



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DISTRIBUCIÓN DE LA SUBUNIDAD ρ_1 DEL RECEPTOR
GABA_C EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

TESIS

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:
Abraham Rosas Arellano

Director de Tesis:
Dr. Ataúlfo Martínez Torres

UNAM CAMPUS JURIQUILLA, QUERÉTARO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto fue realizado gracias al apoyo de:

Beca Nacional de Maestría del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (No. de Becario 189290).

Proyecto **PAPIIT - DGAPA** No. IN204806-17 23.

Proyecto **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**
No. 41309Q

***....Amo la noche, sombrero de todos los días,
la noche, la noche del día, del día al día siguiente...***

Vicente Huidobro "*Altazor*"

Cuentan de un sabio que un día
tan pobre y mísero estaba,
que sólo se sustentaba
de las hierbas que cogía.
¿-Habrá otro-, entre sí decía,
-más pobre y triste que yo-?;
y cuando el rostro volvió
halló la respuesta, viendo
que otro sabio iba cogiendo
las hierbas que él arrojó.

Pedro Calderón de la Barca
“*La vida es un sueño*”

DEDICATORIAS

A:

la memoria de mis padres Nelly Arellano Martínez y Abraham Rosas Castillo, por esa manera tan especial de educar, por la vida, por el Dios heredado y por ser el recuerdo más importante que guardo.

mis hermanos Miguel Angel, Ilse Nelly, Julio César, Eduardo Salvador y Fernando Rosas Arellano, por el apoyo y confianza en esta meta, con especial aprecio para ustedes.

las Familias Castillo-Ramírez y Arellano-Arriaga, por ese apoyo tan valioso brindado durante mi vida.

Martha Arellano Moreno, por ese apoyo especial que me has dado.

Mi tutor Ataúlfo Martínez Torres: Por la enseñanza, la amistad y la oportunidad recibida.

los queridos amigos: Carmen Maldonado, Rosa María Ostiguín, Rafael Lara, Betsabé Barbosa, Alejandra Arciniega, Monserrat Santiago, Araceli Revilla, Victor Hugo Jiménez, Erick Centenero, Familia Jiménez Arcos, María Eugenia Garín Aguilar, Gustavo Valencia del Toro, Azucena Aguilar Vázquez, Lenin David Ochoa de la Paz, Fernando Rosas Sánchez, Argel Estrada Mondragón, Irma Martínez Dávila, a la hija del doctor Cano: Daniela Cano Sotomayor, Fabiola Morales Mandujano, Evangelina Delgado, Rebeca Corona, Claudia Calipso, Fabiola García, Araceli Montoya y Pilar Galarza Barrios; por su amistad, y apreciados consejos durante mis estudios.

Berenice Salazar Soto: Por tu importante apoyo y compañía.

Catalina Trevilla Roman: Por ser parte importante de este logro, por motivar el inicio y por todo ese apoyo recibido.

AGRADECIMIENTOS

A:

Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme tan amplia gama de posibilidades en el desarrollo de calidad profesional y humana que caracteriza a esta la máxima casa de estudios del país.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por el apoyo, confianza y amistad brindados en el transcurso de mis estudios, por sobre todo por esa manera tan especial de enseñar lo que conocemos como ciencia.

Dr. Raúl Paredes Guerrero y Dr. Jorge A. Larriva Sahd, Dra. Elvira Galárraga, Dr. Alfonso Cárabez Trejo y Dra. Sofía Díaz Miranda, por sus apreciados comentarios, orientación y apoyo para la elaboración de la presente tesis.

Compañeros de Laboratorio, Lenin David Ochoa de la Paz, Fernando Rosas Sánchez, Argel Raúl Estrada Mondragón, Berenice Salazar Soto, Irma Alicia Martínez Dávila, Ariel López Chávez, Flor de María Trejo Medinilla, Joel Vergara Quintanar, Angélica López Rodríguez, Carlos Martínez del Valle, Ernesto López Salas, Efrén Ruíz Alcibar, Paloma Escobar, Mariana Duhne Ramírez, Carmen Mejía Vázquez, Gustavo Martínez Delgado, por su valioso apoyo, tiempo, conocimiento y amistad brindados.

Personal Académico, por ese compromiso de enseñar y ser una motivación durante mis estudios, en especial a los Dr's Manuel Salas Alvarado, Jorge Larriva Sahd, Teresa Edith Garay Rojas, Alfredo Varela Echavarría, Ataúlfo Martínez Torres, Rogelio Arellano Ostoa, Carlos Saldaña Gutiérrez, Juan Riesgo Escobar, Mauricio Díaz Muñoz, José Jesús García Colunga, Raúl Paredes Guerrero, Aurea Orozco Rivas, Carmen Clapp, Alfonso Cárabez Trejo, Sofía Díaz Miranda, Hugo Merchant Nancy, Lenin David Ochoa de la Paz, Gonzalo Martínez de la Escalera, Isabel Miranda Saucedo, Victor Ramírez Amaya y Berta Gabriela González Frankenberger.

Enseñanza

- M. en C. Leonor Casanova Rico

Biblioteca

- Bib. Pilar Galarza Barrios, Bib. Rafael Silva Cruz, Bib. Ignacio Caballero Navarro, María Teresa Plafox Domínguez.

Dra. Irma Alicia Martínez Dávila, Dra. Azucena Aguilar Vázquez y Ht. Evelin Flores Hernández. Por el invaluable apoyo técnico para la elaboración de la presente tesis.

Compañeros de maestría en especial, Fernando Rosas, Fabiola García, Daniela Cano, Claudia Calipso, Jeans Fernández, Adriana de León, Victor Urbina y Juan Pablo McGregor.

CONTENIDO

Resumen

Abstract

Introducción

Localización en el SNC del Receptor GABA_c

Planteamiento del problema

Preguntas a contestar

Hipótesis

Objetivos

Generales

Específicos

Materiales y Métodos

Disección y extracción de tejido

Inmunohistoquímica

Observación en microscopia óptica y estereoscópica

Western Blott

Golgi rápido

Resultados

Distribución de la subunidad $\rho 1$ en el Bulbo Raquídeo

Distribución de la subunidad $\rho 1$

en la Cabeza del Núcleo Caudado

Western Blot

Discusión

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

ANEXOS

Resultados Aceptados en “Neuroscience Research”

RESUMEN

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio importante en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados. Históricamente los receptores a GABA eran divididos en dos clases de acuerdo a su estructura y farmacología: GABA_A y GABA_B. Actualmente se sabe que el GABA presenta una tercera clase de receptor: GABA_C, el cual está conformado por tres subunidades: ρ 1, ρ 2 y ρ 3. Estos receptores se expresan predominantemente en retina, sin embargo han sido localizados en diversas estructuras del SNC.

