



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral: “Estudio de la inhibición de los canales de calcio presinápticos tipo Ca_v2 por la actividad constitutiva del receptor de ghrelina (GHSR) y su impacto sobre la actividad sináptica en neuronas hipocámpales”

Tesista: Lic. Valentina Martínez Damonte

Directora: Dra. Jesica Raingo

Año: 2019

*«De todo quedaron tres cosas:
la certeza de que estaba siempre comenzando,
la certeza de que había que seguir
y la certeza de que sería interrumpido antes de terminar.*

*Hacer de la interrupción un camino nuevo,
hacer de la caída, un paso de danza,
del miedo, una escalera,
del sueño, un puente,
de la búsqueda, ...un encuentro»*

-Fernando Pessoa

Índice

<i>Índice</i>	3
<i>Listado de Abreviaturas</i>	5
<i>Resumen</i>	7
<i>Abstract</i>	9
<i>Publicaciones</i>	11
<i>Introducción</i>	12
<i>Ca_v: canales de calcio operados por voltaje</i>	13
<i>Ca_v y sinapsis</i>	14
<i>Regulación de Ca_v</i>	15
<i>La regulación de Ca_v por receptores acoplados a proteína G</i>	16
<i>GHSR: el receptor de ghrelina</i>	17
<i>GHSR en el circuito hipocampal</i>	20
<i>Objetivos</i>	22
<i>Materiales y Métodos</i>	24
1. Modelos experimentales.....	25
1.1. <i>Células HEK293T</i>	25
1.2. <i>Animales</i>	25
2. Biología molecular	27
2.1. <i>Obtención de clones para transfección</i>	27
2.1.5. <i>Cuantificación de ADN</i>	29
3. Expresión heteróloga.....	29
3.1. <i>Transfecciones transientes en células HEK293T en cultivo</i>	29
3.2. <i>Transducción de cultivos neuronales hipocampales primarios con partículas lentivirales</i>	29
4. Técnicas de Imágenes.....	30
4.1. <i>Análisis de la funcionalidad de Ca_v2.1-GFP y Ca_v2.2-GFP</i>	30
4.2. <i>Coloración de la membrana plasmática</i>	31
4.3. <i>Adquisición de microfotografías y análisis de imágenes</i>	31
5. Cultivos neuronales primarios de ratón.....	31
5.1. <i>Preparación de vidrios estériles para cultivo</i>	31
5.2. <i>Extracción y cultivo de neuronas hipocampales de ratón</i>	32
6. Rebanadas de hipocampo de ratón	33
7. <i>Patch-clamp</i> en configuración de célula entera	33

7.1. Cultivo primario	34
7.2. Rebanadas de hipocampo	35
8. Drogas.....	35
9. Análisis Estadístico	36
<i>Resultados – Capítulo I</i>	37
Objetivo 1a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes de calcio totales en neuronas hipocampales en cultivo y determinar cuál es la contribución de los subtipos Ca _v 2.1 y Ca _v 2.2 a la corriente modulada.	38
Objetivo 1b- Estudiar si la inhibición de Ca _v 2.1 y Ca _v 2.2 por la actividad constitutiva de GHSR involucra la disminución de la densidad de Ca _v 2.1 y Ca _v 2.2 en la membrana plasmática en células HEK293T transfectadas.....	41
<i>Resultados – Capítulo II</i>	47
Objetivo 2a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en neuronas hipocampales en cultivo	48
Objetivo 2b- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en el circuito hipocampal en rebanadas de cerebro.	56
<i>Discusión</i>	59
<i>Conclusiones</i>	78
<i>Bibliografía</i>	80
<i>Agradecimientos</i>	103

Listado de Abreviaturas

µg	microgramo
µM	micromolar
µs	microsegundo
µl	microlitro
aCSF	líquido cefalorraquídeo artificial
A	absorbancia
APV	(2R)-amino-5-fosfopentanoato
ATB	antibiótico
BAPTA	ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético
BC	células canasta
Ca _v	canales de calcio operados por voltaje
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
DIV	día in vitro
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N', N'-ácido tetraacético
EPSCs	corrientes postsinápticas excitatorias
GC-IPSC	corrientes postsinápticas inhibitorias intra-giro dentado
GD	giro dentado
GDP	guanosín difosfato
GHSR	receptor de ghrelina
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GTP	guanosín trifosfato, guanosín trifosfato
h	hora
HEK293	human embryo kidney 293
HICAP	células del <i>hilus</i> relacionadas con la vía de asociación comisural
IPSCs	corrientes postsinápticas inhibitorias
LB	Luria Bertani
LEAP2	<i>liver-expressed antimicrobial peptide 2</i>
M	molar
MΩ	mega ohm
mA	miliamperio
mEPSCs	corrientes postsinápticas miniatura excitatorias
mIPSCs	corrientes postsinápticas miniatura inhibitorias
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ms	milisegundo
mV	milivoltio
MΩ	megaohm
ng	nanogramo
nm	nanómetro
ORL1	<i>opiod receptor-like type 1</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción de la polimerasa en cadena
PIR-EPSC	corrientes postsinápticas excitatorias DG-CA3
PKC	proteína quinasa C

r.p.m.....	revoluciones por minuto
s	segundo
SFB.....	suero fetal bovino
SGZ	zona subgranular
SPA.....	análogo de la sustancia P
TBC.....	transcription blocking cassette
TTX.....	tetrodotoxina
VGLUT3.....	transportador vesicular de glutamato tipo 3

Resumen

Los canales de calcio operados por voltaje tipo Ca_v2 presinápticos acoplan la despolarización de membrana al influjo de calcio, desencadenando la liberación de vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores. Existen muchos mecanismos fisiológicos que controlan la actividad de los Ca_v2 , siendo los receptores acoplados a proteína G (GPCR) uno de los más efectivos. Esta modulación ocurre mediante la alteración de la expresión, el tráfico o el funcionamiento de los Ca_v2 e impacta en la actividad neuronal. GHSR es un GPCR que posee una alta actividad constitutiva -independiente de la unión a ligando- la cual modula los Ca_v2 en un sistema de expresión heterólogo. A diferencia de la función fisiológica de su actividad evocada por ghrelina, el rol de su actividad constitutiva aún no se comprende completamente, debido a su naturaleza crónica y a la falta de agonistas inversos específicos. GHSR se encuentra ampliamente expresado en numerosos núcleos cerebrales con bajo acceso a la ghrelina plasmática como el hipocampo, donde se ha reportado que la aplicación de ghrelina exógena provoca distintos efectos, como la reorganización y el aumento de la densidad de espinas sinápticas, el incremento en la plasticidad a largo plazo y la neurogénesis. Así, en esta tesis postulamos que la modulación de los Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR podría ser relevante en la neurotransmisión hipocampal.

Nuestra estrategia experimental consistió en realizar registros de *patch-clamp* en configuración de célula entera en cultivos hipocampales primarios de embriones de 16-18 días de ratones C57BL6 salvajes y deficientes en GHSR, luego de manipular los niveles de expresión de GHSR mediante transducción lentiviral. Encontramos que la actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes nativas $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, siendo el $Ca_v2.2$ el subtipo más afectado. Luego, indagamos acerca del mecanismo por el que ocurre esta modulación mediante la coexpresión de versiones fluorescentes de los Ca_v2 y GHSR en un sistema de expresión heterólogo. Así, encontramos que la reducción de la corriente macroscópica conlleva una reducción de la densidad en membrana de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$, y además, demostramos que esta forma constitutiva de inhibición de los Ca_v por GHSR depende de la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$. Este subconjunto de datos fue parte de dos trabajos publicados en colaboración con otros miembros de

nuestro laboratorio. Al evaluar si la modulación de Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR afecta la transmisión sináptica en el hipocampo, encontramos que ésta conduce a una disminución de la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA pero no de glutamato. Por otro lado, encontramos que GHSR no afecta la neurotransmisión inhibitoria o excitatoria independiente de los Ca_v ni la maquinaria de exocitosis de vesículas sinápticas. En base a nuestros resultados, postulamos que la selectividad del efecto de GHSR está vinculada con la mayor dependencia de la neurotransmisión GABAérgica del subtipo $Ca_v2.2$ respecto de $Ca_v2.1$. Esto es coincidente con varios estudios que reportan una mayor dependencia de la liberación de GABA con los $Ca_v2.2$, mientras que la neurotransmisión glutamatérgica depende en mayor medida de los $Ca_v2.1$. Para evaluar las consecuencias fisiológicas del efecto que observamos en neuronas en cultivo exploramos cómo afecta la actividad constitutiva de GHSR al circuito hipocampal intacto. El giro dentado es el punto de ingreso al circuito principal de la formación hipocampal, y funciona como un filtro fuertemente controlado mediante interneuronas locales. Observamos que la actividad constitutiva de GHSR reduce la transmisión GABAérgica local en el giro dentado en rebanadas horizontales de cerebro de ratón, mientras que no modifica la salida excitatoria del giro dentado a las neuronas piramidales de CA3.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral estudiamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes Ca_v nativas y la transmisión sináptica en neuronas del hipocampo, un área con acceso restringido a ghrelina. El efecto de la actividad constitutiva de GHSR y su selectividad hacia la neurotransmisión GABAérgica dependiente de $Ca_v2.2$ podría tener importantes implicancias en los procesos fisiológicos que dependen del hipocampo como el aprendizaje y la memoria, en los cuales GABA ha ganado relevancia en los últimos años.

Abstract

Ca_v2 channels couple membrane depolarization to calcium influx, triggering synaptic vesicle release containing neurotransmitters. There are many physiological mechanisms aimed at controlling Ca_v2 activity, GPCR activation being one of the most effective. This modulation is achieved by altering the expression, trafficking, or function of Ca_v channels affecting neuronal activity. GHSR is a GPCR that displays high constitutive activity -independent from its endogenous ligand, ghrelin- which has been described to regulate Ca_v2 in a heterologous system. Opposite to GHSR ghrelin-induced active mode, its constitutive active mode function is less understood due to its chronic nature and the scarcity of specific inverse agonists. GHSR is highly expressed in many brain nuclei with restricted access to plasma ghrelin, as the hippocampus, where exogenous ghrelin application results in reorganization and increase in the density of dendritic spines, augmentation of long term potentiation and neurogenesis. Hence, in this thesis we postulate that GHSR constitutive activity-mediated modulation of Ca_v2 could be relevant in the hippocampus.

Our experimental strategy consisted in whole-cell patch-clamp recordings in hippocampal primary cultures from 16-18 days old C57BL6 wild type and GHSR deficient embryonic mice after manipulating GHSR expression with lentiviral transduction. We found that GHSR constitutive activity impairs Ca_v2.1 and Ca_v2.2 native calcium currents, being Ca_v2.2 the most affected subtype. Then, we explored the mechanism underlying this modulation using a heterologous expression system to coexpress fluorescent versions of each Ca_v2 and GHSR. We found that the reduction in the macroscopic current observed implies the reduction of Ca_v2.1 and Ca_v2.2 membrane density, and we also demonstrated that this constitutive form of GPCR inhibition of Ca_v depends on the presence of Ca_vβ subunit. This data subset was included in two peer-reviewed publications in collaboration with other lab members. When we evaluated if Ca_v2 modulation by GHSR constitutive activity could affect hippocampal Ca_v-dependent synaptic transmission, we found that the Ca_v2 basal impairment observed leads to a decrease in GABA but not glutamate release. We also found that GHSR does not affect Ca_v-independent synaptic neurotransmission nor the release machinery.

We postulate that this selective effect is related to a higher Ca_v2.2 contribution over Ca_v2.1 to GABA release. This is in agreement with several studies that report a

greater coupling of GABA release to Ca_v2.2, while glutamatergic neurotransmission depends to a greater extent on Ca_v2.1. To evaluate the physiological consequences of the effect we found in neurons in culture, we explored how GHSR constitutive activity affects the intact hippocampal circuit. The dentate gyrus is the entry point to the main circuit of the hippocampal formation, and it works as a filter strongly controlled by local interneurons. We observed that GHSR constitutive activity reduces local GABAergic transmission in horizontal mice brain slices, while it does not affect the glutamatergic output of the dentate gyrus towards CA3.

In summary, in this thesis we aimed to study the effect of GHSR constitutive activity on hippocampal presynaptic Ca_v currents and synaptic transmission in neurons from the hippocampus, a brain area with restricted ghrelin access. The effect of GHSR constitutive activity and its selectivity towards GABAergic transmission relying on Ca_v2.2 could be of high relevance in hippocampal-dependent physiological processes, in which GABA modulation has recently gained attention.

Publicaciones

Los resultados de esta tesis doctoral forman parte de las siguientes publicaciones:

GHSR constitutive activity impairs voltage-gated calcium channel (Ca_v)-dependent inhibitory neurotransmission in hippocampal neurons.

Martínez Damonte Valentina, Rodríguez Silvia Susana and Raingo Jesica.
J Physiol. 2018 Nov; 596(22):5415-5428. doi: 10.1113/JP276256. Epub 2018 Oct 14.

PMID: 30199095

Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca²⁺ channels in a Ca_vβ-dependent manner.

Mustafá ER, López Soto EJ, **Martínez Damonte V**, Rodríguez SS, Lipscombe D, Raingo J.BN- J Cell Sci. 2017 Nov 15; 130(22):3907-3917. doi: 10.1242/jcs.207886. Epub 2017 Oct 16.

PMID: 29038230

Constitutive and ghrelin-dependent GHSR activation impairs Ca_v2.1 and Ca_v2.2 currents in hypothalamic neurons.

López Soto EJ, Agosti F, Cabral A, Mustafa ER, **Damonte VM**, Gandini MA, Rodríguez S, Castrogiovanni D, Felix R, Perelló M, Raingo J.

J Gen Physiol. 2015 Sep;146(3):205-19. doi: 10.1085/jgp.201511383. Epub 2015 Aug 17.

PMID: 26283199

Introducción

«Yo diría [...] que la ciencia está mucho más cerca de la poesía que de la realidad, que su función en el organismo de nuestra vida se parece mucho a la del arte. Sin duda, en comparación con una novela, la ciencia parece la realidad misma. Pero en comparación con la realidad auténtica se advierte lo que la ciencia tiene de novela, de fantasía, de construcción mental, de edificio imaginario.»

-José Ortega y Gasset, Ideas y creencias

Ca_v: canales de calcio operados por voltaje

Los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) son proteínas de membrana que se expresan en la mayoría de las células excitables en las que permiten el paso selectivo de iones calcio a través de la membrana plasmática. Los Ca_v se abren en respuesta a despolarizaciones transduciendo cambios en el potencial de membrana en rápidos aumentos locales de la concentración intracelular de calcio. Debido al rol central del ion calcio en las cascadas de señalización, estos incrementos locales desencadenan una amplia gama de respuestas fisiológicas, como la secreción hormonal, la contracción muscular y la transmisión sináptica.

Los Ca_v son complejos heterotriméricos formados por una subunidad principal Ca_vα₁ y por las subunidades auxiliares regulatorias Ca_vβ y Ca_vα₂δ (Simms y Zamponi, 2012; Felix *et al.*, 2013; Dolphin, 2016). La subunidad Ca_vα determina las propiedades generales de los Ca_v, ya que posee los elementos básicos para su funcionamiento, como el sensor de voltaje y el poro selectivo para el ion calcio. Los Ca_v han sido clasificados según las distintas subunidades Ca_vα que los componen. Se conocen diez genes que codifican para la subunidad principal de los Ca_v en vertebrados que se agrupan en las familias Ca_v1, Ca_v2 y Ca_v3 (Ertel *et al.*, 2000). Las propiedades biofísicas de cada subtipo son diferentes, permitiendo que estos canales tengan funciones específicas (Dolphin, 2012). Además, los distintos subtipos de Ca_v son sensibles a diferentes toxinas naturales específicas, las cuales permiten identificar la participación de sus corrientes en los distintos procesos celulares. Las subunidades Ca_vβ y Ca_vα₂δ poseen roles importantes en la modulación de los Ca_v. A diferencia de los Ca_v3, los Ca_v1 y Ca_v2 se expresan generalmente junto a las subunidades auxiliares, las cuales promueven el tráfico de la subunidad principal desde el retículo endoplasmático hacia la membrana y la estabilidad en la misma (Dolphin, 2012), modificando además las propiedades cinéticas y su regulación por segundos mensajeros. A su vez existen varios subtipos de las subunidades auxiliares Ca_vβ y Ca_vα₂δ que modifican diferencialmente a los Ca_v.

En las neuronas, las funciones de cada subtipo de Ca_v son muy variadas y dependen de su localización subcelular. Así, los Ca_v pueden modular la actividad eléctrica en el axón (Ca_v3) (Molineux *et al.*, 2006), la transcripción dependiente de calcio en el soma (Ca_v1.2 y Ca_v1.3) (Wheeler *et al.*, 2008), o la liberación de

neurotransmisores desde las terminales ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$) (Dunlap *et al.*, 1995; Catterall y Few, 2008; Pan y Zucker, 2009). Los Ca_v presinápticos (Ca_v2) permiten el acoplamiento entre la despolarización de la membrana plasmática producto de la llegada de potenciales de acción a la terminal presináptica y el influjo de calcio que conduce a la liberación de neurotransmisores (Mochida, 2018). El calcio que ingresa se une a distintas proteínas sensoras específicas disparando la fusión de la membrana de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la consecuente liberación de neurotransmisores. En particular, estos Ca_v se activan a potenciales cercanos a cero y son sensibles a las toxinas naturales específicas ω -agatoxina IVA ($Ca_v2.1$) y ω -conotoxina GVIA ($Ca_v2.2$) mientras para $Ca_v2.3$ no existen toxinas específicas.

Ca_v y sinapsis

La sinapsis constituye la unidad funcional que permite la comunicación entre las neuronas. Es una estructura asimétrica muy especializada en la que los neurotransmisores liberados de la terminal presináptica al espacio intersináptico se unen a receptores de la neurona postsináptica (Südhof, 2014). Aunque todas operan bajo el mismo principio básico, caracterizado por la rapidez y la precisión de los pasos involucrados en la transmisión de la señal, las sinapsis difieren profundamente entre sí en propiedades como la fuerza, la plasticidad y el grado de sincronía con el disparo de potenciales de acción (Scimemi y Diamond, 2013). Dado el rol central del calcio en la neurotransmisión, la distribución de los Ca_v en la terminal presináptica y su grado de proximidad con los sitios de liberación de neurotransmisores, así como la identidad y contribución de los distintos subtipos al ingreso de calcio inciden fuertemente en las propiedades de la sinapsis (Nakamura *et al.*, 2015; Stanley, 2016). La cercanía de los Ca_v2 a las vesículas listas para ser liberadas modifica la velocidad de detección del incremento local de calcio por las proteínas sensoras localizadas en la membrana de las vesículas. Por lo tanto, la distancia entre los Ca_v2 y las vesículas sinápticas, que puede estar en el rango de los nanómetros (nanodominio) a micrómetros (microdominio), modifica el grado de acoplamiento entre los potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores desde un nivel muy estrecho de asociación hasta uno más débil (Stanley, 2016). Se ha descrito que este grado de acoplamiento varía con el subtipo de Ca_v2 . En

varias sinapsis donde el acoplamiento es fuerte se encontró que los $Ca_v2.1$ median mayoritariamente la liberación de neurotransmisor (Wu y Saggau, 1994; Mintz *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Los subtipos de Ca_v2 en la presinapsis también contribuyen a la variabilidad entre las sinapsis por sus propiedades biofísicas particulares y su sensibilidad diferencial a moduladores (Stanley, 2015). En este contexto se ha encontrado cierta correlación entre el tipo de sinapsis y la identidad de los Ca_v que gobierna la neurotransmisión. Así, las sinapsis excitatorias suelen depender de ambos subtipos, $Ca_v2.2$ y los $Ca_v2.1$, en distinta medida (Luebke *et al.*, 1993; Takahashi y Momiyama, 1993; Regehr y Mintz, 1994; Wheeler *et al.*, 1994), aunque $Ca_v2.3$ y $Ca_v1.2$ pueden estar también involucrados en algunas circunstancias (Jensen y Mody, 2001; Dietrich *et al.*, 2003). En cambio, las sinapsis GABAérgicas tienden a utilizar mayoritariamente un subtipo u otro de Ca_v2 (Poncer *et al.*, 1997; Brager *et al.*, 2003); aunque algunas sinapsis inicialmente expresan ambos subtipos de Ca_v2 para depender luego solo de $Ca_v2.1$ a medida que maduran (Rosato-Siri *et al.*, 2002).

Así, la identidad de los Ca_v que median la transmisión, sus particularidades y la distancia de éstos a las proteínas sensoras de calcio constituyen factores determinantes para la velocidad y eficacia de la transmisión sináptica, por lo que la regulación de los Ca_v es crítica para la neurotransmisión.

Regulación de Ca_v

Los mecanismos de regulación de Ca_v2 incluyen la modulación de las propiedades intrínsecas de los Ca_v por el voltaje o por el propio calcio, la acción de las subunidades auxiliares, la unión directa de proteínas sinápticas y la regulación por cascadas activadas por receptores acoplados a proteína G (GPCR, de la sigla en inglés para *G protein-coupled receptor*). La inactivación dependiente de voltaje y la dependiente de calcio son mecanismos de control que inactivan los Ca_v luego de ser activados para que los cambios en la concentración de calcio sean acotados en el tiempo (Catterall, 2000; Budde *et al.*, 2002; Christel y Lee, 2012). Cuando una despolarización es sostenida en el tiempo, los Ca_v se inactivan provocando una disminución del ingreso de calcio, mientras que el propio flujo de calcio inactiva los Ca_v2 de manera dependiente de calmodulina (Christel y Lee, 2012). Ambos mecanismos de inactivación evitan que la señal de calcio se prolongue en el tiempo

permitiendo que la neurona sea sensible a la llegada de un nuevo estímulo despolarizante en intervalos de tiempo cortos. Además, las subunidades auxiliares modulan la cinética de activación, inactivación y desactivación (Campiglio y Flucher, 2015) en forma particular para cada subtipo de Ca_v (Bichet *et al.*, 2000; Stotz y Zamponi, 2001; Fang y Colecraft, 2011). Por otro lado, la interacción con proteínas sinápticas presentes en las vesículas también regula la actividad de los Ca_v2 , como es el caso de syntaxina 1, cuya interacción con $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$ disminuye la probabilidad de apertura de estos Ca_v (Jarvis y Zamponi, 2001). Una de las formas más eficientes de regular los Ca_v es a través de la actividad de GPCRs debido a la alta sensibilidad de los Ca_v a éstos (Currie, 2010), en particular la del subtipo $Ca_v2.2$ (Colecraft *et al.*, 2000; Agler *et al.*, 2003). Este es un mecanismo compartido por una gran variedad de moduladores, que funcionan como agonistas específicos de los GPCRs, entre los que se encuentran los propios neurotransmisores (Hille, 1994; Currie, 2010). En el apartado siguiente abordamos los detalles de esta modulación que constituyen el núcleo de estudio de esta tesis.

La regulación de Ca_v por receptores acoplados a proteína G

La activación canónica de los GPCRs ocurre por la unión de agonistas en el lado extracelular. No obstante, muchos GPCRs poseen la capacidad de adquirir un estado conformacional activo de manera independiente de ligando conocido como actividad constitutiva (Bond y IJzerman, 2006). En sus estados activos los GPCRs señalizan a través de proteínas G conformadas por la subunidad principal $G\alpha$ y la subunidad $G\beta\gamma$. Estas proteínas poseen actividad GTPasa, la cual es crucial para su función ya que se encuentran activas cuando poseen guanósín trifosfato (GTP, de la sigla en inglés para *guanosine triphosphate*) en su estructura, e inactivas cuando se trata de guanósín difosfato (GDP, de la sigla en inglés para *guanosine diphosphate*). Los GPCRs pueden estar acoplados a uno o más tipos de proteínas G, las cuales cuando se activan liberan la subunidad $G\beta\gamma$ y permiten que $G\alpha$ desencadene la amplificación de vías de señalización. Los GPCRs regulan los Ca_v2 generalmente en forma negativa, lo que conlleva una reducción de la liberación de neurotransmisores (Catterall y Few, 2008; Zamponi y Currie, 2013). El mecanismo mejor descrito de inhibición de los Ca_v requiere la interacción física entre $G\beta\gamma$ libre y los Ca_v2 (Ikeda, 1996). Esta inhibición de la corriente Ca_v es

dependiente del voltaje, ya que la unión $G\beta\gamma$ - Ca_v2 es removida por la despolarización de la membrana (Jeong y Ikeda, 2000). En cambio, la modulación de Ca_v a través de las proteínas $G\alpha$ ha sido menos explorada. Se sabe que esta inhibición es independiente del voltaje, implica una amplificación de señal por segundos mensajeros y puede involucrar cambios en los niveles de fosforilación de los Ca_v (Raingo *et al.*, 2007) o en su densidad en membrana (Beedle *et al.*, 2004; Zamponi y Currie, 2013). Las características de esta inhibición dependen de la identidad de la subunidad de la proteína G involucrada. Existen distintos genes que codifican para la subunidad $G\alpha$, las cuales se clasifican en tres familias principales: G_s , G_i/o , y G_q . Esta inhibición es más lenta que la inhibición mediada por $G\beta\gamma$ debido a que involucra distintos pasos en las cascadas de señalización. Las vías mejor descritas para esta inhibición son aquellas activadas por GPCRs acoplados a G_q , que implican la depleción de fosfatidilinositol difosfato en la membrana por activación de fosfolipasa C (Suh *et al.*, 2010), la activación de proteína quinasa C (PKC) y la síntesis de ácido araquidónico (Delmas *et al.*, 2005). Aunque el mecanismo clásico por el que los GPCRs acoplados a G_i/o actúan sobre los Ca_v es la inhibición dependiente del voltaje por $G\beta\gamma$, estos receptores también pueden inhibir algunas formas de corte y empalme de $Ca_v2.2$ de manera independiente del voltaje a través de activación de tirosina quinasa por $G\alpha$ (Raingo *et al.*, 2007). Los GPCRs pueden promover la remoción de los Ca_v de la membrana plasmática por internalización del Ca_v o del complejo Ca_v -GPCR a través de mecanismos dependientes o no de proteína G (Simms y Zamponi, 2012). En esta tesis estudiamos la modulación de los Ca_v por un GPCR en particular, el receptor de ghrelina.

