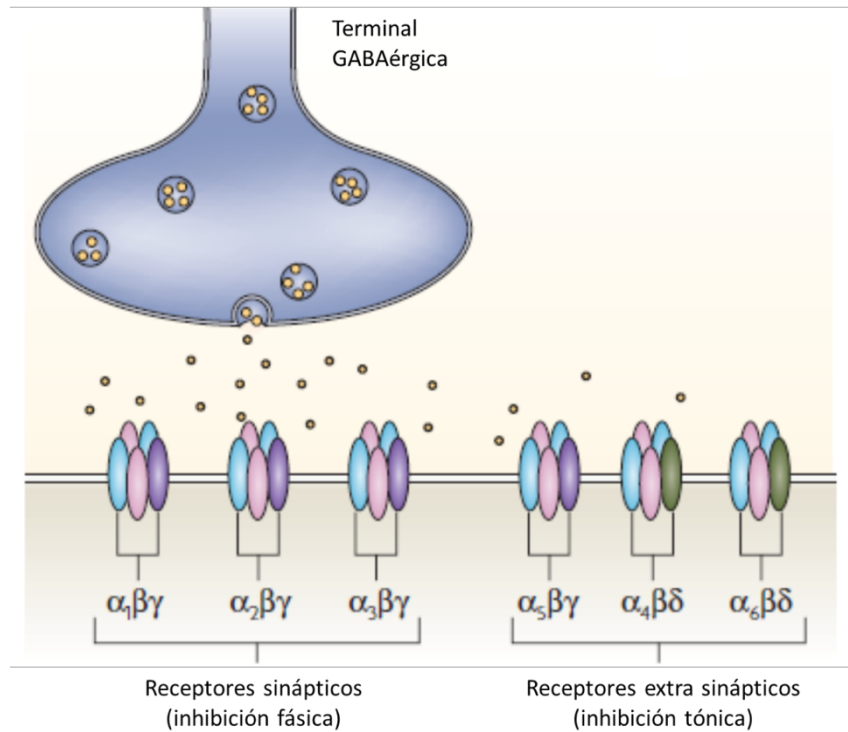


Figura 3. Localización de los receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos. Los receptores GABA_A sinápticos se ubican delimitadamente en la postsinapsis donde se alcanza la mayor concentración del neurotransmisor liberado. Por otra parte, los receptores GABA_A extrasinápticos se encuentran fuera del espacio sináptico donde el neurotransmisor llega a muy baja concentración, sin embargo, dada la alta afinidad de estos receptores, dichas concentraciones son suficientes para activar los receptores extrasinápticos y generar la respuesta tónica (Tomado de Jacob et al., 2008).

IV. 3. Insulina

La insulina es una hormona de 5.8 KDa, secretada por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre. Su principal función mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal (80-105 mg/dl), favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en el músculo y en el tejido adiposo, mientras que en hígado favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. La insulina, además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Olivares y Arellano, 2008).

En las células β pancreáticas la insulina es sintetizada como pre-proinsulina y procesada en el retículo endoplásmico a proinsulina. La proinsulina es posteriormente procesada a insulina y péptido-C para ser almacenada en gránulos de secreción (Fu et al., 2013). Cuando la concentración de glucosa en plasma aumenta, la captación de glucosa y el metabolismo de la célula beta pancreática aumentan. Algunos productos del metabolismo de la glucosa provocan el cierre de los canales K_{ATP} . Esta reducción en la permeabilidad de K^+ de la membrana hace que la membrana de las células β se despolarice, debido a que el flujo hacia el exterior de los iones K^+ , es ahora más pequeño que la corriente interna del fondo. Como consecuencia del cambio en el potencial de membrana, los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje se abren, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y estimulando la liberación de insulina (Ashcroft y Gribble, 1999).

Una vez liberada a la circulación, la insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor a insulina pertenece a la subfamilia de receptores con actividad tirosina cinasa, es un heterotetrapentámero compuesto por dos subunidades α y dos β que funcionan como enzimas alostéricas, donde las subunidades α inhiben la actividad tirosina cinasa de las subunidades β (Patti y Kahn, 1998). Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen los sitios de unión

a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular, en donde se localiza el dominio con actividad de tirosina cinasa (Olivares y Arellano, 2008). Una vez que la insulina se une a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de tirosina (Youngren, 2007).

IV. 3. 1. Vías de señalización de la insulina

IV. 3. 1. 1. Vía de señalización de las MAP cinasa (MAPK)

Los efectos de la insulina en la regulación de la expresión génica y en la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK. Esta vía de señalización inicia por la fosforilación en residuos de tirosina del sustrato del receptor a insulina (IRS) y/o de la proteína Shc (subtipo de sustrato del receptor a insulina), que a su vez interactúa con el complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar la proteína Ras GTPasa (Saltiel y Kahn, 2001; Olivares y Arellano, 2008).

La activación de Ras GTPasa inicia el encendido de la cascada de las MAPK. La Ras GTPasa se une y activa a Raf-1 (MAP3K) para subsecuentemente llevar a la fosforilación y activación de la vía que involucra el reclutamiento y activación de MEK 1/2 (MAPK/ERK cinasa 1 y 2) y en consecuencia de las ERK1 y ERK2 (MAPK) (Meister et al., 2013; Avruch, 1998). Una vez que se ha activado ERK, se transloca hacia el núcleo, donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción, iniciando un programa transcripcional que permite la proliferación y la diferenciación celular (Boulton et al., 1991) (Figura 4).

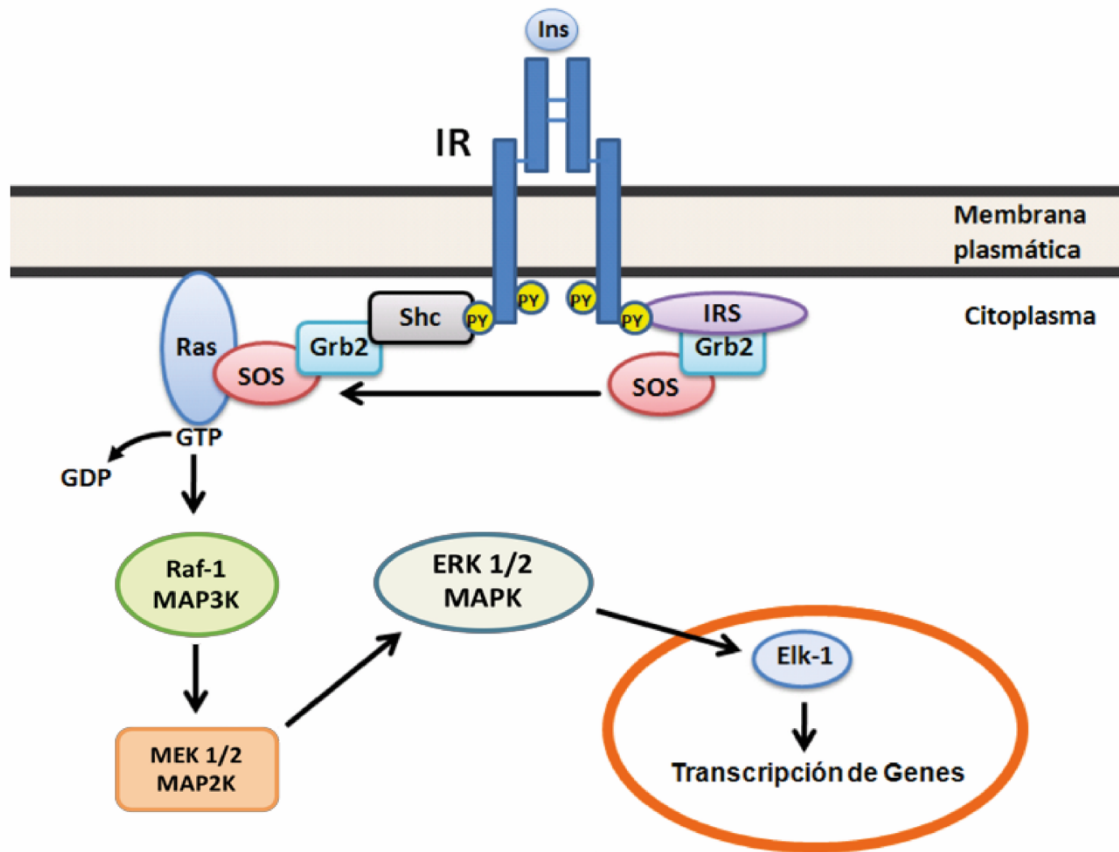


Figura 4. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras, la cual a su vez inicia el encendido de la cascada de las MAPK. Ras GTPasa y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2 (Modificado de Olivares y Arellano, 2008).

IV. 3. 1. 2. Vía de señalización de la PI3K/Akt

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y es autofosforilado, hay una fosforilación de los IRS, esto permite la asociación de los IRS (de los cuales se conocen IRS1-4) con las subunidades reguladoras de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) a través de su dominio SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src) (Bevan, 2001) que funciona como proteína adaptadora.

Las PI3Ks, son heterodímeros conformados por una subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ó p55PIK) y una subunidad catalítica (p110 α , p110 β o

p110 δ). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales permiten su unión a las proteínas IRS-1. La interacción entre ambas proteínas permite la activación de la subunidad catalítica de la PI3K. A consecuencia de ello, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados generando los productos PIP2 (PI3,4-bisfosfato) y PIP3 (PI3,4,5- trisfosfato), respectivamente. El PIP3 sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y Akt o proteína cinasa B (PKB) (Engelman et al., 2006).

La activación de la PKB regula varios efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de diferentes sustratos que median la respuesta a la insulina, incluyendo a la enzima glucógeno sintasa (GS), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la fosfofructocinasa 2 (PFK2), la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD) (Myers y White, 2002). De entre estos efectos destaca la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; la inhibición de GSK3 por PKB favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno. Por otra parte, la activación de la PKB también promueve la translocación de las vesículas del transportador de glucosa GLUT-4 (en músculo y en tejido adiposo) del citoplasma a la membrana plasmática, donde permite la entrada de glucosa a la célula, así como también promueve a través de otras cinasas como mTOR la síntesis de proteínas (Bevan, 2001) (Figura 5).

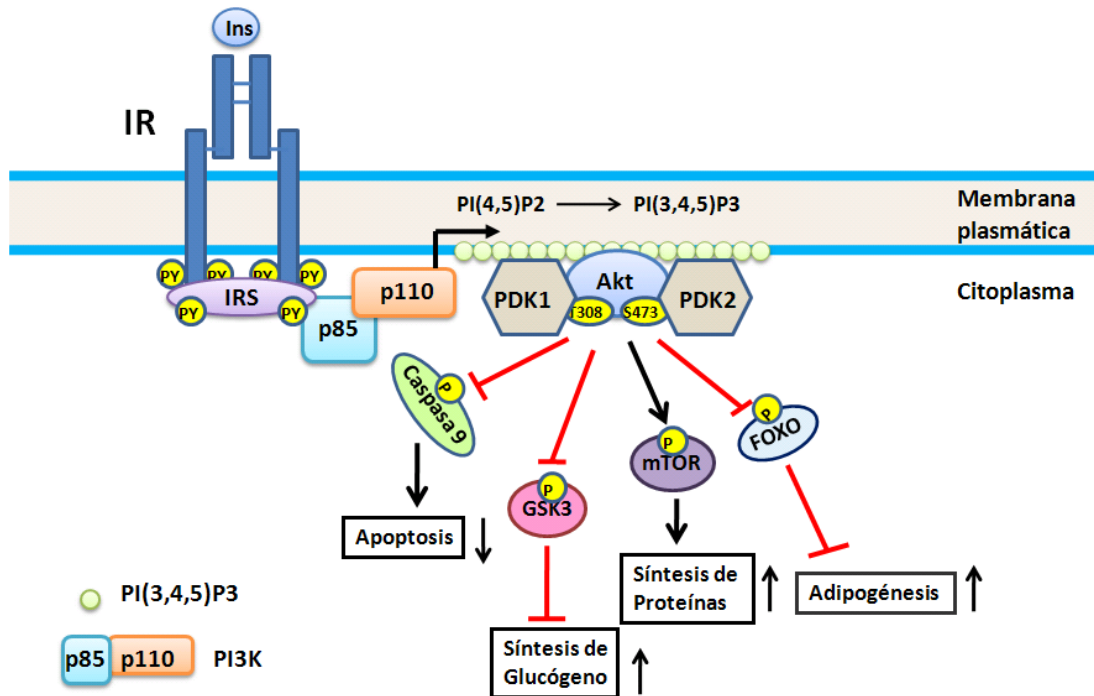


Figura 5. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. El IR activo y autofosforilado, activa al IRS el cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 promueve la activación de p110 y p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P3, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. Ésta última regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de modular la activación de diferentes sustratos que propagan su respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9. (Tomado de Olivares y Arellano, 2008).

IV. 3. 2. La insulina en el cerebro

Durante mucho tiempo se consideró al cerebro como un órgano insensible a la insulina ya que la captación de glucosa en éste no se ve afectada por los niveles de dicha hormona, dado que no es necesaria para la expresión de transportadores de glucosa (Ghasemi et al., 2013). Si bien hay evidencia de la expresión y actividad del transporte de glucosa con el transportador GLUT4 sensible a la insulina en algunos núcleos cerebrales (en donde coincide con el receptor de insulina) se encuentra en menor proporción ya que en el tejido nervioso las isoformas más abundantes son el transportador GLUT1 y GLUT3. El primero se encuentra en las células endoteliales de los capilares, así como en los astrocitos, mientras que el GLUT3 es la isoforma predominante en las neuronas (Vannucci et al., 1998); sin embargo, ninguna de éstas presenta translocación por la acción de la insulina (Ghasemi et al., 2013; McEwen y Reagan, 2004). Ya que la insulina no es necesaria para el transporte de glucosa en la mayoría de las células cerebrales, ésta desempeña un papel como péptido neuroregulador. Mientras algunos trabajos sugieren que puede existir síntesis de insulina a nivel cerebral (Deltour et al., 1993; Mehran et al., 2012; Molnár et al., 2014), el aporte pancreático es la fuente principal que promueve la señalización de insulina en el cerebro (Gray y Barrett, 2018).

La insulina periférica es transportada al cerebro a través de una vía saturable mediada por el transportador de insulina en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Baura et al., 1993). Este mecanismo permite al transportador llevar a la molécula de insulina de un lado al otro de la célula por un mecanismo llamado transcitosis (Banks, 2004; Begg, 2015). Por lo tanto, el transporte normal de la insulina periférica al SNC sigue un modelo de tres compartimentos, del plasma al líquido intersticial del cerebro y de ahí al líquido cefalorraquídeo (Schwartz et al, 1992; Banks, 2004). Por otra parte, la insulina puede eliminarse del SNC por reabsorción del líquido cefalorraquídeo hacia el plasma o bien degradarse por enzimas dentro del SNC, como la enzima degradadora de insulina (Begg, 2015).

IV. 3. 3. Funciones de la Insulina en el SNC

IV. 3. 3. 1. Ingesta de alimentos y balance energético.

La región hipotalámica más importante en el control de la ingesta y el gasto energético es el núcleo arqueado ya que constituye el punto primario de integración de las señales relacionadas con el hambre y la saciedad procedentes de la periferia. Estas señales son nutrientes y factores hormonales, cuya concentración en la sangre es dependiente del estado nutricional (Niswender et al., 2003). El núcleo arqueado contiene dos subpoblaciones celulares: 1) neuronas que estimulan efectos de tipo anabólico, mismas que producen sustancias con acción orexigénica: el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP); suelen denominarse neuronas NPY/AgRP (Niswender et al., 2004). 2) neuronas que estimulan el catabolismo, ya que producen péptidos anorexigénicos: la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) proveniente de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART); se les denomina neuronas POMC/CART. Las neuronas del núcleo arqueado proyectan fibras que finalizan sobre otras neuronas, situadas en diferentes núcleos hipotalámicos: paraventricular, ventromedial, etc. Estas fibras permiten la llegada de todos esos péptidos a dichos núcleos, un proceso necesario para que induzcan sus efectos orexigénicos y anorexigénicos (Benoit et al., 2002; Berthoud, 2002; Mendieta-Zerón et al., 2007). Además, entre las dos subpoblaciones del núcleo arqueado existen conexiones en ambas direcciones, gracias a lo cual la estimulación de las neuronas anabólicas provoca la inhibición de las catabólicas y viceversa (Jobst et al., 2004).

Las dos subpoblaciones neuronales del núcleo arqueado poseen receptores a insulina y a leptina; por lo tanto, son sensibles a ambas hormonas (Schwartz, 1996). Los efectos de ambas son aumentar la actividad de las neuronas catabólicas (anorexigénicas) e inhibir la actividad de las neuronas anabólicas (orexigénicas). En consecuencia, cuando los niveles de insulina son bajos (ayuno) y disminuye el nivel de ocupación de sus receptores en el núcleo arcuado, se incrementa la producción

de péptidos orexigénicos (NPY, AgRP), mientras que se inhibe la síntesis de los anorexigénicos (α -MSH, CART); como consecuencia se promueve la sensación de hambre. Por el contrario, cuando los niveles de insulina son altos (estado postprandial), la tasa de producción de ambos tipos de péptidos cambia en sentido opuesto al descrito, de modo que aparece la sensación de saciedad (Benoit et al., 2002; Niswender et al., 2004). Es importante destacar que la insulina, que se comporta como hormona anabólica en los tejidos periféricos, actúa como un factor catabólico sobre el SNC (Mendieta-Zerón et al., 2007).