Estudios realizados en nuestro laboratorio por técnicas de RT-PCR indican que la subunidad ρ 1 se expresa en retina, cerebelo, bulbo raquídeo, médula espinal, hipófisis, núcleo caudado y cuerpo calloso. En el presente estudio se determinó por inmunohistoquímica la distribución de dicha subunidad en las estructuras del bulbo raquídeo, puente, cabeza del núcleo caudado y cuerpo calloso del cerebro bovino.

Utilizando técnicas de inmunohistoquímica indirecta con anticuerpos anti- ρ 1, se observó que dicha subunidad se localiza en los núcleos olivares, reticulares, cuneiforme y cuneiforme accesorio del bulbo raquídeo, donde neuronas de tipo oval, piramidal y fusiforme mostraron inmunorreacción. En la cabeza del núcleo caudado, neuronas de tipo piramidal y fusiforme presentaron inmunorreacción para esta subunidad. Finalmente ni el puente ni en el cuerpo calloso mostraron inmunorreacción. Sin embargo, por análisis de "Western Blot" pudimos determinar su expresión en el puente. La expresión de GABA_C en el SNC sugiere que podrían jugar un papel importante en el cerebro.

ABSTRACT

The γ -aminobutyric acid (GABA) is an important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of the vertebrates. The GABA receptors are divided in three classes according to their structure and pharmacology: GABA_A and GABA_B, and GABA_C. The GABA_C receptor is formed by ρ 1, ρ 2 y ρ 3 subunits and is expressed predominantly in the retina; nevertheless it has been located in several structures of the CNS, such as the midbrain, hippocampus, brain stem and spinal cord.

RT-PCR studies indicate that the ρ 1 subunit is expressed in retina, cerebellum, *medulla oblongata*, spinal cord, pituitary, caudate nucleus and corpus callosum (Lopez-Chávez et al., 2005). In the present study the cell distribution of this subunit was determined in the *medulla oblongata*, pons, head of the caudate nucleus and *genu* of corpus callosum of the bovine brain.

By indirect immunohistochemical techniques using antibodies anti- ρ 1, ρ 1 was located in the olivar, reticular, cuneiform and accessory cuneiform nuclei, of the *medulla oblongata*, where oval, pyramidal and fusiform neurons showed immunoreaction. In the head of the caudate nucleus, pyramidal and fusiform neurons were positively labelled. Neither the pons of Varolio or the *genu* of *corpus callosum* showed the immunoreaction. However, western blot analysis showed the expression of ρ 1 in pons.

Expression of GABA_C receptors in the CNS suggests that they many play an important role in the synaptic transmission of the brain. Functional studies as well as inmuno-gold/electron microscopy could shed some light on the function and exact location of GABA_C receptors in these regions.

INTRODUCCIÓN

Transmisión sináptica

En el sistema nervioso de los vertebrados, la transmisión de señales químicas en la sinapsis neuronal se realiza mediante la liberación de sustancias denominadas neurotransmisores. Su liberación ocurre como consecuencia de una despolarización de la membrana plasmática de las terminales sinápticas. Las sinapsis eléctricas transmiten señales sencillas de despolarización sin intervenir en la producción de acciones inhibitoras o de cambios de larga duración en las propiedades eléctricas de las células postsinápticas; las sinapsis químicas son capaces de una transmisión de señales variables, y así pueden producir reacciones celulares más complejas. Pueden mediar en acciones tanto excitadoras como inhibitoras en la célula postsináptica (Kandel et al., 2001; Zigmond et al., 1999).

El intervalo de despolarización con el que se produce la liberación del neurotransmisor es de 40-70 mV, por encima del nivel del potencial en reposo de membrana. Normalmente la célula presináptica genera un potencial de acción con una amplitud de 110mV, lo que induce la liberación del transmisor y la generación de un potencial sináptico en la célula postsináptica. El potencial de acción se debe a la entrada de Na^+ y a la salida de K^+ a través de canales sensibles al voltaje (Kandel et al., 2001; Zigmond et al., 1999).

Una característica de la liberación de neurotransmisores en todas las sinapsis es su dependencia no lineal de la entrada de Ca^{2+} , de manera que un incremento de dos veces en la entrada de Ca^{2+} , puede aumentar la liberación del transmisor hasta 16 veces. Una vez liberado, el neurotransmisor difunde a través de la hendidura intersináptica, llegando a la membrana plasmática de la neurona postsináptica donde actúa sobre receptores específicos (Kandel et al., 2001; Zigmond et al., 1999).

Los receptores sobre los que los neurotransmisores actúan, pueden estar directa o indirectamente acoplados a canales iónicos. Las dos clases de acción del transmisor están mediadas por proteínas receptoras derivadas de la expresión de diferentes familias de genes. Los receptores que abren y cierran los canales de forma directa son proteínas integrales de membrana, constituidos por varias subunidades que forman una sola macromolécula. Cada subunidad contiene un dominio extracelular que forma el sitio de unión del transmisor y otros dominios que atraviesan la membrana plasmática. Esta familia de receptores son conocidos como **ionotrópicos** (Kandel et al., 2001; Zigmond et al., 1999).

La transmisión sináptica a través de receptores ionotrópicos, juega un papel importante en la función del sistema nervioso central (SNC). Estos receptores contienen un sitio de unión específico para el neurotransmisor y forman un canal iónico selectivo dentro del complejo proteico. Estos pueden alterar la concentración de iones en las neuronas en milisegundos. Una parte de la información codificada por señales nerviosas es transmitida vía mecanismos **excitatorios** usando iones positivamente cargados, mientras que la **inhibición** balancea esta excitación por el incremento intracelular de Cl^- (Kandel et al., 2001; Zigmond et al., 1999).

Ácido γ -aminobutírico

La inhibición sináptica en el cerebro de los mamíferos es mediada principalmente por receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) (Byrne & Roberts, 2004). El GABA es un neurotransmisor inhibitorio importante del SNC de los vertebrados (Krnjevic & Phillis, 1963), fue descubierto en 1950 por Eugene Roberts; aunque inicialmente el GABA fue descrito en interneuronas hay evidencia de que también se le puede encontrar en neuronas de proyección (Zigmond et al., 1999; Tepper et al., 2004).

El GABA es derivado del metabolismo de la glucosa, donde se sintetiza a partir del α -cetoglutarato derivado del ciclo de Krebs, el cual es transaminado por la enzima α -oxoglutarato transaminasa (GABA-T) para formar el aminoácido glutamato. En todas las células en las cuales el GABA es usado como neurotransmisor, la presencia de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) permite la formación del GABA a partir de glutamato; se sabe que la GAD presenta dos isoformas la GAD65 y GAD67 codificadas por dos distintos genes (Zigmond et al., 1999).