GHSR: el receptor de ghrelina

GHSR (de la sigla en inglés para *growth hormone secretagogue receptor*) es el GPCR específico de la hormona ghrelina. Está codificado por un único gen que se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso, particularmente en el hipotálamo, aunque también se ha reportado su expresión en otras zonas donde no se conoce su función en detalle, como la glándula pituitaria, el sistema cardiovascular y el páncreas (Petersenn *et al.*, 2001). El corte y empalme del ARNm primario para GHSR da lugar a dos isoformas del receptor: GHSR1a,

codificada por dos exones, y GHSR1b, codificada por un único exón. La isoforma de este receptor con la que trabajamos es GHSR1a (en esta tesis, GHSR), la única para la cual se identificó la proteína nativa funcional (Kojima, 1999; Callaghan y Furness, 2014). GHSR posee dos propiedades que lo caracterizan como un GPCR particular: activa múltiples cascadas de señalización y posee una elevada actividad constitutiva. GHSR ha sido tradicionalmente descrito como un GqPCR, ya que la activación de GHSR desencadena a su vez la activación de proteína Gq y de las cascadas intracelulares correspondientes, incluyendo el aumento transitorio de la concentración intracelular de inositol trifosfato, de calcio y de la actividad de PKC (Howard *et al.*, 1996; Holst *et al.*, 2003; Holliday *et al.*, 2007). No obstante, recientemente se ha descrito que GHSR también puede acoplarse a las proteínas Gi/o y G12/13, así como también a vías independientes de proteína G, como la que recluta β -arrestina (Bennett *et al.*, 2009; Evron, Sean M Peterson, *et al.*, 2014). En este sentido, recientemente hemos demostrado que una forma de modulación de Ca_v2 no depende de Gq, sino de Gi/o (López Soto *et al.*, 2015). En cuanto a la segunda propiedad, si bien la mayoría de los GPCRs poseen algún porcentaje de actividad constitutiva, ésta es en general muy baja. La actividad constitutiva se observa cuando los GPCRs adquieren espontáneamente un estado conformacional activo en ausencia de agonista, que es distinto a los estados activos en presencia de agonista (Mary *et al.*, 2012). En el caso de GHSR esta actividad es la más alta conocida para un GPCR, alcanzando, para la activación de Gq, el 50 % de su máxima actividad dada por una dosis saturante de ghrelina (Holst *et al.*, 2007). La actividad constitutiva de GHSR es muy superior a la del GPCR con mayor homología respecto a GHSR, el receptor de motilina (Holst *et al.*, 2003), y comparable con la de uno de los GPCR con actividad constitutiva mejor caracterizado, el receptor viral ORF74 (Rosenkilde *et al.*, 1999). Una herramienta muy útil para el estudio de la actividad constitutiva de GHSR es un mutante natural puntual (GHSRA204E) en humanos que posee una sustitución de alanina por glutamato en una región extracelular del receptor, generando que la variante GHSRA204E carezca por completo de actividad constitutiva (Pantel *et al.*, 2006). Por otro lado, la unión de algunos ligandos, denominados agonistas inversos, desplazan el equilibrio desde el estado conformacional activo basal hacia un estado inactivo, disminuyendo el grado de actividad constitutiva de los GPCRs (Strange, 2002). En general, los agonistas inversos poseen sitios de unión diferentes de los

agonistas y muchas veces funcionan además como antagonistas. En cuanto a GHSR, existe un péptido sintético denominado análogo de la sustancia P (del inglés para [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]-*substance P analogue*, SPA) que funciona como un potente agonista inverso (Holst *et al.*, 2006). Sin embargo, este péptido también actúa como antagonista de baja eficiencia y posee otros blancos neuronales que lo invalidan como herramienta experimental en sistemas nativos. Recientemente se ha reportado el hallazgo de un antagonista natural de ghrelina (Ge *et al.*, 2018) que también posee cierto comportamiento como agonista inverso (M'Kadmi *et al.*, 2018) denominado LEAP2 (de la sigla en inglés para *liver-expressed antimicrobial peptide 2*), el cual está actualmente bajo intenso estudio. Estos comportamientos duales no son excepcionales ya que muchos ligandos sintéticos de GHSR tampoco funcionan estrictamente como agonistas, antagonistas o agonistas inversos sino que poseen características mixtas dependiendo de las vías que activan o inhiben, evidenciando la complejidad del funcionamiento de GHSR (Ramirez *et al.*, 2018).

La activación de GHSR por su ligando endógeno ghrelina, una hormona peptídica secretada por células endócrinas del tracto digestivo, ejerce un potente efecto orexigénico a nivel central (Kojima, 1999). Cuando el estómago está vacío se produce la secreción de ghrelina hacia el torrente sanguíneo, por el cual circula hasta alcanzar el hipotálamo a través de capilares fenestrados de los órganos circunventriculares. Su acción resulta en un rápido aumento del apetito como consecuencia de la estimulación de las neuronas NPY/AGRP del núcleo arcuato del hipotálamo (Perello *et al.*, 2012). Pese a que GHSR se encuentra expresado en otras áreas del cerebro, ghrelina no puede atravesar libremente la barrera hematoencefálica, de modo que solo algunos núcleos son sensibles a los niveles de ghrelina en sangre (Cabral *et al.*, 2015; Abizaid y Edwards, 2017; Cabral, Cornejo, *et al.*, 2017). Otro punto de acceso de ghrelina a los núcleos extrahipotalámicos podría ser la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo a través de los plexos coroideos o los tanicitos hipotalámicos, células ependimarias especializadas a las que se les ha atribuido un rol de transporte de sustancias entre el tercer ventrículo y la eminencia media. También se ha planteado la posibilidad de que esta hormona se sintetice a nivel central pero los datos al respecto son controversiales (Cabral, López Soto, *et al.*, 2017). Actualmente existe consenso en que, de ocurrir, la síntesis local genera cantidades insignificantes de ghrelina en el

sistema nervioso central del ratón o la rata y que las neuronas que expresan GHSR no reciben sinapsis de neuronas inmunoreactivas para ghrelina (Furness *et al.*, 2011). De esta manera, la falta de accesibilidad de ghrelina a aquellas zonas donde no se registra su presencia pero sí la de su receptor, como el hipocampo, incrementa la relevancia de la característica distintiva de GHSR, su alta actividad constitutiva.

GHSR en el circuito hipocampal

El hipocampo está constituido por un circuito neuronal glutamatérgico principal, en el que la información fluye de manera unidireccional desde las células granulares del giro dentado (GD), cuyos axones envían proyecciones a neuronas piramidales en la región 3 del cuerno de Ammon (CA3) y estas a su vez forman sinapsis con las neuronas piramidales de la región 1 del cuerno de Ammon (CA1). Este circuito trisináptico está a su vez influenciado por múltiples interneuronas inhibitorias (Maccaferri y Lacaille, 2003; Houser, 2007; Mann y Paulsen, 2007). A pesar de que esta área se encuentra alejada de los sitios por los que ghrelina accede al cerebro, GHSR está ampliamente expresado en el hipocampo, particularmente en el GD (Zigman *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2013; Mani *et al.*, 2014, 2017) donde la aplicación de ghrelina exógena modula comportamientos vinculados al valor hedónico de los alimentos, la respuesta al estrés, la memoria espacial y el aprendizaje (Diano *et al.*, 2006; Atcha *et al.*, 2009; Carlini *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Cahill *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Kanoski y Grill, 2015; Kent *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2016). Los mecanismos vinculados a estas modulaciones del comportamiento incluyen la formación de espinas dendríticas, el desarrollo de potenciación a largo plazo (Diano *et al.*, 2006), y la regulación positiva de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA (Cuellar y Isokawa, 2011; Ribeiro *et al.*, 2014; Ghersi *et al.*, 2015). Si bien estos trabajos han contribuido al conocimiento sobre el funcionamiento de GHSR, es difícil proyectar un efecto fisiológico considerando la ausencia de ghrelina en el hipocampo. En este contexto, nosotros planteamos la posibilidad de que la actividad constitutiva de GHSR sea fisiológicamente relevante en esta área. Existen evidencias que apoyan nuestra hipótesis, entre ellas un estudio reciente que ha demostrado que los ratones deficientes en GHSR presentan neurogénesis disminuida y una menor

densidad de espinas sinápticas en el GD en comparación con ratones salvajes, asociándose estos efectos con un déficit cognitivo durante la realización de diversas tareas (Hornsby *et al.*, 2016).

En base a estos antecedentes en esta tesis indagamos los mecanismos y los efectos de la actividad constitutiva de GHSR en el hipocampo enfocándonos en un blanco corriente de la actividad de los GPCRs: los Cav.

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar el efecto de la actividad constitutiva del receptor de ghrelina, GHSR, sobre la actividad de los canales de calcio presinápticos operados por voltaje tipo $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ y su impacto en la neurotransmisión hipocampal.

Basados en los antecedentes ya detallados proponemos completar los siguientes objetivos específicos:

1- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes de calcio nativas de neuronas hipocampales.

1a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes de calcio totales en neuronas hipocampales en cultivo y determinar cuál es la contribución de los subtipos $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ a la corriente modulada.

1b- Estudiar si la inhibición de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR involucra la disminución de la densidad de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática en células HEK293T transfectadas

2- Determinar el impacto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la transmisión sináptica en el circuito hipocampal.

2a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en neuronas hipocampales en cultivo.

2b- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en el circuito hipocampal (células granulares del GD y neuronas piramidales de CA3) en rebanadas de cerebro de ratón.

Materiales y Métodos

1. Modelos experimentales

1.1. Células HEK293T

Como modelo de célula eucariota utilizamos la línea celular HEK293T, derivada de la línea HEK293 (de la sigla en inglés para *human embryo kidney 293*). Esta línea celular fue establecida mediante la transformación con adenovirus de un cultivo de células de riñón humano embrionario. Esta variante posee el gen sensible a la temperatura para el antígeno T del virus SV40 y constituye una línea celular altamente transfectable y de uso frecuente para la expresión de proteínas heterólogas (Lin *et al.*, 2014).

1.1.1. Cultivo de línea celular

Cultivamos las células HEK293T rutinariamente en botellas T25 (*NEST Biotechnology Co.*, cat#707003, Jiangsu, China) en *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, *Laboratorios Microvet*, cat#P3030, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, cat#1650-01, *Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina*). Mantuvimos las botellas en una estufa de cultivo a 37 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂ y 95 % de aire. Para el repique y los subcultivos, retiramos el medio de cultivo de las botellas y agregamos 3 ml de solución cítrico salina conteniendo (en mM): 171,2 KCl y 17 Na₃C₆H₅O₇. Luego monitoreamos el desprendimiento de las mismas durante 5 min. Una vez logrado el desprendimiento de la monocapa celular, disgregamos las células por pipeteo. Para el mantenimiento del cultivo celular en botellas T25 agregamos 0,5 ml de la suspensión celular en un volumen final de 5 ml de medio completo. Para los subcultivos en placa de 35 mm agregamos 0,3 ml de la suspensión celular por placa de cultivo de 35 mm, en un volumen final de 2,5 ml de DMEM + 10 % SFB. Incubamos estas placas en las mismas condiciones que las descritas para las botellas.

1.2. Animales

Los animales de laboratorio que utilizamos para realizar experimentos en esta tesis doctoral fueron manipulados rutinariamente en forma semejante a la mayoría de los laboratorios nacionales e internacionales que abordan una temática de estudio similar. Realizamos el presente estudio con la autorización del comité de ética del

IMBICE, en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU., e intentando minimizar el sufrimiento animal en cuanto fue posible. (Expediente del Comité de Ética: 03-09-16 - “Caracterización de la modulación de los canales de calcio por receptores acoplados a proteína G”).

1.2.1. Origen y fuente de los animales

Llevamos a cabo este trabajo con animales C57BL/6 salvajes y deficientes en el receptor de ghrelina, que no expresan este receptor (Zigman *et al.*, 2005) derivados de cruces entre animales heterocigotas retrocruzados por más de diez generaciones. Criamos ratones de ambos sexos en el IMBICE bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en una sala con temperatura constante (22 ± 2 °C) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Para el genotipado de los animales, realizamos una amplificación por la reacción de la polimerasa en cadena (de la sigla en inglés para *polimerase chain reaction*, PCR) de secuencias específicas utilizando como molde ADN extraído de la cola de los ratones.

1.2.2. Extracción de ADN

Cortamos fragmentos de ~2 mm de las colas de los ratones o embriones a genotipar y los colocamos en tubos *ependorf* de 0,1 ml. Añadimos 75 µl de una solución de NaOH 25 mM/ EDTA 0,2 mM. Colocamos los tubos en un ciclador BioRad (*T100™ Thermal Cycler, TecnoLab, Buenos Aires, Argentina*) y los sometimos a un ciclo de 1 h (95 °C 45 min, 4 °C 15 min). Al finalizar este tiempo, añadimos a cada tubo 75 µl de una solución de Tris/HCl 40 mM pH 5,5. Transvasamos el contenido de cada tubo a otro nuevo para eliminar restos de tejido, y los conservamos a -20 °C hasta que lo utilizamos para la genotipificación.

1.2.3. Genotipificación de ratones salvajes y deficientes en GHSR.

Realizamos dos PCRs para cada ratón o embrión, una que amplifica el gen de GHSR y otra que amplifica el *cassette* TBC (de la sigla en inglés para *transcription blocking cassette*), que interrumpe el gen GHSR en los animales deficientes en GHSR. La amplificación de una banda en la primera PCR y ninguna en la segunda, indica que el ratón es homocigota para el genotipo salvaje; en cambio, la amplificación de una banda en cada PCR indica que el ratón es heterocigota para

GHSR; mientras que una banda sólo en la segunda PCR señala que el ratón es homocigota deficiente en GHSR. Indicamos a continuación los cebadores utilizados para cada reacción y el tamaño de banda que se obtiene en cada una:

-PCR1: banda de 184 pb

“Forward WT” 5'- GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG -3'

“Reverse WT” 5'- GTGCGAACATTAGCGATGAAAGG -3'

-PCR2: banda de 175 pb

“Forward TBC” 5'- AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA -3'

“Reverse TBC” 5'- CCACTGCACGTCTCTCCCTATTT -3'

Utilizamos para cada reacción de PCR 12,5 µl finales con: 1 µl de ADN molde, buffer 10X 1,25 µl; MgCl₂ 50 mM 0,625 µl, seroalbúmina bovina 2 µl, dNTPs 10 mM 0,25 µl, cebadores *forward* y *reverse* 0,625 µl, Taq ADN polimerasa (*Promega, Madison, EE.UU.*) 0,0625 µl y agua milliQ c.s.p. Para la amplificación del ADN utilizamos las siguientes condiciones de ciclado: una desnaturalización inicial a 94 °C 4 min, seguido de 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C 30 s, un *annealing* a 60 °C 30 s y una extensión a 72 °C 45 s, seguidos de una extensión final a 72 °C 7 min. Posteriormente sembramos y revelamos los productos de reacción de PCR en geles de agarosa al 2 % teñida con 0,2 µl/ml de *GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)*.

2. Biología molecular

2.1. Obtención de clones para transfección

2.1.1. Cepa bacteriana

Para la amplificación de plásmidos empleamos la cepa bacteriana DH5α de la bacteria *Escherichia coli*. Esta cepa se caracteriza por su eficiencia de transformación con ADN no metilado (*hsdR*), la ausencia de actividad de endonucleasa inespecífica I (*endA1*) -que permite preparaciones de plásmidos de buena calidad- la resistencia a los fagos T1 (*fhuA2*) y la actividad de recombinación disminuida (*recA1*) -que incrementa la estabilidad de los insertos-. Esta cepa es además sensible a ampicilina y kanamicina.

2.1.2. Preparación de bacterias competentes

Para obtener bacterias competentes seguimos los pasos del método Inoue, para lo cual partimos de una reserva de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, sembrando una anizada en forma estéril sobre una placa de medio Luria Bertani (LB, en %: 1,5 agar-agar, 1 triptona, 0,5 extracto de levadura y 1 NaCl en agua milliQ) sin antibiótico (ATB), que incubamos a 37 °C toda la noche. A la mañana siguiente tomamos una colonia y la transferimos a 5 ml de medio LB, e incubamos entre 6-8 h a 37 °C con agitación. Con este cultivo inoculamos tres recipientes con medio, cada uno conteniendo 100 ml de LB sin ATB. El primero recibió 4 ml de cultivo, el segundo 1,6 ml y el tercero 0,8 ml. Incubamos los frascos toda la noche a 18 °C. Al día siguiente realizamos lecturas de densidad óptica a 600 nm hasta la obtención de un valor de 0,55 A en alguno de los tres cultivos. Transferimos este último a un baño de hielo durante 10 min, y descartamos los otros dos. Transcurridos los 10 min, realizamos una centrifugación a 4000 r.p.m. por 10 min a 4 °C para precipitar las células, descartamos el sobrenadante, dejamos secar el pellet durante 2 min y luego resuspendimos las células en 32 ml del buffer Inoue (en mM: 55 MnCl₂.4 H₂O, 15 CaCl₂.2H₂O, 250 KCl, 10 PIPES pH 6,7) previamente enfriado. Repetimos la centrifugación y el secado y resuspendimos las células en 8 ml buffer Inoue al que añadimos 0,64 ml de dimetilsulfóxido. Por último, separamos esta suspensión en alícuotas de 200 μ l y las conservamos a -70 °C hasta su utilización.

2.1.3. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

Para realizar la transformación de las bacterias competentes seguimos el protocolo descrito por (Cohen, 1974). Para ello adicionamos 50 ng de ADN plasmídico a 200 μ l de la suspensión de bacterias competentes e incubamos la mezcla en hielo durante 30 min. Luego, la transferimos a un baño de agua a 42 °C para realizar un choque térmico de 45 s de duración. Inmediatamente después, colocamos el tubo en hielo, agregamos 800 μ l de medio SOC e incubamos 40 min a 37 °C. Luego de la incubación, sembramos las bacterias en placas de agar LB con el antibiótico de selección adecuado e incubamos a 37 °C durante una noche para permitir el desarrollo de colonias transformantes.

2.1.4. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (midiprep)

Inoculamos 200 ml de medio LB conteniendo la concentración adecuada del antibiótico de selección correspondiente con 0,5 ml de un cultivo primario de las

bacterias que contenían el plásmido de interés, e incubamos el cultivo durante 12-16 h a 37 °C con agitación enérgica. Transcurrido ese tiempo, centrifugamos el cultivo durante 30 min a 4000 r.p.m. a 4 °C para separar las bacterias. Realizamos la obtención del ADN plasmídico utilizando un *kit* comercial (*QIAfilter® Plasmid Midi Kit cat# 12145, Massachusetts, EE.UU.*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.5. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de muestras de ADN medimos la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Delaware, EE.UU.)*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Como parámetro de calidad del ADN utilizamos las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

3. Expresión heteróloga

3.1. Transfecciones transientes en células HEK293T en cultivo

Para la transfección transitoria de los distintos plásmidos utilizamos liposomas catiónicos comerciales (*Lipofectamine 2000, Invitrogen® cat#11668-019, Massachusetts, EE.UU.*), el ADN de interés clonado en un vector de expresión eucariota y células HEK293T crecidas al ~80-90 % de confluencia en placas de cultivo de 35 mm. Utilizamos una mezcla de transfección siguiendo las instrucciones del proveedor utilizando una relación ADN/reactivo de transfección 1:2. Incubamos las células transfectadas 24-48 h.

3.2. Transducción de cultivos neuronales hipocampales primarios con partículas lentivirales

3.2.1. Producción de partículas lentivirales

Utilizamos vectores lentivirales de tercera generación con bioseguridad incrementada (Tiscornia *et al.*, 2006). Adicionalmente, ya que el virus del cual derivan es un patógeno humano (virus de la inmunodeficiencia humana), durante la realización de los experimentos que involucraron la producción de lentivirus seguimos estrictamente las normas de bioseguridad recomendadas por la *American Biological Safety Association*.

Subcultivamos células HEK293T en medio DMEM + 10 % SFB hasta alcanzar un 80 % de confluencia. Al día 1 de obtenido el cultivo neuronal (día *in vitro*, DIV), sembramos las células HEK293T en placas de 100 mm de diámetro. Al DIV 2, las

cotransfectamos con los plásmidos codificantes para un sistema de lentivirus de tercera generación usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen®). Una hora antes de la transfección reemplazamos el medio de cultivo. Para la transfección de una placa utilizamos un total de 20 µg de plásmidos: 3,5 µg del plásmido de envoltura pCMV-VSV-G, 6,5 µg de los plásmidos de empaquetamiento pMDLg /pRRE (4 µg), pRSV-Rev (2,5 µg) (provistos gentilmente por el Dr. Ege Kavalali, Universidad de Texas, EE.UU.) y 10 µg del vector de transferencia conteniendo GHSR (FU-GHSR-YFP-W) o un mutante natural sin actividad constitutiva, GHSRA204E (FU-GHSR-A204E-YFP-W), subclonados en nuestro laboratorio. Luego de la transfección, mantuvimos las células en cultivo durante 48 h para permitir la producción lentiviral. Para infectar las neuronas con el medio propio del cultivo neuronal, reemplazamos el medio de cultivo de las HEK293T por medio condicionado, el cual recolectamos el DIV 4, centrifugamos a 750-1000 r.p.m. y filtramos con filtros de 0,22 µm de tamaño de poro.

3.2.2. Infección de cultivos neuronales

A continuación, recolectamos el medio con los vectores lentivirales producidos y centrifugamos durante 10 min a temperatura ambiente a 1000 r.p.m. El DIV 5, filtramos el sobrenadante con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y usamos 500 µl de este filtrado para infectar cada pocillo conteniendo el cultivo primario reemplazando el medio de cultivo durante 4 h. Conservamos el medio original del cultivo neuronal durante esas 4 h a 37 °C en una atmósfera con 95 % aire y 5 % CO₂ para reemplazarlo por el medio con los vectores lentivirales cumplido el tiempo de infección.

4. Técnicas de Imágenes

4.1. Análisis de la funcionalidad de Ca_v2.1-GFP y Ca_v2.2-GFP

Para estudiar la distribución subcelular de los Ca_v utilizamos quimeras de las subunidades principales Ca_v2.1 y Ca_v2.2 unidas a la proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Ca_v2.1-GFP y Ca_v2.2-GFP), cuya funcionalidad evaluamos mediante *patch-clamp*, obteniendo valores similares a los registrados en nuestro laboratorio utilizando las versiones no fusionadas de estos Ca_v ((López Soto *et al.*, 2015), Ca_v2.1-GFP: $-47,0 \pm 14,5$ pA/pF, n = 9; Ca_v2.2-GFP: $-51,8 \pm 12,3$ pA/pF, n = 5).

4.2. Coloración de la membrana plasmática

Subcultivamos células HEK293T transfectadas en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro con medio de cultivo. Transcurridas 48 h post transfección, retiramos la placa de la estufa y reemplazamos el medio de cultivo por una solución del marcador de membrana plasmática (*CellMaskTM Orange Plasma membrane Stain* (Cogger *et al.*, 2010)). Por cada placa de cultivo de 35 mm de diámetro utilizamos 1 ml de solución a 1 µg/ml en medio de cultivo.

Mantuvimos las células en estufa a 37 °C 1 min, luego de lo cual retiramos la solución del marcador de membrana y enjuagamos tres veces con buffer fosfato salino (en mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na₂HPO₄ y 2 KH₂PO₄, pH 7,4 con HCl) a 37 °C 1 min. A continuación retiramos todo el líquido y colocamos con delicadeza un vidrio limpio de 22 x 22 mm sobre la placa. Observamos el preparado en un microscopio óptico *Nikon DS-Ri1* con cubo-filtros B2A y G2A.

4.3. Adquisición de microfotografías y análisis de imágenes

Para obtener imágenes de fluorescencia utilizamos un microscopio óptico de fluorescencia *Nikon Eclipse 50i*, equipado con cubo-filtros B2A y G2A, una cámara *Nikon DS-Ri1* de tipo RGB, y para el análisis de imágenes aplicamos el software libre de FIJI. Medimos la intensidad de fluorescencia como “densidad integrada”. La “densidad integrada” es la suma de los valores de intensidad de los píxeles en la imagen o selección de interés, y es equivalente al producto del área y el valor gris medio.

5. Cultivos neuronales primarios de ratón

5.1. Preparación de vidrios estériles para cultivo

Colocamos vidrios circulares de 12 mm de diámetro y espesor 0,13-0,17 mm., en un contenedor cerrado y realizamos enjuagues sucesivos de media hora cubriendo todos los vidrios una vez con xileno, dos veces con acetona, una vez con etanol 100 % y una última vez con etanol 70 %. Luego los separamos y los dejamos secar en toallas de papel limpias en una cabina de flujo laminar. Colocamos los cubreobjetos limpios y secos con una pinza en una caja de Petri cubierta con papel absorbente y los esterilizamos. Posteriormente, 24 h antes de utilizarlos, realizamos

un recubrimiento con poli-L-lisina (*Sigma Aldrich, cat#P8920, Buenos Aires, Argentina*) para mejorar la adhesión celular. Para ello, colocamos los vidrios estériles en una placa de cultivo de 24 pocillos (*Greiner Bio-One, cat#662-160, Kirchdorf an der Krems, Austria*), los cubrimos con una solución de poli-L-lisina durante 1 h. Luego los enjuagamos tres veces con agua milliQ estéril y los dejamos secar en una cabina de flujo laminar.

5.2. Extracción y cultivo de neuronas hipocampales de ratón

Obtuvimos los cultivos primarios de hipocampo de ratones salvajes y deficientes en el receptor de ghrelina entre los días embrionarios E16-E18. Realizamos la dislocación cervical de un total de diecisiete hembras preñadas para remover rápidamente los embriones. Inmediatamente los colocamos en medio Hank estéril y frío (*Microvet, cat#L2005-500, Buenos Aires, Argentina*) para la posterior extracción de los cerebros. Disecamos los hipocampos, los colocamos en medio Hank estéril y los enjuagamos dos veces. Luego, disociamos las células a 37 °C durante 20 min con tripsina 0,25 mg/ml (*Microvet, cat#L2700-100, Buenos Aires, Argentina*). A continuación, añadimos 300 µl de SFB para detener la digestión enzimática y 50 µl de 0,28 mg/ml desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (*Sigma Aldrich, cat#D5025, Buenos Aires, Argentina*). Disgregamos mecánicamente las células usando diferentes pipetas con puntas de diámetros consecutivamente más pequeños. Sembramos alrededor de 70.000 células en vidrios de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina. Incubamos las células a 37 °C en una atmósfera controlada de 95 % aire y 5 % CO₂ con medio de cultivo DMEM (*Microvet, Buenos Aires, Argentina*)/F12 1:1 suplementado con B27 (1:50, *GIBCO, cat#17504-044, Thermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina*), 10 % SFB, 0,25 % glucosa, 2 mM glutamina (*GIBCO*), 3,3 µg/ml insulina (*Novo Nordisk Pharmaceutical Industries, Inc., Buenos Aires, Argentina*), 40 µg/ml sulfato de gentamicina (*Richet, Buenos Aires, Argentina*), y 1 % de solución de vitamina (*Microvet, Buenos Aires, Argentina*). El 4 DIV reemplazamos la mitad del medio de incubación por medio fresco conteniendo Ara-C, β-d-arabifuranósido citosina (*Sigma Aldrich, cat# C1768, Buenos Aires, Argentina*), para alcanzar una concentración final de 5 µM en cada pocillo.

6. Rebanadas de hipocampo de ratón

Anestesiaremos ratones salvajes y deficientes en el receptor de ghrelina con isoflurano (2 %) y los decapitamos inmediatamente. Extrajimos rápidamente los cerebros y preparamos rebanadas de 300 μm conteniendo el hipocampo (Bischofberger *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2017) en una solución enfriada con hielo y burbujeada con carbógeno 95 % O_2 /5 % CO_2 conteniendo (en mM): 110 cloruro de colina; 25 glucosa; 25 NaHCO_3 ; 7 MgCl_2 ; 11,6 ácido ascórbico; 3,1 sodio piruvato; 2,5 KCl; 1.25 NaH_2PO_4 ; 0.5 CaCl_2 . Transferimos inmediatamente las rebanadas a una cámara de incubación conteniendo líquido cerebroespinal artificial (aCSF, de la sigla en inglés para *artificial cerebrospinal fluid*) equilibrado con carbógeno 95 % O_2 /5 % CO_2 conteniendo (en mM): 124 NaCl; 26,2 NaHCO_3 ; 11 glucosa; 2.5 KCl; 2.5 CaCl_2 ; 1,3 MgCl_2 ; 1 mM NaH_2PO_4 .