IV. 3. 3. 2. Glucorregulación

El metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo está coordinado por el cerebro (Schwartz et al., 1992) y depende de la acción eficaz de la insulina en éste. La insulina modula el metabolismo de la glucosa periférica principalmente a través de RI localizados en el hipotálamo (Pocai et al., 2005), donde la regulación del sistema nervioso autónomo también es crucial (Alquier y Kahn, 2004). Se ha visto que la administración central de insulina mejora su sensibilidad de forma remota en los tejidos periféricos asociada a una disminución en la producción de glucosa hepática (Pocai et al., 2005; Alquier y Kahn, 2004). Se requiere un mecanismo de señalización de insulina hipotalámico intacto para el efecto de la insulina sistémica en la inhibición de la producción de glucosa endógena. Tras deficiencias de la señalización insulínica hipotalámica, la subsecuente disminución de la sensibilidad hepática a la insulina circulante estimula la producción de glucosa hepática (Obici et al., 2002).

IV. 3. 3. 3. Reproducción

Estudios clínicos han evaluado la asociación de la obesidad con condiciones infértiles (Legro et al, 1998; Franks et al., 1999) y han identificado un vínculo potencial entre el metabolismo y las funciones reproductivas. Los ratones NIRKO (neuronal insulin receptor-knock-out) muestran una obesidad leve sensible a la dieta y una fertilidad reducida debido a una alteración de la hormona luteinizante (Brüning

et al., 2000). De manera similar, los ratones que carecen del subtipo de receptor a insulina IRS-2 en todos los tejidos, incluido el cerebro, son obesos y tienen ovarios pequeños y anovulatorios con un número reducido de folículos como consecuencia de un desarrollo hipofisario deficiente y una insuficiencia gonadotrófica (Burks et al., 2000). Estas observaciones indican que el RI tiene un importante papel funcional en el SNC con respecto a la regulación de la fisiología reproductiva. Esto ha sido corroborado por resultados que muestran que tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) tienen un efecto estimulante sobre la producción de la hormona liberadora de gonadotropina en células hipotalámicas tanto in vitro como in vivo (Kovacs et al., 2002; Burcelin et al., 2003).

IV. 3. 3. 4. Memoria

La presencia de insulina y de sus receptores en regiones cerebrales que intervienen en procesos cognitivos sugiere que ésta hormona ejerce algún tipo de acción sobre las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Derakhshan y Toth., 2013). Por ello se han estudiado en particular la corteza y el hipocampo, sobre todo este último ya que es determinante para la consolidación de acontecimientos y pautas de conducta en la memoria. Se ha observado que la administración de insulina por vía intracraneal en el tercer ventrículo promueve un aumento en la capacidad para retener y consolidar pautas de conducta previamente aprendidas en ratas (Park et al., 2000). También en estos animales se ha visto que algunas tareas de memoria conllevan un incremento en la expresión del receptor de insulina y de su vía de señalización en el hipocampo (Zhao et al., 1999; Dou et al., 2005). Por otra parte, se sabe que las pérdidas de memoria derivadas de lesiones isquémicas en el hipocampo pueden evitarse mediante la administración de insulina (Voll et al., 1989). También se ha visto que administración de insulina intranasal mejora la memoria tanto en humanos sanos como en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Reger et al., 2006). Si bien la administración de insulina sistémica a ancianos no diabéticos presenta riesgos de hipoglucemia, el suministro intranasal dirige la insulina al cerebro, evitando los efectos secundarios sistémicos. En pacientes con

enfermedad de Alzheimer, la insulina intranasal mejora la atención, la memoria y la función cognitiva en los 21 días posteriores al inicio del tratamiento intranasal (Reger et al., 2008).

V. Antecedentes

Desde hace tiempo se sabe que la insulina en el SNC funciona, no sólo como un regulador de la homeostasis cerebral, sino también como un neuromodulador. Uno de los efectos de la insulina que ha suscitado mayor interés es la modulación de receptores de GABA. Palovcick y colaboradores en 1984 observaron que la aplicación de insulina, en concentraciones dentro del rango nanomolar, causaba una inhibición del disparo espontáneo en neuronas del hipocampo. Posteriormente, se demostró que este efecto se debe a un aumento en la expresión de los receptores de GABA_A sinápticos en la membrana de las neuronas hipocámpales, lo cual resulta en un incremento de las corrientes postsinápticas inhibitorias de GABA (Figura 6) (Wan et al., 1997). A su vez, se ha caracterizado la activación de mecanismos de señalización intracelulares que promueven la fosforilación de los receptores GABA_A sinápticos mediante la activación de cinasas como la PI3K, que se encuentran en la vía de señalización de la insulina. Se sabe, que estos mecanismos de señalización están involucrados en la translocación de receptores GABA_A sinápticos desde citosol a la membrana celular (Wan et al., 1997; Ma et al., 2003; Vetiska et al., 2007).

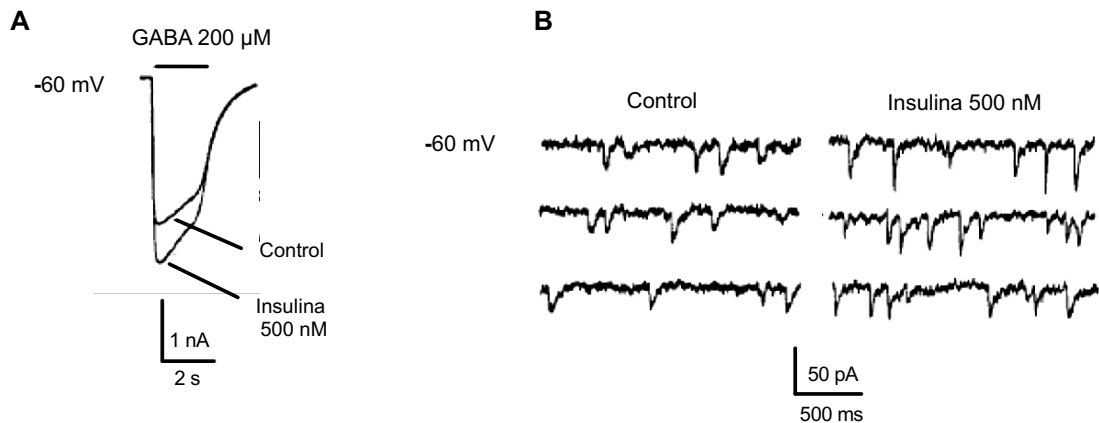


Figura 6. Potenciación por insulina de las corrientes activadas por GABA_A en cultivos de neuronas de hipocampo. A) Trazos de corriente inducida por aplicación de GABA antes (control) y 10 minutos después de la aplicación de insulina 500 nM en configuración de parche perforado. Se observa como la insulina potencia las corriente activada por GABA. B) Registros de mIPSC mediados por GABA_A antes (control) y 8 minutos después de la aplicación de insulina (500 nM) (Tomado de Wan et al., 1997).

Por otra parte, se ha sugerido que la insulina también puede promover la expresión de receptores GABA_A extrasinápticos en las neuronas CA1 del hipocampo, las cuales normalmente no exhiben corriente tónica inhibitoria en animales adultos (Figura 7) (Jin et al., 2011).

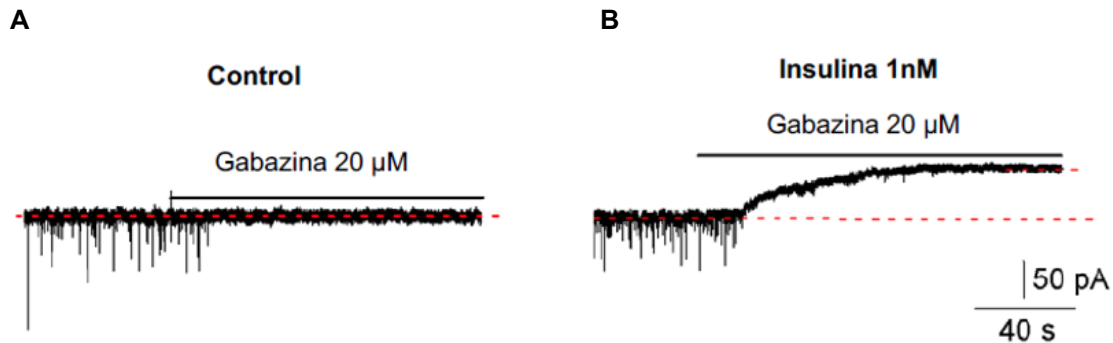


Figura 7. La insulina promueve la generación de la corriente tónica inhibitoria en neuronas de hipocampo. A) Trazo de corriente en condiciones control. Se observa como a la aplicación de gabazina 20 μM hay un bloqueo de las IPSC (componente fásico). B) Trazo de corriente de rebanada previamente incubada con insulina 1 nM durante 2 horas. La aplicación de gabazina 20 μM no solo bloquea el componente fásico sino que genera un desplazamiento en la corriente de mantenimiento, revelando el componente tónico inducido por la acción de la insulina (Tomado de Jin et al., 2011).

Además de lo anterior, otros trabajos han reportado que la insulina puede modular diversos canales iónicos incluyendo canales de potasio (Bowlby et al., 1997; Fadool et al., 2000), de calcio (Viard et al., 2004; Toledo et al., 2012) y de sodio (Lu et al., 2012). Todos estos hallazgos han llevado a especular que la insulina podría alterar funciones cerebrales y regular procesos cognitivos tales como el aprendizaje y la memoria (Crestani et al., 2002; Caraiscos et al., 2004; Pavlov et al., 2009; Martin et al., 2010). En apoyo a esta idea, se ha demostrado que alteraciones en la señalización insulínica incrementan el riesgo de padecer enfermedades como demencia y Alzheimer (Rönnemaa et al., 2008). Asimismo, se han encontrado déficits cognitivos en ciertos pacientes diabéticos (Seaquist, 2010) así como una baja en los niveles de la actividad beta cerebrocortical en pacientes con sobrepeso que presentan resistencia a la insulina (Tschritter et al., 2007). En otros estudios ha encontrado una asociación entre la aparición de crisis epilépticas y deficiencias en la señalización insulínica (Verrotti et al., 2008; Ramakrishnan y Appleton, 2012).

Cabe señalar, que la mayoría de los estudios de los efectos de la insulina sobre la expresión de receptores GABA_A han sido realizados en líneas celulares (células HEK) o en neuronas cultivadas, especialmente del hipocampo. Sin embargo, se sabe que existe una alta densidad de receptores a insulina en otras estructuras incluyendo el bulbo olfatorio, el cerebelo y la neocorteza (Havrankova et al., 1981; Hill et al., 1986; Werther et al., 1987).

En el presente trabajo, se investigaron los efectos de la insulina sobre la modulación de las corrientes tónicas inhibitorias mediadas por receptores de GABA_A extrasinápticos en la corteza prefrontal, un área cerebral asociativa involucrada en procesos cognitivos, sensoriales y emocionales.

Por otra parte, se ha demostrado que la corriente tónica, mediada por receptores GABA_A extrasinápticos contribuye en mayor proporción a la transmisión sináptica inhibitoria en comparación con la contribución de la corriente fásica ejercida a través de receptores GABA_A sinápticos. Además, los receptores GABA_A extrasinápticos, son posiblemente los sitios de acción más importantes de diversos fármacos como las benzodiazepinas y los anestésicos generales puesto que son activados por concentraciones muy bajas de GABA (Olsen y Sieghart, 2009).

El nivel de inhibición tónica en diversas áreas cerebrales puede variar dependiendo de las concentraciones locales de GABA ambiental y la expresión de receptores extrasinápticos GABA_A (Walker y Semyanov, 2007; Rossi et al., 2003; Semyanov et al., 2003; Brickley et al., 1996).

Considerando que la corriente tónica juega un papel crucial en la regulación de la excitabilidad de las redes neuronales y del procesamiento de la información (Semyanov y cols., 2003; Scimemi y cols., 2005), el estudio de su modulación por insulina y los mecanismos implicados en dicha modulación en la corteza prefrontal son de gran importancia clínica y fisiológica.

VI. Justificación

La modulación de la inhibición tónica en neuronas del hipocampo permite la regulación de diversos procesos cognitivos (Crestani et al., 2002; Caraiscos et al., 2004; Pavlov et al., 2009; Martin et al., 2010). Sin embargo, se desconoce si la insulina tiene un efecto modulador en otras áreas cerebrales donde se ha observado la presencia de receptores a insulina, como la corteza prefrontal (Havrankova et al., 1981), un área determinante no sólo en el desempeño de tareas cognitivas, sino en el procesamiento de la información sensorial y las emociones entre otras funciones. El estudio es de gran importancia fisiológica y clínica ya que ayudaría dilucidar la manera en que la insulina modula la excitabilidad de las neuronas individuales y los circuitos neuronales cerebrales. Esto podría ayudar a entender la asociación que se ha encontrado entre la diabetes infantil y la manifestación de crisis epilépticas (Verrotti et al, 2012; Ramakrishnan y Appleton, 2012; Yun y Xuefeng, 2013). Particularmente, sus efectos en la CPF permitirían explicar el deterioro de las habilidades cognitivas asociadas a las alteraciones de la señalización insulínica.

VII. Hipótesis

Si las neuronas de la capa V-VI de la CPF poseen receptores a insulina, ésta incrementará la corriente tónica inhibitoria mediada por receptores GABA_A en las neuronas piramidales reduciendo su excitabilidad.

VIII. Objetivos

VIII. 1. Objetivo General

Estudiar el efecto modulador de la insulina sobre las corrientes tónicas mediadas por receptores GABA_A extrasinápticos en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de la rata.

VIII. 2. Objetivos Particulares

- Determinar si la insulina modula la corriente tónica en neuronas piramidales de las capas V-VI de la CPF examinando su efecto sobre la corriente de mantenimiento en experimentos de fijación de voltaje.
- Utilizar herramientas farmacológicas, p.e. moduladores de los receptores GABA_A extrasinápticos que contienen las subunidades δ , $\alpha 4$, $\alpha 5$ para identificar los receptores mediando el efecto insulínico sobre la corriente tónica.
- Definir la vía de señalización intracelular insulínica que lleva a la modulación de las corrientes tónicas mediadas por el receptor GABA_A.
- Discriminar los efectos de la insulina sobre la excitabilidad neuronal utilizando técnicas electrofisiológicas.
- Determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, las subunidades que constituyen a los receptores de GABA_A mediando la corriente tónica en la CPF.

IX. Metodología

IX. 1. Preparación del tejido

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo con lo establecido por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 25 a 30 días de edad provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las ratas fueron decapitadas para extraer el cerebro que se colocó en una solución de Ringer (4 °C) que contenía (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, y 25 glucosa, 300 mOsM, pH 7.3 ajustado con NaOH y oxigenada con 95% O₂-5% CO₂. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas coronales de la corteza prefrontal de 350 µm de espesor utilizando un vibratomo (Pelco 102, Ted Pella INC). Las rebanadas obtenidas se mantuvieron en la misma solución Ringer oxigenada a temperatura ambiente (20-22° C) o fueron incubadas con insulina (20 nM) por 2 horas dependiendo del experimento.

IX. 2. Registros electrofisiológicos

Se empleó la técnica de fijación de voltaje en célula completa (Garduño et al., 2012). Las neuronas piramidales de la capa V-VI fueron visualizadas con un sistema de video-microscopía por infrarrojo (BX51WI; Olympus Instruments) y un objetivo de inmersión en agua de 80X. La imagen de la célula registrada fue obtenida con una cámara CCD y visualizada en un monitor. Para los registros de fijación de corriente y fijación de voltaje se utilizó un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices) monitoreado con una computadora personal mediante el software Clampex 10 (Molecular Devices). Se registró una sola célula por rebanada. Para los experimentos de fijación de voltaje los electrodos de registro fueron llenados con solución interna, la cual contenía (en mM): 140 CsCl, 0.1 CaCl₂, 1 EGTA, 0.5 KCl, 1

MgCl₂, 2 ATPMg, 0.3 GTPNa, 5 QX-314 y 10 HEPES, pH= 7.35 ajustado con KOH, 280–300 mOsM. Para los experimentos de fijación de corriente la solución interna consistió en: (en mM) 70 K-gluconato, 70 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂ATP, y 0.5 Na₂GTP; pH 7.35 ajustado con trizma base, 280–300 mOsM. Los electrodos fueron hechos con tubos de vidrio de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) utilizando un estirador de pipetas (Sutter Instrument, Novato, CA) para obtener una resistencia de 5 a 7 MΩ. Los datos experimentales obtenidos fueron filtrados a 5 KHz, digitalizados y almacenados en una computadora utilizando una interfase Digidata 1440A (Molecular Devices).

Los registros se realizaron a un potencial de mantenimiento de -70 mV. La resistencia de acceso fue monitoreada durante todo el experimento. Si la resistencia de acceso variaba >15% el experimento era descartado. Para los registros de cell-attached el giga-sello se realizó con electrodos (2-3 MΩ) cuya solución interna contenía: 150 mM NaCl and 10 mM HEPES. Un electrodo de estimulación concéntrico (diámetro de la punta, 10 μm) se ubicó a ≈500 μm de la célula registrada. Se aplicaron pulsos eléctricos (0.2 ms de duración) por medio del electrodo de estimulación a una frecuencia de 0.02 Hz. La intensidad el estímulo se ajustó para obtener ≈100% de éxito en la generación de corrientes de acción en la célula registrada. Para los registros de parche perforado, los electrodos (2-3 MΩ) fueron llenados con la misma solución a base de K-gluconato suplementada con gramicidina (10 μg/ml). Una vez que se establecía el giga-sello, transcurrían aproximadamente 15 minutos para poder observar corrientes transmembranales en la célula registrada.