Estudios farmacológicos indican que la acción del GABA puede ser mediada por autorreceptores vía activación de proteínas G acopladas a receptores de siete pases transmembranales (metabotrópicos), los cuales están ubicados en las terminales nerviosas de la neurona presináptica, cuando el GABA se une a estos receptores disminuye la liberación del neurotransmisor. Otro medio por el cual el GABA actúa es la recaptura a través de transportadores (GAT), que están presentes tanto en neuronas como en glia, la presencia de los GAT responde a su subsecuente metabolismo o integración vesicular para ser liberado nuevamente (Zigmond et al., 1999).

El GABA se encuentra en el citoplasma de numerosas neuronas del SNC, sobre todo, en la sustancia nigra, el núcleo caudado, el globo pálido, el putamen y la

corteza cerebral. Células GABAérgicas tipo difuso, en forma de cesta y que forman sinapsis axo-axónicas, median ritmos de disparo específicos con oscilaciones de 40 Hz que son fundamentales para los ensambles neuronales funcionales en la neocorteza y el hipocampo. Las neuronas de la *pars reticulata* de la sustancia nigra liberan el GABA y los blancos de este neurotransmisor son componentes parvocelulares de la formación reticular. También se han encontrado neuronas GABAérgicas en el núcleo reticular magnocelular, de donde se proyecta a la médula espinal (Butler, 1996).

Históricamente los receptores a GABA eran divididos en dos clases de acuerdo a su estructura y farmacología: GABA_A y GABA_B. Actualmente se sabe que el GABA presenta una tercera clase de receptor: GABA_C. Los receptores GABA_B son miembros de la familia de receptores de siete pasas transmembranales, que están acoplados tanto a canales de K⁺ como de Ca²⁺ vía proteínas G y son regulados por sistema de segundos mensajeros (Hill et al., 1984). En contraste los receptores GABA_A y GABA_C son receptores ionotrópicos y como consecuencia de su activación el Cl⁻ pasa al interior de la célula (Polenzani et al., 1991), y ambos están involucrados en respuestas inhibitorias rápidas (Tabla 1). Filogenéticamente los receptores ionotrópicos a GABA pertenecen a la misma superfamilia génica junto con los nicotínicos de acetilcolina, de glicina y serotonina (5-HT₃) (López et al., 2003).

Receptor GABA_A

El receptor inotrópico que se encuentra distribuido más ampliamente y que es activado por GABA es el receptor GABA_A. Está compuesto por múltiples subunidades, las cuales probablemente forman un complejo heteropentámero de aproximadamente 275kDa (Byrne & Roberts, 2004). Dichas subunidades son, α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π y θ , y están codificadas por varios genes, se sabe que contienen un amino terminal y un extremo carboxilo extracelular, cuatro regiones transmembranales, que a su vez se ensamblan en un canal pentamérico. La predicción con base en la secuencia aminoacídica indica que cada subunidad tiene un peso molecular de entre 48 a 64kDa (Byrne & Roberts, 2004). Las subunidades del receptor GABA_A contienen sitios de unión para benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides y alcohol etílico (Bormann, 1988; Doble, 1992; Macdonald & Olsen, 1994), aunque la expresión del receptor GABA_A en ovocitos de *Xenopus laevis* indicaba que la subunidad α es esencial para producir un canal funcional (Sieghart, 1992; Byrne & Roberts, 2004), estudios recientes han mostrado que la subunidad γ 2 también puede formar receptores homoméricos en ovocitos de *X. laevis* (Martínez-Torres & Miledi, 2004).

Cuando el GABA se une y activa a este receptor, hay un flujo de Cl^- al interior de la célula, produciendo una hiperpolarización que se traduce en un movimiento del potencial de membrana muy por debajo del potencial de acción, los niveles de conductancia se ubican entre los 25 y 30 pS (ver tabla 1) (Byrne & Roberts, 2004). La activación de los receptores GABA_A es antagonizada por bicuculina (BMC) y por SR95531 (GABAzina) (Storustovu & Ebert, 2005).

Receptor GABA_B

Esta clase de receptores acoplados a proteínas G están presentes tanto pre como postsinápticamente, como se mencionó en la primera condición aparecen para mediar la inhibición de la liberación del neurotransmisor funcionando allí como un autorreceptor mediante la activación de conductancias de K^+ y disminuyendo la conductancia de Ca^{2+} . Postsinápticamente la activación del receptor produce una hiperpolarización a través de la activación de la conductancia de K^+ . Estructuralmente presentan dos isoformas GABA-R_1 y GABA-R_2 , las cuales son codificadas por dos diferentes genes. La clonación del receptor GABA_B (GABA_BR_1), revela que tiene una secuencia altamente homologa con los receptores de glutamato acoplados a proteínas G, sin embargo muestran pequeña similitud con otros receptores acoplados a proteínas G (Byrne & Roberts, 2004).

Se presume que en el dominio amino terminal extracelular se encuentra el sitio de unión al GABA. Este dominio es característico del receptor debido a su larga secuencia de aminoácidos. Tanto el GABA como el baclofeno (análogo del saclofeno) son agonistas; el CGP64213 es el antagonista específico más potente, mientras que el saclofeno y faclofeno presentan menor potencia (ver tabla 1) (Byrne & Roberts, 2004).

Los receptores GABA_B forman heterodímeros a nivel de la membrana plasmática y se ha demostrado que la expresión de GABA_BR_1 no produce por si mismo receptores funcionales; sin embargo cuando se co-expresa con la isoforma GABA_BR_2 , se generan receptores con las características farmacológicas y funcionales de este receptor (Jones et al., 1998). Por otra parte se ha comprobado por estudios de inmuno-oro y microscopía electrónica que los dímeros del receptor GABA_B existen en las membranas plasmáticas de neuronas tanto del globo pálido interno como externo (Charara et al., 2005).

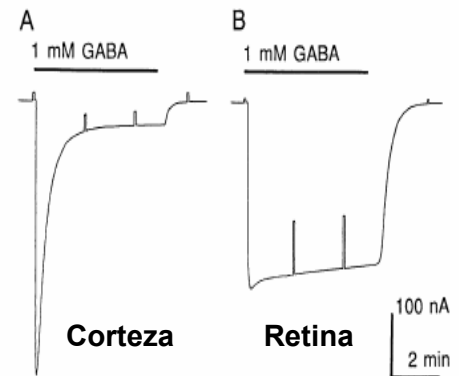
Tabla 1. Diferencias funcional, estructural y farmacológica que presentan los diferentes tipos de receptores a GABA.