7. Patch-clamp en configuración de célula entera

Realizamos los registros en cultivos primarios con un amplificador Axopatch 200b (*Molecular Devices, San Jose, CA, EE.UU.*), y los registros en rebanadas finas de cerebro con un amplificador EPC7 (*HEKA Electronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania*). Los datos fueron tomados a 20 kHz y filtrados a 10 kHz (-3 dB) usando el software PCLAMP8.2 (*Molecular Devices, San Jose, CA, EE.UU.*) o PatchMaster (*HEKA Electronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania*). Utilizamos microelectrodos de registro constituidos por un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) incluido en una micropipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo 1,5 mm e interno 1,1 mm, *King Precision Glass Inc., cat#KG-33, California, EE.UU.*), fabricadas con un estirador de pipetas (*Sutter Instrument Co., P-80, California, EE.UU.*) y cargadas con la solución intracelular correspondiente según cada experimento. Utilizamos electrodos con una resistencia entre 2 y 5 M Ω . Descartamos los registros con resistencias en serie menores a 6 M Ω , compensando al 80 % con 10 μs *lag time* y sustrajimos el *leak online* usando un protocolo P/-4. Realizamos todos los registros a temperatura ambiente (~ 24 °C).

7.1. Cultivo primario

7.1.1. Corrientes de bario

Obtuvimos registros de *patch-clamp* con fijación de voltaje en la configuración de célula entera entre los 5–21 DIV en neuronas de ratón, en un potencial de mantenimiento de -80 mV, y aplicando pulsos cuadrados a 0 mV durante 20 ms cada 10 s. Para llenar los microelectrodos usamos una solución interna conteniendo (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, and 4 MgATP, pH 7,2 con CsOH. Mantuvimos las neuronas en una solución con alta concentración de sodio, conteniendo (en mM): 135 NaCl, 4.7 KCl, 1,2 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 10 HEPES, y 10 glucosa, pH 7,4 con NaOH. Después de obtener la configuración de célula entera, registramos las corrientes, Ca_v reemplazando la solución externa por una alta en bario, conteniendo (en mM): 10 BaCl₂, 110 cloruro de colina, 20 cloruro de tetraetilamonio, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, y 0,001 tetrodotoxina (TTX; *Sigma Aldrich, cat#T8024, Missouri, EE.UU.*), pH 7,4 con CsOH.

7.1.2. Corrientes postsinápticas

Obtuvimos registros de *patch-clamp* con fijación de voltaje en la configuración de célula entera entre los 12–21 DIV en neuronas de ratón, en un potencial de mantenimiento de -80 mV. Para llenar los microelectrodos usamos una solución interna conteniendo (en mM): 115 metanosulfonato de cesio, 10 CsCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 20 cloruro de tetraetilamonio, 4 Mg-ATP, 0,3 NaGTP, 0,6 EGTA y 10 N-etil bromuro lidocaína (pH 7,2 con CsOH). Utilizamos la solución externa alta en sodio previamente descrita, conteniendo además 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 10 µM *Alomone Labs, Jerusalem, Israel*) y (2R)-amino-5-fosfopentanoato (APV, 100 µM *Alomone Labs, Jerusalem, Israel*) o picrotoxina (50 µM, *Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina*) para aislar las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs de la sigla en inglés para *inhibitory postsynaptic currents*) y las excitatorias (EPSCs, de la sigla para *excitatory postsynaptic currents*) respectivamente. Para obtener respuestas evocadas, estimulamos eléctricamente las neuronas con un potencial de mantenimiento -80 mV mediante electrodos de platino paralelos (1 ms de duración; amplitud de 20 mA). Para registrar las corrientes postsinápticas miniatura inhibitorias y excitatorias (mIPSCs y mEPSCs), añadimos TTX 1 µM. Para la Figura 10, registramos las respuestas pareadas a pulsos pareados, variando el intervalo entre estímulos entre 20 y 200 ms. Para la Figura 9, variamos la concentración de CaCl₂ entre 0,5 y 10 mM.

7.1.3. Choque hiperosmótico

Medimos la respuesta al choque hiperosmótico por la aplicación de un pulso de una solución de sacarosa a 0,5 M como el movimiento de carga producido mientras se mantenía a las neuronas a -80 mV. Medimos la carga como el área integrada 3 s antes y después del pico de la respuesta.

7.2. Rebanadas de hipocampo

7.2.1. Corrientes postsinápticas

Mantuvimos las rebanadas obtenidas a temperatura ambiente en aCSF. Realizamos registros en la configuración de célula entera con fijación de voltaje o de corriente con un microscopio invertido *Recordings Zeiss Examiner.A1* a 25 °C en esta misma solución con un flujo constante de 2,5 ml/min. Monitoreamos la resistencia de acceso mediante un pulso cuadrado de -10 mV. Como en el cultivo primario, añadimos CNQX y APV, o picrotoxina a la solución de registro para aislar las IPSCs y EPSCs. Descartamos aquellos registros en los que la resistencia de acceso varió >20 %. La solución interna que utilizamos para examinar la excitabilidad neuronal contuvo (en mM): 140 gluconato de potasio, 5 NaCl, 5 KCl, 4 MgCl₂, 0,6 EGTA, 10 HEPES, 3 Na₂ATP, and 0,3 Na₂GTP (pH 7,3 con KOH). Para evocar tanto las IPSCs como las EPSCs utilizamos un electrodo concéntrico bipolar FHC que colocamos en la capa de células granulares del hipocampo. Para los registros con fijación de voltaje mantuvimos las células a -80 mV, mientras que realizamos los registros con fijación de corriente usando una serie de pulsos cuadrados (desde -80 a 100 pA) para inducir potenciales de acción (5 pA por pulso, de 400 ms de duración).

8. Drogas

En algunos experimentos de imágenes en células HEK293T transfectadas aplicamos el bloqueante específico de la proteína Gi/o, toxina pertussis (PTx, 1 μM, *Sigma Aldrich, cat#P7208, Buenos Aires, Argentina*); o el agonista inverso SPA (1 μM, *Biotechnology, Texas, EE.UU.*).

En algunos registros de *patch-clamp* en los cultivos neuronales primarios aplicamos los bloqueantes específicos de los canales de calcio operados por voltaje

Ca_v2.1, ω-agatoxina-IVA (0.2 μM, *Peptides International, Louisville, KY, EE.UU.*); y Ca_v2.2, ω-conotoxina-GVIA (1 μM, *Alomone Labs, Jerusalem, Israel*).

9. Análisis Estadístico

Analizamos estadísticamente los datos obtenidos con el software GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software Inc., California, EE.UU.*). Evaluamos la conformidad con una distribución normal con el test de Kolmogorov–Smirnov, y la homogeneidad de varianzas con los tests de Bartlett (datos con distribución normal) o de Brown-Forsythe (datos con distribución no normal). Obtuvimos los valores de *p* a partir del test *t* de Student o del test de comparación múltiple de varianzas de una vía ANOVA con el post test de Tukey (datos con distribución normal); o a partir del test de Mann-Whitney o el test de comparación múltiple de varianzas no paramétrico Kruskal–Wallis test con el post test de Dunn (datos con distribución no normal), después de intentar la transformación de los datos. Indicamos el test específico usado y el tamaño de la muestra para cada conjunto de datos en la leyenda de las figuras. Consideramos que una diferencia es estadísticamente significativa para valores de $p < 0,05$. En las figuras 1 y 10, indicamos esta significancia estadística mediante asteriscos, mientras que en las demás indicamos los valores de *p*. Expresamos los datos como la media ± el error estándar de la media, y los puntos individuales como puntos negros.

Resultados – Capítulo I

En esta primera sección describimos los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes Ca_V nativas de neuronas hipocampales y exploramos, además, aspectos relacionados al mecanismo subyacente en un sistema de expresión heterólogo.

Objetivo 1a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes de calcio totales en neuronas hipocampales en cultivo y determinar cuál es la contribución de los subtipos $Ca_V2.1$ y $Ca_V2.2$ a la corriente modulada.

Para determinar si la actividad constitutiva de GHSR afecta las corrientes Ca_V totales de neuronas hipocampales en cultivo, realizamos registros de *patch-clamp* en la configuración de célula entera con fijación de voltaje. Dado que la actividad constitutiva depende directamente de los niveles de expresión del receptor (López Soto *et al.*, 2015), registramos las corrientes Ca_V nativas totales en cultivos hipocampales primarios donde manipulamos el nivel de expresión de GHSR. Los cultivos primarios hipocampales fueron obtenidos a partir de ratones salvajes (indicados como wt por *wild type* en las figuras), que expresan niveles nativos de GHSR, o de ratones deficientes en este receptor (indicados como def en las figuras), que poseen un TBC que interrumpe el gen que codifica para GHSR. Además, para tener una condición con altos niveles de expresión, sobreexpresamos GHSR mediante la transducción con vectores lentivirales desarrollados en el laboratorio (indicados como +GHSR en las figuras). Se ha descrito que estos vectores lentivirales transducen el ~80 % de las neuronas en cultivo (Bender *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Para asegurar que el efecto observado se debiera exclusivamente a la actividad constitutiva de GHSR y no a la maniobra de transducción, también transdujimos algunos cultivos con la versión de GHSR que carece de actividad constitutiva GHSRA204E aunque conserva la misma actividad evocada por ghrelina (indicados como +A204E en las figuras).

En estas condiciones, encontramos que las corrientes Ca_V totales aumentaron significativamente después del DIV 7 tanto en los cultivos salvajes como en los deficientes en GHSR y que la sobreexpresión de GHSR suprimió este incremento en ambas condiciones (Figura 1). Es importante señalar que el incremento en la amplitud de la corriente fue mayor en las neuronas de los cultivos deficientes en

GHSR que en las de los cultivos salvajes. Además, los niveles de corriente en los cultivos con sobreexpresión de GHSR fueron de la misma magnitud en las dos condiciones.

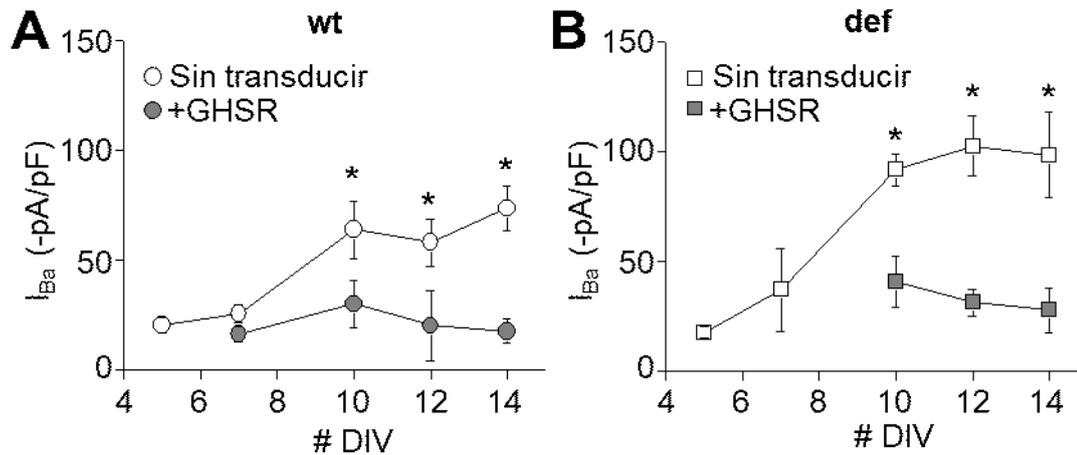


Figura 1: El nivel de expresión de GHSR afecta el incremento temporal de las corrientes Ca_v nativas totales en neuronas hipocampales en cultivo. Niveles de corriente I_{Ba} de neuronas hipocampales en cultivo salvajes (A, wt) y deficientes en GHSR (B, def) transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) o sin transducir (sin transducir) entre los 5 y 14 DIV. Significancia estadística evaluada mediante el test de Mann-Whitney ($n=122$, entre 3-12 por condición).

En cultivos maduros (>14 DIV) en los que se observa el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los niveles de corriente Ca_v no encontramos diferencias entre las neuronas con sobreexpresión de GHSRA204E y la condición salvaje (Figura 2).

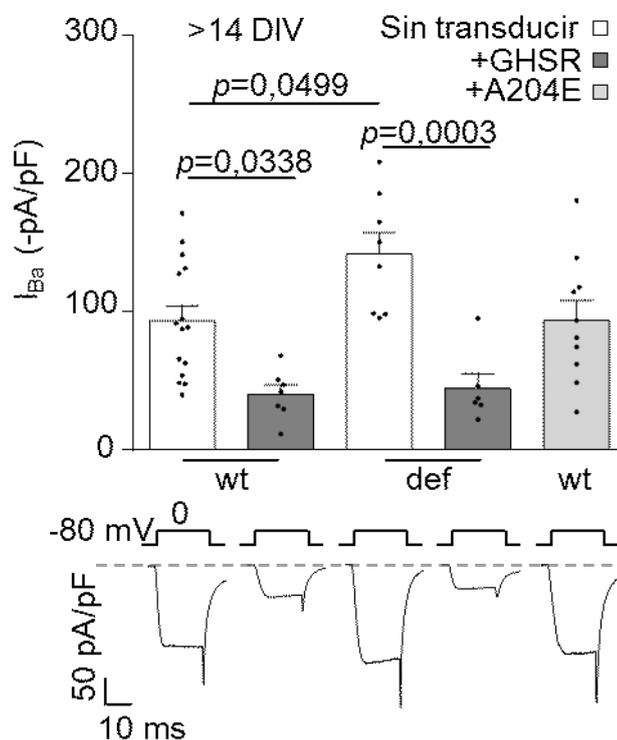


Figura 2: La actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v nativas en neuronas hipocampales en cultivo. Trazos representativos y valores promedio de niveles de corriente I_{Ba} de neuronas hipocampales maduras (>14 DIV) en cultivos salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) o para GHSRA204E (+A204E), o sin transducir (sin transducir). Significancia estadística evaluada mediante ANOVA y post-test de Tukey.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión de GHSR reduce los niveles de corriente Ca_V en neuronas hipocampales en cultivo y que este efecto está relacionado con su actividad constitutiva.

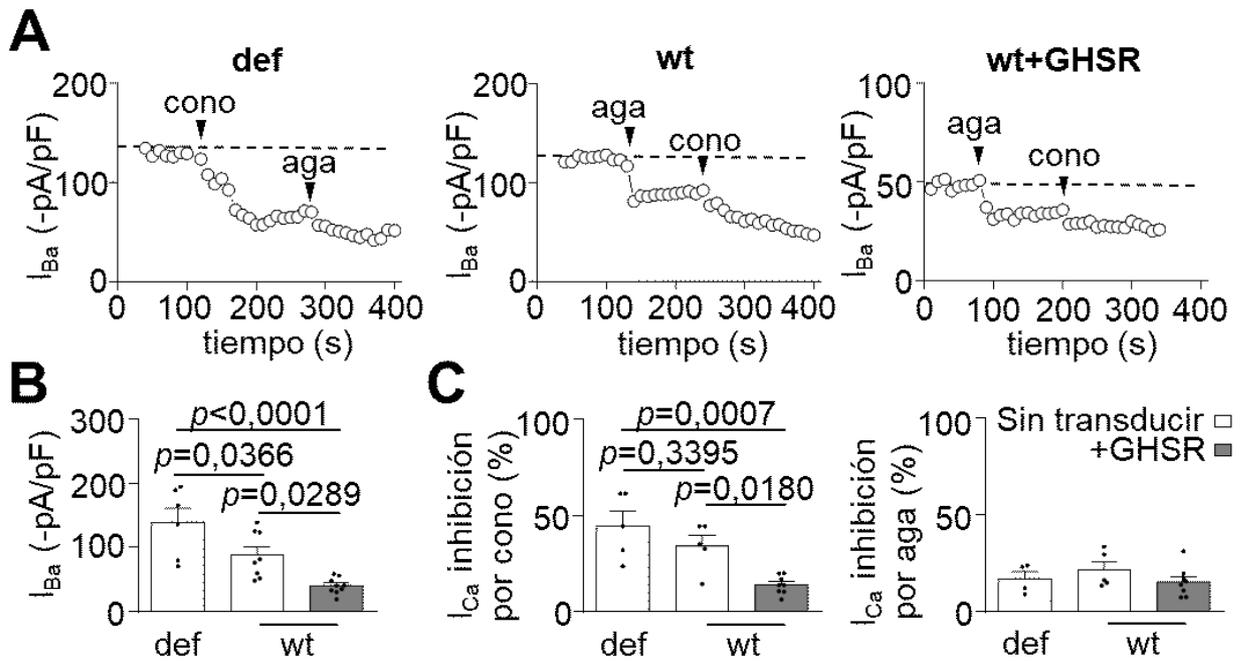


Figura 3: La expresión de GHSR reduce la contribución de $Ca_V2.2$ a la corriente Ca_V total. A- Curso temporal de la aplicación de 1 μ M ω -conotoxina-GVIA (cono) y 0,2 μ M ω -agatoxina-IVA (aga) sobre las corrientes I_{Ba} . B- valores promedio de la corriente I_{Ba} y C- porcentaje promedio de inhibición de neuronas hipocampales en cultivo >12 DIV deficientes en GHSR (def), salvajes (wt) y salvajes transducidas con lentivirus codificando para GHSR (wt+GHSR). Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post- test de Dunn.

Para comenzar a indagar en los efectos de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión hipocampal, exploramos la contribución de los dos principales subtipos de Ca_V presinápticos a la corriente reducida por GHSR. Para ello, evaluamos el efecto de los inhibidores de los dos principales Ca_V presinápticos sobre las corrientes Ca_V totales de neuronas maduras (ω -conotoxina-GVIA, inhibidor específico de $Ca_V2.2$ y ω -agatoxina-IVA, inhibidor específico de $Ca_V2.1$) deficientes en GHSR y salvajes con o sin sobreexpresión de GHSR (Figura 3). Encontramos que ω -conotoxina-GVIA inhibió en menor medida la corriente Ca_V en la condición salvaje (~35 %) y de sobreexpresión de GHSR (~15 %), respecto a la condición deficiente en GHSR (~45 %); mientras que ω -agatoxina-IVA inhibió en magnitudes comparables la corriente Ca_V en todas las condiciones (~20 %). Estos datos sugieren que la actividad constitutiva de GHSR afecta en mayor medida a las corrientes $Ca_V2.2$ que a las $Ca_V2.1$ en neuronas hipocampales en cultivo. Cabe

señalar que en estos experimentos pudimos reproducir nuestros resultados previos (Figura 2), ya que observamos corrientes Ca_v totales menores en la condición salvaje y con sobreexpresión de GHSR en comparación con la condición deficiente en GHSR.

Estos experimentos en conjunto muestran que la actividad constitutiva es capaz de modular los niveles de corriente Ca_v nativas en cultivos hipocampales primarios, y que existe un efecto diferencial mayor sobre $Ca_v2.2$ que sobre $Ca_v2.1$. En el siguiente apartado, indagamos en aspectos del mecanismo subyacente a esta modulación.

Objetivo 1b- Estudiar si la inhibición de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de GHSR involucra la disminución de la densidad de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática en células HEK293T transfectadas.

Datos previos de nuestro laboratorio muestran que la coexpresión de GHSR produce una reducción crónica de la corriente $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ que sólo se revierte con preincubaciones prolongadas con SPA, el agonista inverso de GHSR (López Soto *et al.*, 2015). Basándonos en ello, y en trabajos que indican que algunos GPCRs modulan el tráfico de los Ca_v , postulamos que la inhibición de la corriente Ca_v2 por la actividad constitutiva de GHSR está vinculada a una disminución de la densidad en membrana de los Ca_v2 . Los resultados de esta sección forman parte de dos trabajos de nuestro laboratorio, en los que mostramos que una menor expresión en membrana de los Ca_v2 y la participación de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ están asociadas al mecanismo por el cual la actividad constitutiva de GHSR reduce la corriente de Ca_v2 en un sistema de expresión heterólogo y en neuronas hipotalámicas (López Soto *et al.*, 2015; Mustafá *et al.*, 2017).

Como parte de mi contribución a estos trabajos, puse a punto un método para monitorear el patrón de distribución de los Ca_v que consistió en la coexpresión de versiones de los Ca_v fusionadas con la proteína fluorescente GFP, las subunidades auxiliares y GHSR en células HEK293T, a las cuales incubé con un marcador de membrana plasmática rojo fluorescente (Ver métodos).

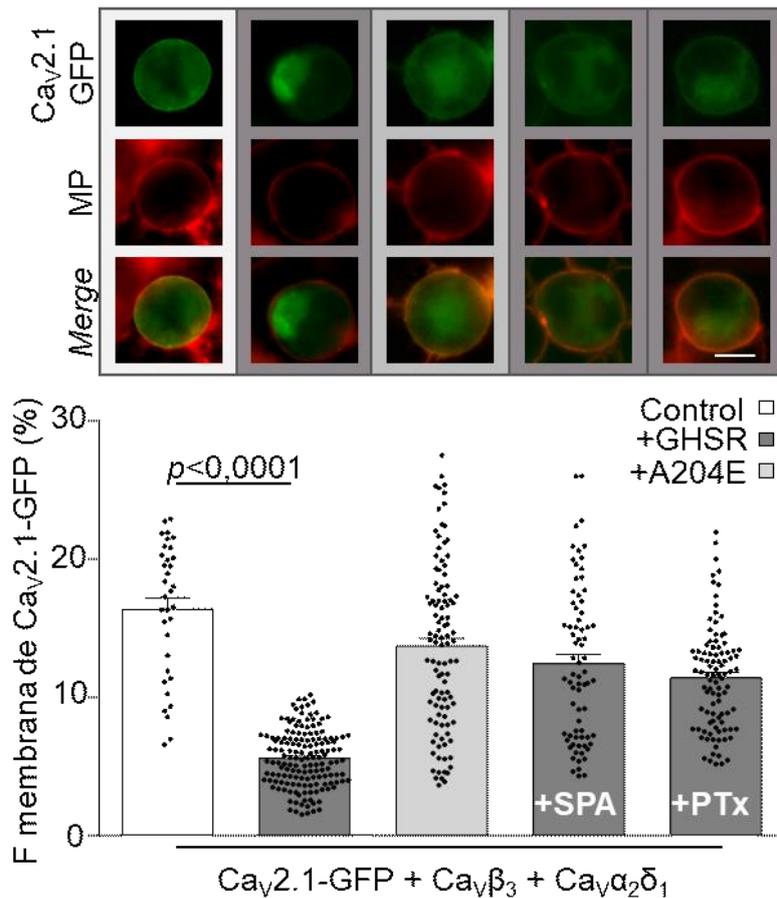


Figura 4: La actividad constitutiva de GHSR reduce la expresión en membrana de Ca_v2.1-GFP. A- Fotomicrografías y B- valores promedio del porcentaje de la señal fluorescente verde en membrana de células HEK293T transfectadas con Ca_v2.1-GFP, sus subunidades auxiliares (Control) con GHSR GHSRA204E, y preincubadas o no con 1 μM SPA o 500 ng/ml PTx. Las señales fluorescentes verde y roja corresponden a Ca_v2.1-GFP y al marcador de membrana *CellMask*, respectivamente. Significancia estadística evaluada mediante Kruskal–Wallis y post test de Dunn. Escala = 10 μm.

Con estos experimentos, determinamos que la señal fluorescente de Ca_v2.1-GFP (Figura 4) y de Ca_v2.2-GFP (Figura 5) en la membrana plasmática fue significativamente menor en las células transfectadas con GHSR con respecto a aquellas transfectadas con GHSRA204E. Además, para verificar que efectivamente la reducción de la densidad de Ca_v2 en la membrana plasmática se debía a la actividad constitutiva, realizamos dos experimentos: preincubamos las células coexpresando las quimeras y GHSR con SPA, el agonista inverso de GHSR, y con PTx, un inhibidor específico de la proteína Gi/o involucrada en la vía de reducción de las corrientes Ca_v2 macroscópicas por la actividad constitutiva de GHSR (López Soto *et al.*, 2015). En ambas condiciones, el porcentaje de señal fluorescente verde en la membrana fue similar a la condición de Ca_v2.1-GFP y Ca_v2.2-GFP en ausencia de GHSR o con coexpresión de GHSRA204E.

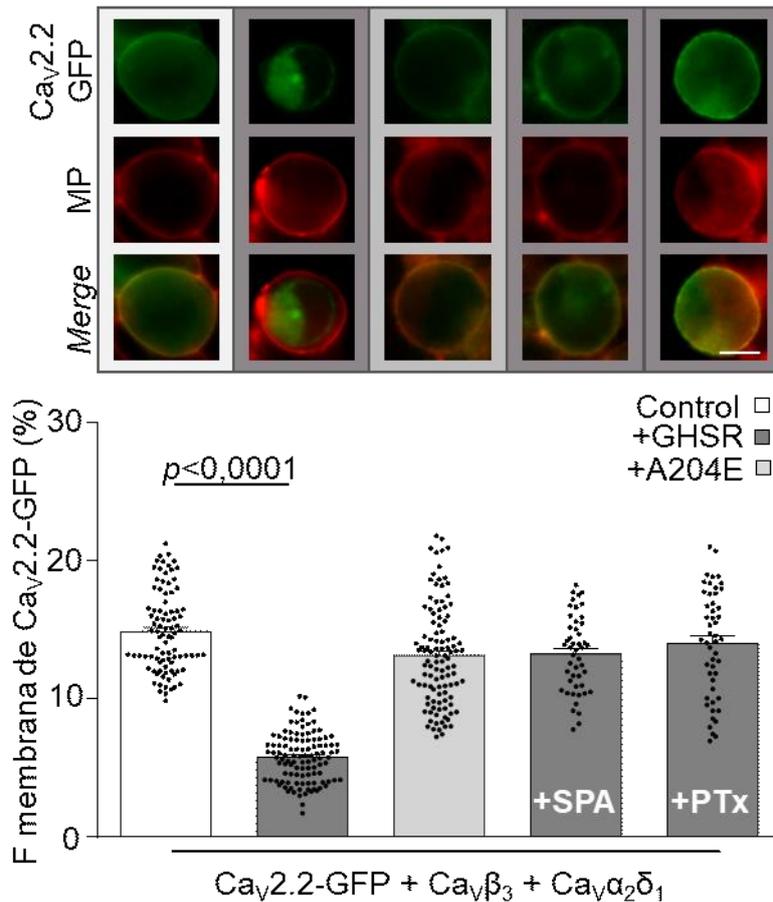


Figura 5: La actividad constitutiva de GHSR reduce la expresión en membrana de Ca_v2.2-GFP. A- Fotomicrografías y B- valores de porcentaje promedio de la señal fluorescente verde en membrana de células HEK293T transfectadas con Ca_v2.2-GFP, sus subunidades auxiliares (Control) con GHSR GHSRA204E, y preincubadas o no con 1 μM SPA o 500 ng/ml PTx. Las señales fluorescentes verde y roja corresponden a Ca_v2.2-GFP y al marcador de membrana *CellMask*, respectivamente. Significancia estadística evaluada mediante Kruskal–Wallis y post test de Dunn. Escala = 10 μm.