IX. 3. Inmunocitoquímica

Las rebanadas coronales de la corteza prefrontal se fijaron durante toda la noche en una solución de PBS/paraformaldehído al 4% (pH 7.4). Posteriormente, fueron lavadas en PBS e infiltradas en una solución de sacarosa al 30% para después ser embebidas en agar y cortadas en un vibratomo en secciones de 40 μm. Éstas

rebanadas fueron incubadas por 40 minutos en solución PBS con Tritón 0.2%, posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas por un lapso de 18-24 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-conejo del receptor GABA_A subunidad α 4, α 5, o δ diluídos 1:100 (Phosphosolutions, Aurora CO). Transcurrido el tiempo de incubación las rebanadas se lavaron con PBS para ser re-incubadas por 2 horas con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína y diluído 1:1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Posteriormente, las rebanadas fueron examinadas en un microscopio de epifluorescencia para detectar la presencia de la marca de fluorescencia. Las rebanadas fueron finalmente colocadas en un medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) para ser examinadas en un microscopio confocal (MRC 1024, Bio-Rad, Natford, UK) equipado con láser kriptón/argón. Un láser de 2 líneas con emisión a 488 nm fue utilizado para excitar a la fluoresceína. Las imágenes digitalizadas fueron transferidas a una computadora con un software de captura de imagen (Confocal Assistant, T. C. Brelje, Minneapolis, MN). En experimentos control, la omisión del anticuerpo primario anuló la detección de la señal (datos no mostrados).

IX. 3. 1. Densitometría

La densidad óptica de las imágenes digitalizadas de las células marcadas con el anticuerpo para la subunidad δ del receptor fue medida usando el programa Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para ello se utilizaron las imágenes maximizadas de las células marcadas. La densidad óptica se determinó trazando líneas de densidad a través del soma de dichas células (Morigaki y Goto, 2015).

IX. 4. Western Blot

Se utilizó tejido de la capa V-VI de la corteza prefrontal, mismo que fue homogenizado por tratamiento ultrasónico en un buffer de lisis que contenía (en mM): 0.1 EDTA y 10 Tris·HCl; pH 7.6, suplementado con un coctel de inhibidores (protease inhibitor cocktail, Roche). La concentración de proteína en el tejido fue

determinada por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se utilizaron 80 µg de proteína para realizar los experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE 7.5%). Las bandas obtenidas fueron transferidas a una membrana PVDF (Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell, Bio-Rad) e incubadas con anticuerpos primarios contra las subunidades del receptor GABA_A mencionadas en la sección anterior (diluciones 1:1000). Las membranas fueron posteriormente incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:10000). Los complejos antígeno-anticuerpo fueron visualizados utilizando el sustrato Luminate Crescendo Western HRP substrate (Millipore). Las bandas fueron visualizadas con un sistema de reacción quimioluminiscente Che-miDoc, BioRad) y analizadas con el programa Image lab (BioRad).

IX. 5. Incubación con fármacos

Para la realización de algunos experimentos, las rebanadas fueron incubadas de 1-2 horas en solución externa burbujeada con 95%O₂-5% CO₂ a la cual se le agregó insulina para obtener una concentración de 20 nM. Para los experimentos donde se utilizó LY-294002, LY-303511, wortmanina, o genesteína, las rebanadas fueron incubadas con alguno de estos fármacos en solución externa por 1 hora, posteriormente se agregó insulina para obtener una concentración de 20 nM y se continuó la incubación por 1 hora más antes de realizar el registro. Cuando se realizaron los experimentos con los inhibidores de la síntesis de proteínas, las rebanadas fueron incubadas en solución externa con cicloheximida o anisomicina por 40 minutos, posteriormente, se agregó insulina para obtener una concentración de 500 nM y se continuó la incubación por 30 minutos más antes de realizar el registro.

IX. 6. Aplicación de fármacos

En otras series de experimentos, SR-95531 (gabazina), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), tetrodotoxina (TTX), gaboxadol (THIP) y L-655708 fueron directamente aplicados a la perfusión durante el registro. En algunos experimentos,

se aplicó insulina a una alta concentración (500 nM), de esta forma se reduce el tiempo de incubación y se hace posible evaluar los efectos de la insulina antes y después de su aplicación en la misma célula (Wan et al., 1997; Vetiska et al., 2007).

Los fármacos utilizados se aplicaron directamente a la solución externa a partir de soluciones stock y fueron administrados por medio de un sistema de perfusión por gravedad. El tiempo necesario para obtener una concentración homogénea de los fármacos en la cámara de registro fue de 3 a 4 minutos. Para los registros de fijación de voltaje se esperó al menos 10 minutos para permitir la estabilización del sello luego de tener acceso a la célula; durante este tiempo, el bloqueador de receptores a glutamato (CNQX) estuvo presente en la perfusión. Posteriormente se agregó gabazina (20 μ M) y se procedió al registro de su efecto durante la administración (8-15 minutos). Para los experimentos de *cell-attached*, se aplicó insulina (500 nM) a la perfusión durante el registro. En otro grupo experimental las rebanadas fueron previamente incubadas con LY-294002 o LY-303511 por 1 hora antes de la aplicación de insulina.

Insulina, TTX, CNQX, gabazina, cycloheximida, anisomicina, gaboxadol (THIP), genisteína, wortmanina, LY-294002 y LY-303511 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich RBI (St. Louis, MO). L-655708 y gramicidina fueron comprados de Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

IX. 7. Análisis estadístico

La corriente tónica activada por receptores GABA_A se cuantificó como el resultado del desplazamiento de la corriente de mantenimiento cuando se aplicó el antagonista de receptores a GABA_A, gabazina (20 μ M). Para la cuantificación, se tomaron muestras de 5 ms de la corriente de mantenimiento cada 100 ms antes y al efecto máximo de gabazina. La corriente tónica fue obtenida al restar el valor de la corriente mínima de la máxima (Drasbek and Jensen, 2006). Los valores obtenidos fueron normalizados y se usaron para el análisis estadístico. El análisis de datos (offline) se hizo utilizando Clampfit 10.2 (Molecular Devices) y Origin 8

(Microcal, Northampton MA). Los datos fueron expresados como la media \pm S.E.M. Para cada grupo experimental un mínimo de 5 células fueron registradas. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (San Jose CA, USA), las pruebas estadísticas utilizadas para el análisis fueron Wilcoxon o Mann-Whitney para datos pareados o no pareados respectivamente (valores de $p < 0.05$ fueron tomados como significativos).

X. Resultados

X. 1. La insulina modula la corriente activada por receptores GABA_A en la CPF

Un total de 116 neuronas de la CPF fueron registradas y asignadas a los diferentes grupos experimentales. Se realizaron registros electrofisiológicos en configuración de célula completa en neuronas piramidales de la capa V-VI. Estas células fueron identificadas con base en su morfología característica así como por su patrón de disparo regular (Figura 8). Las células registradas presentaron un potencial de membrana en reposo de 65 ± 2 mV y una resistencia de entrada (RN) de 186 ± 37 M Ω (n = 37).

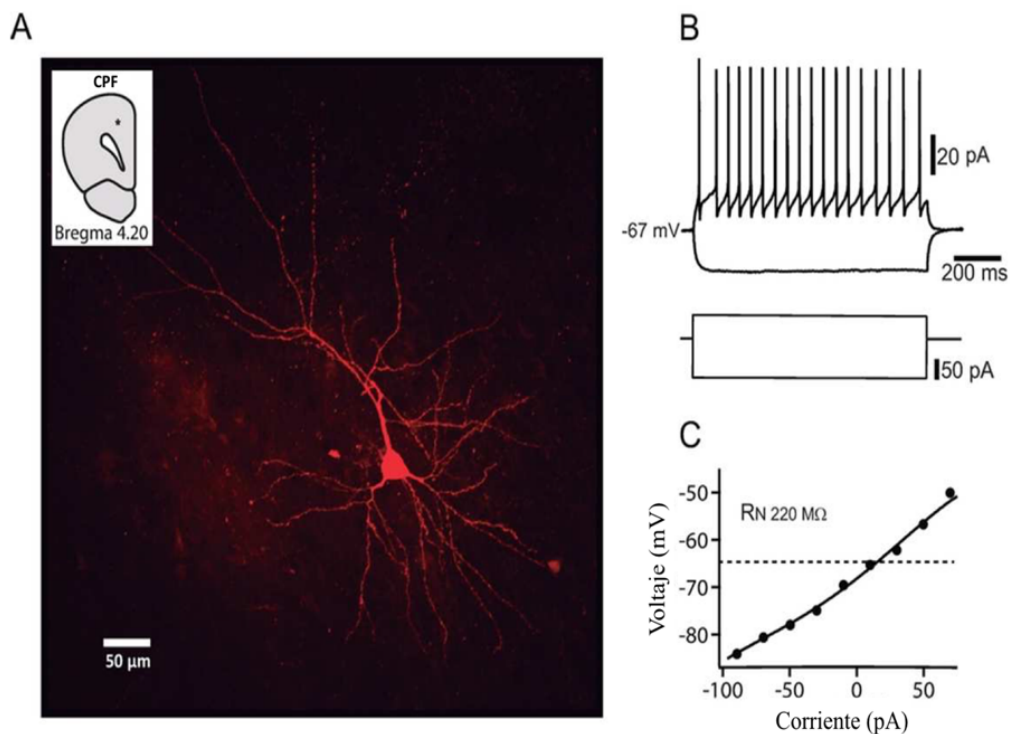


Figura 8. Neuron piramidal de la CPF. A) Fotomicrografía de una neurona piramidal de la CPF marcada con biocitina. Las neuronas fueron registradas en la capa V-VI como se muestra con un punto en el esquema (inserto). B) Respuestas de la célula mostrada en A a pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes. Todas las células registradas presentaron un patrón de disparo regular con poca adaptación. C) Gráfica de la relación corriente-voltaje (I-V) de la misma célula en A.

Estudios previos han caracterizado el efecto modulador de la insulina sobre los receptores GABA_A en neuronas del hipocampo. Con la finalidad de explorar la presencia de una corriente tónica inhibitoria mediada por la presencia de receptores GABA extrasinápticos y su posible modulación por insulina en la CPF se realizaron experimentos de fijación de voltaje para registrar las IPSCs. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de CNQX, un bloqueador de receptores a glutamato AMPA/kainato, a una concentración de 10 μ M para aislar el componente GABAérgico. Posteriormente a la aplicación de gabazina 20 μ M, un bloqueador selectivo de receptores GABA_A se observó un bloqueo de las IPSCs, así como también un pequeño pero significativo desplazamiento en la corriente de mantenimiento de 4.9 ± 1 pA, lo que representó el $13.2 \pm 1\%$ con respecto a la corriente basal (Figura 9 A,C, cuadros negros) (Wilcoxon, $p = 0.0022$, $n = 5$).

Cuando las rebanadas fueron incubadas con insulina a una concentración de 20 nM durante 2 horas previo al registro, la aplicación de gabazina produjo un claro aumento en el desplazamiento de la corriente de mantenimiento de 38 ± 2.2 pA ($25.6 \pm 1.8\%$, $n = 7$) con respecto a la basal (Figura 10 B, C, círculos negros). En la gráfica de cajas (Figura 9 D) se compara el desplazamiento de la corriente de mantenimiento producido por la aplicación de gabazina en condiciones control (rebanadas no incubadas) con las rebanadas incubadas con insulina (Mann-Whitney, $p = 0.0025$). En algunos experimentos se utilizaron otros bloqueadores de los receptores GABA_A, bicuculina y picrotoxina (a concentraciones de 10 y 40 μ M, respectivamente) observándose el mismo efecto sobre la corriente de mantenimiento que con gabazina (datos no mostrados). Estos resultados sugieren la presencia de una corriente tónica modulada por insulina en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal.

Se sabe que la generación de la corriente tónica en el SNC depende de la concentración ambiental de GABA que activa a los receptores GABA_A extrasinápticos (Bright et al., 2007). Por lo anterior, se investigó en qué medida la liberación vesicular del GABA dependiente del potencial de acción contribuye a

mantener los niveles ambientales de GABA en la corteza prefrontal. Para ello, las neuronas piramidales fueron registradas en presencia de TTX (bloqueador de canales de sodio) a una concentración de 500 nM para inhibir la actividad sináptica dependiente de potencial de acción. En las rebanadas que fueron incubadas con insulina la sola aplicación de TTX produjo un desplazamiento en la corriente de mantenimiento de 39 ± 1.2 pA ($27.9 \pm 2.6\%$) respecto a la basal. Bajo estas mismas condiciones, la subsecuente aplicación de gabazina (20 μ M) fue aún capaz de producir un pequeño pero significativo desplazamiento en la corriente de mantenimiento (Figuras 9 E, F). En la gráfica de cajas (Figura 9 F, inserto) se observa como el desplazamiento en la corriente de mantenimiento producido por la aplicación de TTX + gabazina fue más pequeño ($5.6 \pm 1.4\%$) que el producido por el TTX *per se* (Wilcoxon, $p = 0.0065$, $n = 5$). Estos resultados concuerdan con estudios previos de afirman que las concentraciones de GABA ambiental no dependen solamente de la liberación de GABA por el disparo de potenciales de acción (Jin et al., 2011), sino también por otros mecanismos de liberación de GABA no vesicular e independiente de Ca^{2+} tanto desde la glía como de terminales GABAérgicas (Rossi et al., 2003; Semyanov et al., 2004; Walker y Semyanov, 2008).

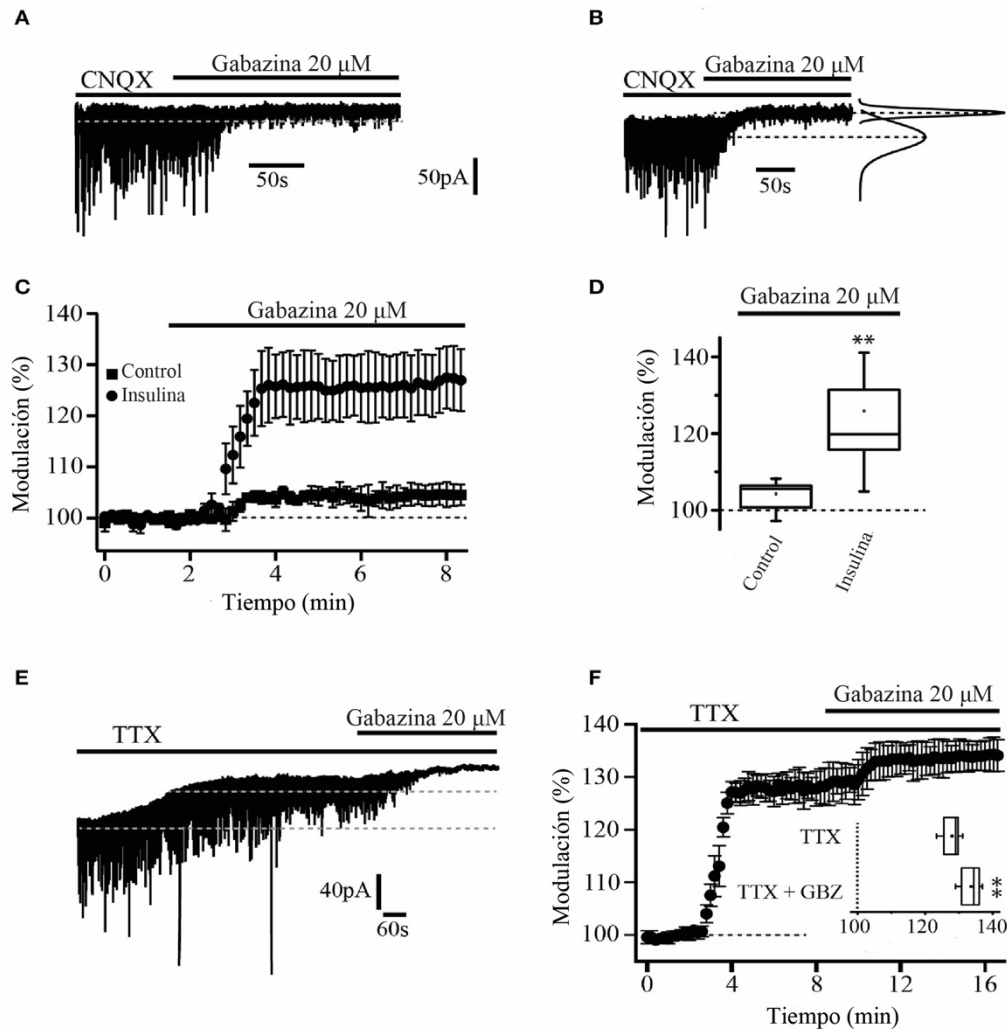


Figura 9. La insulina incrementa la corriente tónica en las neuronas piramidales de la CPF. A) Registro de la corriente tónica en condiciones control (sin insulina). La gabazina (20 μ M) inhibe las IPSCs y produce un pequeño pero significativo desplazamiento de la corriente de mantenimiento. B) Registro de la corriente tónica en una rebanada incubada con insulina (20 nM). Puede apreciarse que en este caso la gabazina bloquea las IPSCs y produce un desplazamiento mayor de la corriente de mantenimiento. A la derecha se muestra un ajuste Gaussiano a un histograma de un segmento de 30s de registro de corriente tomado en la parte control y después de la aplicación de gabazina. Los picos en esta gráfica se indican con líneas punteadas. La línea inferior corresponde a la corriente basal, la línea superior indica el nivel de la corriente posterior a la aplicación de gabazina. C) Comparación del curso temporal del efecto de gabazina en condiciones control (cuadros) y en las rebanadas incubadas con insulina (círculos). La respuesta fue expresada como % de la corriente basal. D) Gráfica de cajas donde se compara el efecto de la gabazina en condiciones control (n=5) e insulina (n=7). E) Registro de la corriente tónica donde se muestra el efecto de la gabazina en presencia de TTX (500nM). F) Curso temporal del efecto de TTX y de TTX+gabazina expresado como % de la corriente basal (n=5). El inserto muestra el resumen en gráfica de cajas. Todos estos experimentos fueron realizados en células de rebanadas incubadas con insulina en presencia de CNQX. **p < 0.01.