	Clase de Receptor		
	A	B	C
Tipo	Ionotrópico	Metabotrópico	Inotrópico
Consecuencia de la activación	Paso de Cl ⁻	Modula canales de K ⁺ y Ca ²⁺	Paso de Cl⁻
Subunidades	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \pi$ y θ	R1 y R2	$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$
Agonistas	Muscimol, TACA, isoguvacina, 14AA, THIP, Zolpidem, TAMP	Baclofeno	TACA, CACA, glicina β-alanina, CAMP, TAMP, muscimol
Antagonistas	Bicuculina	Faclofeno CGP64213 Saclofeno	TPMPA 3-APA y 3-APMPA, 14AA, Isoguvacina, THIP
Tiempo $\frac{1}{2}$ de apertura del canal	25 A 30 ms	Receptor carente de canal	150 a 200 ms
Desensibilización	Alta	Dependiente cascada de señalización.	Baja

Propiedades de los receptores GABA_C

Estos receptores fueron descritos por primera vez por Miledi y colaboradores cuando expresaron RNAm de retina de bovino en ovocitos de *X. laevis* (Fig. 1) (Polenzani et al., 1991). Actualmente sabemos que están conformados por tres subunidades: $\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$ (Cutting et al., 1991; Ogurusu & Shingai, 1996). Estos receptores muestran propiedades electrofisiológicas peculiares; por ejemplo comparados con GABA_A, los GABA_C tienen una alta sensibilidad por el GABA y el canal se caracteriza por mayores tiempos de apertura y baja conductancia a Cl⁻ (Feingenspan et al., 1993; Feingenspan & Bormann, 1994). Se piensa que son estructuralmente semejantes al receptor GABA_A, aunque esto no se ha demostrado de manera experimental.

Figura 1. Corrientes a GABA generadas por ovocitos inyectados con RNAm de: A) Corteza cerebral y B) retina bovina. Nótese las diferencias en la tasa de desensibilización entre ambos componentes (Tomado de Polenzani et al., 1991).



Propiedades Farmacológicas

Los receptores GABA_C son insensibles tanto a la bicuculina como al baclofeno (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992). Los más potentes agonistas al receptor GABA_C (además del GABA), son el muscimol y el ácido 4-trans-aminocrotónico (TACA). Aunque TACA es también agonista de los receptores GABA_A, se observa una gran diferencia en este efecto con el enantiómero de TACA, el ácido cis-aminocrotónico (CACA), que activa únicamente a los receptores GABA_C. Los enantiómeros *cis* y *trans* del ácido carboxílico 2-aminometil-ciclopropano (CAMP y TAMP) son también análogos a GABA; GABA_C es activado por CAMP de manera específica mientras TAMP es agonista (Bormann & Feigenspan, 1995).

Por otra parte existen antagonistas débiles del receptor GABA_C como la isoguvacina, 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol (5,4-c) piridin-3-ol, ácido piperidin-4-sulfónico y el ácido Z-3-amidinotiopropenónico. El ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-metilfosfínico (TPMPA) y el ácido acético 4-imidazol son fuertes antagonistas de los receptores a GABA_C (Ragozzino et al., 1996).

Es importante mencionar que los receptores GABA_C no responden a los moduladores del receptor GABA_A como las benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides. El zinc inhibe las respuestas a GABA_C (Calvo et al., 1994), mientras que GABA_A no se afecta por este ión (Qian & Dowling, 1995). El canal es bloqueado por la picrotoxina y el biciclofosforotionato-t-butílico 5 (Bormann & Feigenspan, 1995; Woodward et al., 1992; 1993).

Estructura

Basados en el modelo estructural de GABA_A (Fig. 2), se ha propuesto que el extremo amino y carboxilo de las subunidades ρ son extracelulares (Hackman et al.,

1997) y están sujetas en su posición por cuatro regiones o dominios transmembranales (TM1-TM4) (Trudell & Bertaccini, 2004).

El receptor está compuesto de un grupo de proteínas con propiedades funcionales diversas, pero estructuralmente homólogas; el dominio amino terminal contiene el sitio de unión al agonista; entre TM3 y TM4, una larga asa intracelular contiene sitios consenso que pueden ser modulados por proteínas; como las proteínas cinasas (Feingenspan & Bormann, 1994; Filippova et al., 1999; 2000; Kusama et al., 1995, 2000). Hay evidencia que sugiere que el dominio TM2 de cada una de las cinco subunidades forman el poro y que el filtro de selectividad puede localizarse al final de este dominio, ya que al realizar mutaciones en esta región pueden revertir el paso de un anión a un catión; en cuanto a TM1 se sabe que el asa intracelular que forma con TM2, contribuye a la permeabilidad del ión como quedó demostrado al realizar mutación sitio dirigida y el análisis funcional (Filippova et al., 2004).

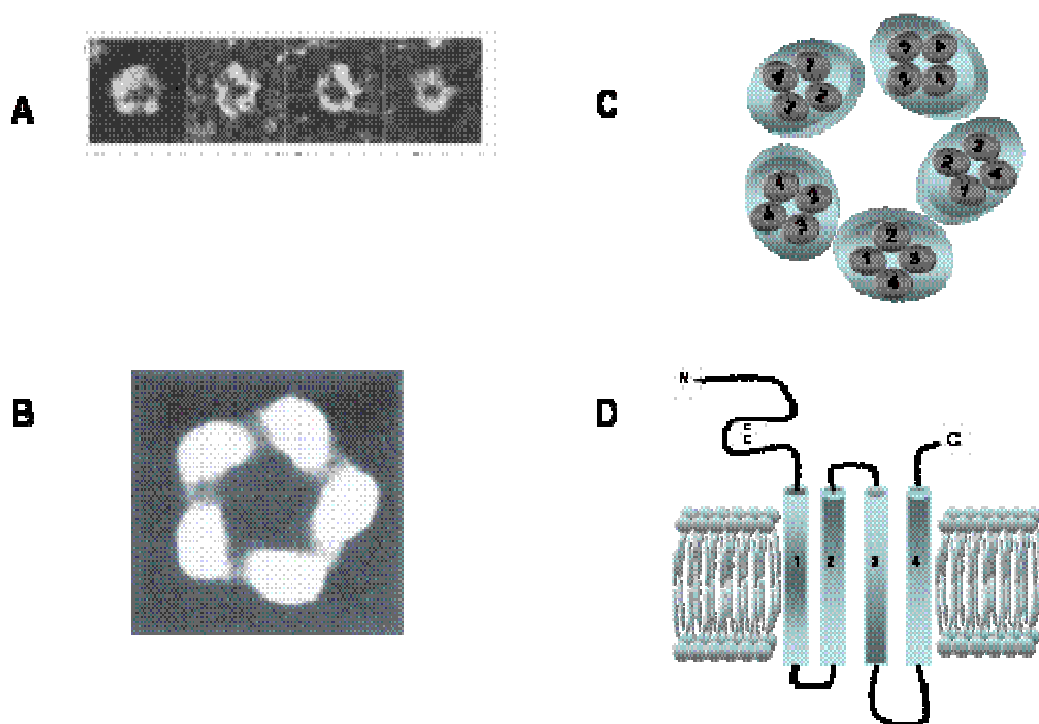


Figura 2. Modelo estructural del receptor GABA_A. A) Imágenes de cuatro receptores a GABA_A en su conformación pentamérica, éstas fueron obtenidas por barrido densitométrico al microscopio electrónico con aumento de 33 000X. B) Imagen procesada del receptor donde se aprecia claramente su conformación pentamérica. (A y B tomadas de Nayeem et al., 1994). C) Modelo del pentámero en un corte horizontal virtual de un receptor ionotrópico típico GABA_A, 1-4 se refiere a los segmentos transmembranales (TM). D) Cada una de las subunidades está constituida por una sola cadena polipeptídica, que consta de un dominio amino terminal extracelular, que forma un puente intercisteínas (C-C), cuatro segmentos transmembranales (1-4), un dominio carboxilo terminal extracelular y dos asas intracelulares.