Así, este conjunto de datos acompañado del estudio de las corrientes Ca_v que forma parte de la tesis doctoral de Javier López Soto, nos permitió concluir que la inhibición de las corrientes de Ca_v2.1 y Ca_v2.2 por la actividad constitutiva de GHSR involucra la disminución de la densidad de estos canales en la membrana plasmática. Posteriormente, continuamos este estudio en conjunto con E. Román Mustafá, donde profundizamos en el mecanismo detrás de este efecto. Dado que el correcto tráfico de los complejos Ca_v2 a la membrana plasmática depende de las subunidades auxiliares Ca_vβ y Ca_vα₂δ en el complejo Ca_v, ensayamos el efecto de la actividad constitutiva de GHSR en presencia o ausencia de dichas subunidades. Para esto, realizamos los experimentos de distribución en la membrana plasmática de la quimera Ca_v2.2-GFP en presencia o ausencia de las subunidades Ca_vβ₃ y Ca_vα₂δ₁. Como esperábamos, la señal en membrana en ausencia de una de las dos subunidades Ca_vβ₃ o Ca_vα₂δ₁ fue menor que en presencia de ambas subunidades (Figura 6, comparación entre barras blancas +Ca_vβ₃ ó +Ca_vα₂δ₁ versus +Ca_vβ₃+Ca_vα₂δ₁), evidenciando la importancia de las mismas para el tráfico del canal.

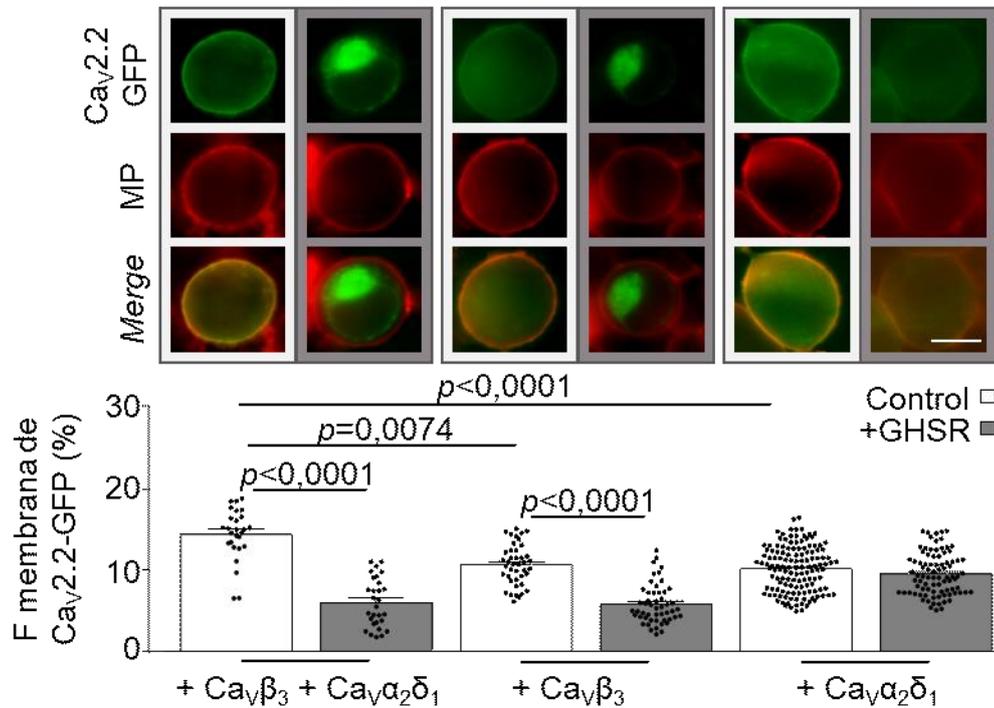


Figura 6. La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad de Ca_V2.2 en la membrana plasmática de manera dependiente de la presencia Ca_Vβ₃ pero no de Ca_Vα₂δ₁. Fotomicrografías y porcentajes promedio de la señal fluorescente verde en membrana de células HEK293T transfectadas con Ca_V2.2-GFP en presencia o en ausencia de las subunidades auxiliares Ca_Vα₂δ₁ o Ca_Vβ₃ (\pm Ca_Vα₂δ₁, \pm Ca_Vβ₃), sin (Control) y con GHSR (+GHSR). Las señales fluorescentes verde y roja corresponden a Ca_V2.2-GFP y al marcador de membrana *CellMask*, respectivamente. Significancia estadística evaluada mediante el test de Mann Whitney. Escala = 10 μ m

En presencia de ambas subunidades auxiliares, corroboramos que la densidad de Ca_V2.2 en membrana disminuía con la coexpresión de GHSR (Figura 6, +Ca_Vβ₃ +Ca_Vα₂δ₁). Al realizar este mismo experimento en ausencia de Ca_Vα₂δ₁, observamos que la coexpresión de GHSR redujo la señal de Ca_V2.2-GFP en membrana en una proporción similar a la observada en presencia de ambas subunidades Ca_Vβ₃ y Ca_Vα₂δ₁ (Figura 6, +Ca_Vβ₃). En contraste, cuando estudiamos el efecto de la coexpresión de GHSR en ausencia de Ca_Vβ₃, no observamos una disminución de la señal de Ca_V2.2-GFP en membrana (Figura 6, +Ca_Vα₂δ₁), lo que indica que la subunidad Ca_Vβ es necesaria para el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_V2.2.

Para confirmar el rol de la subunidad Ca_Vβ en el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la distribución de los Ca_V2, evaluamos si GHSR es capaz de modificar la distribución subcelular de Ca_V3.2, un subtipo de Ca_V cuyo tráfico a la membrana plasmática es independiente de las subunidades auxiliares Ca_Vβ y Ca_Vα₂δ pero que, no obstante, es capaz de interactuar con éstas cuando se

encuentran coexpresados (Wyatt *et al.*, 1998; Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005). Utilizando una quimera fluorescente de $Ca_v3.2$, observamos que en ausencia de la subunidad $Ca_v\beta_3$ no hubo diferencias en la distribución de la señal en membrana entre la condición control y la condición con sobreexpresión de GHSR (Figura 7, $-Ca_v\beta_3$). Sin embargo, la incorporación de la subunidad $Ca_v\beta_3$ fue suficiente para que $Ca_v3.2$ adquiriera sensibilidad a la actividad constitutiva de GHSR. Además, esta reducción de la densidad en la membrana plasmática de $Ca_v3.2$ -GFP fue revertida por la preincubación con el agonista inverso de GHSR (Figura 7, $+Ca_v\beta_3$).

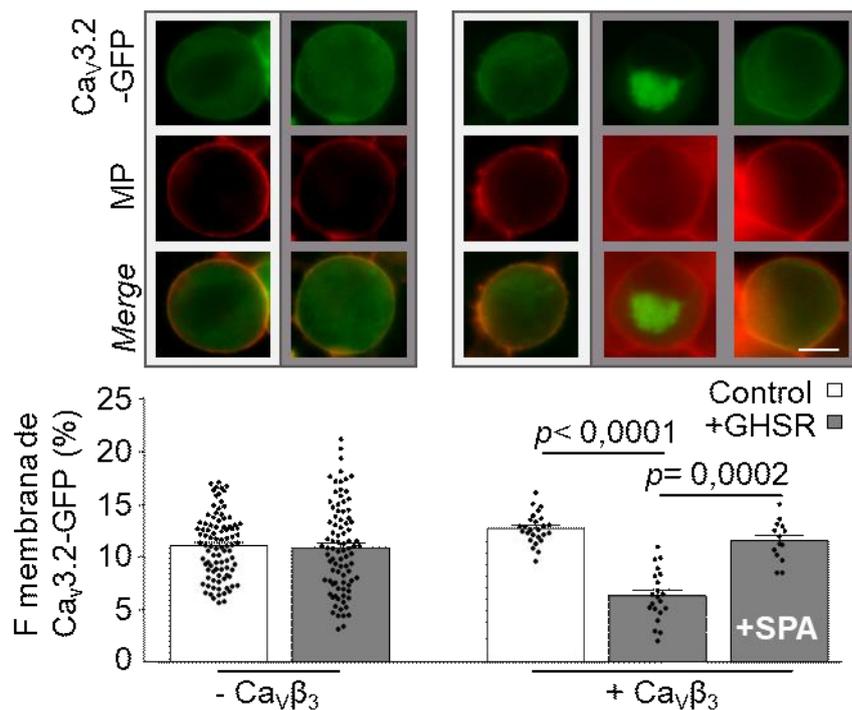


Figura 7: La actividad constitutiva de GHSR reduce la densidad en membrana de $Ca_v3.2$ sólo en presencia $Ca_v\beta_3$. Fotomicrografías y porcentajes promedio de la señal fluorescente verde en membrana de células HEK293T transfectadas con $Ca_v3.2$ -GFP (Control) y GHSR (+GHSR), y GHSR preincubadas con SPA 1 μ M (+GHSR+SPA), en presencia (+ $Ca_v\beta_3$) o ausencia (- $Ca_v\beta_3$) de $Ca_v\beta_3$. Las señales fluorescentes verde y roja corresponden a $Ca_v3.2$ -GFP y al marcador de membrana *CellMask*, respectivamente. Significancia estadística evaluada mediante el test de Mann Whitney o de Kruskal-Wallis con el post test de Dunn. Escala = 10 μ m.

Este conjunto de resultados, junto con otros experimentos de electrofisiología (realizados en paralelo como parte de la tesis doctoral de E. Román Mustafá) indican que el efecto de la actividad constitutiva sobre los Ca_v implica una reducción en la densidad de los Ca_v en la membrana plasmática dependiente de la subunidad $Ca_v\beta$, extendiendo este efecto a distintos subtipos de Ca_v .

Tras demostrar que la actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v nativas totales en cultivos hipocampales e identificar parte de su mecanismo, exploramos cuál es el impacto de esta actividad basal en la neurotransmisión.

Resultados – Capítulo II

En esta sección, evaluamos cuál es el impacto del efecto de la actividad constitutiva sobre los Ca_v en la actividad sináptica del hipocampo utilizando dos modelos experimentales: cultivos primarios y rebanadas de cerebro de ratón.

Objetivo 2a- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en neuronas hipocampales en cultivo.

Los principales neurotransmisores rápidos en el sistema nervioso central son glutamato y GABA, los cuales poseen receptores ionotrópicos que al ser activados producen corrientes despolarizantes excitatorias (glutamato) o hiperpolarizantes inhibitorias (GABA) en el cerebro adulto. La entrada de calcio a través de los Ca_v es fundamental para la liberación de estos neurotransmisores.

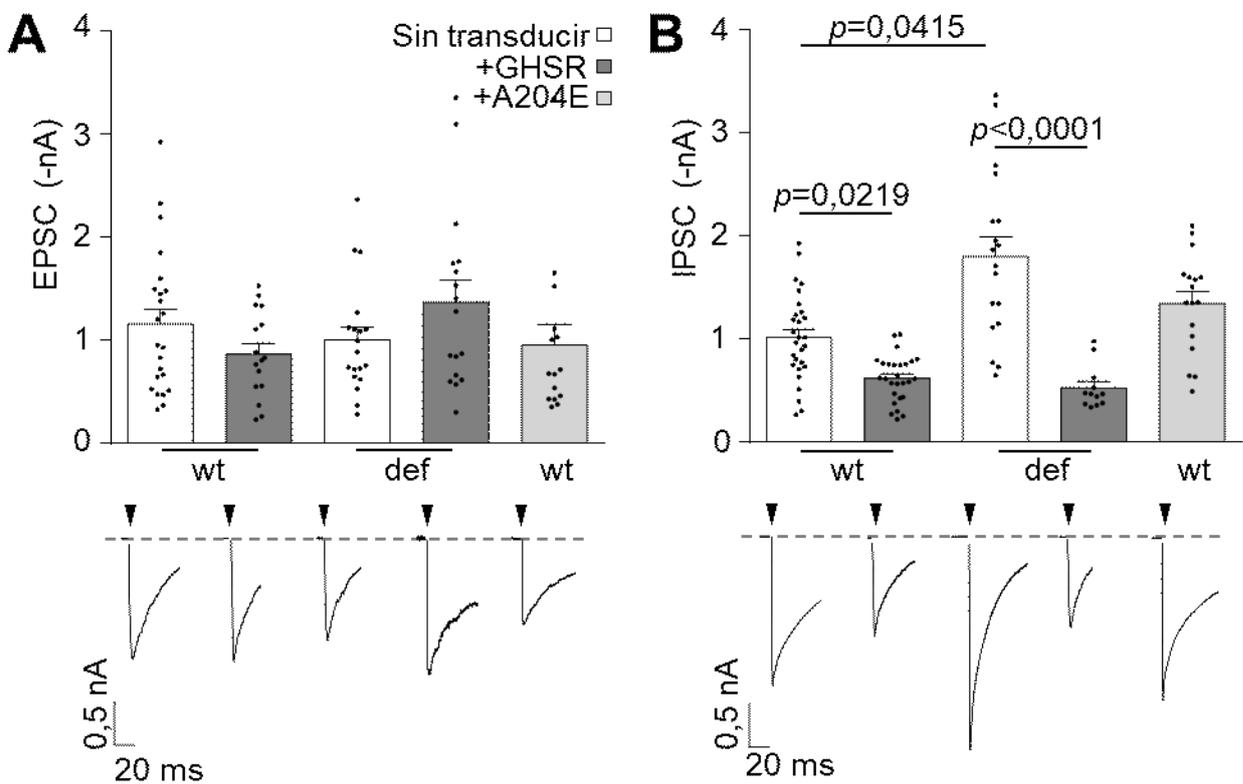


Figura 8: La expresión de GHSR modifica exclusivamente la transmisión inhibitoria dependiente de Ca_v . Trazos representativos de A-EPSCs y B-IPSCs evocadas por estímulos eléctricos (indicados por las flechas negras) y valores de amplitud promedio en neuronas hipocampales maduras (>14 DIV) salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) transducidas o no con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) o GHSRA204E (+A204E) o sin transducir (sin transducir). Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post test de Dunn.

Así, en este apartado utilizamos estrategias experimentales que nos permitieran distinguir entre la liberación de GABA y la de glutamato dependiente e independiente de calcio, para diferenciar el impacto del efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre los Ca_v de otros blancos posibles.

Primero evaluamos el efecto de la expresión de GHSR sobre la actividad sináptica dependiente de calcio. Utilizando la misma estrategia experimental para manipular la cantidad de GHSR que usamos para el registro de las corrientes Ca_v , registramos las EPSCs e IPSCs evocadas por estimulación de campo en cultivos hipocampales maduros (>14 DIV) obtenidos a partir de ratones salvajes o deficientes en GHSR con o sin sobreexpresión de GHSR o GHSRA204E. Para la neurotransmisión glutamatérgica, encontramos que la amplitud de las EPSCs no se modificó por la sobreexpresión de GHSR ni de GHSRA204E en los cultivos salvajes ni en aquellos deficientes en GHSR (Figura 8A). En cambio, la sobreexpresión de GHSR, pero no la de GHSRA204E, redujo la amplitud de las IPSCs significativamente tanto en los cultivos salvajes como en los deficientes en GHSR (Figura 8B). Estos resultados indican que la expresión de GHSR ejerce un efecto inhibitorio selectivo sobre la neurotransmisión GABAérgica dependiente de calcio. Sin embargo, considerando que i- el vector lentiviral que utilizamos para la sobreexpresión de GHSR posee un promotor ubicuo (pUBC, promotor de ubiquitina), ii- que tanto las EPSCs como las IPSCs son dependientes de las corrientes Ca_v , y iii- que la actividad constitutiva de GHSR reduce las corrientes Ca_v totales, habríamos esperado que ambos tipos de corrientes postsinápticas se vieran afectados.

Una posibilidad para explicar esta selectividad es que el efecto de GHSR estuviera vinculado con un cambio en la sensibilidad al calcio de las sinapsis GABAérgicas o glutamatérgicas que se sumase al efecto inhibitorio sobre las corrientes Ca_v . La sensibilidad al calcio es una propiedad de las sinapsis que refleja la eficiencia con la que el calcio que ingresa a través de los Ca_v produce la liberación de neurotransmisores. Nuestra hipótesis se basa en las diferencias que existen en las propiedades de liberación entre ambos subtipos de presinapsis (Moulder *et al.*, 2007; Bragina *et al.*, 2010; Grønborg *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010). Para evaluar la sensibilidad al calcio en nuestras condiciones de trabajo, registramos las EPSCs e IPSCs a cinco concentraciones diferentes de calcio externo entre 0,5 y 10 mM en cultivos salvajes y deficientes en GHSR. Un cambio

en la sensibilidad al calcio se habría observado como una modificación de la pendiente de la rectas obtenida al graficar la magnitud de las corrientes postsinápticas *versus* el logaritmo de la concentración de calcio. Al realizar estos gráficos no encontramos diferencias en las pendientes de las rectas para las EPSCs ni para las IPSCs (Figura 9). Este resultado indica que el efecto diferencial de GHSR sobre las IPSCs no reside en un cambio en la sensibilidad al calcio de las sinapsis. Por otro lado, encontramos que los ratones deficientes en GHSR presentaron mayores IPSCs para todas las concentraciones de calcio ensayadas, lo que se evidenció como un aumento en el valor absoluto de la ordenada al origen de la recta para las IPSCs *versus* calcio (Figura 9B). Así, esta observación concuerda con nuestra hipótesis según la cual GHSR modula el número de Ca_v disponibles para acoplar la despolarización a la liberación de vesículas. En conjunto, estos datos indican que la actividad constitutiva de GHSR ocasiona un cambio en el número de Ca_v disponibles solamente en las sinapsis inhibitorias.

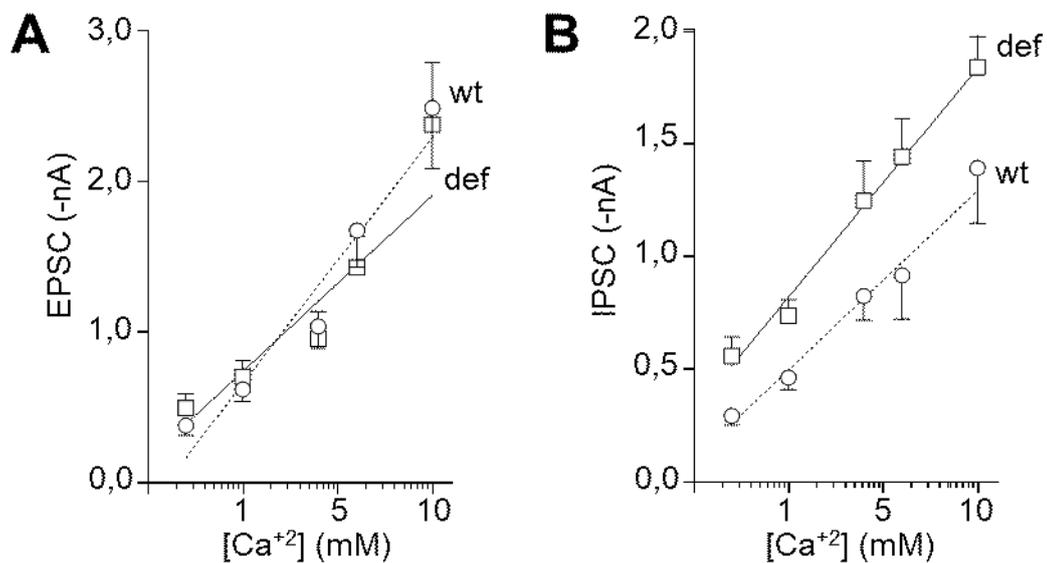


Figura 9: La actividad constitutiva de GHSR no afecta la sensibilidad al calcio de las EPSCs/IPSCs. Valores promedio de A- EPSCs y B- IPSCs a diferentes concentraciones de calcio ($[Ca^{+2}]$, escala logarítmica) y regresión lineal de neuronas hipocámpales de >14 DIV salvajes (wt, círculos) y deficientes en GHSR (def, cuadrados). Parámetros de ajuste de la regresión lineal: test de pendientes de las EPSCs: $F=1,2298$, $DFn=1$, $DFd=75$, $p=0,271$, pendiente combinada= $0,5761$ $r^2(wt)=0,7167$, $r^2(def)=0,5260$; test de la ordenada al origen: $F=0,0203$ $DFn=1$ $DFd=76$ $p=0,887$, ordenada combinada= $2,7799$. ($n=79$, entre 3-12 por cada valor promedio). Test de pendientes de las IPSCs: $F=0,6996$, $DFn=1$, $DFd=81$, $p=0,4054$, pendiente combinada= $0,5015$ $r^2(wt)=0,5170$, $r^2(def)=0,5888$; test de la ordenada al origen $F=29,3249$, $DFn=1$, $DFd=82$, $p<0,0001$, ordenada (wt)=- $0,50 \pm 0,05$ nA, ordenada (def)=- $0,82 \pm 0,06$ nA. ($n=85$, entre 3-13 por cada valor promedio).

Según nuestras observaciones, la actividad constitutiva de GHSR modificaría selectivamente la cantidad de Ca_v disponibles en las sinapsis GABAérgicas. Para testear esta hipótesis, medimos el cociente entre las respuestas postsinápticas evocadas por pulsos pareados consecutivos con diferentes intervalos de tiempo (PPR, de la sigla en inglés para *paired pulse ratio*). Esta es una manera de estimar la probabilidad de liberación de neurotransmisor, una magnitud de naturaleza presináptica. Este cociente puede ser mayor o menor que 1, según se observe facilitación o depresión sináptica. La facilitación sináptica se asocia con una acumulación de calcio en la terminal sináptica entre el primer y el segundo pulso, producto de una baja probabilidad inicial de liberación. En cambio, la depresión

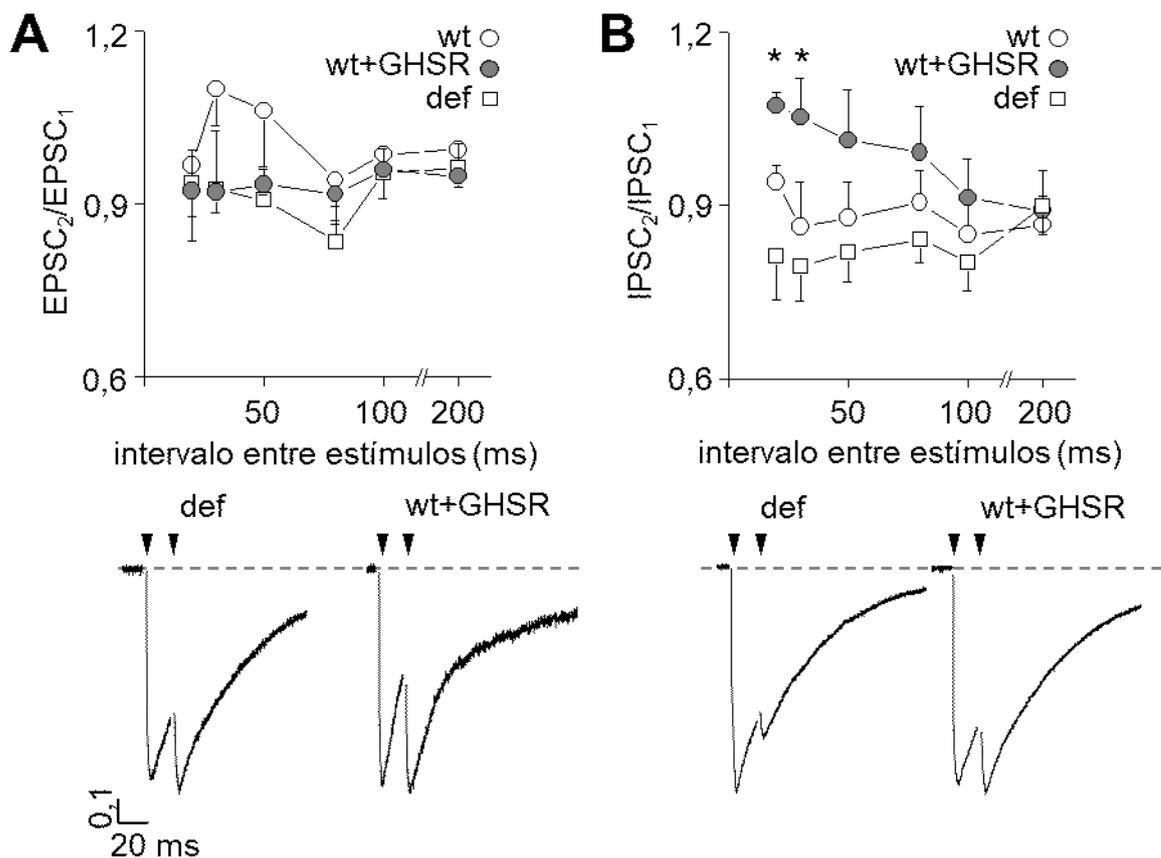


Figura 10: El cociente de pulsos pareados (PPR) se modifica por los niveles de expresión de GHSR solo para la transmisión inhibitoria. Valores promedio de PPR de A- EPSCs y B- IPSCs a diferentes intervalos entre estímulos (20-200 ms) de neuronas hipocámpales de >14 DIV deficientes en GHSR (def) y salvajes transducidas o no (wt) con lentivirus codificando para GHSR (wt+GHSR) y trazos representativos de las EPSCs e IPSCs normalizadas para las condiciones de neuronas salvajes sobreexpresando GHSR (wt+GHSR) y deficientes en GHSR (def) evocadas por estímulos depolarizantes de 1 ms con un intervalo entre pulsos de 20 ms. Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post test de Dunn (n=283, entre 4-11 por condición).

sináptica se atribuye a una probabilidad inicial de liberación alta, de manera que una menor cantidad de vesículas está disponible para ser liberada por el segundo pulso (Zucker y & Regehr, 2002). La actividad constitutiva de GHSR, al disminuir la disponibilidad de Ca_v2 , reduciría la probabilidad inicial de liberación de vesículas sinápticas, dejando un mayor número de vesículas disponibles para ser liberadas por un segundo estímulo. Así, esto se traduciría en un aumento en el PPR para la neurotransmisión inhibitoria. Como puede observarse en la Figura 10, nuestras predicciones fueron corroboradas experimentalmente ya que el PPR para la neurotransmisión inhibitoria aumentó de acuerdo con la expresión de GHSR. La diferencia observada en el PPR para la neurotransmisión inhibitoria se extinguió a intervalos entre pulsos mayores, en concordancia con el hecho de que un mayor intervalo de tiempo entre pulsos permite el reabastecimiento de vesículas sinápticas, (Figura 10B). En contraposición, el PPR para la neurotransmisión excitatoria fue similar entre las distintas condiciones a todos los intervalos entre

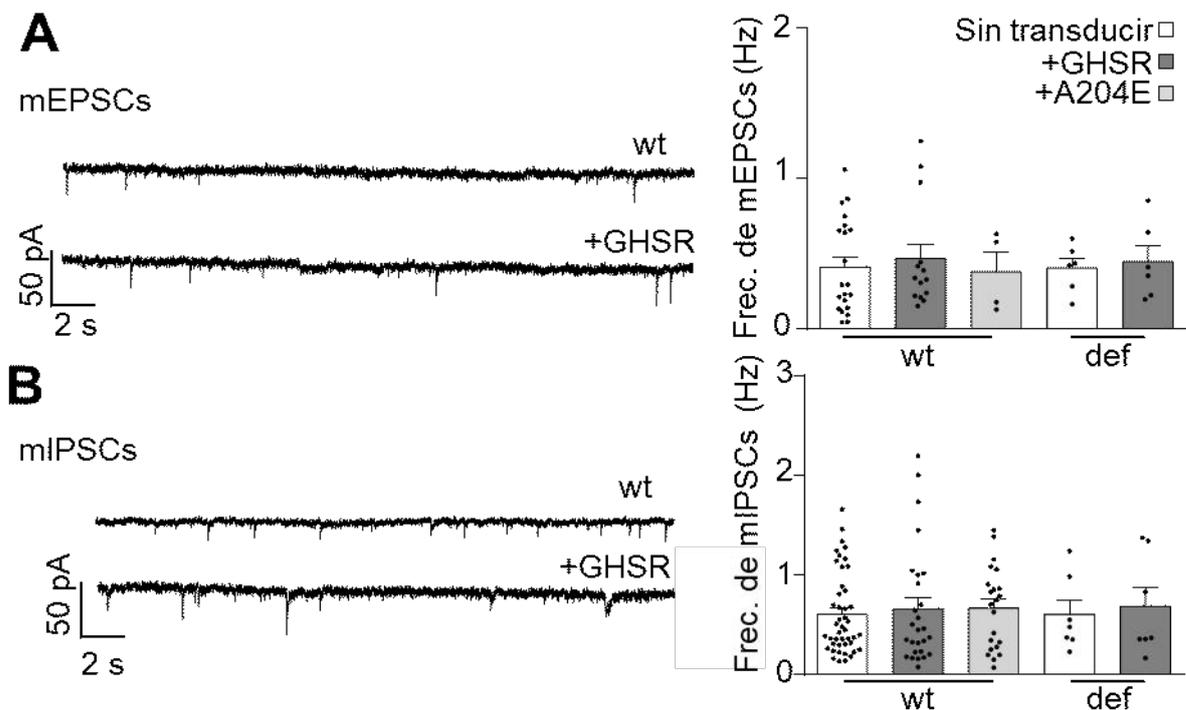


Figura 11: La frecuencia de las mEPSCs y mIPSCs independientes de Ca_v no se ve afectada por la actividad constitutiva de GHSR. Valores promedio de frecuencia, y trazos representativos de A- mEPSCs y B- mIPSCs en neuronas hipocámpales maduras (>14 DIV) salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) y GHSRA204E (+A204E) o sin transducir (sin transducir). Tanto las mEPSCs como las mIPSCs fueron registrados en presencia de 1 μ M TTX y de 100 μ M de $CdCl_2$, el bloqueante de Ca_v . Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post test de Dunn.

pulsos ensayados (Figura 10A).