X. 2. La insulina modula la corriente tónica inhibitoria a través de la activación de la enzima PI3K

Diferentes vías de señalización intracelular pueden ser activadas por acción de la insulina permitiendo de esta forma la regulación de diversos procesos celulares. Vetiska y colaboradores, en el 2007 reportaron que la insulina puede modular la expresión de receptores GABA_A sinápticos por la activación de la enzima PI3K. Para determinar si la PI3K participa en la modulación de la corriente tónica mediada por receptores GABA_A extrasinápticos, un grupo de rebanadas de corteza prefrontal fueron incubadas con insulina (20 nM) en presencia de LY294002 (1 μM) un inhibidor selectivo de la PI3K (ver metodología). Se observó que la modulación por insulina de la corriente tónica fue completamente suprimida por acción del inhibidor de la PI3K, ya que no se presentó efecto sobre la corriente de mantenimiento posterior a la aplicación de gabazina (n=5) (Figura 10 A). Otro grupo de rebanadas fue incubado con insulina y con el análogo inactivo del inhibidor de la PI3K, el LY303511 (5 μM). En este caso, cuando la gabazina fue aplicada las neuronas registradas presentaron un claro desplazamiento en la corriente de mantenimiento de 27.4 ± 1.3 pA lo que representa el $19.6 \pm 6\%$ con respecto de la basal (n = 7) (Figura 10 B). Este efecto fue estadísticamente significativo comparado con el efecto de la gabazina en el grupo de rebanadas incubadas con LY294002 (Mann-Whitney, p = 0.0013). Asimismo, la incubación con wortmanina (200 nM), otro inhibidor de la enzima PI3K, también suprimió el efecto de la gabazina sobre la corriente tónica (n = 5, Figura 10 D). Por otra parte, cuando las rebanadas fueron incubadas con genisteína, un inhibidor de la enzima tirosina cinasa, la aplicación de gabazina produjo un pequeño pero significativo desplazamiento en la corriente de mantenimiento de 9.3 ± 4.5 pA ($5.01 \pm 3.5\%$) respecto a la basal (n = 6) (Wilcoxon, p = 0.0331, Figura 10 C).

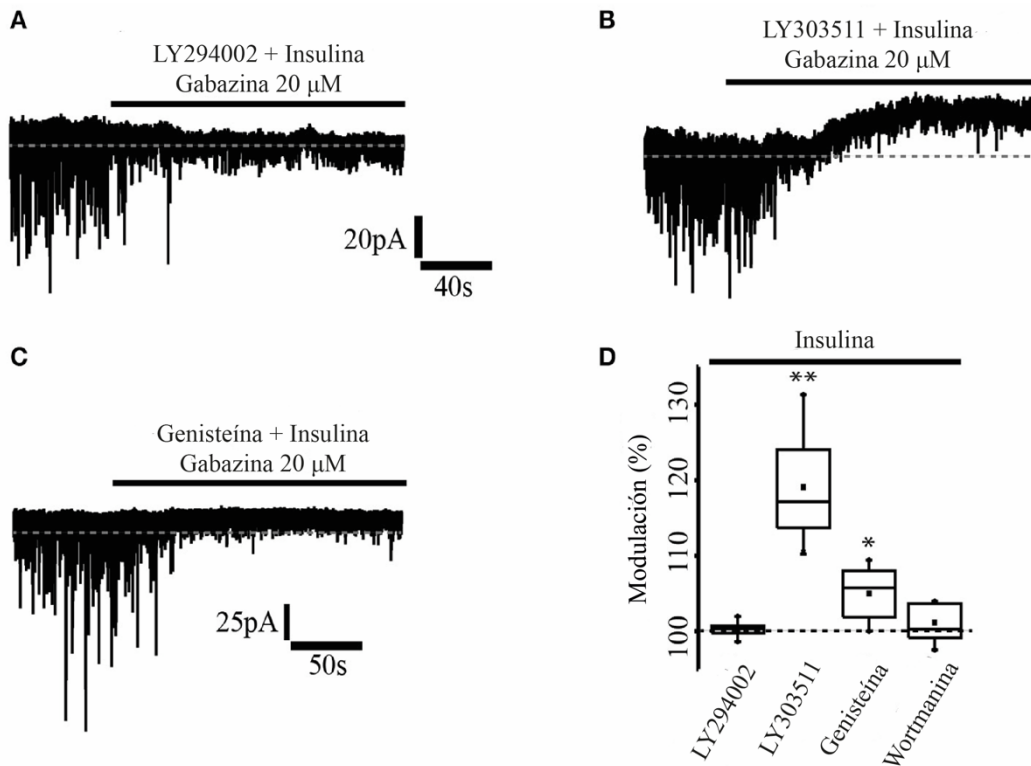


Figura 10. El efecto de la insulina es mediado a través de la vía PI3K/Akt. A) Registro obtenido en fijación de voltaje de rebanadas incubadas con un inhibidor de la vía de la PI3K, LY294002 (1 μM) e insulina. Se aprecia como la gabazina no tiene efecto sobre la corriente tónica inhibitoria. B) Cuando la incubación fue hecha con un análogo inactivo del inhibidor de la vía de la PI3K, LY303511 (5 μM) e insulina, el efecto modulador de la insulina si se produjo. C) En rebanadas incubadas con genisteína (50 μM) (un inhibidor de la enzima tirosina cinasa) e insulina, la gabazina produjo un pequeño desplazamiento en la corriente de mantenimiento. D) Resumen en gráfica de cajas de los resultados de la modulación por gabazina en presencia de: LY294002 (n=5), LY303511 (n=7), genisteína (n=6) y wortmanina (200 nM, n=5) *p < 0.05, **p < 0.01.

X. 3. La corriente tónica inhibitoria es mediada por receptores GABA_A con las subunidades α5 y δ

Como se mencionó anteriormente, los receptores GABA_A conformados por las subunidades α5, α4, α6 y δ se localizan casi exclusivamente en el espacio extrasináptico (Birnie y Korpi, 2007). Sin embargo, de éstas, las subunidades α5 y δ son las que más comúnmente integran a los receptores de GABA extrasinápticos (Scimemi et al., 2005). Para saber que subunidades conforman a los receptores

GABA_A extrasinápticos que son modulados por la insulina en la CPF, primero se evaluó el efecto del L655, 708 un agonista inverso selectivo de los receptores GABA_A que poseen la subunidad $\alpha 5$. Este fármaco fue aplicado durante el registro a rebanadas previamente incubadas con insulina (20 nM), en estas condiciones, la aplicación de L655, 708 (5 μ M) produjo un desplazamiento en la corriente de mantenimiento de 41.19 ± 1.8 pA, lo que representa el $18.7 \pm 0.6\%$ con respecto a la basal. La subsecuente aplicación de gabazina (20 μ M) en presencia de L655, 708 provocó un desplazamiento adicional en la corriente de mantenimiento de 17.11 ± 2.5 pA ($13.02 \pm 1.6\%$) (Figura 11 A, B). En la gráfica de cajas (Figura 12 B, inserto) se observa la comparación de los efectos de L655, 708 y L655, 708 + gabazina sobre el desplazamiento de la corriente de mantenimiento (Wilcoxon, $p = 0.0156$, $n = 7$). Estos datos sugieren que la corriente tónica en la capa V-VI de la CPF no solo depende de receptores de GABA extrasinápticos que contienen la subunidad $\alpha 5$. Por esta razón, se decidió utilizar el THIP, un agonista selectivo de los receptores extrasinápticos que poseen la subunidad δ . A una concentración de 5 μ M, el THIP produjo un marcado incremento en la corriente tónica, lo que se observó como un desplazamiento hacia abajo (incremento) en la corriente de mantenimiento de 171.33 ± 7.9 pA (Figura 11 C). La subsecuente aplicación de gabazina provocó un gran desplazamiento de la corriente hacia arriba (bloqueo) de 94.0 ± 9.8 pA que sobrepasó la corriente de mantenimiento inicial (línea punteada). El desplazamiento de la corriente de mantenimiento normalizada respecto a la basal fue de ($46 \pm 2.1\%$, hacia abajo, $p = 0.0313$) y ($29.2 \pm 3.3\%$, hacia arriba, $p = 0.0323$) para el THIP y THIP + gabazina, respectivamente (Wilcoxon, $n = 5$) (Figura 11 D e inserto). Estos resultados sugieren que los receptores GABA_A conformados por la subunidad δ también participan en la generación de la corriente tónica en la capa CPF.

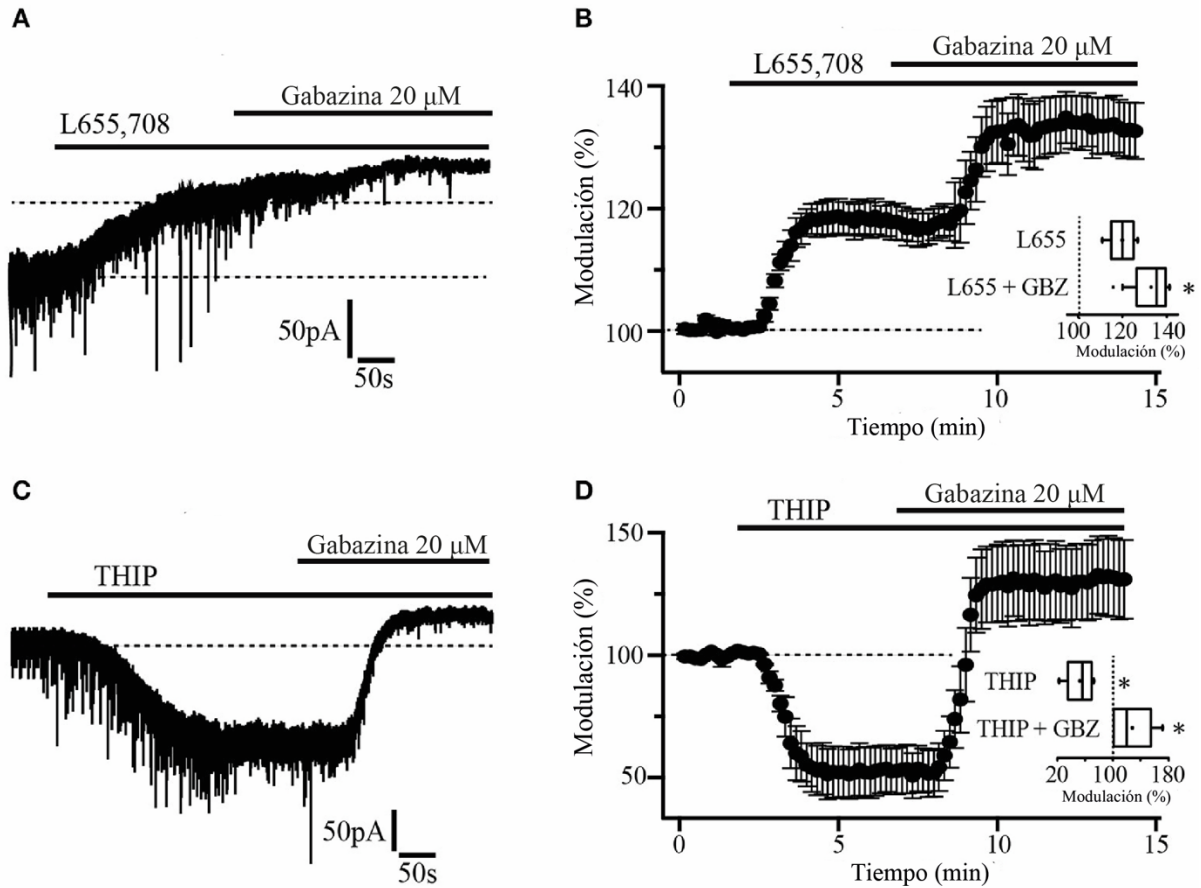


Figura 11. La corriente tónica sensible a insulina es mediada a través de receptores GABA_A que contienen las subunidades α 5 y δ . A) El agonista inverso de la subunidad α 5, L655, 708 inhibe la corriente tónica mediada por receptores GABA_A en neuronas piramidales. Note que hay un remanente de la corriente tónica que es bloqueado por la aplicación de gabazina (línea superior discontinua). B) Curso temporal del desplazamiento de la corriente de mantenimiento por la aplicación de L655, 708 y la subsecuente aplicación de gabazina. La respuesta es expresada como % de la corriente basal (n=7). El inserto en B muestra la gráfica de cajas donde se compara el efecto de L-655, 708 con L-655, 708 + gabazina (GBZ). C) THIP, un agonista de los receptores GABA_A que contienen la subunidad δ produce un incremento en la corriente de mantenimiento, mismo que posteriormente es bloqueado por la aplicación de gabazina. D) Curso temporal del desplazamiento de la corriente de mantenimiento por la aplicación de THIP y la subsecuente aplicación de gabazina expresado como % de la corriente basal (n=5). El inserto en D muestra el resumen en una gráfica de cajas. Estos experimentos fueron realizados en rebanadas previamente incubadas con insulina (20 nM) *p < 0.05.

X. 4. La insulina incrementa la expresión de receptores GABA_A extrasinápticos

Trabajos anteriores han demostrado que la insulina promueve la translocación de receptores GABA_A sinápticos al citoplasma de la membrana en células del hipocampo (Wan et al., 1997). Para explorar esta posibilidad en la CPF se aprovechó la observación de que, cuando la gabazina es administrada a una concentración de 20 μ M por 10 min, sus efectos sobre la corriente tónica no se revierten hasta 1 hora después de su aplicación. Tomando en cuenta lo anterior, se utilizó gabazina (20 μ M) para generar un bloqueo a largo plazo de los receptores GABA_A. Al inicio del experimento la gabazina fue aplicada por 15 minutos, posteriormente, fue retirada y se agregó insulina (500 nM) a la perfusión. Esta alta concentración de insulina fue utilizada alcanzar sus efectos en un menor tiempo (Wan et al., 1997; Vetiska et al., 2007). La insulina produjo un incremento en la corriente de mantenimiento (46.36 ± 1.9 pA). Aún en presencia de insulina, una segunda aplicación de gabazina promovió un desplazamiento hacia arriba en la corriente de mantenimiento aún cuando los receptores a GABA_A habían sido previamente bloqueados por la primera aplicación de gabazina (Figura 12 A).

Cuando la insulina fue sustituida por solución salina durante el registro, la aplicación de gabazina no generó ningún efecto (5 de 5 células) (Figura 12 B). En resumen, en valores normalizados, el desplazamiento de la corriente de mantenimiento producido por la aplicación de insulina respecto a la primera aplicación de gabazina fue de $18.3 \pm 4.4\%$ ($p = 0.0011$, Wilcoxon. $n = 7$). Por otra parte, el efecto de la insulina + gabazina (segunda aplicación) no fue estadísticamente diferente del efecto de la primera aplicación de gabazina ($p = 0.0647$, Wilcoxon) (Figura 12 C, inserto).

Para determinar si el efecto de la gabazina sobre la corriente tónica (posterior a la aplicación de insulina) fue debido a la síntesis de nuevos receptores GABA_A, se realizaron experimentos en los que las rebanadas de la CPF fueron incubadas por separado en diferentes grupos: insulina (500 nM) o insulina + inhibidores de las

síntesis de proteínas, cicloheximida (50 μ M) o anisomicina (40 μ M). En todos los grupos, la gabazina aún fue capaz de producir un desplazamiento en la corriente de mantenimiento (Figure 12 D). Este desplazamiento en la corriente fue de 43.7 ± 8 pA ($24.52 \pm 1.6\%$), 31.4 ± 2 pA ($23.54 \pm 1.6\%$), y 26.2 ± 4 pA ($22.95 \pm 1.4\%$) para el grupo control (insulina, $n = 5$), insulina + cicloheximida ($n = 5$) e insulina + anisomicina ($n = 5$) respectivamente. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos de inhibidores de las síntesis de proteínas contra el control ($p = 0.1847$ y $p = 0.0543$, Wilcoxon) para cicloheximida y anisomicina, respectivamente. En conjunto, estos datos sugieren que el efecto modulador de la insulina sobre la corriente tónica inhibitoria no depende de la síntesis de nuevos receptores GABA_A extrasinápticos.