Existen dos proteínas que interactúan con el asa formada entre los segmentos TM3 y TM4 de la subunidad $\rho 1$. Una corresponde a una variante del transportador de glicina GLYT-1, mientras la segunda es la proteína de unión a microtúbulos 1B (MAP 1B) (Billups et al., 2000; Hanley et al., 2000; Pattnaik et al., 2000). Aunque MAP-1B se une a microtúbulos, la proteína no es esencial para anclar receptores GABA_C al citoesqueleto de células bipolares, como se mostró al generar un ratón “knock-out” deficiente en MAP-1B (Meixner et al., 2000). Es importante resaltar que ni GLYT-1 ni MAP-1B interactúan con las subunidades $\rho 2$ o $\rho 3$, ni con receptores GABA_A (Crocì et al., 2003).

Expresión funcional y localización genómica

Estudios de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células de mamífero en cultivo, han demostrado que las subunidades ρ pueden formar canales iónicos homoméricos y heteroméricos, con propiedades farmacológicas similares y se sabe que los genes que les codifican son GABRR1, GABRR2 Y GABRR3, para las subunidades 1, 2 y 3 respectivamente (Bailey, 1999).

El gen que codifica para la subunidad $\rho 1$, está localizado en el cromosoma 4 de ratón y 6 humano (Bailey et al., 1999). Su DNAC consta de 1976 pares de bases y su secuencia codificante va del nucleótido 38 al 1459. El dominio amino terminal extracelular va de las bases 263 a la 862. Los 4 dominios transmembranales van de la 881 a la 1444 (Bailey et al., 1999; Cutting et al., 1991). Se han descrito tres isoformas de la subunidad $\rho 1$ en retina de humano, las cuales son producto de “splicing” alternativo (Demuro et al., 2000; Martínez-Torres et al., 1998).

LOCALIZACIÓN EN EL SNC DEL RECEPTOR GABA_C

La distribución precisa en el SNC de los receptores GABA_C no se conoce por completo, pero en este sentido desde hace ya varios años se describió en estudios de unión a receptor que una fracción de receptores al GABA son resistentes a bicuculina en cerebro, médula espinal, hipocampo y tectum óptico (Nistri & Silvilotti, 1985; Silvilotti & Nistri, 1989).

Los receptores GABA_C se expresan de manera predominante en retina, donde participan en la formación de la imagen visual por extracción espacial de representaciones neuronales (Lukasiewicz, 2005); las subunidades ρ están presentes en las terminales axónicas de las células bipolares, como quedó demostrado con técnicas de inmunocitoquímica (anticuerpos anti- ρ 1) (Enz et al., 1996, Fletcher et al., 1998; Koulen et al., 1998), mientras la expresión en otras áreas del cerebro es relativamente baja (Boue-Grabot et al., 1998; Enz et al., 1995; Enz & Cutting, 1999, Wellis & Werblin, 1995).

Electrofisiológicamente las células bipolares de la retina mostraron un componente GABAérgico insensible a la bicuculina y baclofeno, pero activado selectivamente por CACA (Euler et al., 1996; Feingenspan et al., 1993; Feingenspan & Bormann, 1994; Pan & Lipton, 1995; Zhang & Slaugther, 1995).

Los receptores GABA_C se localizan en células horizontales en la retina de diversas especies de peces. Dong y cols en 1994, los registraron electrofisiológicamente en la retina del bagre, señalando además que la función probable de GABA_C radica en su participación en la retroalimentación positiva. Takahashi y cols en 1994, los describieron por técnica de fijación de voltaje en célula completa en la retina del bagre; Qian y Dowling en 1993 los describieron en células bipolares de lobina blanca (*Morone chrysops*) y lobina rayada (*Morone saxatilis*) al encontrar respuestas características a GABA_C que fueron moduladas por Zinc (Qian & Dowling, 1995).

Los receptores GABA_C se han observado también en la retina de anfibios (Dong et al., 1994; Wegelius et al., 1998); y el colículo superior de roedores como la rata (Pan & Lipton, 1995; Pattnaik et al., 2000; Rozzo et al., 2002); en el hipocampo (Pasternack et al., 1999; Strata & Cherubini, 1994) en el cerebelo (Drew & Johnston, 1994; López-Chávez et al., 2005) y en interneuronas de la médula espinal (Rozzo et al., 2002). Se le ha localizado con técnicas de inmunohistoquímica y por métodos

electrofisiológicos (Pasternack et al., 1999), específicamente en el estrato gris superficial del colículo superior, así como en el complejo nuclear pretectal (Boller & Schmidt, 2001).

Estudios realizados en el tallo cerebral por técnicas de RT-PCR, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y electrofisiología, han demostrado que GABA_C se encuentra en el núcleo vagal dorsal, donde el 100% de las neuronas contienen la expresión de la subunidad $\rho 1$; mientras en el núcleo del tracto solitario se presenta en aproximadamente 70% de las neuronas (Milligan et al., 2004). El RNAm de receptores GABA_C, se encuentra en el núcleo subcortical visual, incluyendo el colículo superior, donde se presume que el receptor este localizado en interneuronas GABAérgicas del estrato superficial grisáceo; así mismo se ha localizado en el complejo pretectal nuclear y el núcleo geniculado lateral (Boller & Schmidt, 2001).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se detectó por métodos inmunohistoquímicos la presencia de la subunidad $\rho 1$ en cerebelo humano (Fig. 3-A) (Trejo, 2005); así mismo por análisis de RT-PCR se determinó la distribución del RNAm de las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ del receptor GABA_C en el sistema nervioso central bovino (figura 3-B) (López-Chávez et al., 2005).