Para estudiar si la actividad constitutiva de GHSR modifica la neurotransmisión a través de otros posibles blancos además de los Ca_v , evaluamos el efecto de la sobreexpresión de GHSR sobre la liberación de neurotransmisor independiente de Ca_v con dos paradigmas experimentales: el registro de corrientes postsinápticas miniatura (mIPSCs y mEPSCs) y de la respuesta postsináptica a un choque hiperosmótico, ambos en presencia de $1 \mu\text{M}$ de TTX, un bloqueante de los canales de sodio operados por voltaje y de $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , un bloqueante de los Ca_v . Esta maniobra farmacológica anula la posibilidad de que se produzcan disparos de potenciales de acción y la consecuente entrada de calcio a través de los Ca_v . En el primer conjunto de experimentos, medimos la frecuencia de mEPSCs y mIPSCs, y no encontramos diferencias entre las condiciones experimentales en ningún caso (Figura 11). Luego, al evaluar la carga movilizada por la aplicación de una solución hiperosmótica conteniendo $0,5 \text{ M}$ de sacarosa, tampoco encontramos diferencias entre las distintas condiciones experimentales (Figura 12). Esta maniobra permite evaluar el tamaño del *pool* de vesículas listas para liberarse

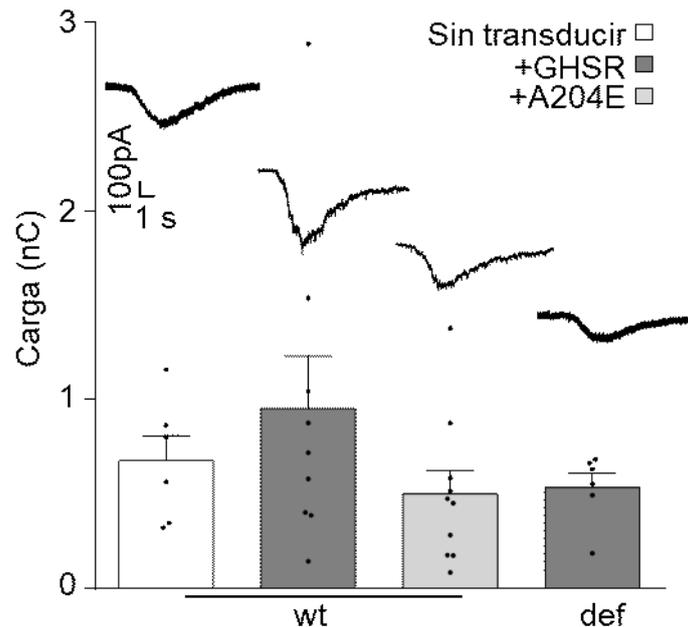


Figura 12: La respuesta a la aplicación de una solución hiperosmótica de sacarosa no se ve afectada por la actividad constitutiva de GHSR. Trazos representativos y valores promedio de la carga movilizada en neuronas hipocampales maduras (>14 DIV) salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) y GHSRA204E (+A204E) o sin transducir (sin transducir) como respuesta a la estimulación con una solución $0,5 \text{ M}$ de sacarosa en presencia de $1 \mu\text{M}$ de TTX y $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , el bloqueante de Ca_v . Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post test de Dunn.

(*ready releasable pool*), una variable que incide en la magnitud de la corriente postsináptica. Por otro lado, teniendo en cuenta que GHSR puede encontrarse expresado tanto pre- como postsinápticamente, verificamos si el efecto observado sobre la neurotransmisión estaba compensado o acompañado por alguna modificación de naturaleza postsináptica. Para ello, examinamos la amplitud de las mIPSCs y mEPSCs en neuronas que expresan o no GHSR o su versión mutante, ya que esta medida refleja la disponibilidad de receptores en la membrana postsináptica. Como se observa en la Figura 13 la amplitud de las mIPSCs y mEPSCs fue igual en todas las condiciones experimentales permitiéndonos descartar un efecto sobre la densidad de receptores en la postsinapsis.

Este conjunto de datos sugieren que el origen del efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión inhibitoria está limitado a la modulación negativa de la densidad de los Ca_v presinápticos, descartando otros mecanismos postsinápticos o presinápticos independientes de Ca_v .

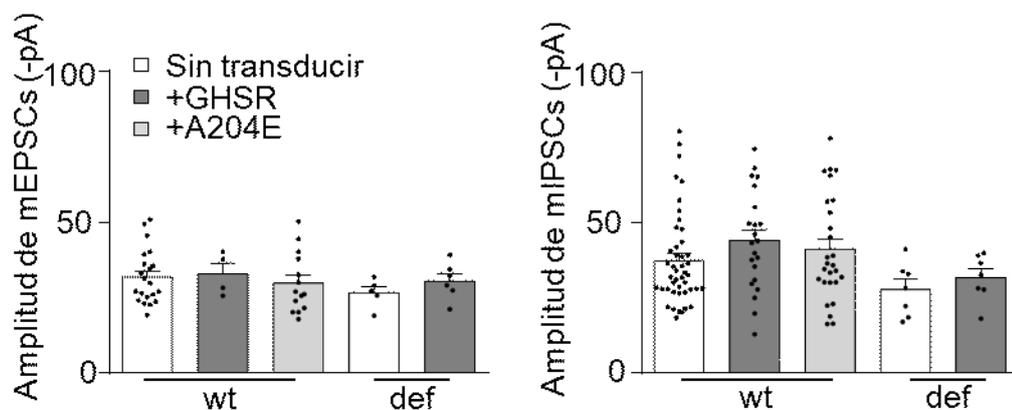


Figura 13: La amplitud de las mEPSCs y mIPSCs independientes de Ca_v no se ve afectada por la actividad constitutiva de GHSR. Valores promedio de amplitud de mEPSCs y mIPSCs de neuronas hipocámpicas maduras (>14 DIV) salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR) y GHSRA204E (+A204E) o sin transducir (sin transducir). Tanto las mEPSCs como las mIPSCs fueron registradas en presencia de 1 μ M TTX y de 100 μ M de $CdCl_2$, el bloqueante de Ca_v . Significancia estadística evaluada mediante Kruskal Wallis ANOVA y post test de Dunn.

Luego intentamos entender por qué el efecto de la actividad constitutiva de GHSR es selectivo para las sinapsis inhibitorias. En base a los resultados mostrados en la figura 3 que indican una mayor contribución del subtipo $Ca_v2.2$ a la corriente total inhibida por GHSR, es posible plantear que la especificidad del efecto se deba a un acople diferencial de las IPSCs a los $Ca_v2.2$ respecto de los $Ca_v2.1$. Entonces analizamos el efecto de la aplicación de ω -conotoxina-GVIA (bloqueador

de $Ca_v2.2$) sobre las IPSCs y las EPSCs en cultivos salvajes. Encontramos que ω -conotoxina-GVIA redujo en mayor medida la amplitud de las IPSCs que de las EPSCs ($37,7 \pm 4,1 \%$, $n=9$ versus $21,23 \pm 3,3 \%$, $n=7$, $p=0,0097$, test t de Student) en los cultivos salvajes. Por otro lado evaluamos el efecto de ω -conotoxina-GVIA y ω -agatoxina-IVA en cultivos salvajes sobreexpresando o no GHSR (Figura 14). En estos experimentos encontramos nuevamente que la sobreexpresión de GHSR redujo en un $\sim 50 \%$ la amplitud de las IPSCs (Figura 14A). Al evaluar el efecto de las toxinas sobre la amplitud de las IPSCs encontramos que las IPSCs de cultivos salvajes con sobreexpresión de GHSR sólo fueron un $\sim 20 \%$ sensibles a ω -conotoxina-GVIA, mientras que en los cultivos salvajes sin transducir el porcentaje fue de $\sim 40 \%$. En concordancia con nuestra hipótesis, la sensibilidad a ω -agatoxina-IVA fue similar en los cultivos salvajes sobreexpresando o no GHSR, $\sim 15 \%$ (Figura 14B y C). Por lo tanto, la dependencia de las IPSCs de $Ca_v2.2$ fue mayor que la de $Ca_v2.1$ en los cultivos salvajes. Cabe señalar que la sobreexpresión de GHSR redujo la dependencia porcentual de las IPSCs a $Ca_v2.2$ sin modificar la dependencia de $Ca_v2.1$. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la especificidad del efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión inhibitoria reside en una reducción mayor de las corrientes $Ca_v2.2$, de las cuales depende mayoritariamente la liberación de GABA, respecto de las corrientes mediadas por $Ca_v2.1$, en nuestras condiciones experimentales.

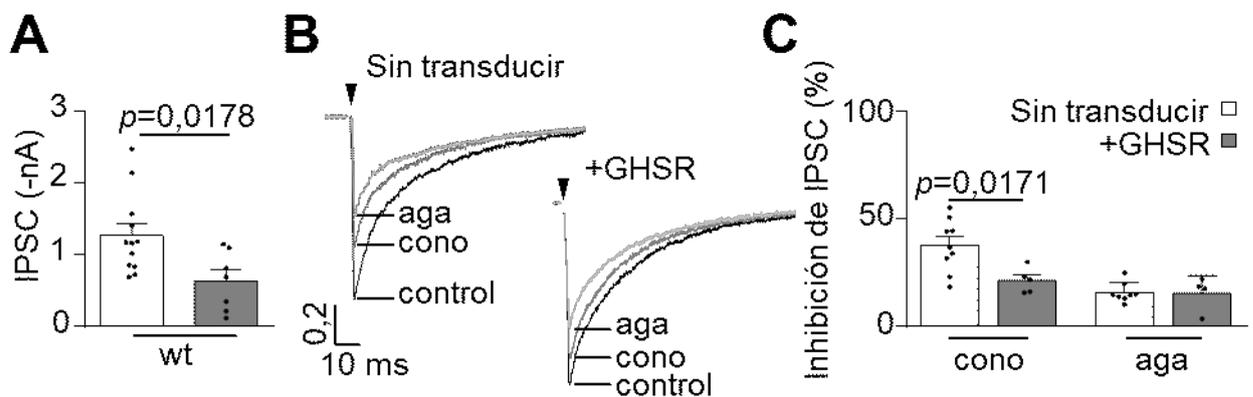


Figura 14: La inhibición de la transmisión inhibitoria producto de la expresión de GHSR está relacionada con una dependencia mayor de las IPSCs de $Ca_v2.2$. A- Amplitud promedio de IPSCs y B- trazos representativos de las IPSCs normalizadas antes (control) y después de la aplicación sucesiva de $1 \mu\text{M}$ de ω -conotoxina-GVIA (cono) y $0,2 \mu\text{M}$ de ω -agatoxina-IVA (aga), C- porcentaje de inhibición de neuronas de >12 DIV salvajes (wt) y salvajes transducidas con lentivirus codificando para GHSR (+GHSR). Significancia estadística evaluada mediante el test t de Student.

Objetivo 2b- Estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la neurotransmisión en el circuito hipocampal en rebanadas de cerebro.

Después de caracterizar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR en cultivos hipocampales primarios y habiendo obtenido datos que muestran un rol importante de esta actividad basal en la neurotransmisión inhibitoria, exploramos cuál era el impacto de esta modulación en el circuito hipocampal intacto. Para ello, instalé, junto con otros becarios del laboratorio, una unidad para registros electrofisiológicos en rebanadas de cerebro de roedores. Además, en 2017, obtuve una beca para asistir a un curso de técnicas avanzadas para el estudio de la sinapsis, en el Campus de neurociencias de Bordeaux, donde aprendí los detalles necesarios para poner a punto la técnica a mi regreso.

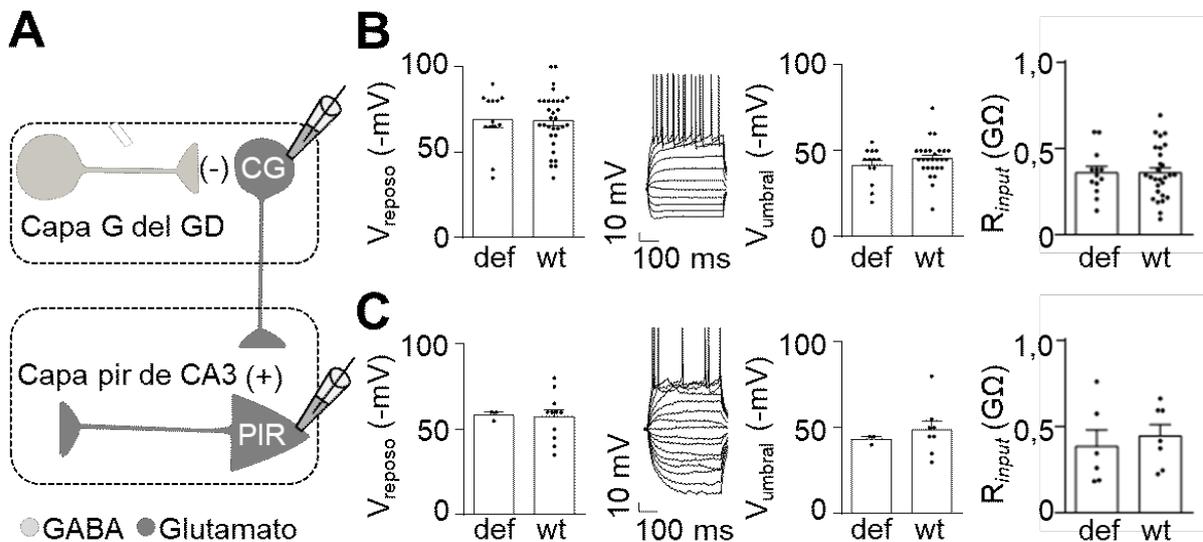


Figura 15: La actividad constitutiva de GHSR no afecta las propiedades electrofisiológicas de dos tipos de neuronas hipocampales. A- Esquema del hipocampo indicando las zonas de registro, la capa de las células granulares del giro dentado (Capa G del GD) y la capa de células piramidales de CA3 (Capa pir de CA3). Caracterización electrofisiológica de neuronas B- granulares y C- piramidales salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def) mostrando los valores de potencial de reposo promedio (V_{reposo}), trazos representativos de registros en fijación de corriente, los valores de potencial umbral promedio para el disparo de potenciales de acción (V_{umbral}) y los valores de resistencia de entrada promedio (R_{input}). Significancia estadística evaluada mediante el test de Mann-Whitney.

El circuito clásico principal de la formación hipocampal es de carácter excitatorio. El giro dentado (GD), que constituye el filtro de entrada de la información que ingresa al hipocampo, recibe inervación de la corteza entorrinal a través de la vía perforada, y envía sus proyecciones al área CA3 mediante las

fibras musgosas, y ésta al área CA1 por las vías colaterales de Schaffer. Este circuito glutamatergico se encuentra modulado por una gran variedad de interneuronas inhibitorias, tanto de forma tónica como a través de circuitos de alimentación y retro-alimentación. GHSR se encuentra expresado en estas tres regiones, especialmente en el GD (Guan *et al.*, 1997; Mani *et al.*, 2014, 2017). En este contexto y basándonos en los resultados obtenidos en cultivos primarios, pensamos que GHSR podría tener un rol importante en esta área, regulando la neurotransmisión inhibitoria en el GD. Como primer paso, corroboramos que la actividad constitutiva de GHSR no afecta el potencial de reposo, el potencial umbral de disparo ni la resistencia de *input*, propiedades intrínsecas de las células granulares que forman el GD y de las neuronas piramidales de CA3 (Figura 15).

Luego evaluamos si la expresión de GHSR afectaba la actividad sináptica del GD y de CA3 de ratones salvajes y deficientes en GHSR. Primero medimos la magnitud de las IPSCs intra-GD registrando en las células granulares (CG-IPSC), y colocando el estimulador en esta misma área, como se muestra en el esquema de la figura 16A. Encontramos que la magnitud de las CG-IPSCs obtenidas a partir de

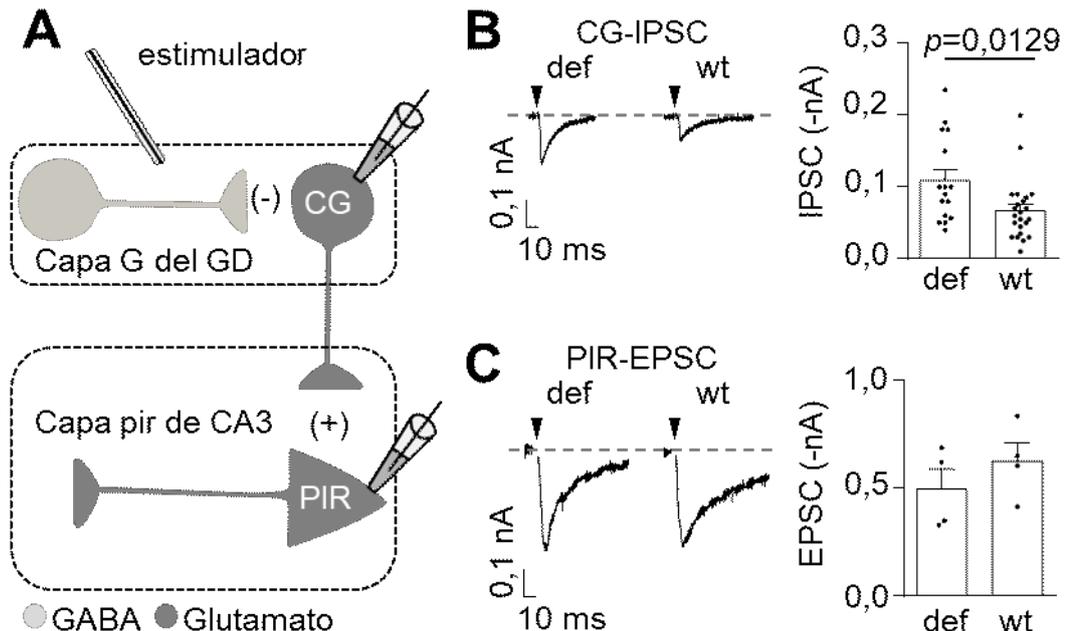


Figura 16: Impacto del efecto de la actividad constitutiva de GHSR en el circuito hipocampal. A-Esquema del hipocampo mostrando las posiciones del estimulador extracelular y de los electrodos de registro en la capa de las células granulares del giro dentado (Capa G del GD) y de la capa de células piramidales de CA3 (Capa pir de CA3) y trazos representativos y valores de amplitud promedio de B- CG-IPSC y C- PIR-EPSC de neuronas piramidales salvajes (wt) y deficientes en GHSR (def). Significancia estadística evaluada mediante el test de Mann-Whitney.

ratones salvajes fueron significativamente menores que aquellas obtenidas a partir de ratones deficientes en GHSR (Figura 16B). Esto indicaría que la presencia de GHSR es capaz de modular el circuito hipocampal a nivel del GD. A continuación, para analizar si el efecto de la expresión de GHSR afecta también la inervación excitatoria del GD a CA3, registramos las EPSCs en CA3 manteniendo la posición del estimulador en la capa de las células granulares del GD (Figura 16A), sin observar diferencias entre los ratones salvajes y deficientes en GHSR (Figura 16C).

Los resultados de esta última parte nos permiten concluir que la actividad constitutiva de GHSR puede modular la neurotransmisión hipocampal regulando la transmisión inhibitoria intra-GD, sin afectar la actividad glutamatérgica que impacta sobre CA3, ni las propiedades intrínsecas de las neuronas principales de estas regiones hipocampales.

Discusión

En esta tesis mostramos que la actividad constitutiva de GHSR regula la neurotransmisión inhibitoria en neuronas hipocampales. Nuestros resultados sugieren que esta alteración depende de un efecto presináptico mediado por la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ que afecta particularmente la liberación de GABA.

La capacidad de las células de detectar y reaccionar ante señales químicas externas –como hormonas, neurotransmisores o iones- es indispensable para muchas de las funciones de los seres vivos. Los GPCRs son un tipo de receptores de membrana conservados en todos los organismos eucariotas esenciales para esta comunicación (Shalaeva *et al.*, 2015). Los GPCRs acoplan la unión de ligandos a un sitio específico con la activación de proteínas G determinadas que desencadena un abanico de acciones en el interior celular. Los ligandos capaces de unirse a un GPCR pueden activar las vías intracelulares asociadas en distintos grados, lo que se conoce como eficacia. En particular, la observación de que la unión de algunos ligandos genera una eficacia negativa llevó al descubrimiento de la actividad constitutiva de los GPCRs en los años '90 (Costa y Cotecchia, 2005). Pronto se comprendió que la actividad constitutiva es la capacidad de los GPCRs de adquirir una conformación activa aun en ausencia de ligando y que, los ligandos con eficacia negativa son en realidad agonistas inversos (Bond y IJzerman, 2006). La actividad constitutiva de los GPCRs se ha observado en sistemas heterólogos y nativos a distintos niveles de expresión de receptor (Smit *et al.*, 2007) indicando que la sola expresión de los GPCRs constitutivamente activos puede ejercer una modulación celular crónica. La actividad constitutiva se ha observado en más de 60 GPCRs -de los ~750 conocidos- acoplados a distintas proteínas G y expresados tanto en humanos como en otras especies (Seifert y Wenzel-Seifert, 2002). Como mencionamos antes, el receptor de ghrelina posee la mayor actividad constitutiva conocida, alcanzando el SPA, su agonista inverso, una eficacia negativa de magnitud comparable a la eficacia de ghrelina (Holst *et al.*, 2003; Sivertsen *et al.*, 2013). La actividad constitutiva de GHSR ha sido un fenómeno difícil de abordar experimentalmente debido a su naturaleza crónica y a la falta de especificidad de SPA, el cual posee otros efectores celulares como el receptor de bombesina, el de neurokinina 1 y el del péptido liberador de gastrina (Jarpe *et al.*, 1998; Djanani *et al.*, 2003; MacKinnon *et al.*, 2005). La mayoría de los trabajos avocados a la investigación de la actividad constitutiva de GHSR han indagado en los

mecanismos moleculares utilizando sistemas de expresión heterólogos y evaluando la activación de vías intracelulares en respuesta a ligandos sintéticos, que funcionan como agonistas inversos con diferente eficacia (Els *et al.*, 2012; McCoull *et al.*, 2014; Daina *et al.*, 2018).

La actividad constitutiva de GHSR y la mediada por ghrelina poseen importantes diferencias en la señalización intracelular que desencadenan y en la temporalidad en que se producen sus efectos. Los datos previos de nuestro laboratorio refuerzan esta diferencia funcional de ambos modos de activación de GHSR actuando sobre un blanco común: los canales de calcio activados por voltaje (López Soto *et al.*, 2015). Aunque los Ca_v son muy sensibles a la activación de GPCRs, el impacto de la actividad constitutiva sobre los mismos ha sido poco explorado. Nosotros hemos demostrado recientemente que estos dos modos de activación de GHSR son capaces de afectar a los Ca_v2 reduciendo los niveles de corriente. Una hipótesis plausible era que la actividad evocada por ghrelina y la actividad constitutiva utilizaran la misma cascada de señalización para inhibir los Ca_v y que el efecto final fuera una suma de la activación basal de esa vía a la que se adicionara una activación extra por la unión de ghrelina al GHSR. Sin embargo, nuestros estudios demostraron que se trata de mecanismos radicalmente distintos que señalizan a través de diferentes proteínas G: la unión de ghrelina a GHSR actúa a través de Gq, mientras que el efecto de la actividad constitutiva está mediado por Gi/o. Estudios sobre las vías de señalización de GHSR han identificado a la proteína Gq como la principal efectora de ambos modos de activación de GHSR desde su descubrimiento, por lo que comúnmente se describe a este receptor como un GqPCR (Howard *et al.*, 1996; Holst *et al.*, 2003; Malagón *et al.*, 2003). Sin embargo, existen antecedentes demostrando que GHSR también puede activar otras proteínas G además de Gq como Gs (Kohno *et al.*, 2003), G12/13 (Evron, Sean M. Peterson, *et al.*, 2014) y Gi/o (Dezaki *et al.*, 2007). En el caso de Gi/o, estudios tanto de ensayos de unión de [35S]-GTPγS en un sistema de expresión heterólogo (Bennett *et al.*, 2009) como de reconstitución de GHSR en discos lipídicos han confirmado que tanto la actividad constitutiva de GHSR como la evocada por ghrelina pueden activarla, y que la aplicación de SPA es capaz de revertir la activación basal de esta proteína G (Damian *et al.*, 2012; Mary *et al.*, 2012). Respecto de la escala temporal de los efectos de GHSR sobre los Ca_v ,

hemos encontrado que el mediado por ghrelina es rápido, ya que puede observarse una disminución en tiempo real de las corrientes tras la aplicación aguda de agonista, y que es también parcialmente reversible mediante un pulso de voltaje breve. En contraposición, el efecto basal de GHSR dependiente de G_i/o sobre los Ca_v es de carácter crónico e implica, como mostramos en esta tesis, una disminución de la densidad de Ca_v en membrana (López Soto *et al.*, 2015).