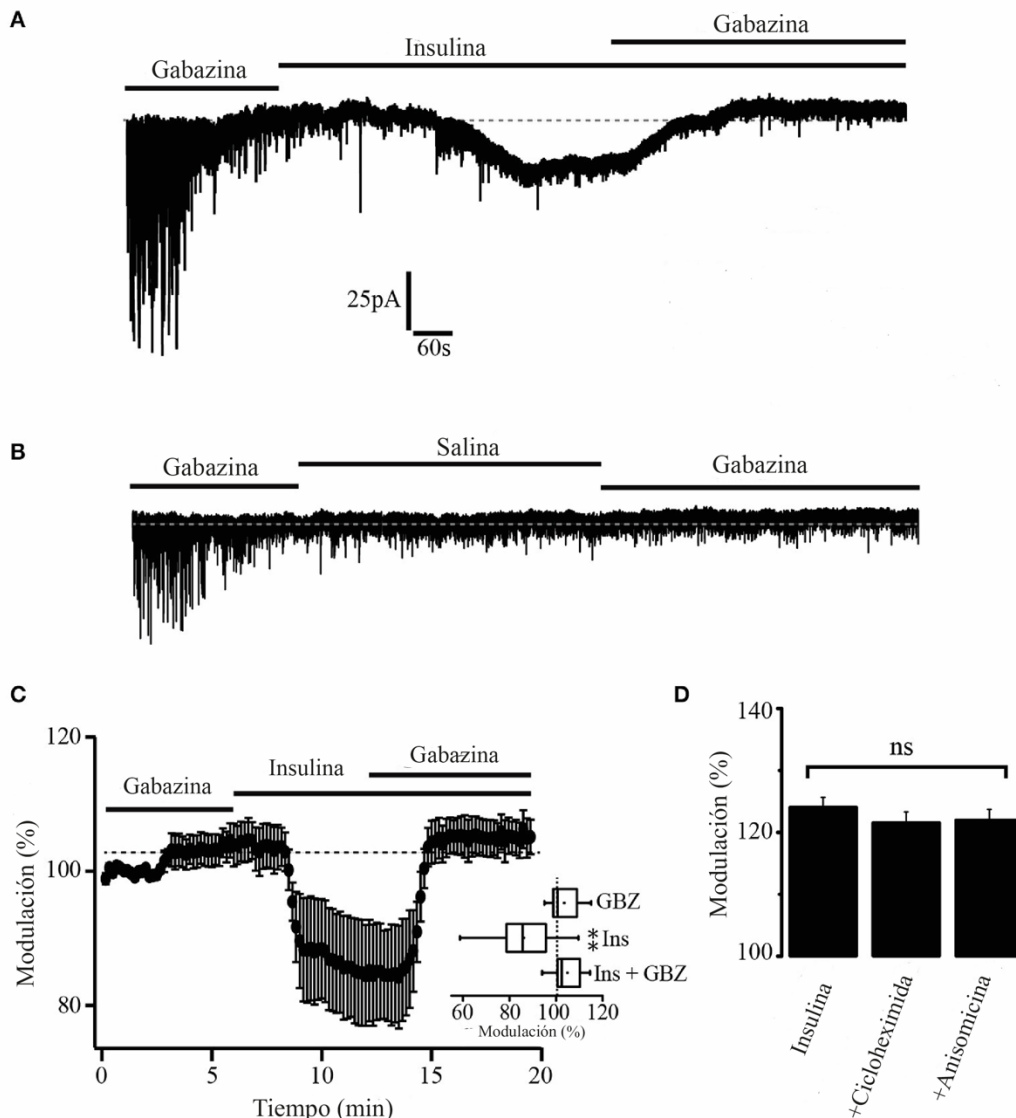


Figura 12. La insulina promueve el incremento en la corriente tónica mediada por receptores GABA_A. A) Posterior al bloqueo de los receptores GABA_A por gabazina, la aplicación de insulina (500 nM) produjo un incremento en la corriente de mantenimiento (desplazamiento hacia abajo). Este efecto fue revertido por una subsecuente aplicación de gabazina. B) Cuando la gabazina fue sustituida por solución salina durante el registro, la nueva aplicación de gabazina no presentó efecto sobre la corriente (n=5). C) Modulación de la corriente tónica por insulina e insulina + gabazina expresada en valores normalizados respecto al efecto de gabazina sola (n=7). El inserto en C muestra la gráfica de cajas donde se compara el efecto de la insulina e insulina + gabazina contra el efecto de gabazina sola. D) Gráfica de barras donde se compara en valores normalizados la modulación de la corriente de mantenimiento por gabazina en células de rebanadas incubadas con insulina (n=5), insulina + cicloheximida (n=5) e insulina + anisomicina (n=5). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (ns), **p < 0.01.

X. 5. La insulina disminuye la excitabilidad neuronal

La observación de que la insulina produce un incremento en la corriente tónica activada por receptores GABA_A plantea cuestionamientos acerca del papel fisiológico de esta modulación. Para evaluar si la insulina tiene un efecto sobre la excitabilidad neuronal se realizaron registros en fijación de corriente en los cuales se aplicaron pulsos despolarizantes para generar potenciales de acción. Para realizar estos registros se utilizó una solución interna de gluconato de potasio. Durante el registro, se aplicó un protocolo de pulsos de inyección de corriente despolarizante partiendo de un potencial de mantenimiento de -70 mV. Posteriormente, se agregó insulina (500 nM) a la solución de perfusión por un lapso de 10-15 minutos antes de volver a aplicar el mismo protocolo de inyección de corriente a la célula. En todas las células registradas, la insulina produjo un desplazamiento hiperpolarizante de ≈ 4 mV del potencial de mantenimiento, así como una disminución en la frecuencia de disparo. Aun cuando a éstas células se les inyectó corriente despolarizante para regresarlas al potencial de mantenimiento de -70 mV, el efecto en la reducción de la frecuencia de disparo por la insulina se mantuvo (Figuras 13 A, B). La disminución en la frecuencia de disparo por insulina respecto al control (en valores normalizados) fue de $28.18 \pm 9.5\%$ al máximo pulso despolarizante (255 pA) (Wilcoxon, p = 0.008, n = 5).

Por otra parte, a manera de comparación, en otro grupo experimental, la insulina se aplicó en presencia de gabazina (20 μ M). Bajo estas condiciones, la insulina no tuvo efecto sobre la frecuencia de disparo ni sobre el potencial de mantenimiento (n = 6) (Figuras 13 C, D). Finalmente, para determinar si la insulina podría tener un efecto sobre corrientes dependientes de voltaje, se analizaron gráficas de espacio-fase de dV_m/dt contra el mV de los potenciales de acción antes y después de la aplicación de insulina en presencia de gabazina. La Figura 13 E muestra las gráficas espacio-fase en ambas condiciones observándose un solapamiento entre ellas, esto sugiere que la insulina no tiene efecto sobre otras conductancias de la célula.

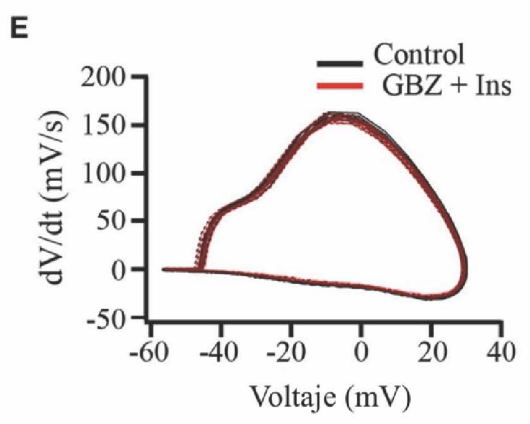
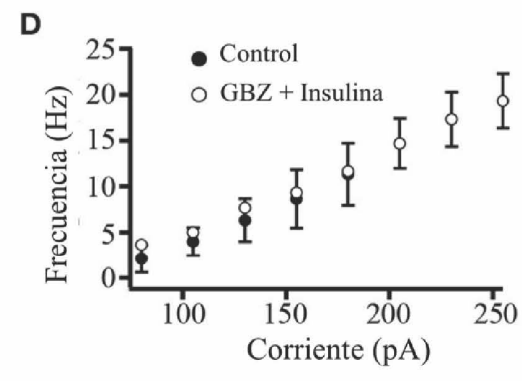
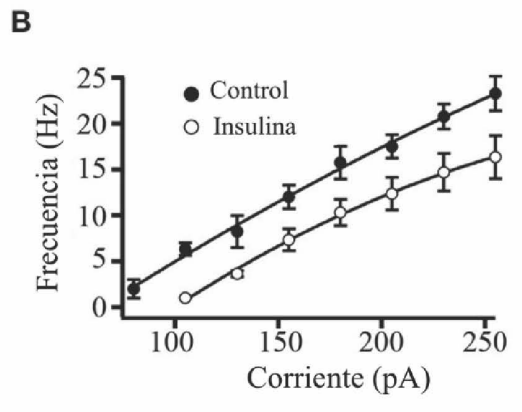
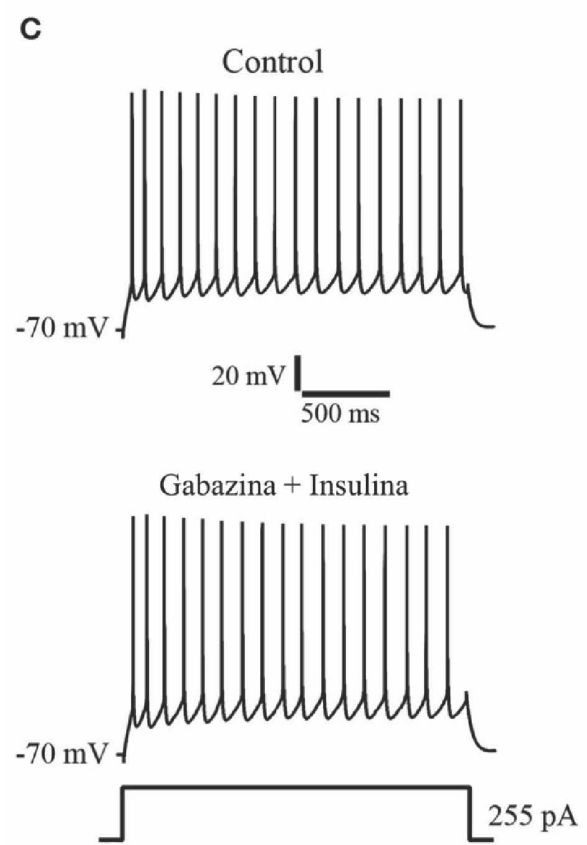
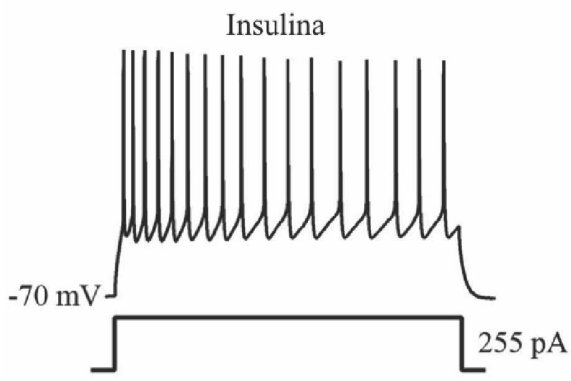
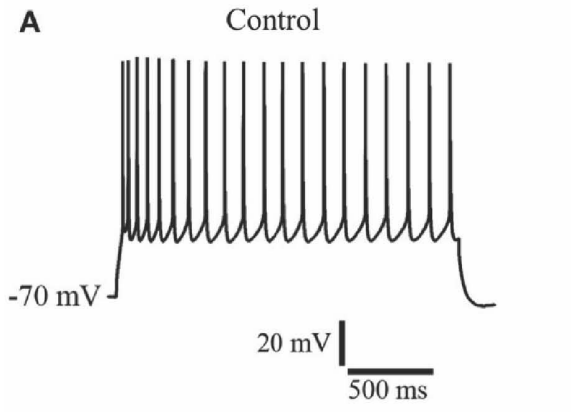


Figura 13. La insulina disminuye la frecuencia de disparo. A) Registros de fijación de corriente en condiciones control (trazo superior) e insulina (500 nM, trazo inferior) donde se muestra la respuesta a inyecciones de corriente despolarizante de 255 pA. Nótese que posterior a la incubación con insulina la frecuencia de los potenciales de acción disminuye. B) Relación corriente-frecuencia en condiciones control e insulina (n=5). C) Registros en fijación de corriente en condiciones control (gabazina, superior) e insulina en presencia de gabazina (inferior). Nótese que en este caso la insulina no tiene efecto en la frecuencia de disparo (n=6) (trazo inferior). D) Relación corriente-frecuencia en control (círculos negros) y en insulina + gabazina (círculos blancos). E) Gráfica espacio-fase de potenciales de acción para ambos grupos, control (línea negra) y gabazina + insulina (línea roja).

X. 6. La insulina disminuye la ganancia de las células piramidales de la corteza prefrontal

Para poder tener una estimación más fisiológica del efecto de la insulina sobre la excitabilidad neuronal se realizaron experimentos en la configuración de cell-attached en donde no se tiene acceso al interior celular y por lo tanto no se altera su composición iónica, incluyendo la concentración intracelular de cloro. En estos experimentos se utilizó un electrodo de estimulación concéntrico (10 μm de diámetro) el cual se situó en la capa V de la corteza prefrontal, aproximadamente a 500 μm de distancia de la célula registrada. Mediante este electrodo se aplicaron pulsos de corriente para generar corrientes de acción en la célula registrada. La intensidad del estímulo se ajustó para tener una tasa de éxito cercana al 100%. Como se observa en la Figura 14 A, la insulina (500 nM) produjo un incremento en la variación de la latencia en la generación de corrientes evocadas, lo cual se traduce en una mayor dispersión de la respuesta en comparación con las condiciones control. Asimismo, la insulina provocó un mayor número de fallos ante la aplicación del estímulo (Figura 14 B). Estos efectos de la insulina no se observaron cuando se realizó una pre-incubación de las rebanadas con el inhibidor de la enzima PI3K, el LY294002, pero sí en presencia de su análogo inactivo LY303511 (ver métodos). En la Figura 14 C, la gráfica de barras muestra una comparación de las fallas en la generación de las corrientes de acción de los diferentes grupos experimentales respecto al control (n=6). Los porcentajes de las

fallas para cada grupo fueron: $19.8 \pm 4.7\%$, $4.9 \pm 2.7\%$; $18.4 \pm 3.5\%$ para insulina (n=6), insulina + LY294002 (n=5), e insulina + LY303511(n=6), respectivamente (Figura 14 C). Como se observa, sólo los grupos de insulina e insulina + LY303511 fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control ($p=0.0320$ y $p=0.0313$, Wilcoxon, respectivamente).

En otra serie de experimentos, se aplicó un estímulo sub-umbral dentro de la corteza prefrontal y la respuesta sináptica excitatoria fue registrada en configuración de parche perforado en neuronas piramidales (ver métodos). La aplicación de insulina (500 nM) en la perfusión produjo una disminución en la amplitud de la respuesta sináptica evocada. Este efecto se vio revertido por la aplicación de gabazina (20 μ M). La disminución de la corriente sináptica evocada respecto al control fue de $57.8 \pm 2\%$, (Wilcoxon, $p=0.0062$, n=5) (Figura 14 D).

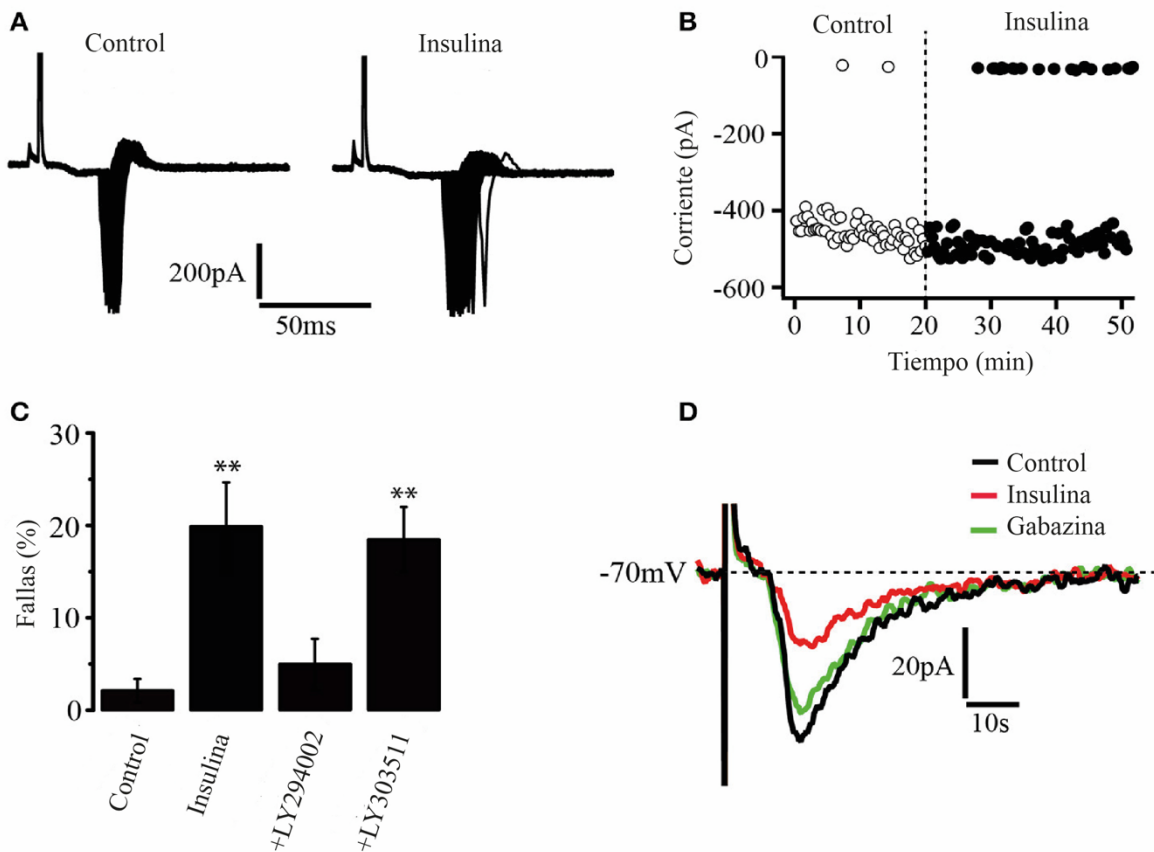


Figura 14. La insulina disminuye la ganancia en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal. A) Registros de corrientes de acción en configuración de cell-attached en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de insulina (500 nM). Nótese la variación en la latencia (dispersión de la respuesta) producida por la aplicación de insulina. B) La insulina incrementa el número de fallas para generar corrientes de acción (círculos negros) en comparación con el control (círculos blancos). C) Gráfica de barras donde se muestra la comparación de los porcentajes de fallos en condiciones control (n=6), insulina (n=6), LY294002 (n=5) y el análogo inactivo LY303511 (n=6). En esta serie de experimentos sólo el grupo de insulina e insulina + LY303511 fueron estadísticamente diferentes del grupo control. D) Registro de corrientes sinápticas evocadas en configuración de parche perforado. Se muestra como en presencia de insulina hay una disminución en la amplitud de la corriente sináptica excitatoria evocada por la estimulación cortical (trazo rojo), este efecto es a su vez revertido por gabazina (trazo verde) (n=5), **p < 0.01.