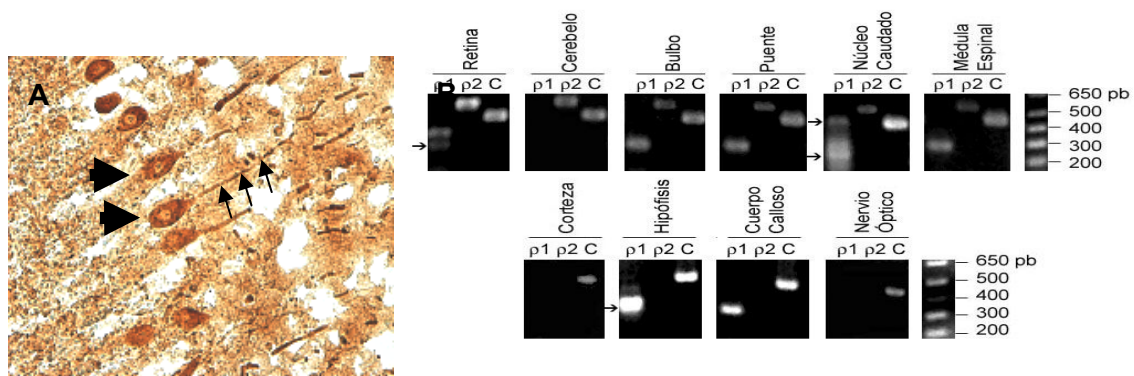


Figura 3. Distribución de las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ del receptor GABA_C en el SNC. A. Inmunohistoquímica en corte de cerebelo humano. Las flechas se señalan las células de Purkinje con reacción positiva a la subunidad $\rho 1$ (Tomado de Trejo, 2005). **B.** Fotografía de gel de agarosa de los productos de RT-PCR correspondientes a las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$. Con flechas se señalan las posibles variantes alternativas encontradas (Tomado de López-Chávez et al., 2005).

En estos estudios se identificaron las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ en retina, sin embargo no se detectó ninguna de las subunidades ni en corteza ni en nervio óptico; mientras que en el resto de las áreas analizadas se encontraron ambas o al menos una de ellas; como fueron los casos de núcleo caudado, puente, bulbo y médula

espinal, en donde se encontraron las dos subunidades, mientras que en cuerpo calloso e hipófisis se encontró solamente la subunidad $\rho 1$.

De manera particular se observó la amplificación de múltiples bandas en las muestras del núcleo caudado. Este hallazgo sugiere la posibilidad de una diversidad molecular del transcrito de $\rho 1$ que podría codificar para varias formas alternativas de “splicing”.

ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LAS ESTRUCTURAS ESTUDIADAS

Los resultados obtenidos por López-Chávez y colaboradores en 2005 indican que el RNAm de la subunidad $\rho 1$ del receptor $GABA_C$ se encuentra en la retina, bulbo, puente, núcleo caudado, médula espinal, hipófisis y cuerpo calloso del cerebro bovino. En el presente trabajo se evaluó la distribución de la subunidad $\rho 1$ en el tallo cerebral (bulbo raquídeo y protuberancia anular) por la importancia que tienen a nivel de funciones especiales, la rodilla del cuerpo calloso por su interacción con la corteza prefrontal y la cabeza del núcleo caudado, por su importancia a nivel cognitivo y en el control motor, esto en tejido correspondiente al cerebro bovino por las siguientes consideraciones:

- 1) Los antecedentes directos donde se determinó la presencia del RNAm que codifica al receptor $GABA_C \rho 1$ fueron realizados en bovino (*Bos taurus*).
- 2) En el cerebro bovino la cabeza del núcleo caudado no se encuentra fusionada con el putamen como es el caso de los roedores.
- 3) Es posible una extracción considerable de proteínas de membrana para el análisis por técnica de Western Blot, considerando que los reportes indican que la subunidad $\rho 1$ del receptor $GABA_C$ no es abundante en algunas regiones del cerebro. Además de que estas membranas pueden ser transplantadas a ovocitos de *Xenopus laevis* en donde se pueden estudiar sus propiedades electrofisiológicas.

Rodilla del Cuerpo Calloso

Las fibras que interconectan las regiones correspondientes de ambos hemisferios están representadas por dos estructuras: 1) El **cuerpo calloso** y 2) la comisura anterior (Carpenter, 1994). Así las fibras del cuerpo calloso conectan entre sí la mayor parte de las áreas corticales respectivas de los hemisferios, con excepción de las porciones anteriores de los lóbulos temporales; estas áreas temporales, que

incluyen en especial a la amígdala, están interconectadas por fibras que atraviesan la comisura anterior (Guyton, 1994).

El **cuerpo calloso** es una placa amplia y gruesa con densas fibras mielínicas que ocupan casi el 50% de la longitud de los hemisferios cerebrales (Guyton, 1994) y que interconectan en forma recíproca extensas regiones de la corteza de todos los lóbulos con las regiones correspondientes del hemisferio opuesto. Estas fibras atraviesan el piso de la cisura hemisférica, conforman la mayor parte del techo de los ventrículos laterales y se abren en abanico formando una radiación callosa que se distribuye a las diversas regiones corticales (Carpenter, 1994). Las partes que componen el cuerpo calloso (Fig. 4) reciben los nombres de: 1) Pico (*rostrum*), 2) Rodilla (*genu*), 3) Cuerpo (*corpus*) y 4) Rodete (*splenium*).

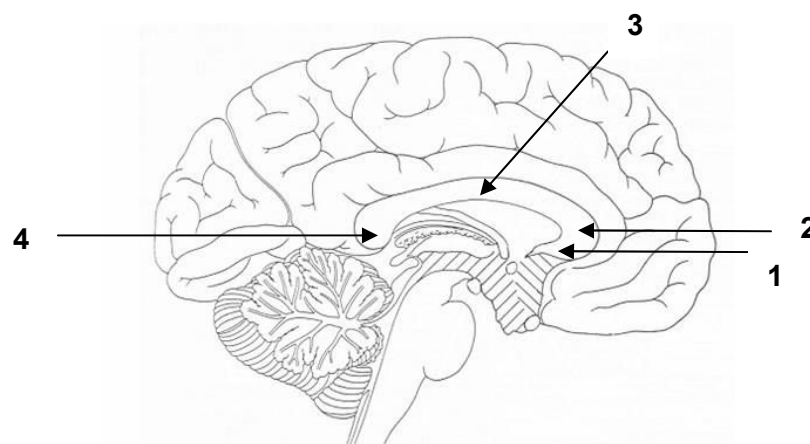


Figura 4. Corte sagital mostrando las partes del cuerpo calloso que lo componen. 1. Pico (*Rostrum*), 2. Rodilla (*Genu*), 3. Cuerpo (*Corpus*) y 4. Rodete (*Splenium*) (Tomado de Mosental, 1995).

La **rodilla** contiene fibras que interconectan las partes anteriores de los lóbulos frontales (Fig. 5); las fibras de las restantes partes de los lóbulos frontal y parietal atraviesan la porción corporal del cuerpo calloso, las fibras que atraviesan el rodete relacionan entre sí regiones correspondientes de los lóbulos temporal y occipital. Las fibras del rodete del cuerpo calloso, que se extienden inferiormente a lo largo del margen lateral del asta posterior del ventrículo lateral del asta posterior del ventrículo lateral y separan el ventrículo de la radiación óptica formando el *tapetum*.