Ahora bien, ¿cómo se puede abordar el estudio del efecto de la activación de estas vías a nivel cerebral? Si bien el efecto orexigénico de ghrelina sobre neuronas hipotalámicas ha sido el más estudiado (Nakazato *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2014), GHSR también se expresa en poblaciones neuronales extra hipotalámicas (Zigman *et al.*, 2006), lo que sugiere que este receptor posee funciones fisiológicas adicionales al control del apetito. GHSR se encuentra ampliamente expresado en todo el hipocampo (Zigman *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2014; Mani *et al.*, 2014, 2017). En esta área, la actividad de GHSR desencadenada por ghrelina exógena controla la actividad neuronal a través de diversos mecanismos como el aumento de la densidad de receptores postsinápticos y del número de espinas dendríticas (Diano *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2014). El hipocampo es una zona de gran interés para el estudio de la actividad constitutiva de GHSR ya que, pese a ser uno de los núcleos cerebrales que cuenta con elevada expresión de GHSR, no está ubicado en la cercanía de las áreas con acceso a la ghrelina plasmática. Para abordar el estudio de la acción de la actividad constitutiva de GHSR en el hipocampo en esta tesis nos basamos en tres aspectos: por un lado, en nuestros resultados preliminares que muestran una alta sensibilidad de los Ca_v a la actividad constitutiva; por otro, en el hecho de que muchos GPCRs modulan los circuitos neuronales actuando sobre la liberación de neurotransmisores (Catterall y Few, 2008); y por último, en el rol fundamental de los Ca_v2 para la liberación de neurotransmisores (Dunlap *et al.*, 1995). El modelo experimental principal utilizado en esta tesis fueron los cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratones salvajes o deficientes en GHSR y la estrategia de sobreexpresión de GHSR con lentivirus. Los cultivos neuronales primarios son ampliamente usados para estudiar las propiedades de la transmisión sináptica, ya que constituyen un preparado con un ambiente controlado que permite recapitular las propiedades de las neuronas *in vivo* (Basarsky *et al.*, 1994; Matteoli *et al.*, 1995;

Verderio *et al.*, 1999; Maximov *et al.*, 2007). La maniobra de sobreexpresión de GHSR nos permite suponer homogeneidad en su expresión en los distintos subtipos neuronales debido a que la misma es dependiente de un promotor universal (pUBC). Los cultivos primarios exhiben un intenso crecimiento axonal y dendrítico, así como la formación de sinapsis maduras de manera controlada en un período acotado de tiempo. De este modo, pudimos estudiar cómo la actividad constitutiva impacta sobre la densidad de corriente Ca_v2 y sobre las propiedades sinápticas en un intervalo de tiempo crítico. Complementamos nuestro estudio con análisis de la distribución de Ca_v en un sistema de expresión heterólogo para indagar en algunos detalles del efecto de GHSR y con registros de actividad sináptica en rebanadas de cerebro para recapitular nuestros hallazgos en los cultivos primarios.

En nuestros experimentos en cultivos primarios observamos que las neuronas deficientes en GHSR mostraron un nivel de corriente Ca_v total aumentado respecto de las neuronas salvajes, y que la sobreexpresión de GHSR evitó el incremento de la corriente Ca_v observado a través de los días de cultivo (Figura 1). Podemos afirmar que este efecto es producto de la actividad constitutiva, dado que en la condición con sobreexpresión de la versión mutante de GHSR sin actividad constitutiva, GHSRA204E, no observamos diferencias con la condición control (Figura 2). Este primer resultado condice con nuestros estudios previos en los que mostramos que la sobreexpresión de GHSR en cultivos hipotalámicos reduce la corriente Ca_v nativa total. Otros grupos han mostrado que los niveles de ARNm y de proteína en neuronas hipocámpales cultivadas revelan que el perfil de expresión de GHSR está regulado durante el desarrollo de la sinapsis *in vitro*, exhibiendo un incremento significativo entre los DIV 7 a 21 (Lattuada *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2014), en concordancia con el curso temporal en el que observamos un fuerte incremento en la corriente Ca_v total en las neuronas deficientes en GHSR. Además, el hecho de que la actividad constitutiva de GHSR reduzca el aumento progresivo de la corriente Ca_v concuerda con el carácter crónico del efecto de esta actividad. Respecto del mecanismo subyacente a esta modulación, recientemente se ha descrito que los GPCRs pueden regular la distribución o densidad en membrana de Ca_v mediante cambios en el tráfico de estos canales desde o hacia la membrana (Davidova D., 2014; Ferron, 2014; Nakamura *et al.*, 2015; Schneider

et al., 2015). Estos mecanismos difieren de la modulación canónica de los Ca_V por la activación de GPCRs, que involucra cambios en la cinética de activación y deactivación como así también la modificación en la dependencia del voltaje por unión directa de $G\beta\gamma$ y la fosforilación a través de distintas proteínas quinasas (Burgoyne y Weiss, 2001; Catterall y Few, 2008). Entre los GPCRs que regulan el tráfico de los Ca_V se encuentran los receptores ORL1 (de la sigla en inglés para *opioid receptor-like type 1*), de dopamina. ORL1 reduce la densidad de Ca_V en membrana plasmática tras la aplicación prolongada de agonista, incrementando el tráfico de Ca_V a endosomas tempranos o a lisosomas (Altier *et al.*, 2006). También se ha descrito que este mismo receptor puede internalizar el complejo GPCR- $Ca_V2.2$ en forma independiente de ligando (Beedle *et al.*, 2004). Por otro lado, los receptores de dopamina D1R y D2R al activarse por su ligando se cointernalizan con el Ca_V (Kisilevsky y Zamponi, 2008) mientras que, en ausencia de su agonista, D1R interactúa directamente con $Ca_V2.2$ aumentando su expresión en membrana (Kisilevsky *et al.*, 2008). En el caso de GHSR, en experimentos en los que utilizamos quimeras de $Ca_V2.1$ y $Ca_V2.2$ fusionadas a GFP observamos que la alteración de las corrientes Ca_V por la actividad constitutiva está vinculada con una disminución en la densidad de Ca_V en la membrana plasmática (Figura 4 y 5), dado que la señal fluorescente verde en membrana disminuyó con la coexpresión de GHSR y que esto pudo ser revertido mediante la coexpresión del mutante GHSRA204E, o la preincubación con SPA. Además, confirmamos que esta modulación depende de la activación de Gi/o (Figura 4 y 5, (López Soto *et al.*, 2015; Mustafá *et al.*, 2017)), ya que la preincubación con PTx también fue capaz de restituir los valores de intensidad de fluorescencia a los de la condición control. Por otro lado datos de nuestro laboratorio han mostrado que las quimeras de Ca_V con GFP quedan retenidas en compartimentos intracelulares, colocalizando con marcadores del retículo endoplasmático (Mustafá *et al.*, 2017). Así, postulamos que el efecto de GHSR sobre la corriente Ca_V implica una reducción del tráfico desde el sistema de endomembranas hacia la membrana plasmática.

Existen varios aspectos interesantes que se desprenden de nuestras observaciones sobre la modulación del tráfico de Ca_V por GHSR. Por un lado, tenemos pendiente la identificación del mecanismo que media entre la activación de Gi/o y el secuestro de los Ca_V en los compartimentos intracelulares. Aquí no solo

sería importante indagar en los segundos mensajeros involucrados sino también en qué parte de la estructura de los Ca_v2 está involucrada. En esta tesis observamos que el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre la expresión de los Ca_v en membrana depende de la presencia de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ (Figuras 6 y 7). Además, la inclusión de $Ca_v\beta_3$ en estos experimentos nos permitió extender el efecto de la actividad constitutiva a los Ca_v3 , subtipo cuyo tráfico es independiente de las subunidades auxiliares. Otros estudios han establecido que $Ca_v\beta$ estimula el tráfico de los Ca_v hacia la membrana plasmática enmascarando un dominio de retención en el retículo endoplasmático y evitando así la ubiquitinización del canal y su degradación en el proteasoma (Catterall, 1995; Altier *et al.*, 2011; Fang y Colecraft, 2011; Simms y Zamponi, 2012; Yeon *et al.*, 2018). Nuestros datos respecto de la relevancia de $Ca_v\beta$ en la acción basal de un GPCR sobre los Ca_v se suman al ya conocido rol de esta subunidad auxiliar en el efecto agudo de GPCRs sobre estos canales (Zamponi y Currie, 2013; López Soto *et al.*, 2015). Por otro lado, existe la posibilidad que GHSR pueda señalizar basalmente sin estar inserto en la membrana plasmática. En este sentido, se ha descrito que varios GPCRs pueden activar cascadas de señalización intracelular aun estando internalizados, en particular aquellos receptores acoplados a Gs y Gi/o (Calebiro *et al.*, 2010; Lohse y Hofmann, 2015). Estos receptores internalizan independientemente de las proteínas G de membrana plasmática e interactúan con otras presentes en compartimentos intracelulares (Calebiro *et al.*, 2010). Si bien la señalización a través de Gq activada por ghrelina requeriría la presencia de GHSR en membrana (Holliday *et al.*, 2007), es posible que GHSR actúe desde compartimentos intracelulares acoplado basalmente a Gi/o para modular el tráfico de los Ca_v . Una posibilidad es que actúe luego de ser internalizado, ya que se ha mostrado que este receptor se desensibiliza rápidamente ante la aplicación de ghrelina (Camiña *et al.*, 2004; Portelli *et al.*, 2012) y que la actividad constitutiva de GHSR promueve su internalización (Holliday *et al.*, 2007). Por otro lado, GHSR podría comenzar a señalizar desde su síntesis en los compartimentos intracelulares. En nuestro conocimiento no existen descripciones claras en la bibliografía sobre cuándo ocurre el acoplamiento de GPCRs a las proteínas G en las células. Por último, nuestro descubrimiento de que la actividad constitutiva de GHSR modula el tráfico de los Ca_v hacia la membrana plasmática junto con nuestros datos sobre el impacto de este efecto en las sinapsis nos permite pensar que GHSR podría modular el tráfico

de los Ca_v hacia las terminales presinápticas. Las neuronas están muy especializadas para transportar proteínas a lo largo del axón hacia la terminal presináptica (Hirokawa y Takemura, 2005; Gibbs et al., 2015). Respecto a esto, si bien los experimentos de transporte axonal *in vitro* poseen algunas limitaciones y/o desventajas –como el tamaño de la proteína o el curso temporal de los protocolos experimentales- habría sido interesante evaluar el efecto de GHSR sobre el transporte nativo de sondas fluorescentes fusionadas a Ca_v (Alloatti et al., 2018). Corroborar que GHSR modula el tráfico axonal de Ca_v , resaltaría la relevancia de esta regulación en funciones neuronales como el desarrollo, la neurogénesis adulta y periodos de formación activa de nuevas sinapsis, incluyendo fenómenos de plasticidad vinculados al aprendizaje (Bergami et al., 2015; Nakamura et al., 2015) que dependen del tráfico activo de Ca_v hacia las terminales.

En base a lo anterior, ¿cómo podrían las neuronas moderar el efecto crónico de este GPCR con actividad basal? Por un lado, el nivel de expresión de GHSR puede aumentar en estados metabólicos de restricción calórica como el ayuno (Kim et al., 2003; Fernandez et al., 2018), lo que incrementaría directamente los niveles de actividad basal en las neuronas. Por otra parte, se ha descrito que GHSR puede heterodimerizar con otros GPCRs (Kern et al., 2015; Schellekens et al., 2015; Wellman y Abizaid, 2015). Respecto de esto, en nuestro laboratorio estamos abordando la posibilidad de que la asociación con los receptores para dopamina modifique la señalización basal de GHSR. Finalmente, la actividad constitutiva de GHSR podría ser regulada por agonistas inversos naturales aun no identificados. En este sentido, nuestro grupo ha mostrado previamente que el efecto crónico sobre los Ca_v por la actividad constitutiva del receptor de melanocortinas tipo 4 puede ser revertido por su agonista inverso natural, el péptido relacionado a Agouti (Agosti et al., 2017). Pese a los esfuerzos de varios grupos de investigación todavía no se ha descubierto un agonista inverso natural específico para GHSR, y se sigue intentando desarrollar un agonista inverso sintético específico que permita aislar los efectos fisiológicos de la actividad basal de este receptor (Holst et al., 2006, 2007; Moulin, Demange, et al., 2007; Moulin, Ryan, et al., 2007; Damian et al., 2012; Els et al., 2012). En este marco, el reciente descubrimiento de LEAP2, el péptido endógeno que funcionaría como agonista inverso además de como antagonista de GHSR (Al-Massadi et al., 2018; Ge et al., 2018; M'Kadmi et al., 2018) constituye

una importante herramienta para profundizar el conocimiento sobre este efecto fisiológico en el control de la alimentación y además refuerza la relevancia de esta actividad basal, delineada sólo por algunos estudios *in vivo* (Petersen PS, 2009; Els *et al.*, 2012; Uchida *et al.*, 2013).

Los resultados de la primera sección demuestran que la actividad constitutiva de GHSR afecta la densidad de Ca_v2 en membrana y reduce consecuentemente las corrientes Ca_v2 . Este efecto impactaría directamente en la presinapsis donde una disminución de la cantidad de Ca_v2 reduciría la liberación de neurotransmisores. Las neuronas se comunican principalmente a través de sinapsis químicas que garantizan el rápido flujo de información mediante una serie de eventos altamente coordinados que ocurren en pocos milisegundos. Los Ca_v presinápticos juegan un papel esencial en este proceso, que comenzó a elucidarse a partir del trabajo de Bernard Katz y Ricardo Miledi en la unión neuromuscular (Katz y Miledi, 1967). Ante la llegada de un potencial de acción a la terminal presináptica, se produce la apertura de los Ca_v presinápticos. El flujo de calcio a través de los Ca_v2 es detectado por proteínas específicas de las vesículas sinápticas que desencadenan la liberación de neurotransmisores. Por lo tanto, el control de la actividad de Ca_v2 es esencial para modular los procesos neuronales (Catterall y Few, 2008). Esto puede lograrse mediante distintos mecanismos como cambios en su cinética de activación y desactivación (Burgoyne y Weiss, 2001; Catterall y Few, 2008) o cambios en su distribución o densidad en membrana (Davidova D., 2014; Ferron, 2014; Nakamura *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2015). Por lo tanto, cambios en la cantidad de Ca_v disponibles por la actividad constitutiva de GHSR podrían constituir un mecanismo para el control de la actividad neuronal. Es difícil evaluar experimentalmente una variación en el número de Ca_v involucrados en la liberación de neurotransmisores. Los métodos no electrofisiológicos incluyen entre otros la identificación mediante el uso de anticuerpos específicos contra los Ca_v (Westenbroek *et al.*, 1992) o contra sus bloqueantes específicos (Cohen *et al.*, 1991) o la microscopía electrónica con inmunomarcado con partículas de oro y microscopía de superresolución (Nakamura *et al.*, 2015). Muchos de estos estudios requieren tecnología de punta o explotan las ventajas que presentan ciertas sinapsis con morfología o tamaños que facilitan su estudio, como el cáliz de Held. Los experimentos electrofisiológicos que

realizamos en esta tesis junto con datos que muestran que las propiedades biofísicas de los canales no varían por acción de la actividad constitutiva de GHSR (López Soto *et al.*, 2015) nos permiten sugerir –aunque de manera indirecta- que el efecto basal de este receptor está relacionado con un cambio en el número de Ca_v en la presinapsis.

La comunicación química rápida entre las neuronas del sistema nervioso central está mediada principalmente por la liberación de los aminoácidos glutamato y GABA. Estos neurotransmisores generan respuestas antagónicas en las neuronas postsinápticas, que pueden ser excitatorias (glutamato) o inhibitorias (GABA). Al evaluar el impacto del efecto de GHSR sobre los Ca_v en la neurotransmisión encontramos que solamente la liberación de GABA -y no la de glutamato- se vio afectada (Figura 8). Si la selectividad del efecto sobre la neurotransmisión inhibitoria se debiera exclusivamente a una expresión diferencial de GHSR en las neuronas GABAérgicas, las EPSCs deberían reducirse en la condición de sobreexpresión del receptor. Por otro lado, a pesar de que glutamato y GABA comparten los mecanismos básicos de liberación, numerosos estudios apuntan a diferencias en las propiedades entre estas presinapsis. Por lo tanto, para intentar comprender la selectividad del efecto de GHSR sobre GABA, primero decidimos descartar la acción de GHSR sobre mecanismos de liberación de neurotransmisores independientes de Ca_v que pudieran estar sesgando o enmascarando el impacto de la disminución de la densidad de Ca_v sobre la neurotransmisión.

Un posible blanco adicional de la acción de GHSR es la maquinaria de exocitosis de las vesículas sinápticas. Varios trabajos han señalado algunas diferencias en la distribución de estas proteínas entre las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas (Bragina *et al.*, 2010; Boyken *et al.*, 2013). Una de estas proteínas es Vamp1, localizada exclusivamente en las vesículas GABAérgicas, para la que recientemente se demostró que RBFOX1 -una proteína de unión a ARN- estabiliza su mensajero exclusivamente en interneuronas (Vuong *et al.*, 2018). Por otro lado, la comparación cuantitativa del perfil de proteínas asociadas a vesículas identificadas como glutamatérgicas o GABAérgicas ha indicado que las vesículas GABAérgicas parecen poseer menores cantidades de sinaptotagminas que las

glutamatérgicas (Grønborg *et al.*, 2010). Para descartar un efecto de GHSR diferencial en la liberación de GABA y glutamato que dependa del aparato de exocitosis evaluamos la sensibilidad al calcio como la pendiente de la curva del tamaño de las EPSCs e IPSCs *versus* la concentración de calcio externo (Figura 9) y observamos que la actividad constitutiva de GHSR no las modifica. Por otro lado, observamos un desplazamiento de la recta de las IPSCs hacia magnitudes mayores en ausencia de GHSR. Este cambio concuerda con una mayor disponibilidad de calcio para la liberación que podría deberse a una mayor cantidad de Ca_v en la presinapsis en ausencia de GHSR. Evaluamos además la acción de la aplicación de una solución hiperosmótica de sacarosa, maniobra que provoca la liberación del *pool* de vesículas disponibles para ser liberado en forma independiente de los Ca_v (Rosenmund y Stevens, 1996). Esta medida no reveló diferencias en los tamaños de los *pooles* originadas por la actividad constitutiva de GHSR (Figura 12). Por último, medimos la frecuencia de las mEPSCs y de las mIPSCs. Cambios en la frecuencia de los eventos miniatura podrían indicar un efecto de la actividad constitutiva de GHSR a nivel presináptico independiente de los Ca_v . Sin embargo, no encontramos diferencias entre las distintas condiciones experimentales (Figura 11). Para descartar la incidencia de un mecanismo postsináptico analizamos la amplitud de las mEPSCs y mIPSCs. Cambios en el tamaño de los eventos están vinculados con cambios en la densidad de receptores postsinápticos. No encontramos diferencias entre las distintas condiciones con diferentes niveles de expresión de GHSR (Figura 13). Por último, para reforzar la idea de que el efecto que observamos se debe a la acción de la actividad constitutiva de GHSR sobre la presinapsis, evaluamos además si el cociente entre pulsos pareados (PPR) se modifica a distintos niveles de expresión de GHSR. Este fenómeno de plasticidad a corto plazo indica modificaciones de tipo presináptico y depende de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Katz y Miledi, 1968; Zucker y & Regehr, 2002). Si bien la medida de PPR como estimador de la probabilidad de liberación es más adecuada en registros pareados, también se ha validado su uso para registros de corrientes postsinápticas por estimulación de campo (Maximov *et al.*, 2007). Por otra parte, aunque los fenómenos de plasticidad a corto plazo son específicos de cada sinapsis, su medida constituye una herramienta válida para analizar el efecto de una intervención como la sobreexpresión de GHSR en cultivos primarios. Nosotros encontramos que la

actividad constitutiva modifica el PPR solo para la liberación de GABA sin afectar el de glutamato para intervalos entre pulsos cortos (Figura 10). En conjunto, estos resultados indican que la actividad constitutiva de GHSR modula la neurotransmisión inhibitoria hipocampal actuando sobre una estructura presináptica esencial para la liberación de neurotransmisores: los Ca_v .

Si la selectividad del efecto de GHSR sobre GABA no depende de la expresión diferencial de GHSR ni está compensada por modificaciones de otros blancos, diferentes a los Ca_v , que inciden en la neurotransmisión ¿por qué la actividad constitutiva de GHSR impacta sólo sobre las IPSCs y no sobre las EPSCs? Considerando como único blanco de GHSR a los Ca_v se puede postular que la selectividad esté dada por diferencias en el grado de acoplamiento de la liberación de GABA y glutamato a los Ca_v como así también en el subtipo de Ca_v . El grado de acoplamiento determina la eficiencia de la neurotransmisión y demarca importantes diferencias entre las sinapsis. Así podríamos plantear que la liberación de GABA está acoplada más débilmente a la entrada de calcio que la de glutamato y que, por lo tanto, se vería más afectada por una reducción del número de Ca_v disponibles. Esto podría deberse a una dependencia diferencial de la liberación de GABA y glutamato con los subtipos de Ca_v presinápticos. Respecto de esto se ha mostrado que los $Ca_v2.1$ están más fuertemente acoplados a las vesículas sinápticas, y que poseen una probabilidad de apertura superior a la de los $Ca_v2.2$ a potenciales despolarizantes (Stanley, 2015). Además, un estudio diseñado para entender el rol de $Ca_v2.1$ y de $Ca_v2.2$ en la liberación de neurotransmisor, usando como estrategia la sobreexpresión en neuronas hipocámpales en cultivo tanto de versiones de $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ permeables como impermeables, ha demostrado que existen diferencias en la interacción de estos canales con sitios de unión específicos (*slots*) de la terminal pre-sináptica, regulando la participación relativa de cada subtipo en la liberación de neurotransmisores. En particular, el número de $Ca_v2.1$ satura un subgrupo de *slots*, imponiendo un límite superior a la eficacia sináptica de estos Ca_v . Cabe resaltar que la sobreexpresión de $Ca_v2.2$ no resultó en un incremento de la amplitud de las EPSCs, pese a que la corriente Ca_v se vio aumentada (Cao y Tsien, 2010). Según estos estudios, las sinapsis gobernadas principalmente por el $Ca_v2.2$ serían más sensibles a cambios en el número de Ca_v disponibles para activarse por un potencial de acción en comparación con las

terminales enriquecidas en $Ca_v2.1$. Por otro lado, investigaciones en diferentes áreas del cerebro han señalado una correlación entre el subtipo de Ca_v que media la liberación y el grado de acoplamiento (Eggermann *et al.*, 2013). Adicionalmente, varios grupos han mostrado que durante la maduración de las sinapsis ocurre un cambio en la dependencia del subtipo de Ca_v que controla la liberación de glutamato, pasando de una mayor dependencia de $Ca_v2.2$ a una de $Ca_v2.1$. (Scholz y Miller, 1991; Iwasaki *et al.*, 2000; Pravettoni *et al.*, 2000; Cao y Tsien, 2010). En contraposición, se ha demostrado que la liberación de GABA exhibe una dependencia mayor del influjo de calcio a través del $Ca_v2.2$ a medida que maduran las sinapsis (Basarsky *et al.*, 1994). Nosotros observamos que la corriente Ca_v reducida por la sobreexpresión de GHSR es mayoritariamente $Ca_v2.2$ en neuronas (Figura 3). En este contexto, encontramos que el efecto selectivo de GHSR sobre la liberación de GABA está relacionado con una mayor dependencia de las IPSCs de $Ca_v2.2$ en neuronas de más de 14 DIV (Figura 14) indicando que existe una dependencia diferencial de las IPSCs y EPSCs con cada subtipo de Ca_v . Habría resultado valioso evaluar mediante la utilización de quelantes el grado de acoplamiento de cada uno de los subtipos a la liberación de neurotransmisores. Si la distancia entre los Ca_v y los sensores de calcio fuera pequeña, solo el quelante rápido de calcio BAPTA, pero no el quelante lento, EGTA, dispondría de tiempo suficiente para capturar el calcio que difunde desde los Ca_v a los sensores de calcio y por tanto para reducir la liberación de neurotransmisor. Por el contrario, si la distancia de acoplamiento fuera mayor, tanto el quelante rápido como el lento de calcio habrían sido efectivos. Estos experimentos adicionales nos permitirían asegurar que el grado de acoplamiento de la liberación de GABA a los Ca_v es menor que el de glutamato. En esa situación estaríamos en condiciones de afirmar que una reducción en la cantidad de Ca_v disponibles por la actividad constitutiva de GHSR afectaría mayoritariamente a las sinapsis GABAérgicas que dependen del subtipo menos acoplado, $Ca_v2.2$.

Nuestros resultados muestran la influencia de GHSR en la transmisión hipocampal a través de una propiedad poco estudiada, su actividad constitutiva, y sobre un blanco hasta ahora inexplorado, los Ca_v y la neurotransmisión inhibitoria. Hasta nuestro trabajo solo se había explorado el efecto de la activación aguda de GHSR por ghrelina en el hipocampo señalando a la neurotransmisión

glutamatérgica como principal blanco de la acción de ghrelina, principalmente en la región CA1. En primer lugar, la administración sistémica de ghrelina promueve la reorganización (Berrout y Isokawa, 2012) e incrementa la densidad de espinas sinápticas a la vez que ratones nulos para ghrelina presentan una menor densidad de espinas sinápticas con respecto a animales salvajes en esta área y presentan problemas para desempeñarse en pruebas de memoria (Diano *et al.*, 2006). Por otro lado, ghrelina desencadena el reclutamiento de receptores AMPA a las sinapsis (Ribeiro *et al.*, 2014), y aumenta la expresión de las subunidades NR2B (Gherzi *et al.*, 2015), y la fosforilación de las subunidades NR1 (Muniz y Isokawa, 2015) las cuales juegan un rol importante en la plasticidad a largo plazo y el aprendizaje regulando la tasa de apertura y la expresión del receptor NMDA (Chen y Roche, 2007; Valenzuela Harrington *et al.*, 2007). La aplicación de ghrelina exógena también induce la potenciación a largo plazo en esta área así como en el GD (Diano *et al.*, 2006). En contraste, nosotros no encontramos que la neurotransmisión excitatoria se viera afectada por la actividad constitutiva de GHSR. Respecto de esto es importante recordar que GHSR puede acoplarse a distintas proteínas G. Mientras que nuestros resultados sobre las corrientes Ca_v basales, que regulan la liberación de GABA, son desencadenados por la activación de G_i/o , generalmente los efectos de ghrelina son mediados por G_q (Callaghan y Furness, 2014). Por otro lado, es interesante mencionar que la aplicación exógena de ghrelina puede afectar a neuronas GABAérgicas en otras áreas como el hipotálamo (López Soto *et al.*, 2015), el área postrema (Cabral, Cornejo, *et al.*, 2017) y el núcleo central de la amígdala (Cruz *et al.*, 2012). Una posibilidad a considerar es que una disminución en la actividad GABAérgica contribuya a los procesos neuronales en el mismo sentido que un aumento en la actividad glutamatérgica. Por ejemplo, la estabilidad de las espinas sinápticas depende fuertemente del balance excitatorio-inhibitorio (Smart y Halpain, 2000), y se ha reportado que la disminución en la transmisión GABAérgica produce un aumento del número espinas sinápticas en CA1 (Murphy *et al.*, 1998). Por otra parte, observamos que la actividad constitutiva de GHSR no modifica las propiedades intrínsecas de las células granulares del GD ni de las neuronas piramidales de CA3, acotando el efecto de la expresión del receptor a la modulación de los Ca_v (Figura 15B y C). Habría sido factible observar alguna modificación en estas propiedades, dado que se ha descrito que la aplicación de ghrelina incrementa la frecuencia de

disparo de las células dopaminérgicas presentes en la *substantia nigra pars compacta* mediante la inhibición de los canales de potasio operados por voltaje Kv7 (Shi *et al.*, 2013). Nosotros no encontramos diferencias en el potencial de reposo ni en el umbral para el disparo de potenciales de acción entre ratones salvajes y deficientes de GHSR. Aunque no evaluamos la frecuencia de disparo en condiciones de reposo, el hecho de que estas propiedades no se modifiquen nos permitiría reforzar la significancia de la diferencia entre las vías intracelulares reclutadas por la activación basal de GHSR y la evocada por ghrelina. Así, nuestros estudios sugieren que la actividad constitutiva de GHSR contribuiría a mayores niveles de excitación neuronal de manera indirecta mediante una reducción de la neurotransmisión inhibitoria.