X. 7. La insulina promueve la translocación de receptores GABA_A extrasinápticos a la membrana celular

Dado que los experimentos anteriores sugieren que la corriente tónica en las células piramidales de la corteza prefrontal es mediada por receptores GABA_A que poseen en su conformación las subunidades $\alpha 5$ y δ , se procedió a determinar la presencia de dichas proteínas mediante las técnicas de Western-blot e inmunocitoquímica.

El análisis de Western-blot permitió la identificación de productos inmunorreactivos en muestras de proteína obtenidas de tejido de las capas V-VI de la CPF. La técnica permitió la detección de bandas correspondientes a proteínas con pesos moleculares de 61, 49, y 50 kDa, como se esperaba para las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, y δ respectivamente (Khrestchatisky et al., 1989; Shivers et al., 1989; Malherbe et al., 1990) (Figura 15 A). Asimismo, apoyando los resultados anteriores, experimentos de inmunocitoquímica mostraron células de la corteza prefrontal marcadas con anticuerpos policlonales anti- $\alpha 4$, $\alpha 5$ y δ (Figuras 15 B, C). En algunos experimentos, el anticuerpo anti- δ fue probado en rebanadas que fueron previamente incubadas en insulina (100 nM) o mantenidas en condiciones control (Figuras 15 C–E). Las células de las rebanadas del grupo control presentaron un

marcado difuso anti- δ a lo largo del soma, como se muestra a mayor amplificación en la Figura 15 D (izquierda). En contraste, las células que fueron incubadas con insulina mostraron un fuerte marcado en los límites de la célula y una marca tenue en el soma (Figura 15 E, izquierda). Estos datos apoyan la idea de que la insulina promueve el tráfico de receptores GABA_A a la membrana celular. La densidad óptica fue medida a lo largo del eje mayor de las células (línea blanca) (Morigaki y Goto, 2015). No se observó un cambio significativo en la densidad óptica a lo largo del eje medido en las células control (Figura 15 D, izquierda y centro). La gráfica de barras (derecha) compara la densidad óptica en el soma y la membrana (Mem) de las células control confirmando que no hay diferencias significativas ($p=0.4524$, Wilcoxon, $n=24$). Por otra parte, las células de las rebanadas incubadas con insulina mostraron mayor densidad óptica en los límites de la célula en comparación con el soma (Figura 15 E). En la figura 15 E (centro) se observan 2 picos correspondientes a la densidad óptica cuantificada en los límites de la célula, mientras que la densidad óptica en el soma de estas células es cercano a cero. La gráfica de barras (derecha) confirma estas diferencias ($p=0.0001$, Wilcoxon, $n=28$). Resultados similares se encontraron al usar el anticuerpo policlonal anti- $\alpha 4$ (datos no mostrados).

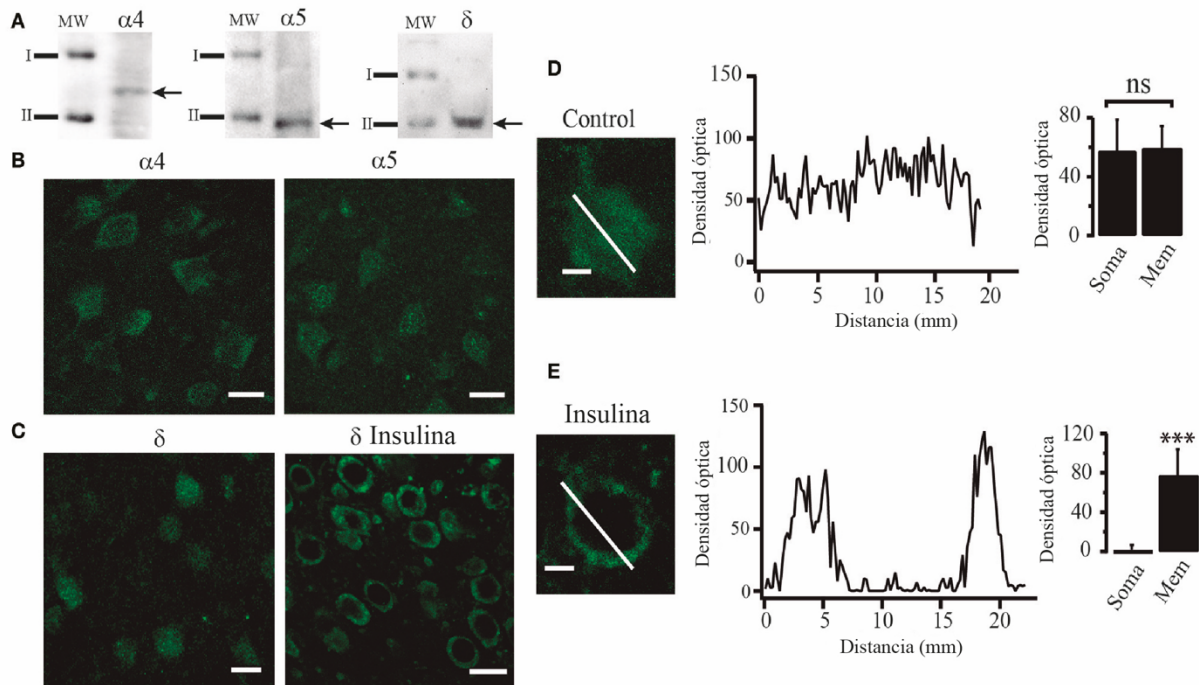


Figura 15. La insulina promueve la translocación de receptores GABA_A del citoplasma a la membrana celular. A) Análisis de Western-blot donde se muestran productos inmunorreactivos de muestras de tejidos de la capa V-VI de la CPF. Las flechas indican las bandas reconocidas por el anticuerpo anti- α 4 del receptor GABA_A (izquierda), anti- α 5 (centro) y anti- δ (derecha) que corresponden a las proteínas con pesos moleculares de 61 KDa, 49 KDa y 50 KDa respectivamente (I =75 KDa, II = 50 KDa). B) Imágenes de microscopía confocal donde se muestra la inmunoreactividad para las subunidades α 4 (izquierda) y α 5 (derecha) del receptor GABA_A. C) Inmunorreactividad para la subunidad δ en células de rebanadas en condiciones control (izquierda) y en células de rebanadas incubadas con insulina (derecha). Nótese que, en las células incubadas con insulina, la marca para el anticuerpo fue más fuerte en los límites de las células en comparación con la marca de las células control. D) Amplificación de la imagen de una célula no incubada (control) marcada con el anticuerpo anti- δ (izquierda). La gráfica del centro muestra la densidad óptica medida a lo largo de la línea blanca trazada sobre la célula (distancia). La gráfica de barras no muestra diferencia significativa en la densidad óptica en la membrana (Mem) con respecto al soma en 24 células (derecha). E) Neurona de una rebanada incubada con insulina y marcada con el anticuerpo anti- δ (izquierda). La gráfica del centro muestra la densidad óptica medida a lo largo de la línea blanca atravesando la membrana celular. Nótese que cuando la línea blanca cruza el soma la densidad óptica es casi cero. La gráfica de barras indica la diferencia de la densidad óptica de la membrana con respecto al soma en 28 células (derecha). Escala en B y C, 20 μ m. Escala en D y E, 5 μ m, ***p < 0.001.

XI. Discusión

Uno de los principales aportes del presente estudio es la demostración de que la insulina incrementa la corriente tónica mediada por receptores GABA_A en las capas V-VI de la corteza prefrontal. Esta es la primera vez que se ha evaluado el efecto de la insulina sobre la corriente tónica en la CPF, una estructura relacionada con procesos cognitivos, el comportamiento y respuestas motoras entre otros. Los datos aquí presentados se suman a los que previamente reportaron la presencia de corrientes tónicas activadas por receptores GABA en diferentes regiones corticales tanto en humanos como en roedores (Yamada et al., 2004; Drasbek y Jensen, 2006; Scimemi et al., 2006; Sebe et al., 2010).

Mediante el uso de técnicas electrofisiológicas y moleculares se determinó cómo la insulina promueve el tráfico de receptores GABA_A extrasinápticos a la membrana celular. Este mecanismo de tráfico por acción de la insulina fue previamente descrito para receptores GABA_A sinápticos en células HEK y en cultivos de neuronas del hipocampo (Wan et al., 1997; Wang et al., 2003; Vetiska et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio también se determinó la presencia de las proteínas que constituyen las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, y δ en la CPF. Estas proteínas son características en la conformación de receptores GABA_A extrasinápticos que generan las corrientes tónicas inhibitorias en diferentes áreas cerebrales.

Los resultados en este trabajo también muestran cómo la corriente tónica mediada por receptores GABA_A está ejerciendo una inhibición constante sobre las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, lo que se hace evidente cuando la sola aplicación de gabazina produce un pequeño pero significativo desplazamiento en la corriente tónica (ver Figura 9). Esta inhibición tónica no está presente en las células piramidales CA1 del hipocampo, donde las corrientes tónicas mediadas por receptores GABA_A son detectadas sólo en etapas tempranas del desarrollo, pero no se observan en animales adultos (Wisden et al., 2002).

Anteriormente, se reportó que la gabazina no lograba bloquear la corriente tónica mediada por receptores GABA_A (Bai et al., 2001; Semyanov et al., 2003). Sin embargo, los experimentos en el presente trabajo así como en otros estudios recientes (Drasbek y Jensen, 2006; Drasbek et al., 2007; Vardya et al., 2008; Jin et al., 2011), demuestran un bloqueo consistente por gabazina de la corriente tónica mediada por receptores GABA_A. Esta discrepancia puede deberse al nivel de expresión de receptores GABA_A extrasinápticos en las áreas cerebrales, así como a las concentraciones locales de GABA en regiones cerebrales específicas. Además, las diferentes conformaciones de los receptores GABA_A extrasinápticos pueden a su vez conferirles diferentes propiedades farmacológicas para la acción de gabazina.

Dos tipos diferentes de receptores GABA_A extrasinápticos participan en la generación de la corriente tónica en la corteza prefrontal

Los datos aquí presentados indican que los receptores GABA_A extrasinápticos en la corteza prefrontal están constituidos por las subunidades $\alpha 5$ y δ ya que el fármaco L-655, 708, un agonista inverso con una alta afinidad para los receptores GABA_A con la subunidad $\alpha 5$, bloquea la corriente tónica mientras que el THIP, cuyos efectos generalmente están relacionados con la expresión de la subunidad δ en los receptores GABA_A, incrementa la corriente tónica. De acuerdo con los experimentos de inmunocitoquímica y el análisis de Western-blot, se confirmó la presencia de las subunidades $\alpha 5$ y δ del receptor GABA_A en las capas V-VI de la corteza prefrontal. Lo más probable es que tanto las subunidades $\alpha 5$ como δ se encuentran formando diferentes tipos de receptores GABA_A, ya que como se menciona en los resultados, L-655, 708 sólo bloqueó parcialmente la corriente tónica inducida por insulina. La subunidad $\alpha 5$, usualmente se encuentra en la conformación $\alpha 5\beta 1-3\gamma 2$ de receptores GABA_A extrasinápticos, como se ha reportado en células piramidales del hipocampo (Brünig et al., 2002; Farrant y Nusser, 2005). Por otra parte, la subunidad δ se encuentra conformando receptores con $\alpha 4$ en diferentes regiones del cerebro anterior, incluyendo la neocorteza (Barnard et al., 1998; Farrant y Nusser, 2005).

Además, estudios de co-inmunoprecipitación han mostrado que anticuerpos contra la subunidad δ precipitan con la subunidad $\alpha 4$ en muestras de tejido del tálamo (Jia et al., 2005). En el presente trabajo, el análisis de Western-blot mostró que además de las proteínas correspondientes a $\alpha 5$ y δ , la proteína correspondiente a $\alpha 4$ también estuvo presente en el tejido de la corteza prefrontal. Por lo tanto, es posible que la combinación de las subunidades $\alpha 4$ y δ puedan formar un subtipo diferente del receptor GABA_A extrasináptico en las capas V-VI de la corteza prefrontal.

La mayoría del GABA ambiental en la corteza prefrontal depende de su liberación por potencial de acción

Se sabe que diferentes fuentes contribuyen a mantener los niveles de GABA ambiental responsables de generar la corriente tónica, entre ellas se encuentran la liberación vesicular de GABA dependiente de potenciales de acción (Brickley et al., 1996; Bright et al., 2007; Glykys y Mody, 2007) así como también mecanismos de liberación independientes de éste como el transporte inverso (Richerson y Wu, 2003) y la liberación de neurotransmisores por parte de los astrocitos (Volkhardt, 2002; Rossi et al., 2003; Kozlov et al., 2006). Los experimentos aquí presentados, muestran que la liberación dependiente de potenciales de acción es el principal aporte del GABA ambiental en las capas V-VI de la corteza prefrontal, sin embargo, otros mecanismos también contribuyen a mantener dichos niveles, ya que aunque la aplicación de TTX redujo la mayor parte de la corriente tónica, la subsecuente aplicación de gabazina produjo una disminución adicional, aunque más pequeña, de la corriente en presencia de insulina.

Estos datos concuerdan con trabajos anteriores, en los cuales se ha observado que el TTX produce una gran reducción en la conductancia tónica en cultivos neuronales de hipocampo y cerebelo (Leao et al., 2000; Petrini et al., 2004). Sin embargo, en células granulares (adultas) de cerebelo la mayor parte de la conductancia tónica es independiente del potencial de acción (Wall and Usowicz, 1997; Rossi et al., 2003).

El efecto modulador de la insulina es mediado por activación de receptores tirosina cinasa y a través de la vía PI3K/Akt

Se observó que el efecto de la insulina sobre la corriente tónica es mediado a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, ya que los bloqueadores de la enzima PI3K, el LY294002 y la wortmanina, inhibieron el desplazamiento de la corriente de mantenimiento inducido por gabazina en neuronas de rebanadas incubadas en insulina. También se observó que el desplazamiento en la corriente de mantenimiento fue reducido por acción de la genisteína, un inhibidor de amplio espectro de la enzima tirosina cinasa, lo que indica un efecto específico de la insulina sobre la activación de receptores tirosina cinasa. Se sabe que tanto la insulina como el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) se unen a sus receptores cuya actividad tirosina cinasa fosforila los dominios intramembranales que sirven de sitios de acoplamiento para el sustrato del receptor a insulina (IRS), lo que lleva a una subsecuente activación de las proteínas PI3K y Akt (Wozniak et al., 1993; Bassil et al., 2014).

La insulina disminuye la excitabilidad en las neuronas de la capa V-VI de la corteza prefrontal

Se probaron diferentes protocolos experimentales para estudiar el efecto de la insulina sobre la excitabilidad neuronal. En registros en fijación de corriente, la insulina produjo un desplazamiento negativo del potencial de mantenimiento, observándose una disminución en la frecuencia de disparo de las células. Este efecto fue suprimido cuando los receptores a GABA_A fueron previamente bloqueados por la aplicación de gabazina en la perfusión.

Se ha reportado que la insulina puede afectar la frecuencia de disparo en las células mediante la modulación de otras conductancias. Trabajos anteriores han reportado que tanto la insulina como el IGF-1 inhiben los canales de potasio Kv 1.3 (Bowlby et al., 1997; Fadool et al., 2000) e incrementan la expresión de canales de

Ca^{2+} (Viard et al., 2004; Toledo et al., 2012). Por otra parte, también se ha reportado que la activación de la vía de la PI3K puede modular corrientes persistentes de Na^+ en miocitos cardiacos (Lu et al., 2012). Estos tipos de modulación de conductancias por efecto de la insulina podrían modificar la dinámica de los potenciales de acción (PAs) de las células. Así, cambios en la corriente persistente de sodio podría desplazar el umbral del PA (Mercer et al., 2007). Asimismo, la inhibición de los canales Kv 1.3 podría aumentar la excitabilidad y oponerse a la repolarización. Además, un incremento en el influjo de Ca^{2+} podría llevar a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , cambiando así la duración y amplitud del PA. La posibilidad de que alguna de estas conductancias estuvieran participando en el efecto modulador de la insulina en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal fueron descartadas ya que las gráficas espacio-fase (dV/dt vs mV) construidas a partir de los PAs antes y después de la aplicación de insulina fueron idénticas.