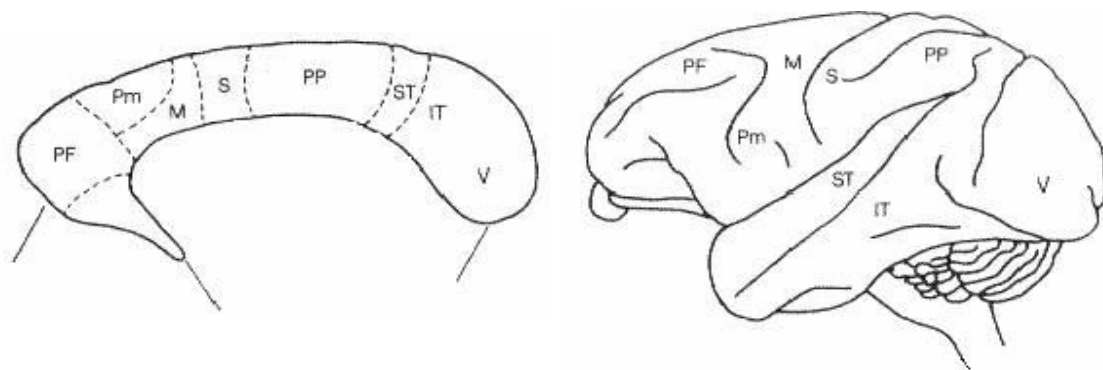


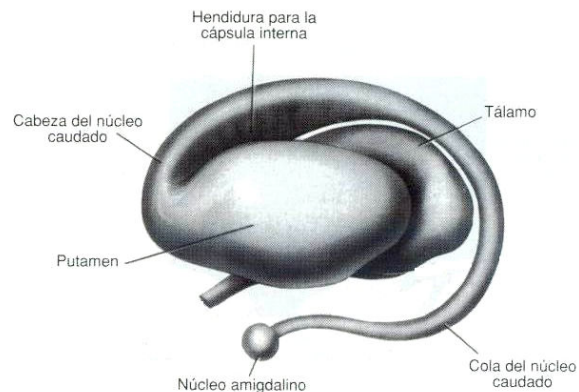
Figura 5. Regiones corticales interconectadas por zonas del cuerpo calloso. PF: área de asociación prefrontal; Pm: área premotora; M: área motora; S: área sensitiva – somática; PP: Corteza parietal posterior; ST: área de asociación somática temporal; IT: Corteza temporal lateral; V: área visual primaria y secundaria (Tomada de Kolb & Wishaw, 1990).

Respecto a esta estructura en el cerebro bovino y las diferencias que presenta con otras especies, Olivares y cols en 2001 realizaron estudios para determinar diferencias y similitudes en la estructura fina del cuerpo calloso, en cuanto a cantidad y tipo de axones (mielinizados y no mielinizados) por tinción de azul de metileno en especies adultas de: **vaca (*Bos taurus*)**, caballo (*Equus caballus*), perro (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), conejo (*Oryctolagus cuniculi*) y rata (*Rattus norvegicus*, *Sprague-Dawley*); el estudio sugiere que: 1) no hay diferencias en el número de fibras; 2) la composición de las fibras está relativamente conservada a través de las especies, lo que sugiere que la velocidad de transmisión interhemisférica no tiende a cambiar con el incremento del tamaño del cerebro y 3) los cerebros grandes (perro, caballo y **vaca**) presentan fibras de diámetros mayores.

Cabeza del núcleo caudado

El cuerpo estriado consta de dos partes distintas, el neostriado (**núcleo caudado** y putamen) y el paleostriado (globo pálido). El núcleo caudado está dispuesto en forma de C y mantiene una relación constante con el ventrículo lateral y está dividido en 3 grandes regiones: 1) la cabeza, 2) cuerpo y 3) cola (Fig 6); la porción más ancha o **cabeza**, se encuentra rostral al tálamo y sobresale en el interior del asta anterior del ventrículo lateral (Carpenter, 1994).

Figura 6. Neostriado aislado en una vista lateral. Se muestra la continuidad entre el núcleo caudado y el putamen, las relaciones entre la cola del núcleo caudado y el núcleo amigdalino, está indicada la hendidura ocupada por las fibras de la cápsula interna, así como la relación que guarda el tálamo y el núcleo amigdalino con el caudado (Tomado de Carpenter, 1994).



La cabeza del núcleo caudado y el putamen están separados por las fibras del brazo anterior de la cápsula interna, excepto en dirección rostroventral, donde se mantiene la continuidad. El cuerpo del núcleo caudado se extiende a lo largo del borde dorsolateral del tálamo, mientras la cola se extiende dentro del lóbulo temporal en el techo del asta inferior del ventrículo lateral y entra en relación con el núcleo central del complejo amigdalino (Carpenter, 1994).

El núcleo caudado presenta dos compartimientos principales que se conocen como placas (estriosomas) y matriz. Citológicamente, está compuesto por células que no presentan laminación ni disposición particular; dichas células se dividen en dos categorías: 1) las que poseen dendritas espinosas y 2) las que poseen dendritas lisas. Las espinosas, que son las más numerosas son redondeadas y ovals, de mediano tamaño, emiten múltiples dendritas primarias cubiertas con espinas y tienen axones largos; siendo su función la recepción y proyección de la información proveniente de la diferentes áreas de la corteza cerebral, cerebro medio y del núcleo intralaminar del tálamo, estas neuronas son las encargadas de la señal de salida, por lo que han sido consideradas la unidad estructural y funcional dentro del estriado (Carpenter, 1994; Oorschot et al, 2002).

La principal información que llega al núcleo caudado (Fig. 7), proviene de la corteza cerebral (área premotora y prefrontal), partes de la amígdala (laterobasal a la región ventromedial del núcleo caudado), sustancia *innomidata* (a la cabeza del núcleo caudado), núcleos talámicos (núcleo parafascicular, central, lateral, centromediano y paracentral), sustancia *nigra* (de los dos tercios rostrales de la *pars compacta* (a la cabeza del núcleo caudado) y los núcleos del rafe (dorsal y medio) (Guyton, 1994).

Las principales eferentes que salen de la cabeza del núcleo caudado (Fig. 7), se proyectan a las partes rostrales de la sustancia *nigra pars reticulata*; se sabe que al

estimular eléctricamente el núcleo caudado da lugar a un acentuado incremento en la liberación de GABA en la sustancia *nigra* (Guyton, 1994).