En la última sección de esta tesis realizamos registros en rebanadas de cerebro de ratón para evaluar si la modulación de la transmisión GABAérgica por la actividad constitutiva de GHSR impacta sobre el circuito hipocampal intacto. Nuestros datos indican que GHSR es capaz de modular la neurotransmisión inhibitoria del GD (Figura 16B). El GD es el punto de ingreso al circuito trisináptico hipocampal, y es una estructura clave en muchos modos de aprendizaje (Burgess, 2002; Leutgeb *et al.*, 2005; Bakker *et al.*, 2008) que dependen de la terminación y la separación de patrones (Kesner y Rolls, 2015; Lopez-Rojas y Kreutz, 2016). Las células granulares del GD se caracterizan por una baja resistencia de acceso, un potencial de membrana en reposo hiperpolarizante (Mongiat *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Ramirez *et al.*, 2013; Denny *et al.*, 2014; Danielson *et al.*, 2016) y una baja frecuencia de disparo en condiciones de reposo (Krueppel *et al.*, 2011). Su actividad está fuertemente controlada por una importante innervación GABAérgica (Nitz y McNaughton, 2004; Sambandan *et al.*, 2010; Dieni *et al.*, 2012; Pernía-Andrade y Jonas, 2014; Temprana *et al.*, 2015). Estas características permiten a estas neuronas funcionar como filtros de la información que ingresa al hipocampo. De hecho, la variación de los circuitos inhibitorios determina que las células granulares en desarrollo sean más sensibles a estímulos de alta frecuencia que las maduras (Pardi *et al.*, 2015). El funcionamiento de una sinapsis como filtro de información se puede ajustar modulando la probabilidad de liberación inicial (Citri y Malenka, 2008). Si la actividad constitutiva de GHSR reduce la probabilidad de liberación inicial a intervalos de tiempo cortos (Figura 10), una mayor expresión de

GHSR inclinaría a las células granulares a funcionar más como filtros de paso alto, ya que trenes de potenciales de acción de alta frecuencia tendrían más probabilidad de transmitirse que aquellos de baja frecuencia. Los axones de las células granulares, las fibras musgosas, inervan las dendritas de las neuronas piramidales de CA3. Nosotros no encontramos diferencias significativas entre las condiciones salvaje y deficiente en GHSR en la salida excitatoria del GD a CA3 (Figura 16C), indicando que la presencia de GHSR en el GD afecta exclusivamente a la transmisión GABAérgica. Además, en concordancia con la selectividad del efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre sinapsis dependientes de $Ca_v2.2$, se ha mostrado que en las fibras musgosas en CA3 los $Ca_v2.2$ median la transmisión en menos sitios de liberación que los $Ca_v2.1$, los cuales son además capaces de reclutar sitios adicionales y que cada subtipo contribuiría a mecanismos contrapuestos de plasticidad sináptica de corto plazo (Chamberland *et al.*, 2017). Así, los experimentos realizados en esta tesis apoyan la importancia de la regulación del circuito hipocampal por la neurotransmisión inhibitoria.

¿Cuál sería la identidad de las interneuronas que median el efecto de la actividad constitutiva de GHSR? Muchas clases de interneuronas hipocampales diferentes residen dentro del GD en las tres capas que lo conforman y tienen proyecciones dendríticas y axonales dentro de éste. Estas pueden subdividirse según su morfología, la distribución de sus somas y sus axones, sus blancos postsinápticos, la expresión de proteínas características y sus propiedades electrofisiológicas (Houser, 2007). Además, la localización de la sinapsis que forman con las células postsinápticas también determina roles diferentes para cada subtipo de interneurona. Las células canasta (BC, de la sigla en inglés *basket cells*) y las células del *hilus* relacionadas con la vía de asociación comisural (HICAP, del inglés *hilar commissural-association pathway-related cells*) se encuentran ubicadas en la base de la capa de células granulares y sus axones generan inhibición a nivel perisomático (BC) y de las dendritas proximales (HICAP). En base a la expresión de marcadores inmunocitoquímicos estos dos subtipos morfológicos de interneuronas han sido identificados como parvalbúmina (BC, PV+) y colecistoquinina (HICAP, CCK+) positivos. Por estar ubicadas en la zona de estimulación que usamos para nuestros experimentos, las CCK+ y las PV+ constituyen dos poblaciones de interneuronas del GD que podrían ser candidatas a

mediar el efecto de GHSR en las CG-IPSCs. Además, un elegante estudio ha correlacionado la identidad inmunocitoquímica de las interneuronas del GD con el subtipo de Ca_v2 que media la liberación de GABA (Hefft y Jonas, 2005). Así, la transmisión inhibitoria de las CCK+ está acoplada a $Ca_v2.2$ mientras que en las PV+ depende de $Ca_v2.1$. Considerando que nuestros datos muestran que la liberación de GABA depende fuertemente de la corriente $Ca_v2.2$, podríamos pensar que el efecto de GHSR podría ejercerse sobre las neuronas CCK+. Además, estos mismos autores han determinado que las terminales de las células CCK+ poseen un acoplamiento menor de los Ca_v al sensor de calcio, y han postulado que la diferencia entre ambos tipos de sinapsis puede estar relacionada con la expresión específica de diferentes sensores de calcio, sugiriendo que la liberación asincrónica observada en las CCK+ podría depender de sinaptotagmina 7. Adicionalmente, han demostrado que las sinapsis GABAérgicas sincrónicas poseen una dependencia menor de sinaptotagmina 1 que las glutamatérgicas (Kerr *et al.*, 2008), proponiendo que la especificidad en el acoplamiento puede estar dada por una expresión selectiva de subtipos de Ca_v . Por otro lado, recientemente se ha reportado que en la corteza insular de rata las terminales GABAérgicas pueden expresar diferencialmente un subtipo de Ca_v u otro, y que estos subtipos determinan la probabilidad de liberación de cada terminal (Yamamoto y Kobayashi, 2018). Estos datos sumados a que la expresión de GHSR podría no ser homogénea en las interneuronas del hipocampo, como ocurre con otros receptores (Lambert y Wilson, 1993; Rusakov *et al.*, 2004) nos permiten proponer una regulación fina del circuito hipocampal por la combinación de la expresión diferencial de los subtipos de Ca_v y la actividad constitutiva de GHSR.

En los últimos años ha cobrado relevancia el fenómeno de coliberación de neurotransmisores de una misma terminal sináptica. La adhesión generalizada a la idea de John Eccles –en base a los estudios de Henry Dale de 1935- de que cada neurona podía liberar sólo un tipo de neurotransmisor (Burke, 2006), dificultó durante varias décadas la aceptación de la existencia de este evento. En este contexto, la modulación selectiva de GHSR podría tener importancia regulando de manera fina la liberación de GABA *versus* glutamato en una misma sinapsis. La coliberación se ha observado en diferentes partes del cerebro para distintas combinaciones de neurotransmisores, en general asociaciones de GABA o

glutamato con otros neuropéptidos pero también entre GABA y glutamato, pese a sus efectos claramente contrapuestos (Granger *et al.*, 2017). Una de las zonas donde se ha descrito más exhaustivamente es en las fibras musgosas que inervan CA3 a partir del GD, donde la coliberación ocurre durante etapas tempranas del desarrollo y luego de incrementos en la actividad incluyendo episodios epilépticos. También se ha señalado la posibilidad de que este tipo de liberación ocurra en situaciones fisiológicas en el circuito hipocampal maduro (Münster-Wandowski *et al.*, 2013), como un mecanismo de modelar la respuesta postsináptica con alta precisión (Somogyi, 2006). Complementariamente, también se ha descrito la expresión del transportador vesicular de glutamato tipo 3 (VGLUT3) en las interneuronas CCK+ del GD (Somogyi *et al.*, 2004). La expresión de VGLUT3 es uno de los indicios asociados con la coliberación de glutamato en terminales GABAérgicas, colinérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas, mientras que VGLUT1 y VGLUT2 parecen ser exclusivos de sinapsis glutamatérgicas puras (Münster-Wandowski *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2015). La expresión de GHSR en las células granulares podría contribuir a minimizar la interferencia por la liberación de GABA en la transmisión excitatoria hacia CA3, mientras que exacerbaría el efecto de la liberación de glutamato en las interneuronas CCK+ moderando la inhibición de las células granulares.

El efecto de GHSR selectivo sobre la neurotransmisión GABAérgica dependiente de $Ca_v2.2$ podría tener importantes implicancias en los procesos fisiológicos del hipocampo como el aprendizaje y la memoria. Estas funciones dependen en gran medida de la plasticidad de las sinapsis excitatorias. Sin embargo, recientemente se ha evidenciado que las interneuronas GABAérgicas pueden tener un impacto importante en estos procesos, modificando el balance excitatorio-inhibitorio y la plasticidad de las neuronas excitatorias principales (Flores y Méndez, 2014; Ramaswamy, 2015). Tradicionalmente se ha asociado a ghrelina con el control central del apetito principalmente a nivel hipotalámico (Cowley *et al.*, 2003). Más recientemente se han vinculado los efectos de GHSR con procesos en otras áreas del cerebro como el sistema límbico y el hipocampo, que poseen un acceso restringido a ghrelina. En este sentido se ha sugerido que en tiempos de escasez de alimentos, la capacidad de recordar un entorno con disponibilidad de alimento aumentaría las posibilidades de supervivencia (Zeltser *et al.*, 2012;

Hornsby *et al.*, 2016). Esto concuerda con un estudio en el que se ha demostrado que el ayuno prolongado estimula la neurogénesis y la separación de patrones en el hipocampo (Hornsby *et al.*, 2016). Este trabajo asocia estos efectos a una amplia expresión de GHSR en la zona subgranular del GD (SGZ), área en que se encuentran las células neurales progenitoras que dan lugar a las células granulares nuevas. Por otro lado, se ha descrito que las interneuronas CCK+ ubicadas en el GD regulan la neurogénesis del hipocampo en adultos (Masiulis *et al.*, 2011). Así, el efecto de GHSR sobre la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo podría contribuir a la modulación de los procesos cognitivos asociados al control de la homeostasis energética.

Conclusiones

- En esta tesis demostramos el impacto de la reducción de la corriente $Ca_v2.2$ por la actividad independiente de agonista de GHSR exclusivamente en la transmisión GABAérgica en el hipocampo.
- Encontramos que la selectividad de este efecto radica en una mayor dependencia de la liberación de GABA de los $Ca_v2.2$ respecto de los $Ca_v2.1$.
- Contribuimos además a demostrar que el mecanismo de acción de la actividad constitutiva sobre Ca_v requiere la presencia de $Ca_v\beta$ e involucra la inhibición del tráfico desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática.
- En conjunto nuestros datos nos permiten proponer un rol fisiológico específico para un GPCR con actividad constitutiva que se expresa a altos niveles en áreas a las que su ligando endógeno no tiene acceso.

Bibliografia

Abizaid, A. y Edwards, A. (2017) «Clarifying the ghrelin system's ability to regulate feeding behaviours despite enigmatic spatial separation of the GHSR and its endogenous ligand», *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). doi: 10.3390/ijms18040859.

Agler, H. L. *et al.* (2003) «Custom distinctions in the interaction of G-protein beta subunits with N-type (CaV2.2) versus P/Q-type (CaV2.1) calcium channels.», *The Journal of general physiology*, 121(6), pp. 495-510. doi: 10.1085/jgp.200208770.

Agosti, F. *et al.* (2017) «Melanocortin 4 receptor constitutive activity inhibits L-type voltage-gated calcium channels in neurons», *Neuroscience*, 346, pp. 102-112. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.007.

Al-Massadi, O. *et al.* (2018) «Ghrelin and LEAP-2: Rivals in Energy Metabolism.», *Trends in pharmacological sciences*, 39(8), pp. 685-694. doi: 10.1016/j.tips.2018.06.004.

Alloatti, M., Bruno, L. y Falzone, T. L. (2018) «Methods for Quantitative Analysis of Axonal Cargo Transport», en *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 217-226. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_16.

Altier, C. *et al.* (2006) «ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels.», *Nature neuroscience*, 9(1), pp. 31-40. doi: 10.1038/nn1605.

Altier, C. *et al.* (2011) «The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels.», *Nature neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 173-80. doi: 10.1038/nn.2712.

Arias, J. M. *et al.* (2005) «Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca²⁺ channels.», *FEBS letters*, 579(18), pp. 3907-12. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.008.

Atcha, Z. *et al.* (2009) «Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists», *Psychopharmacology*, 206(3), pp. 415-427. doi: 10.1007/s00213-009-1620-6.

Bakker, A. *et al.* (2008) «Pattern Separation in the Human Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus», *Science*, 319(5870), pp. 1640-1642. doi: 10.1126/science.1152882.

Basarsky, T. A., Parpura, V. y Haydon, P. G. (1994) «Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution.», *The Journal of Neuroscience: the*

Official Journal of the Society for Neuroscience, 14(11 Pt 1), pp. 6402-6411.

Beedle, A. M. *et al.* (2004) «Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors.», *Nature neuroscience*, 7(2), pp. 118-25. doi: 10.1038/nn1180.

Bender, F. L. P. *et al.* (2007) «High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses», *Histochemistry and Cell Biology*, 127(4), pp. 439-448. doi: 10.1007/s00418-006-0247-5.

Bennett, K. A. *et al.* (2009) «Growth hormone secretagogues and growth hormone releasing peptides act as orthosteric super-agonists but not allosteric regulators for activation of the G protein Galpha(o1) by the Ghrelin receptor.», *Mol. pharmacol*, 76(4), pp. 802-811. doi: 10.1124/mol.109.056101.

Bergami, M. *et al.* (2015) «A Critical Period for Experience-Dependent Remodeling of Adult-Born Neuron Connectivity», *Neuron*, 85(4), pp. 710-717. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.001.

Berrout, L. y Isokawa, M. (2012) «Ghrelin promotes reorganization of dendritic spines in cultured rat hippocampal slices», *Neuroscience Letters*, pp. 280-284. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.

Bichet, D. *et al.* (2000) «The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit.», *Neuron*, 25(1), pp. 177-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707982> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Bischofberger, J. *et al.* (2006) «Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices», *Nature Protocols*, 1(4), pp. 2075-2081. doi: 10.1038/nprot.2006.312.

Bond, R. A. y IJzerman, A. P. (2006) «Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery», *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(2), pp. 92-96. doi: 10.1016/j.tips.2005.12.007.

Boyken, J. *et al.* (2013) «Molecular Profiling of Synaptic Vesicle Docking Sites Reveals Novel Proteins but Few Differences between Glutamatergic and GABAergic Synapses», *Neuron*, 78(2), pp. 285-297. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.027.

Brager, D. H. *et al.* (2003) «Regulation of exocytosis from single visualized GABAergic boutons in hippocampal slices.», *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(33), pp. 10475-86. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627631> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Bragina, L. *et al.* (2010) «Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machinery in cerebral cortex: analysis of synaptogyrin, vesicle-associated membrane protein, and syntaxin», *Neuroscience*, 165(3), pp. 934-943. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.009.

Budde, T., Meuth, S. y Pape, H.-C. (2002) «Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels.», *Nature reviews. Neuroscience*, 3(11), pp. 873-883. doi: 10.1038/nrn959.

Burgess, N. (2002) «The hippocampus, space, and viewpoints in episodic memory», *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A*, 55(4), pp. 1057-1080. doi: 10.1080/02724980244000224.

Burgoyne, R. D. y Weiss, J. L. (2001) «The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins.», *The Biochemical journal*, 353(Pt 1), pp. 1-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115393> (Accedido: 26 de enero de 2018).

Burke, R. E. (2006) «John Eccles' pioneering role in understanding central synaptic transmission», *Progress in Neurobiology*, 78(3-5), pp. 173-188. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.02.002.

Cabral, A. *et al.* (2014) «Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central Ghrelin: Critical role of brain accessibility», *Journal of Neuroendocrinology*. NIH Public Access, 26(8), pp. 542-554. doi: 10.1111/jne.12168.

Cabral, A., Cornejo, M. P., *et al.* (2017) «Circulating ghrelin acts on GABA neurons of the area postrema and mediates gastric emptying in male mice», *Endocrinology*, 158(5), pp. 1436-1449. doi: 10.1210/en.2016-1815.

Cabral, A., López Soto, E. J., *et al.* (2017) «Is ghrelin synthesized in the central nervous system?», *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms18030638.

Cabral, A., Fernandez, G. y Perello, M. (2013) «Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid», *Neuroscience*. NIH Public Access, 253, pp. 406-415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.008.

Cabral, A., De Francesco, P. N. y Perello, M. (2015) «Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: Narrow gates for a vast kingdom», *Frontiers in Endocrinology*, 6(MAR), pp. 1-4. doi: 10.3389/fendo.2015.00044.

Cahill, S. P. *et al.* (2014) «An examination of early neural and cognitive alterations in hippocampal-spatial function of ghrelin receptor-deficient rats», *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V., 264, pp. 105-115. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.004.

Calebiro, D. *et al.* (2010) «Signaling by internalized G-protein-coupled receptors», *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 31(5), pp. 221-228. doi: 10.1016/j.tips.2010.02.002.

Callaghan, B. y Furness, J. B. (2014) «Novel and Conventional Receptors for Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, and Pharmacologically Related Compounds», *Frontiers in endocrinology*, 5(October), pp. 1-8. doi: 10.3389/fendo.2015.00044.

Camiña, J. P. *et al.* (2004) «Desensitization and Endocytosis Mechanisms of Ghrelin-Activated Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a», *Endocrinology*, 145(2), pp. 930-940. doi: 10.1210/en.2003-0974.

Campiglio, M. y Flucher, B. E. (2015) «The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels.», 230(9). doi: 10.1002/jcp.24998.

Cao, Y. Q. y Tsien, R. W. (2010) «Different Relationship of N- and P/Q-Type Ca²⁺ Channels to Channel-Interacting Slots in Controlling Neurotransmission at Cultured Hippocampal Synapses», *Journal of Neuroscience*, 30(13), pp. 4536-4546. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5161-09.2010.

Carlini, V. P. *et al.* (2010) «Ghrelin and memory: Differential effects on acquisition and retrieval», *Peptides*, 31(6), pp. 1190-1193. doi: 10.1016/j.peptides.2010.02.021.

Catterall, W. A. (1995) «Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels», *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), pp. 493-531. doi: 10.1038/260188b0.

Catterall, W. A. y Few, A. P. (2008) «Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity», *Neuron*, 59(6), pp. 882-901. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.005.

Catterall, W. a (2000) «STRUCTURE AND REGULATION OF VOLTAGE-GATED Ca²⁺ CHANNELS», *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 16(521), p. 555.

Chamberland, S., Evstratova, A. y Toth, K. (2017) «Short-Term Facilitation at a Detonator Synapse Requires the Distinct Contribution of Multiple Types of Voltage-

Gated Calcium», *Journal of Neuroscience*, 37, pp. 4913-4927. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0159-17.2017.

Chen, B. S. y Roche, K. W. (2007) «Regulation of NMDA receptors by phosphorylation», *Neuropharmacology*. NIH Public Access, pp. 362-368. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.05.018.

Chen, L. *et al.* (2011) «Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats», *European Journal of Neuroscience*, 33(2), pp. 266-275. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07491.x.

Christel, C. y Lee, A. (2012) «Ca²⁺-dependent modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels», *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, pp. 1243-1252. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.012.

Citri, A. y Malenka, R. C. (2008) «Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms», *Neuropsychopharmacology*, 33(1), pp. 18-41. doi: 10.1038/sj.npp.1301559.

Cogger, V. C. *et al.* (2010) «Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations.», *Journal of structural biology*, 171(3), pp. 382-8. doi: 10.1016/j.jsb.2010.06.001.

Cohen, M. W., Jones, O. T. y Angelides, K. J. (1991) «Distribution of Ca²⁺ channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin.», *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 11(4), pp. 1032-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-04-01032.1991.

Cohen, S. N. (1974) «Transformation of *Escherichia coli* by Recombinant Plasmid Replicons Constructed in Vitro», en *Mechanisms in Recombination*. Boston, MA: Springer US, pp. 155-165. doi: 10.1007/978-1-4684-2133-0_15.

Colecraft, H. M., Patil, P. G. y Yue, D. T. (2000) «Differential Occurrence of Reluctant Openings in G-Protein – inhibited N- and P / Q-type Calcium Channels», 115(February).

Costa, T. y Cotecchia, S. (2005) «Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors», *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(12), pp. 618-624. doi: 10.1016/j.tips.2005.10.009.

Cowley, M. A. *et al.* (2003) «The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy

homeostasis», *Neuron*, 37(4), pp. 649-661. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00063-1.

Cruz, M. T. *et al.* (2012) «Ghrelin Increases GABAergic Transmission and Interacts with Ethanol Actions in the Rat Central Nucleus of the Amygdala», *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 38(2), pp. 364-375. doi: 10.1038/npp.2012.190.

Cuellar, J. N. y Isokawa, M. (2011) «Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus», *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 60(6), pp. 842-851. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.024.

Currie, K. P. M. (2010) «G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels.», *Channels (Austin, Tex.)*, 4(6), pp. 497-509. doi: 10.4161/chan.4.6.12871.

Daina, A. *et al.* (2018) «Rational Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of Novel Ghrelin Receptor Inverse Agonists as Potential Treatment against Obesity-Related Metabolic Diseases», *Journal of Medicinal Chemistry*, 15 octubre, p. acs.jmedchem.8b00794. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00794.

Damian, M. *et al.* (2012) «High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: A study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs», *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), pp. 3630-3641. doi: 10.1074/jbc.M111.288324.

Danielson, N. B. *et al.* (2016) «Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding.», *Neuron*. NIH Public Access, 90(1), pp. 101-12. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.019.

Davidova D. (2014) «Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding proteinNo Title», *Neuron*.

Davis, J. F. *et al.* (2011) «Signaling through the ghrelin receptor modulates hippocampal function and meal anticipation in mice», *Physiology and Behavior*. NIH Public Access, 103(1), pp. 39-43. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.10.017.

Delmas, P. *et al.* (2005) «Phosphoinositide Lipid Second Messengers: New Paradigms for Calcium Channel Modulation», *Neuron*. Cell Press, 47(2), pp. 179-182. doi: 10.1016/J.NEURON.2005.07.001.

Denny, C. A. *et al.* (2014) «Hippocampal Memory Traces Are Differentially Modulated by Experience, Time, and Adult Neurogenesis», *Neuron*, 83(1), pp. 189-201. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.018.

Dezaki, K., Kakei, M. y Yada, T. (2007) «Ghrelin uses G α 2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet β -cells: Novel signal transduction of ghrelin», *Diabetes*, 56(9), pp. 2319-2327. doi: 10.2337/db07-0345.

Diano, S. *et al.* (2006) «Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance.», *Nature neuroscience*, 9(3), pp. 381-8. doi: 10.1038/nn1656.

Dieni, C. V, Chancey, J. H. y Overstreet-Wadiche, L. S. (2012) «Dynamic functions of GABA signaling during granule cell maturation.», *Frontiers in neural circuits*, 6(January), p. 113. doi: 10.3389/fncir.2012.00113.

Dietrich, D. *et al.* (2003) «Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels.», *Neuron*, 39(3), pp. 483-96. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895422> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Djanani, A. *et al.* (2003) «Agonist function of the neurokinin receptor antagonist, [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, in monocytes», *Regulatory Peptides*, 115(2), pp. 123-129. doi: 10.1016/S0167-0115(03)00148-4.

Dolphin, A. C. *et al.* (1999) «The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G.», *The Journal of physiology*, 519 Pt 1, pp. 35-45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432337> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Dolphin, A. C. (2012) «Calcium channel auxiliary α 2 δ and β subunits: trafficking and one step beyond.», *Nature reviews. Neuroscience*, 13(8), pp. 542-55. doi: 10.1038/nrn3311.

Dolphin, A. C. (2016) «Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology», *The Journal of Physiology*. Wiley-Blackwell, 594(19). doi: 10.1113/JP272262.

Dubel, S. J. *et al.* (2004) «Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits.», *The Journal of biological chemistry*, 279(28), pp. 29263-9. doi: 10.1074/jbc.M313450200.

Dunlap, K., Luebke, J. I. y Turner, T. J. (1995) «Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons», *Trends in Neurosciences*, 18(2), pp. 89-98. doi: 10.1016/0166-2236(95)80030-6.

Eggermann, E. *et al.* (2013) «Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels

and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses», 13(1), pp. 7-21. doi: 10.1038/nrn3125.Nanodomain.

Els, S. *et al.* (2012) «An aromatic region to induce a switch between agonism and inverse agonism at the ghrelin receptor», *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(17), pp. 7437-7449. doi: 10.1021/jm300414b.

Ertel, E. *et al.* (2000) «Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels», *Neuron*, 25, pp. 533-535. Disponible en: https://ac.els-cdn.com/S0896627300810570/1-s2.0-S0896627300810570-main.pdf?_tid=47d38118-0e6f-4b44-af9d-dafaab6a3b51&acdnat=1545138910_ecad1cacd58efad248b8fdeffee8cf90 (Accedido: 18 de diciembre de 2018).

Evron, T., Peterson, S. M., *et al.* (2014) «G protein and B-arrestin signaling bias at the ghrelin receptor», *Journal of Biological Chemistry*, 289(48), pp. 33442-33455. doi: 10.1074/jbc.M114.581397.

Evron, T., Peterson, S. M., *et al.* (2014) «G Protein and β -arrestin signaling bias at the ghrelin receptor.», *The Journal of biological chemistry*, 289(48), pp. 33442-55. doi: 10.1074/jbc.M114.581397.

Fang, K. y Colecraft, H. M. (2011) «Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type (CaV1.2) channels», *Journal of Physiology*, 589(18), pp. 4437-4455. doi: 10.1113/jphysiol.2011.214247.