Para tener un acercamiento más fisiológico del efecto de la insulina sobre la excitabilidad neuronal se realizaron experimentos de cell-attached para evitar dializar el interior de la célula. En estas condiciones, la insulina promovió un incremento en el número de fallas de corrientes de acción generadas por estimulación local. En estos experimentos también se observó un incremento en la variación de la latencia para generar dichas corrientes (ver Figura 14). Por último, en experimentos usando la técnica de parche perforado se mostró cómo la insulina disminuye la amplitud de potenciales sinápticos excitatorios evocados, efecto que fue revertido mediante la aplicación de gabazina. En conjunto, estos resultados corroboran que la insulina reduce la excitabilidad neuronal en las capas V-VI de la corteza prefrontal y que un incremento en la corriente tónica activada por receptores GABA_A participa en este efecto.

La insulina promueve la expresión de receptores GABA_A extrasinápticos en la membrana celular

Como se observa en los resultados, posterior al bloqueo de los receptores GABA_A por gabazina (20 μ M), la insulina fue capaz de producir un desplazamiento de la corriente, mismo que fue revertido por la subsecuente aplicación de gabazina (Figura 12). En resumen, los experimentos realizados sugieren que la insulina promueve la translocación de receptores GABA_A, como se esquematiza en la Figura 16. En dichos experimentos, el efecto de la gabazina no se revierte, incluso hasta una hora después de su aplicación. Anteriormente, se reportó un efecto reversible de la gabazina para el caso de corrientes sinápticas mediadas por la activación de receptores GABA_A (Bai et al., 2001). Sin embargo, puede ser que en el caso de los receptores GABA_A extrasinápticos, éstos tengan una mayor afinidad por la gabazina que los sinápticos, por lo que tomaría más tiempo lavar el efecto de la gabazina sobre las corrientes tónicas.

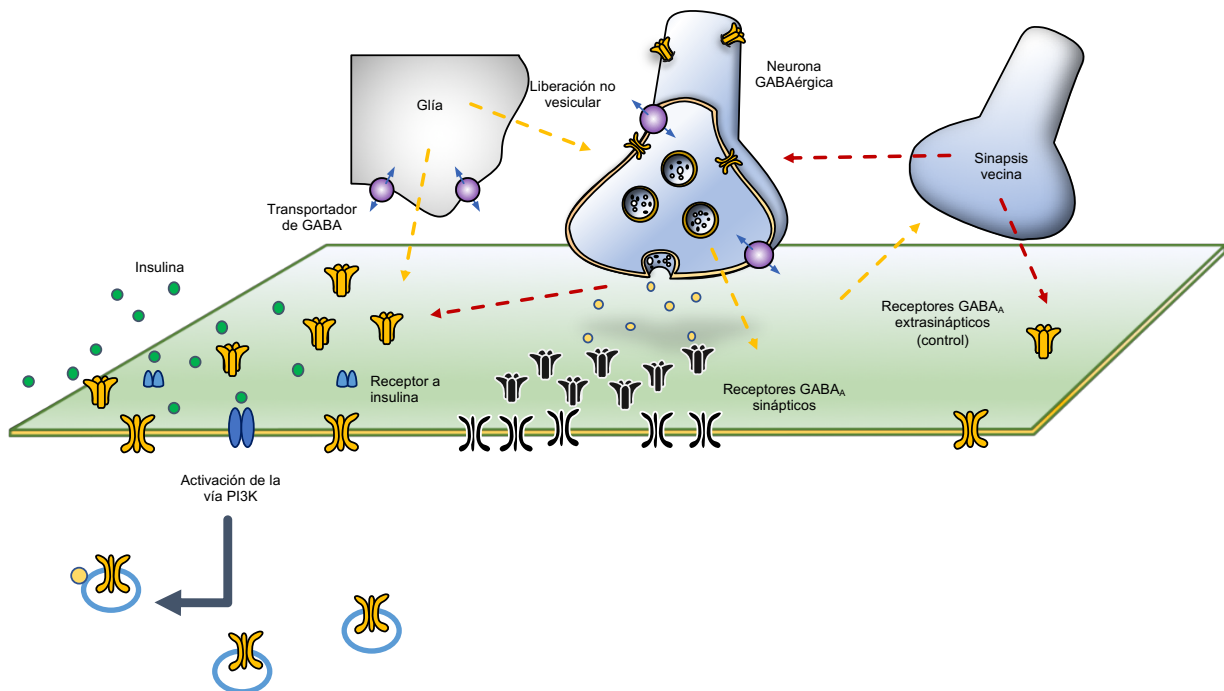


Figura 16. Esquema del efecto modulador de la insulina en una sinapsis gabaérgica de la CPF. A la izquierda, la insulina promueve la translocación de receptores GABA_A extrasinápticos a la membrana celular por activación de la vía de la PI3K. A la derecha, en condiciones control hay un menor número de receptores GABA_A extrasinápticos en la membrana. Las líneas rojas discontinuas, representan el GABA que al ser liberado vesicularmente escapa del espacio sináptico, tanto de la presinapsis como de sinapsis vecinas, para alcanzar espacios extrasinápticos. En líneas amarillas discontinuas, se representa el GABA que puede ser liberado por mecanismos no vesiculares, tanto de la glía como de la presinapsis, y que a su vez también contribuye a mantener las concentraciones basales de dicho neurotransmisor, que activan a los receptores GABA_A extrasinápticos.

Por otra parte, es poco probable que la insulina actúe promoviendo la síntesis de nuevos receptores, ya que los inhibidores de la síntesis de proteínas, cicloheximida y anisomicina no inhibieron el incremento de las corrientes tónicas mediadas por efecto de la insulina. Por lo que es más probable que la insulina promueva la formación del complejo PI3K-GABA_A, el cual juega un papel determinante en la expresión de receptores GABA_A sinápticos, como se ha visto en neuronas del hipocampo (Wan et al., 1997; Vetiska et al., 2007). Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos de los experimentos de inmunocitoquímica, donde se muestra un claro incremento de la marca del anticuerpo para la subunidad δ en los límites de la célula, comparado con el que se observa en el soma, en células de rebanadas previamente incubadas con insulina (ver Figura 15). A manera de resumen, la Figura 17 muestra un esquema del mecanismo de tráfico de los receptores GABA_A extrasinápticos del citoplasma a la membrana. Una vez que los receptores son fosforilados a través de la vía de la PI3K, el complejo del receptor es translocado a la membrana celular donde es reconocido por proteínas de anclaje en los dominios extrasinápticos (Vetiska et al., 2007; Hausrat et al., 2015).

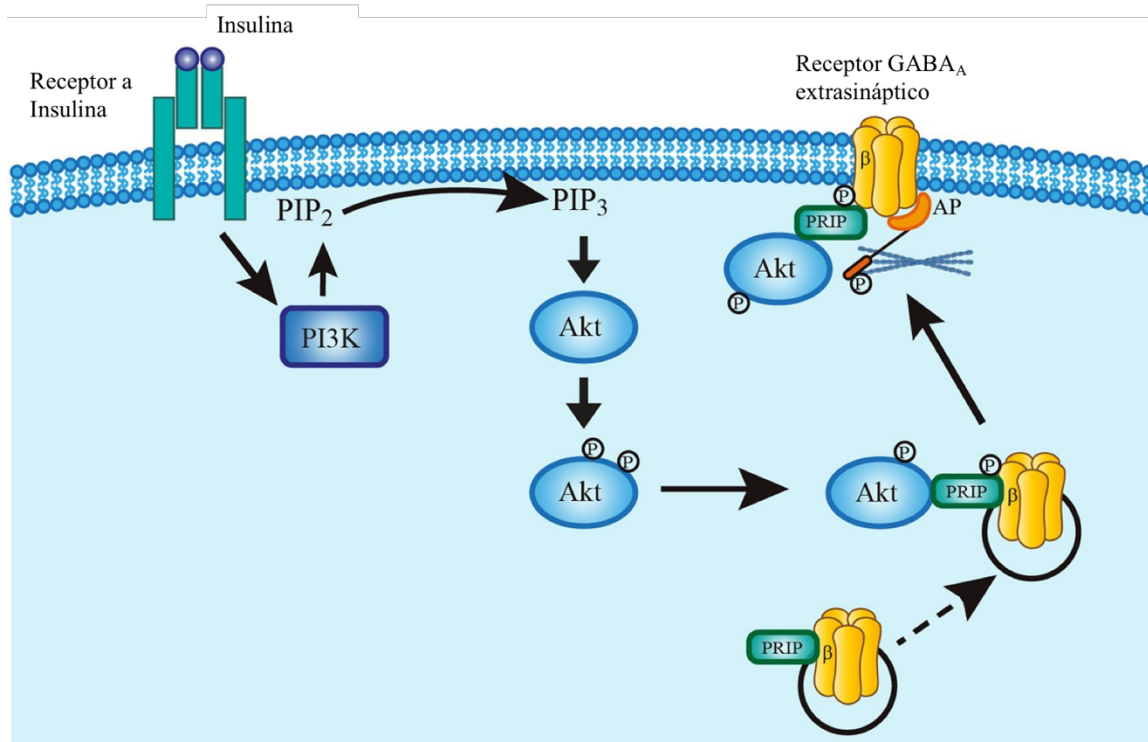


Figura 17. Modelo del mecanismo de translocación de receptores GABA_A por insulina. La insulina al unirse a su receptor activa la vía de la PI3K que a su vez fosforila a PIP₂ convirtiéndolo a PIP₃. La formación de PIP₃ recluta a Akt para rápidamente fosforilar receptores GABA_A en la subunidad β. La proteína acopladora PRIP (Phospholipase-C-related catalytically inactive protein) es determinante ya que ésta permite la fosforilación del receptor por Akt (Vetiska et al., 2007). Una vez fosforilado el receptor ya puede ser translocado a la membrana celular. Una proteína de anclaje situada en el espacio extrasináptico reconoce las subunidades características del receptor GABA_A extrasináptico y por medio de interacciones con los filamentos de actina del citoesqueleto permite su anclaje en el sitio especificado. En el caso de los receptores GABA_A extrasinápticos con la subunidad α5, esta proteína de anclaje es la radixina (Hausrat et al., 2015).

Relevancia fisiológica

Los efectos de la insulina en el cerebro tienen importantes implicaciones fisiológicas ya que permiten el incremento de la inhibición tónica, así como también modifican las propiedades de la membrana celular como la resistencia de entrada y la constante de tiempo. Estos efectos pueden a su vez modificar el potencial en reposo de la célula, la tasa y el patrón de disparo neuronal (Mitchell y Silver, 2003; Semyanov et al., 2003; Rothman et al., 2009). Alteraciones en la señalización de la insulina, como en el caso de padecimientos como la diabetes mellitus, incrementan el riesgo de padecer epilepsia (Verrotti et al., 2008; Ramakrishnan y Appleton, 2012) así como deficiencias cognitivas (Seaquist, 2010; Kullmann et al., 2016). Hasta ahora, la asociación entre estas patologías y los mecanismos de señalización de la insulina no ha sido dilucidados. Sin embargo existen algunos estudios que se han enfocado en esta relación. Por ejemplo, se ha reportado que las modificaciones aberrantes de los receptores GABA_A extrasinápticos conteniendo subunidades $\alpha 5$ y δ o la reducción en su expresión, está asociada con el desarrollo de epilepsia (Schwarzer et al., 1997; Houser y Esclapez, 2003; Dibbens et al., 2004; Peng et al., 2004). Al contrario, se ha visto que un incremento en la expresión de receptores GABA_A con la subunidad δ reduce la ansiedad y la susceptibilidad al desarrollo de cuadros epilépticos (Maguire et al., 2005; Maguire and Mody, 2007).

Por otra parte, experimentos conductuales en ratones han mostrado que la delección o inhibición de receptores GABA_A con la subunidad $\alpha 5$ en el hipocampo se relaciona con un mejoramiento en la memoria (Caraiscos et al., 2004; Martin et al., 2010). Una explicación a esto es que en el hipocampo, las neuronas piramidales del área CA1, poseen receptores GABA_A con la subunidad $\alpha 5$ en las dendritas. La corriente tónica que fluye a través de dichos canales puede provocar *shunting inhibition* y por consiguiente, limitar los efectos de entradas excitatorias a dichas neuronas. Entonces, la delección de estos canales puede favorecer el incremento en la resistencia de entrada en las neuronas de CA1. A su vez, esto facilitaría la

potenciación a largo plazo (LTP) y por consiguiente habría una mejora en el desempeño de tareas de memoria.

Como se ha visto, un incremento en los niveles de insulina en el cerebro puede tener importantes implicaciones fisiológicas. El incremento en las corrientes tónicas por acción de la insulina puede disminuir la excitabilidad neuronal, y ésto a su vez, inducir alteraciones, no sólo de la memoria, sino también de otros procesos cognitivos. En este caso, la inhibición de la excitabilidad neuronal por insulina en las neuronas de la corteza prefrontal puede producir alteraciones en diferentes funciones como en la memoria, el aprendizaje o en los estados de ánimo.

De acuerdo con estudios anteriores, la insulina también estimula la actividad beta y theta cortical y dichos efectos están reducidos en pacientes con resistencia a la insulina (Tschrutter et al., 2007). Sin embargo, se necesitan más estudios para continuar explorando los efectos de la insulina sobre las corrientes tónicas mediadas por receptores $GABA_A$ así como su relación con diferentes padecimientos. Los datos aquí presentados, así como los mencionados en otros estudios, sugieren que los receptores $GABA_A$ extrasinápticos pueden ser un blanco estratégico para el tratamiento de padecimientos relacionados a alteraciones en la señalización de la insulina en el cerebro.

XII. Conclusiones

- Las neuronas piramidales de la capa V-VI de la CPF poseen receptores GABA_A extrasinápticos conformados por subunidades tanto $\alpha 5$ como δ .
- La insulina promueve la translocación de receptores GABA_A extrasinápticos del citoplasma a la membrana celular en la CPF por medio de la activación de la vía de la PI3K.
- La insulina disminuye la excitabilidad neuronal mediante el aumento de receptores GABA_A extra sinápticos en la membrana.

XIII. Referencias

- Amodio, D.M. y Frith, C.D. 2006. Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nat Rev Neurosci* 7: 268-277.
- Ashcroft, F.M. y Gribble, F.M. 1999. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42(8):903-919.
- Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182:31-48.
- Badawy, R. A., Harvey, A. S. y Macdonell, R. A. 2009. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy - part 2. *J Clin Neurosci*. 16:485- 500.
- Bai, D., Zhu, G., Pennefather, P., Jackson, M. F., MacDonald, J. F., and Orser, B. A. 2001. Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by γ -aminobutyric acid A receptors in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 59, 814–824.
- Banks, W. A. 2004. The source of cerebral insulin. *European Journal of Pharmacol.* 490:5-12.
- Barbas, H. 2015. General Cortical and Special Prefrontal Connections: Principles from Structure to Function. *Annu Rev Neurosci.* 38:269–89
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., et al. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313.
- Bassil, F., Fernagut, P. O., Bezard, E., y Meissner, W. G. 2014. Insulin, IGF- 1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: targets for disease modification? *Prog Neurobiol.* 118, 1–18.
- Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D. Jr., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C. y Schwartz, M. W. 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest.* 92(4):1824-30.

- Begg, D. P. 2015. Insulin transport into the brain and cerebrospinal fluid. *Vitamins and hormones*. 98:229-248
- Birnir, B. y Korpi, E. R. 2007. The impact of sub-cellular location and intracellular neuronal proteins on properties of GABA_A receptors. *Curr Pharm Des*. 13: 3169-3177.
- Bevan, P. 2001. Insulin signalling. *Journal of Cell Science* 114: 1429-1430.
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. y Yancopoulos, G. D. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663–675.
- Bowlby, M. R., Fadool, D. A., Holmes, T. C., y Levitan, I. B. 1997. Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J. Gen. Physiol.* 110, 601–610.
- Brickley, S. G., Cull-Candy, S. G. y Farrant, M. 1996. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors. *J. Physiol.* 497, 753–759.
- Bright, D. P., Aller, M. I. y Brickley, S. G. 2007. Synaptic release generates a tonic GABA_A receptor-mediated conductance that modulates burst precision in thalamic relay neurons. *J. Neurosci.* 27, 2560–2569.
- Brown, V. J., y Bowman, E. M. 2002. Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends Neurosci.* 25:340–3.
- Brünig, I., Scotti, E., Sidler, C. y Fritschy, J. M. 2002. Intact sorting, targeting, and clustering of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol.* 443, 43–55.
- Caraiscos, V. B., Elliott, E. M., You-Ten, K. E., Cheng, V. Y., Belelli, D., Newell, J. G., et al. 2004. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha 5 subunit-containing gammaaminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3662–3667.
- Carr, D.B. y Sesack, S. R. 2000. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38: 114-123.

- Chance, F. S., Abbott, L. F., Reyes, A. D. 2002. Gain modulation from background synaptic input. *Neuron* 35:773–782
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J. M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., et al. 2002. Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:8980–8985.
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., Robbins, T. W. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 28(7):771-84.
- Deltour, L., Leduque, P., Blume, N., Madsen, O., Dubois, P., Jami, J., Bucchini, D. 1993. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 90:527–531.
- Dibbens, L. M., Feng, H. J., Richards, M. C., Harkin, L. A., Hodgson, B. L., Scott, D., et al. 2004. GABRD encoding a protein for extra or perisynaptic GABA_A receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1315–1319.
- Drasbek, K. R., y Jensen, K. 2006. THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABA_A receptor-mediated conductance in mouse neocortex. *Cereb. Cortex* 16:1134–1141.
- Drasbek, K. R., Hoestgaard-Jensen, K., y Jensen, K. 2007. Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABA_A-receptor modulators in mouse neocortex. *J. Neurophysiol.* 97, 2293–2300.
- Engelman, J. A., Luo, J. y Cantley, L. C. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7:606-619.
- Fadool, D. A., Tucker, K., Phillips, J. J., y Simmen, J. A. 2000. Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J. Neurophysiol.* 83, 2332–2348.
- Farrant, M., y Nusser, Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosc.* 6: 215-229.
- Fu, Z, Gilbert, E. R. y Liu, D. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 9(1): 25–53.

- Funahashi, K. 1989. On the Approximate Realization of Continuous-Mappings by Neural Networks. *Neural Networks* 2:183-192.
- Fuster, J. M. 2001. The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. *Neuron*. 30(2):319-333.
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P. y Busby, S. J. 2005. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145-177.
- Garduño, J., Galindo-Charles, L., Jiménez-Rodríguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihailescu, S., Hernandez-Lopez, S. 2012. Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci*. 32(43):15148-57.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., y Ahmadiani, A. 2013. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol*. 47(1):145–171.
- Glykys, J. y Mody, I. 2007. Activation of GABA_A Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. *Neuron* 56:763-770.
- Goldman-Rakic, P. S. 1995. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Structure and Functions of the Human Prefrontal Cortex* 769: 71-83.
- Grace, A. A., Floresco, S. B., Goto, Y., y Lodge, D. J. 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci*. 30: 220-227.
- Gray, S. M. y Barrett, E. J. 2018. Insulin transport into the brain. *Am J Physiol Cell Physiol*. 315:C125–C136.
- Graybiel, A. M. 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu. Rev. Neurosci*. 31:359–87.
- Groenewegen, H. J., Uylings, H. B. 2000. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res*. 126:3-28.
- Groenewegen, H. J., Wright, C.I., y Uylings, H. B. M. 1997. The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol*. 11:99–106.

- Hausrat, T. J., Muhia, M., Gerrow, K., Thomas, P., Hirdes, W., Tsukita, S., et al. 2015. Radixin regulates synaptic GABA_A receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. *Nat. Commun.* 6, 6872.
- Havrankova, J., Brownstein, M. y Roth, J. 1981. Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia* 20(Suppl):268-273.
- Hill, J. M., Lesniak, M. A., Pert, C. B., y Roth, J. 1986. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neurosci.* 17, 1127–1138.
- Houser, C. R., y Esclapez, M. 2003. Downregulation of the $\alpha 5$ subunit of the GABA_A receptor in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 13, 633–645.
- Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M. y Saper, C. B. 1991. Efferent Projections of the Infralimbic Cortex of the Rat. *J Comp Neurol.* 308:249-276.
- Isaacson, J. S., Solis, J. M. y Nicoll, R. A. 1993. Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165–175.
- Jacob, T. C., Moss, S. J. y Jurd, R. 2008. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.* 9:331-343.
- Jensen, K., Chiu, C., Sokolova, I., Lester, H., Mody, I. 2003. GABA transporter-(GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABA_A versus GABA_B receptors in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 90, 2690–2701.
- Jia, F., Pignataro, L., Schofield, C. M., Yue, M., Harrison, N. L. y Goldstein, P. A. 2005. An extrasynaptic GABA_A receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 4491–4501.
- Jin, Z., Jin, Y., Kumar-Mendu, S., Degerman, E., Groop, L. y Birnir, B. 2011. Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABA_A channels that generate tonic current. *PLoS One* 6: e16188.
- Jonas, P., Bischofberger, J., Fricker, D. & Miles, R. 2004. Interneuron diversity series: fast in, fast out temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci.* 27, 30–40.

- Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H. y Kojima, I. 1999. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1:165–170.
- Khrestchatisky, M., MacLennan, A. J., Chiang, M. Y., Xu, W. T., Jackson, M. B., Brecha, N., et al. 1989. A novel α subunit in rat brain GABA_A receptors. *Neuron* 3, 745–753.
- Kolb, B. 1984. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research Reviews*, 8: 65-98.
- Kolb, B. Prefrontal cortex. En: Kolb, B., Tees, R. C. 1990. *The cerebral cortex of the rat*. Cambridge, MA: MIT Press. p. 437–458.
- Kozlov, A. S., Angulo, M. C., Audinat, E., y Charpak, S. 2006. Target cell- specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10058–10063.
- Kullmann, D. M., Ruiz, A., Rusakov, D. M., Scott, R., Semyanov, A., Walker, M. C. 2005. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA_A receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol.* 87:33–46.
- Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H. y Häring, H. U. 2016. Brain Insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiol Rev.* 96(4):1169-1209.
- Leao, R. M., Mellor, J. R., y Randall, A. D. 2000. Tonic benzodiazepine- sensitive GABAergic inhibition in cultured rodent cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* 39, 990–1003.
- Lowry, H. O., Rosebrough, J. N., Farr, L. A. y Randall, J. R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, Z., Wu, C. Y., Jiang, Y. P., Ballou, L. M., Clausen, C., Cohen, I. S., et al. 2012. Suppression of phosphoinositide 3-kinase signaling and alteration of multiple ion currents in drug-induced long QT syndrome. *Sci. Transl. Med.* 4, 131–150.
- Lynch, J. 2013. *The Cerebral Cortex*. En: D. Haines. *Fundamental Neuroscience for basic and clinical application*, 4th ed. Philadelphia: Elsevier, pp.442-443.

- Ma, X. H., Zhong, P., Gu, Z., Feng, J. y Yan, Z. 2003. Muscarinic potentiation of GABA(A) receptor currents is gated by insulin signaling in the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 23(4):1159-68.
- Maguire, J. L., Stell, B. M., Rafizadeh, M., y Mody, I. 2005. Ovarian cycle- linked changes in GABA_A receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat. Neurosci.* 8, 797–804.
- Maguire, J., y Mody, I. 2007. Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA_A receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J. Neurosci.* 27, 2155–2162.
- Malherbe, P., Sigel, E., Baur, R., Persohn, E., Richards, J. G. y Möhler, H. 1990. Functional expression and sites of gene transcription of a novel a subunit of the GABA_A receptor in rat brain. *FEBS Lett.* 260, 261–265.
- Man H. Y., Lin J. W., Ju W. H., Ahmadian G., Liu L., Becker L. E., Sheng M. y Wang Y. T. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649–662.
- Martin, D. L., & Olsen, R. W. (Eds.). 2000. *GABA in the nervous system: The view at 50 years.* Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Martin, L. J., Zurek, A. A., MacDonald, J. F., Roder, J. C., Jackson, M. F., and Orser, B. A. 2010. $\alpha 5$ GABA_A receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J. Neurosci.* 30, 5269–5282.
- Martin, J. H. 1998. *Neuroanatomía.* 2da edición. España. Prentice-Hall.
- McEwen, B. S. y Reagan, L. P. 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* 490:13-24.
- Mehran, A. E., Templeman, N. M., Brigidi, G. S., Lim, G. E., Chu, K. Y., Hu, X., Botezelli, J. D., Asadi, A., Hoffman, B. G., Kieffer, T. J., Bamji, S. X., Clee, S. M., Johnson, J. D. 2012. Hyperinsulinemia drives diet- induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* 16: 723–737.
- McKernan, R. M. y Whiting, P. J. 1996. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* 19, 139–143.

- Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A., y Tikkanen, R. 2013. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 4854-4884.
- Mercer, J. N., Chan, C. S., Tkatch, T., Held, J., and Surmeier, D. J. 2007. Nav1.6 sodium channels are critical to pacemaking and fast spiking in globus pallidus neurons. *J. Neurosci.* 27, 13552–13566.
- Mitchell, S. J., Silver, R. A. 2003. Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron* 38:433-445.
- Mody, I. y Pearce, R. A. 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA_A receptors. *Trends Neurosci.* 27(9):569-75.
- Molnár, G., Faragó, N., Kocsis, A. K., Rózsa, M., Lovas, S., Boldog, E., Báldi, R., Csajbók, É., Gardi, J., Puskás, L. G., Tamás, G. 2014. GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *J Neurosci.* 34:1133–1137.
- Morigaki, R., y Goto, S. 2015. Postsynaptic density protein 95 in the striosome and matrix compartments of the human neostriatum. *Front. Neuroanat.* 9:154.
- Myers M. G. Jr. y White M. F. 2002. The Molecular Basis of Insulin Action. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 55-87.
- Nyitrai, G., Kekesi, K. A. y Juhasz, G. 2006. Extracellular level of GABA and Glu: in vivo microdialysis-HPLC measurements. *Curr Top Med Chem.* 6:935–940.
- Olivares, R. J. E. y Arellano, P. A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB.* 27(1):9-18.
- Olsen R. W., Sieghart W. 2009. GABA_A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 56: 141-148.
- Palovcik R.A., Phillips M. I., Kappy M. S. y Raizada M. K. 1984. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* 309: 187-191.
- Passetti, F., Chudasama, Y., y Robbins, T. W. 2002. The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal regions. *Cereb Cortex* 12:1254–68.

- Patti, M. E. y Kahn, C. R. 1998. The insulin receptor a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 9, 89–109.
- Pavlov, I., Savtchenko, L. P., Kullmann, D. M., Semyanov, A., and Walker, M. C. 2009. Outwardly rectifying tonically active GABA_A receptors in pyramidal cells modulate neuronal offset, not gain. *J. Neurosci.* 29, 15341–15350.
- Peng, Z., Huang, C. S., Stell, B. M., Mody, I., y Houser, C. R. 2004. Altered expression of the delta subunit of the GABA_A receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 24, 8629–8639.
- Petrini, E. M., Marchionni, I., Zacchi, P., Sieghart, W., y Cherubini, E. 2004. Clustering of extrasynaptic GABA_A receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 45833–45843.
- Pouille, F., and Scanziani, M. 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293(5532):1159-1163.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (Eds.). 2004. *Neuroscience* (3rd ed.). Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.
- Ramakrishnan, R., y Appleton, R. 2012. Study of prevalence of epilepsy in children with type 1 diabetes mellitus. *Seizure* 21(4), 292-294.
- Richerson, G. B., y Wu, Y. 2003. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.* 90, 1363–1374.
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Sundelöf, J., Sundström, J., Degerman-Gunnarsson, M., Berne, C., Lannfelt, L. y Kilander, L. 2008. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology* 71(14):1065-1071.
- Rose, J. E., y Woolsey, C. N. 1948. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Publ Assoc Nerv Ment Dis.* 27:210–232.
- Rossi, D. J., Hamann, M. y Attwell, D. 2003. Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 548, 97–110.
- Rothman, J. S., Cathala, L., Steuber, V., y Silver, R. A. 2009. Synaptic depression enables neuronal gain control. *Nature* 457, 1015–1018.

- Saltiel, A. R. y Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865):799-806.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte, D., Jr. 1992. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*. 13:387–414.
- Schwarzer, C., Tsunashima, K., Wanzenböck, C., Fuchs, K., Sieghart, W., y Sperk, G. 1997. GABA_A receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 80, 1001–1017.
- Scimemi, A., Andersson, A., Heeroma, J. H., Strandberg, J., Rydenhag, B., McEvoy, A.W., et al. 2006. Tonic GABA_A receptor-mediated currents in human brain. *Eur. J. Neurosci.* 24:1157–1160.
- Scimemi, A., Semyanov, A., Sperk, G., Kullmann, D. M., y Walker, M. C. 2005. Multiple and plastic receptors mediate tonic GABA_A receptor currents in the hippocampus. *J. Neurosci.* 25:10016–10024.
- Sequist, E. R. 2010. The final frontier: how does diabetes affect the brain? *Diabetes* 59, 4–5.
- Sebe, J. Y., Looke-Stewart, E. C., Estrada, R. C., and Baraban, S. C. 2010. Robust tonic GABA currents can inhibit cell firing in mouse newborn neocortical pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1310–1318.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M. y Silver, R. A. 2004. Tonicity active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* 27:262-269.
- Semyanov, A., Walker, M. C. y Kullmann, D. M. 2003. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6(5):484-490.
- Shivers, B. D., Killisch, I., Sprengel, R., Sontheimer, H., Köhler, M., Schofield, P. R., et al. 1989. Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations. *Neuron* 3, 327–337.

- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., et al., (Eds.). 1999. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. (6th ed.) Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., y Kolb, B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? Behavioural Brain Research 146: 3-17.
- Toledo, A., Sandoval, A., González-Ramírez, R., Ávila, T., Almanza, A., Monjaraz, E., et al. 2012. Insulin-mediated upregulation of T-type Ca²⁺ currents in GH3 cells is mediated by increased endosomal recycling and incorporation of surface membrane Cav3.1 channels. Cell Calcium 52, 377–387.
- Tschritter, O., Hennige, A. M., Preissl, H., Porubská, K., Schäfer, S. A., Lutzenberger, W., Machicao, F., Birbaumer, N., Fritsche, A. y Häring, H. U. 2007. Cerebrocortical beta activity in overweight humans responds to insulin detemir. PLoS One 2: e1196.
- Vázquez-Borsetti, P. E. 2008. Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Valverde, F. 2002. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. Rev Neurol. 34: 758-780.
- Vardya, I., Drasbek, K. R., Dósa, Z. y Jensen, K. 2008. Cell typespecific GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. J. Neurophysiol. 100, 526–532.
- Verrotti, A., Scardapane, A., Franzoni, E., Manco, R., y Chiarelli, F. 2008. Increased oxidative stress in epileptic children treated with valproic acid. Epilepsy Res. 78(2-3):171-177.
- Verrotti, A., Scaparrotta, A., Olivieri, C., Chiarelli, F. 2012. Seizures and type 1 diabetes mellitus: current state of knowledge. Eur J Endocrinol. 167(6):749-58.
- Vertes, R. P. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51:32-58.
- Vetiska, S. M., Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wymann, M. P. y Wang, Y. T. 2007. GABA_A receptor associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-

- induced recruitment of postsynaptic GABA_A receptors. *Neuropharmacol.* 52:146–153.
- Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nürnberg, B., Heblich, F., et al. 2004. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat. Neurosci.* 7, 939–946.
- Volkandt, W. 2002. Vesicular release mechanisms in astrocytic signalling. *Neurochem. Int.* 41, 301–306
- Walker, C. M. y Semyanov, A. 2008. Regulation of excitability by extrasynaptic GABA_A Receptors. *Results Probl Cell Differ.* 44:29-48.
- Wall, M. J., y Usowicz, M. M. 1997. Development of action potential- dependent and independent spontaneous GABA_A receptor-mediated currents in granule cells of postnatal rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 9, 533–548.
- Walls, A.B., Nilsen, L.H., Eyjolfsson, E.M., Vestergaard, H.T., Hansen, S.L., Schousboe, A., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S. 2010. GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *J Neurochem* 115, 1398–1408.
- Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F. y Wang, Y. T. 1997. Recruitment of functional GABA_A receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388:686-690.
- Wang, Q., Liu, L., Pei, L., Ju, W., Ahmadian, G., Lu, J., et al. 2003. Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* 38, 915–928.
- Werther, G. A., Hogg, A., Oldfield, B. J., McKinley, M. J., Figdor, R., Allen, A. M., et al. 1987. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121, 1562–1570.
- Winstanley, C. A., Theobald, D. E., Cardinal, R. N., y Robbins, T. W. 2004. Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. *J Neurosci.* 24:4718–2472.
- Wisden, W., Cope, D., Klausberger, T., Hauer, B., Sinkkonen, S. T., Tretter, V., Lujan, R., Jones, A., Korpi, E. R., Mody, I., Sieghart, W., y Somogyi, P. 2002. Ectopic expression of the GABA(A) receptor alpha6 subunit in hippocampal

- pyramidal neurons produces extrasynaptic receptors and an increased tonic inhibition. *Neuropharmacol.* 43(4):530-49.
- Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, S. P., y Raizada, M. K. 1993. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 22, 1–10.
- Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., y Fukuda, A. 2004. Cl–uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 557, 829–841.
- Youngren J. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:873- 891.
- Yun, C., y Xuefeng, W. 2013. Association between seizures and diabetes mellitus: a comprehensive review of literature. *Curr Diabetes Rev.* 9(4):350-354.

XIV. Artículo

Trujeque-Ramos, S., Castillo-Rolón, D., Galarraga, E., Tapia, D., Arenas-López, G., Mihailescu, S. y Hernández-López, S. 2018. Insulin Regulates GABA_A Receptor-Mediated Tonic Currents in the Prefrontal Cortex. *Front Neurosci* 31;12:345. doi: 10.3389/fnins.2018.00345. eCollection 2018.