Felix, R., Calderón-Rivera, A. y Andrade, A. (2013) «Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits», *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 2(5), pp. 207-220. doi: 10.1002/wmts.93.

Fernandez, G. *et al.* (2018) «Evidence supporting a role for constitutive ghrelin receptor signaling in fasting-induced hyperphagia in male mice», *Endocrinology*, 159(2), pp. 1021-1034. doi: 10.1210/en.2017-03101.

Ferron, L. (2014) «Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density», *Nat Commun*.

Flores, C. E. y Méndez, P. (2014) «Shaping inhibition: activity dependent structural plasticity of GABAergic synapses.», *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(October), p. 327. doi: 10.3389/fncel.2014.00327.

Furness, J. B. *et al.* (2011) «Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse», *Neuroscience*, 193, pp. 1-9. doi:

10.1016/j.neuroscience.2011.07.063.

Ge, X. *et al.* (2018) «LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor», *Cell Metabolism*, 27(2), p. 461-469.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2017.10.016.

Gherzi, M. S. *et al.* (2015) «Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor», *Psychopharmacology*, 232(10), pp. 1843-1857. doi: 10.1007/s00213-014-3817-6.

Granger, A. J., Wallace, M. L. y Sabatini, B. L. (2017) «Multi-transmitter neurons in the mammalian central nervous system», *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 85-91. doi: 10.1016/j.conb.2017.04.007.

Grønborg, M. *et al.* (2010) «Quantitative Comparison of Glutamatergic and GABAergic Synaptic Vesicles Unveils Selectivity for Few Proteins Including MAL2 , a Novel Synaptic Vesicle Protein», 30(1), pp. 2-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4074-09.2010.

Guan, X. M. *et al.* (1997) «Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues.», *Brain research. Molecular brain research*, 48(1), pp. 23-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379845> (Accedido: 31 de octubre de 2018).

Hefft, S. y Jonas, P. (2005) «Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse», *Nature Neuroscience*, 8(10), pp. 1319-1328. doi: 10.1038/nn1542.

Hille, B. (1994) «Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors.», *Trends in neurosciences*, 17(12), pp. 531-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532338> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Holliday, N. D. *et al.* (2007) «Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor», *Molecular Endocrinology*, 21(12), pp. 3100-3112. doi: 10.1210/me.2007-0254.

Holst, B. *et al.* (2003) «High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist.», *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(11), pp. 2201-2210. doi: 10.1210/me.2003-0069.

Holst, B. *et al.* (2006) «Ghrelin Receptor Inverse Agonists: Identification of an Active Peptide Core and Its Interaction Epitopes on the Receptor», *Molecular Pharmacology*, 70(3), pp. 936-946. doi: 10.1124/mol.106.024422.

Holst, B. *et al.* (2007) «Identification of an efficacy switch region in the ghrelin

receptor responsible for interchange between agonism and inverse agonism», *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), pp. 15799-15811. doi: 10.1074/jbc.M609796200.

Hornsby, A. K. E. *et al.* (2016) «Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghnr-dependent manner», *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier Ltd, 63, pp. 198-207. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.09.023.

Houser, C. R. (2007) «Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity», *Progress in Brain Research*, 163, pp. 217-233. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63013-1.

Howard, A. D. *et al.* (1996) «A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release», *Science*, 273(August).

Hsu, T. M., Suarez, A. N. y Kanoski, S. E. (2016) «Ghrelin: A link between memory and ingestive behavior», *Physiology and Behavior*. Elsevier B.V., 162, pp. 1-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.03.039.

Ikeda, S. R. (1996) «Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein β γ subunits», *Nature*, 380(6571), pp. 255-258. doi: 10.1038/380255a0.

Iwasaki, S. *et al.* (2000) «Developmental Changes in Calcium Channel Types Mediating Central Synaptic Transmission», *Journal of Neuroscience*, 20, pp. 59-65.

Jarpe, M. B. *et al.* (1998) [D-Arg 1 ,D-Phe 5 ,D-Trp 7,9 ,Leu 11]Substance P Acts as a Biased Agonist toward Neuropeptide and Chemokine Receptors*. Disponible en: <http://www.jbc.org/> (Accedido: 8 de diciembre de 2018).

Jarvis, S. E. y Zamponi, G. W. (2001) «Interactions between presynaptic Ca²⁺ channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex», *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(10), pp. 519-525. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01800-9.

Jensen, K. y Mody, I. (2001) «L-type Ca²⁺ channel-mediated short-term plasticity of GABAergic synapses.», *Nature neuroscience*, 4(10), pp. 975-6. doi: 10.1038/nn722.

Jeong, S. W. y Ikeda, S. R. (2000) «Effect of G protein heterotrimer composition on coupling of neurotransmitter receptors to N-type Ca(2+) channel modulation in sympathetic neurons.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), pp. 907-12. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639178> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Kanoski, S. E. y Grill, H. J. (2015) «Hippocampus Contributions to Food Intake Control: Mnemonic, Neuroanatomical, and Endocrine Mechanisms», *Biological Psychiatry*. Elsevier. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.09.011.

Katz, B. y Miledi, R. (1967) «The timing of calcium action during neuromuscular transmission», *Journal of Physiology*, 189, pp. 535-544.

Katz, B. Y. B. y Miledi, R. (1968) «THE ROLE OF CALCIUM IN NEUROMUSCULAR», *J Physiol.*, 195, pp. 481-492. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351674/pdf/jphysiol01105-0224.pdf> (Accedido: 20 de noviembre de 2018).

Kent, B. A. *et al.* (2015) «The orexigenic hormone acyl-ghrelin increases adult hippocampal neurogenesis and enhances pattern separation», *Psychoneuroendocrinology*, 51, pp. 431-439. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.10.015.

Kern, A. *et al.* (2015) «Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor», *Cell*. Elsevier Inc., 163(5), pp. 1176-1190. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.062.

Kerr, A. M., Reisinger, E. y Jonas, P. (2008) *Differential dependence of phasic transmitter release on synaptotagmin 1 at GABAergic and glutamatergic hippocampal synapses*. Disponible en: www.pnas.org/cgi/content/full/ (Accedido: 3 de noviembre de 2018).

Kesner, R. P. y Rolls, E. T. (2015) «A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments.», *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 48, pp. 92-147. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.11.009.

Kim, M. S. *et al.* (2003) «Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status», *NeuroReport*, 14(10), pp. 1317-1320. doi: 10.1097/00001756-200307180-00006.

Kisilevsky, A. E. *et al.* (2008) «D1 Receptors Physically Interact with N-Type Calcium Channels to Regulate Channel Distribution and Dendritic Calcium Entry», *Neuron*, 58(4), pp. 557-570. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.002.

Kisilevsky, A. E. y Zamponi, G. W. (2008) «D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels ND ES RIB», *Channels*, 2(4), pp. 1-8.

Kohno, D. *et al.* (2003) «Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y-Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus», *Diabetes*, 52, pp. 948-956.

Disponible en: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/diabetes/52/4/948.full.pdf> (Accedido: 21 de noviembre de 2018).

Kojima, M. et al. (1999) «Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.», *Nature*.

Krueppel, R., Remy, S. y Beck, H. (2011) «Dendritic Integration in Hippocampal Dentate Granule Cells», *Neuron*, 71(3), pp. 512-528. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.043.

Lambert, N. A. y Wilson, W. A. (1993) «Heterogeneity in presynaptic regulation of GABA release from hippocampal inhibitory neurons», *Neuron*, 11(6), pp. 1057-1067. doi: 10.1016/0896-6273(93)90219-H.

Lattuada, D. et al. (2013) «The Expression of GHS-R in Primary Neurons Is Dependent upon Maturation Stage and Regional Localization», *PLoS ONE*, 8(6), pp. 2-8. doi: 10.1371/journal.pone.0064183.

Leutgeb, S. et al. (2005) «Place cells, spatial maps and the population code for memory», *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), pp. 738-746. doi: 10.1016/j.conb.2005.10.002.

Li, M. et al. (2010) «Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells», *Journal of Neuroscience Methods*. Elsevier B.V., 189(1), pp. 56-64. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.03.019.

Lin, Y.-C. et al. (2014) «Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations», *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 4767. doi: 10.1038/ncomms5767.

Liu, X. et al. (2012) «Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall», *Nature*, 484(7394), pp. 381-5. doi: 10.1038/nature11028.

Lohse, M. J. y Hofmann, K. P. (2015) «Spatial and Temporal Aspects of Signaling by G-Protein-Coupled Receptors», *Molecular Pharmacology*, 88(3), pp. 572-578. doi: 10.1124/mol.115.100248.

Lopez-Rojas, J. y Kreutz, M. R. (2016) «Mature granule cells of the dentate gyrus—Passive bystanders or principal performers in hippocampal function?», *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 64, pp. 167-174. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.021.

López Soto, E. J. et al. (2015) «Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons.», *The*

Journal of general physiology, 146, pp. 1-15. doi: 10.1085/jgp.201511383.

Luebke, J. I., Dunlap, K. y Turner, T. J. (1993) «Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus.», *Neuron*, 11(5), pp. 895-902. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7902110> (Accedido: 26 de julio de 2018).

M'Kadmi, C. *et al.* (2018) «N-terminal Liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) region exhibits inverse agonist activity toward the ghrelin receptor.», *Journal of Medicinal Chemistry*, p. acs.jmedchem.8b01644. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01644.

Maccaferri, G. y Lacaille, J. C. (2003) «Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications - Making things as simple as possible, not simpler», *Trends in Neurosciences*, 26(10), pp. 564-571. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.002.

MacKinnon, A. C. *et al.* (2005) «Expression of V1A and GRP receptors leads to cellular transformation and increased sensitivity to substance-P analogue-induced growth inhibition», *British Journal of Cancer*, 92(3), pp. 522-531. doi: 10.1038/sj.bjc.6602366.

Malagón, M. M. *et al.* (2003) «Intracellular Signaling Mechanisms Mediating Ghrelin-Stimulated Growth Hormone Release in Somatotropes», *Endocrinology*, 144(12), pp. 5372-5380. doi: 10.1210/en.2003-0723.

Mani, B. K. *et al.* (2014) «Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse», *Journal of Comparative Neurology*, 522(16), pp. 3644-3666. doi: 10.1002/cne.23627.

Mani, B. K. *et al.* (2017) «The role of ghrelin-responsive mediobasal hypothalamic neurons in mediating feeding responses to fasting». doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.011.

Mann, E. O. y Paulsen, O. (2007) «Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations», 30(7). doi: 10.1016/j.tins.2007.05.003.

Mary, S. *et al.* (2012) «Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), pp. 8304-8309. doi: 10.1073/pnas.1119881109.

Masiulis, I., Yun, S. y Eisch, A. J. (2011) «The interesting interplay between interneurons and adult hippocampal neurogenesis.», *Molecular neurobiology*. NIH

Public Access, pp. 287-302. doi: 10.1007/s12035-011-8207-z.

Mason, B. L., Wang, Q. y Zigman, J. M. (2014) «The Central Nervous System Sites Mediating the Orexigenic Actions of Ghrelin», *Annu Rev Physiol.*, 76, pp. 519–533. doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170310. The.

Matteoli, M. *et al.* (1995) «Mechanisms of synaptogenesis in hippocampal neurons in primary culture», *Journal of Physiology - Paris*, 89(1), pp. 51-55. doi: 10.1016/0928-4257(96)80551-1.

Maximov, A. *et al.* (2007) «Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation», *Journal of Neuroscience Methods*, 161, pp. 75-87. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.10.009.

McCoull, W. *et al.* (2014) «Identification, optimization, and pharmacology of acylurea GHS-R1a inverse agonists», *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14), pp. 6128-6140. doi: 10.1021/jm500610n.

Mintz, I. M., Sabatini, B. L. y Regehr, W. G. (1995) «Calcium Control of Transmitter Release at a Cerebellar Synapse», *Neuron*, 15(3), pp. 675-688. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546746> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Mochida, S. (2018) «Presynaptic calcium channels», *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, 127, pp. 33-44. doi: 10.1016/j.neures.2017.09.012.

Molineux, M. L. *et al.* (2006) «Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), pp. 5555-60. doi: 10.1073/pnas.0601261103.

Mongiat, L. A. *et al.* (2009) «Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus.», *PLoS one*. Editado por T. A. Reh, 4(4), p. e5320. doi: 10.1371/journal.pone.0005320.

Moulder, K. L. *et al.* (2007) «Vesicle pool heterogeneity at hippocampal glutamate and GABA synapses.», *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(37), pp. 9846-9854. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2803-07.2007.

Moulin, A., Ryan, J., *et al.* (2007) «Recent developments in ghrelin receptor ligands», *ChemMedChem*, 2(9), pp. 1242-1259. doi: 10.1002/cmdc.200700015.

Moulin, A., Demange, L., *et al.* (2007) «Toward Potent Ghrelin Receptor

Ligands Based on Trisubstituted 1, 2, 4-Triazole Structure . 2 . Synthesis and Pharmacological in Vitro and in Vivo Evaluations», pp. 5790-5806.

Muniz, B. G. y Isokawa, M. (2015) «Ghrelin receptor activity amplifies hippocampal NMDA receptor-mediated postsynaptic currents and increases phosphorylation of GluN1 subunit at Ser 896 and Ser 897», *European Journal of Neuroscience*. doi: 10.1177/0963721412473755.Surging.

Münster-Wandowski, A., Gómez-Lira, G. y Gutiérrez, R. (2013) «Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers», *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00210.

Murphy, D. D. *et al.* (1998) «Estradiol Increases Dendritic Spine Density by Reducing GABA Neurotransmission in Hippocampal Neurons», *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 18(7), pp. 2550-2559. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-07-02550.1998.

Mustafá, E. R. *et al.* (2017) «Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca²⁺ channels in a CaV β -dependent manner.», *J Cell Sci.*, (Cic).

Nakamura, Y. *et al.* (2015) «Nanoscale Distribution of Presynaptic Ca²⁺Channels and Its Impact on Vesicular Release during Development», *Neuron*. The Authors, 85(1), pp. 145-159. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.019.

Nakazato, M. *et al.* (2001) «A role for ghrelin in the central regulation of feeding», *Nature*, 409(6817), pp. 194-198. doi: 10.1038/35051587.

Nitz, D. y McNaughton, B. (2004) «Differential modulation of CA1 and dentate gyrus interneurons during exploration of novel environments.», *Journal of neurophysiology*, 91(2), pp. 863-72. doi: 10.1152/jn.00614.2003.

Pan, B. y Zucker, R. S. (2009) «A general model of synaptic transmission and short-term plasticity.», *Neuron*, 62(4), pp. 539-54. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.025.

Pantel, J. *et al.* (2006) «Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature», *The Journal for Clinical Investigation*, 116(3). doi: 10.1172/JCI25303.760.

Pardi, M. B. *et al.* (2015) «Differential inhibition onto developing and mature granule cells generates high-frequency filters with variable gain.», *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 4, p. e08764. doi: 10.7554/eLife.08764.

Perello, M. *et al.* (2012) «Functional Implications of Limited Leptin Receptor

and Ghrelin Receptor Coexpression in the Brain», 520(2), pp. 281-294. doi: 10.1002/cne.22690.Functional.

Pernía-Andrade, A. J. y Jonas, P. (2014) «Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations.», *Neuron*, 81(1), pp. 140-52. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.046.

Petersen PS, et al. (2009) «In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor.», *Endocrinology*, 150, pp. 4920-4930.

Petersenn, S. et al. (2001) «Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor.», *Endocrinology*, 142(6), pp. 2649-2659. doi: 10.1210/endo.142.6.8184.

Poncer, J. C. et al. (1997) «Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses», *Neuron*, 18(3), pp. 463-472. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81246-5.

Portelli, J. et al. (2012) «Inactivation of the Constitutively Active Ghrelin Receptor Attenuates Limbic Seizure Activity in Rodents», *Neurotherapeutics*, 9(3), pp. 658-672. doi: 10.1007/s13311-012-0125-x.

Pravettoni, E. et al. (2000) «Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons», *Developmental Biology*, 227(2), pp. 581-594. doi: 10.1006/dbio.2000.9872.

Raingo, J., Castiglioni, A. J. y Lipscombe, D. (2007) «Alternative splicing controls G protein–dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors», *Nature Neuroscience*, 10(3), pp. 285-292. doi: 10.1038/nn1848.

Ramaswamy, S. (2015) «Exciting times for inhibition: GABAergic synaptic transmission in dentate gyrus interneuron networks», *Frontiers in Neural Circuits*, 9(13). doi: 10.3389/fncir.2015.00013.

Ramirez, S. et al. (2013) «Creating a False Memory in the Hippocampus», *Science*, 341(6144), pp. 387-391. doi: 10.1126/science.1239073.

Ramirez, V. T. et al. (2018) «Differential functional selectivity and downstream signaling bias of ghrelin receptor antagonists and inverse agonists», *The FASEB Journal*, p. fj.201800655R. doi: 10.1096/fj.201800655R.

Regehr, W. G. y Mintz, I. M. (1994) «Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses.», *Neuron*, 12(3), pp. 605-13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155322> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Reid, C. A., Bekkers, J. M. y Clements, J. D. (1998) «N- and P/Q-type Ca²⁺ channels mediate transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses.», *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(8), pp. 2849-2855. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526002> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Ribeiro, L. F. *et al.* (2014) «Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), pp. E149-58. doi: 10.1073/pnas.1313798111.

Rosato-Siri, M. D. *et al.* (2002) «Differential Ca²⁺-dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions», *European Journal of Neuroscience*, 15(12), pp. 1874-1880. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02015.x.

Rosenkilde, M. M. *et al.* (1999) «Agonists and inverse agonists for the herpesvirus 8-encoded constitutively active seven-transmembrane oncogene product, ORF-74», *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), pp. 956-961. doi: 10.1074/jbc.274.2.956.

Rosenmund, C. y Stevens, C. F. (1996) «Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses», *Neuron*, 16(6), pp. 1197-1207. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80146-4.

Rusakov, D. A., Wuerz, A. y Kullmann, D. M. (2004) «Heterogeneity and specificity of presynaptic Ca²⁺-current modulation by mGluRs at individual hippocampal synapses», *Cerebral Cortex*. Europe PMC Funders, 14(7), pp. 748-758. doi: 10.1093/cercor/bhh035.

Sambandan, S. *et al.* (2010) «Associative Plasticity at Excitatory Synapses Facilitates Recruitment of Fast-Spiking Interneurons in the Dentate Gyrus», *Journal of Neuroscience*, 30(35), pp. 11826-11837. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2012-10.2010.

Schellekens, H. *et al.* (2015) «Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction», *ACS Chemical Neuroscience*, 6(7), pp. 1186-1197. doi: 10.1021/cn500318q.

Schneider, R. *et al.* (2015) «Mobility of Calcium Channels in the Presynaptic Membrane», *Neuron*. Elsevier Inc., 86(3), pp. 672-680. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.050.

Scholz, K. P. y Miller, R. J. (1991) «GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones.», *The Journal of physiology*, 444, pp. 669-86. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018900.

Scimemi, A. y Diamond, J. (2013) «Synapses», *The Journal of Neuroscience*, 32(50), pp. 18157-18176. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3827-12.2012.The.

Seifert, R. y Wenzel-Seifert, K. (2002) «Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors», *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 366(5), pp. 381-416. doi: 10.1007/s00210-002-0588-0.

Shalaeva, D. N., Galperin, M. Y. y Mulkidjanian, A. Y. (2015) «Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins». doi: 10.1186/s13062-015-0091-4.

Shi, L. *et al.* (2013) «Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels.», *Nature communications*. Nature Publishing Group, 4, p. 1435. doi: 10.1038/ncomms2439.

Simms, B. A. y Zamponi, G. W. (2012) «Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(6), pp. 843-856. doi: 10.1007/s00018-011-0843-y.

Sivertsen, B. *et al.* (2013) «Functionally biased signalling properties of 7TM receptors-opportunities for drug development for the ghrelin receptor». doi: 10.1111/bph.2013.170.issue-7.

Smart, F. M. y Halpain, S. (2000) «Regulation of dendritic spine stability», *Hippocampus*, 10(5), pp. 542-554. doi: 10.1002/1098-1063(2000)10:5<542::AID-HIPO4>3.0.CO;2-7.

Smit, M. J. *et al.* (2007) «Pharmacogenomic and Structural Analysis of Constitutive G Protein-Coupled Receptor Activity», *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), pp. 53-87. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105126.

Somogyi, J. *et al.* (2004) «GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat», *European Journal of Neuroscience*, 19(3), pp. 552-569. doi: 10.1111/j.0953-816X.2003.03091.x.

Somogyi, J. (2006) «Functional Significance of Co-Localization of GABA and Glu in Nerve Terminals: A Hypothesis», *Current Topics in Medicinal Chemistry*,

6(10), pp. 969-973. doi: 10.2174/156802606777323737.

Stanley, E. F. (2015) «Presynaptic calcium channels: Why is P selected before N?», *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 108(3), pp. 451-452. doi: 10.1016/j.bpj.2014.12.021.

Stanley, E. F. (2016) «The Nanophysiology of Fast Transmitter Release», *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 39(3), pp. 183-197. doi: 10.1016/j.tins.2016.01.005.

Stotz, S. C. y Zamponi, G. W. (2001) «Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels.», *Trends in neurosciences*, 24(3), pp. 176-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182458> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Strange, P. G. (2002) «Mechanisms of inverse agonism at G protein coupled receptors», *Trends Pharmacol Sci*, 23(2)), p. 89-95.

Südhof, T. C. (2014) «The molecular machinery of neurotransmitter release (nobel lecture)», *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(47), pp. 12696-12717. doi: 10.1002/anie.201406359.

Suh, B.-C., Leal, K. y Hille, B. (2010) «Modulation of High-Voltage Activated Ca²⁺ Channels by Membrane Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate», *Neuron*, 67(2), pp. 224-238. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.001.

Takahashi, T. y Momiyama, A. (1993) «Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission.», *Nature*, 366(6451), pp. 156-8. doi: 10.1038/366156a0.

Temprana, S. G. *et al.* (2015) «Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells.», *Neuron*, 85(1), pp. 116-130. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.023.

Tiscornia, G., Singer, O. y Verma, I. M. (2006) «Production and purification of lentiviral vectors», *Nat Protoc*, 1(1), pp. 241-245. doi: nprot.2006.37 [pii]r10.1038/nprot.2006.37.

Uchida, A., Zigman, J. M. y Perelló, M. (2013) «Ghrelin and eating behavior: Evidence and insights from genetically-modified mouse models», *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 JUL), p. 121. doi: 10.3389/fnins.2013.00121.

Valenzuela Harrington, M., Gruart, A. y Delgado García, J. M. (2007) «Contribution of NMDA receptor NR2B subunit to synaptic plasticity during associative learning in behaving rats», *European Journal of Neuroscience*, 25(3),

pp. 830-836. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05325.x.

Verderio, C. *et al.* (1999) «Synaptogenesis in hippocampal cultures», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(11), pp. 1448-1462. doi: 10.1007/s000180050384.

Vuong, C. K. *et al.* (2018) «Rbfox1 Regulates Synaptic Transmission through the Inhibitory Neuron-Specific vSNARE Vamp1», *Neuron*, 98(1), p. 127-141.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.008.

Wang, J. *et al.* (2013) «Ghrelin increases hippocampal recombination activating gene 1 expression and spatial memory performance in mice.», *Neuroreport*, 24(13), pp. 712-717. doi: 10.1097/WNR.0b013e328363fdc6.

Wellman, M. y Abizaid, A. (2015) «Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers: A New Pharmacological Target(1,2,3).», *eNeuro*, 2(2). doi: 10.1523/ENEURO.0053-14.2015.

Westenbroek, R. E. *et al.* (1992) «Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit.», *Neuron*, 9(6), pp. 1099-1115. doi: 0896-6273(92)90069-P [pii].

Wheeler, D. B., Randall, A. y Tsien, R. W. (1994) «Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission.», *Science (New York, N.Y.)*, 264(5155), pp. 107-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7832825> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Wheeler, D. G. *et al.* (2008) «CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling.», *The Journal of cell biology*, 183(5), pp. 849-63. doi: 10.1083/jcb.200805048.

Williams, M. E., De Wit, J. y Ghosh, A. (2010) «Molecular Mechanisms of Synaptic Specificity in Developing Neural Circuits». doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.007.

Wu, L. G. *et al.* (1999) «Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses.», *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(2), pp. 726-36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880593> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Wu, L. G. y Saggau, P. (1994) «Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus.», *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(9), pp. 5613-22. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083757> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Wyatt, C. N. *et al.* (1998) «The effect of overexpression of auxiliary Ca²⁺ channel subunits on native Ca²⁺ channel currents in undifferentiated mammalian NG108-15 cells.», *The Journal of physiology*, 510 (Pt 2), pp. 347-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705988> (Accedido: 26 de julio de 2018).

Xiong, G. *et al.* (2017) «A Comparison of Different Slicing Planes in Preservation of Major Hippocampal Pathway Fibers in the Mouse», *Frontiers in neuroanatomy*, 11(November), pp. 1-17. doi: 10.3389/fnana.2017.00107.

Yamamoto, K. y Kobayashi, M. (2018) «Opposite roles in short-term plasticity for N-type and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in GABAergic neuronal connections in the rat cerebral cortex», *The Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 38(46), pp. 0337-18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0337-18.2018.

Yeon, J.-H. *et al.* (2018) «Translocatable voltage-gated Ca²⁺ channel β subunits in $\alpha 1$ - β complexes reveal competitive replacement yet no spontaneous dissociation», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), p. 201809762. doi: 10.1073/pnas.1809762115.

Zamponi, G. W. y Currie, K. P. M. (2013) «Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors», *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1828(7), pp. 1629-1643. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.004.

Zeltser, L. M., Seeley, R. J. y Tschöp, M. H. (2012) «Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance.», *Nature neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(10), pp. 1336-42. doi: 10.1038/nn.3219.

Zhao, Z. *et al.* (2014) «Ghrelin administration enhances neurogenesis but impairs spatial learning and memory in adult mice», *Neuroscience*, 257, pp. 175-185. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.063.

Zigman, J. M. *et al.* (2005) «Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity», *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 115(12), pp. 3564-3572. doi: 10.1172/JCI26002.

Zigman, J. M. *et al.* (2006) «Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain», *Journal of Comparative Neurology*, 494(3), pp. 528-548. doi: 10.1002/cne.20823.

Zimmermann, J., Herman, M. A. y Rosenmund, C. (2015) «Co-release of

glutamate and GABA from single vesicles in GABAergic neurons exogenously expressing VGLUT3», *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 7(SEP). doi: 10.3389/fnsyn.2015.00016.

Zucker, R. S. y & Regehr, W. G. (2002) «Short-Term Synaptic Plasticity», *Annual Review of Physiology*, 64(1), pp. 355-405. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.

Agradecimientos

*«Yo digo que mis ávidos amores
son fuertes y viven más que yo
son gigantes tenues como flores
que alientan este turbio corazón.»*

-Jorge Fandermole, Cuando

*«A veces comprendemos algo entre la noche y la noche.
Nos vemos de pronto parados debajo de una torre
tan fina como el signo del adiós
y nos pesa sobre todo desconocer si lo que no sabemos
es adónde ir o adónde regresar »*

-Roberto Juarroz, Poesía vertical