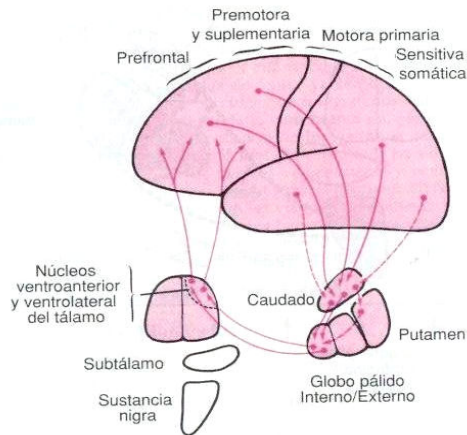


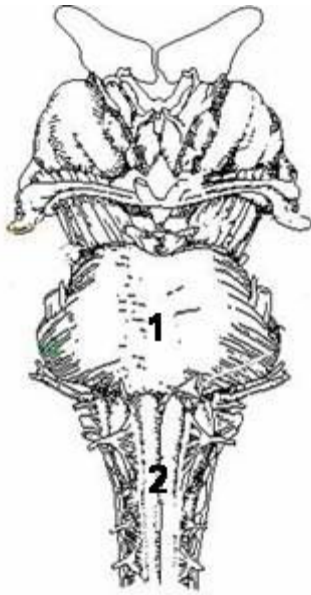
Figura 7. Circuito del caudado. Las conexiones nerviosas entre el sistema de control motor corticoespinal y el núcleo caudado. Las conexiones hacia el núcleo caudado comienzan a través de los lóbulos parietal y occipital para dirigirse a los lóbulos temporales; sin embargo tiene gran aferencia de la corteza cerebral; las eferentes van al globo pálido interno; después a los núcleos tálamicos ventroanterior y ventrolateral y finalmente a áreas prefrontal, promotora y motora suplementaria (Tomado de Guyton, 1994).

En cuanto a la similitud que presenta el núcleo caudado bovino respecto a otras especies en 1978 Nieto y cols realizaron un estudio donde se comparó el volumen de esta estructura con la de diferentes especies de mamíferos las cuales incluían: rata, conejo, gato, cebrá, ciervo, antilope, **vaca**, caballo, delfín y humano. Los resultados indican que no hay una correlación cercana entre el tamaño del núcleo del caudado y el peso del cerebro de los diferentes animales estudiados cuando el núcleo caudado equino es incluido, sin embargo cuando se omite este, existe una cerrada correlación entre el tamaño del caudado y el peso del cerebro entre las diferentes especies, debido a que el caudado del equino es extremadamente largo en relación con el peso de su cerebro, por lo tanto concluyen que las demás especies incluida la **vaca** tienen conservada esta estructura respecto al peso del cerebro.

Protuberancia Anular (Puente de Varolio)

La protuberancia (metencéfalo) (Fig. 8), que representa la parte rostral del cerebro posterior, tiene límites bien definidos sobre la cara anterior del tronco del encéfalo; está cubierto centralmente por bandas anchas de fibras orientadas en dirección transversal, y está separado: 1) del mesencéfalo por el surco protuberancial superior y 2) del bulbo (Fig 8) por el surco protuberancial inferior. Lateralmente, las fibras transversales de la parte ventral de la protuberancia forman el pedúnculo cerebeloso medio. La protuberancia consta de una voluminosa porción central compuesta por: 1) fascículos descendentes de fibras longitudinales, 2) núcleos protuberanciales y 3) fibras orientadas en forma transversal que se proyectan hacia el cerebelo (Carpenter, 1994).

Las fibras que atraviesan los pedúnculos cerebrales del mesencéfalo descienden en la porción ventral de la protuberancia. A continuación, las fibras corticoespinales se



dirigen hacia abajo atravesando el bulbo raquídeo hacia la médula espinal. Las fibras corticopontinas terminan aquí haciendo sinapsis en múltiples núcleos pontinos. Desde estos núcleos, fibras transversas cruzan inmediatamente hacia el lado opuesto de la protuberancia ventral y después describen un círculo hacia atrás, alrededor de las dos caras laterales de la protuberancia, para formar los pedúnculos cerebelosos medios que se extienden hacia atrás, en los dos hemisferios cerebelosos. Además, algunas fibras también se dirigen directamente hacia atrás en los pedúnculos del mismo lado (Guyton, 1994).

Figura 8. Esquema del tallo cerebral en vista anterior. Se muestra: 1) La protuberancia anular (puente de Varolio), y 2) bulbo raquídeo (*medulla oblongata*) (Tomado de Mosental, 1995).

A causa de la decusación de las fibras transversas, y como la mayoría de los tractos de fibras eferentes que abandonan el cerebelo para volver a entrar en el tallo encefálico también cruzan hacia el lado opuesto, la mitad derecha del cerebelo funciona principalmente con la mitad izquierda y la mitad izquierda con la mitad derecha del cerebro (Guyton, 1994).

Una porción dorsal más pequeña, denominada *calota protuberancial (tegmentum)*, contiene agrupaciones de células y fibras que forman una parte central denominada formación reticular. La calota protuberancial tiene continuidad con la formación reticular del bulbo y el mesencéfalo. En la calota protuberancial se encuentran núcleos de los nervios craneales, sistemas sensoriales ascendentes y las vías motoras descendentes más antiguas que surgen de los núcleos del tronco del encéfalo. Los núcleos de los nervios craneales asociados con la protuberancia corresponden al trigémino (V); motor ocular externo (*abducens*) (VI), que ayuda a controlar los movimientos oculares; facial (VII), que controla los músculos de la expresión facial y los dos componentes del vestíbulo coclear (VIII), que transmite señales desde el oído y el aparato vestibular (involucrado en el equilibrio en el oído interno) (Carpenter, 1994; Guyton, 1994).

Bulbo Raquídeo (*Médula oblongata, mielencéfalo*)

El bulbo raquídeo se encuentra en el extremo inferior del tallo encefálico (Fig. 8), a nivel externo existen dos características que lo distinguen:

1) sobre la cara anterior se presentan dos columnas longitudinales que protuyen, denominadas pirámides. Las pirámides llevan las mismas fibras corticoespinales que se dirigen desde la corteza cerebral a través de los pedúnculos cerebrales del mesencéfalo y la protuberancia ventral. Las fibras se dirigen a todos los niveles de la médula espinal y llevan señales que controlan la contracción muscular. En la porción inferior del bulbo, las fibras de la pirámide cruzan hacia el lado opuesto, antes de descender hasta la médula espinal, lo que se denomina decusación de las pirámides; por tanto, la corteza cerebral izquierda controla la contracción muscular en el lado derecho del cuerpo, mientras que la corteza derecha controla el lado izquierdo (Guyton, 1994).

2) Una oliva protuye desde cada superficie anterolateral del bulbo, por fuera de las pirámides. En la profundidad de la proyección externa de la oliva se encuentra el *núcleo olivar inferior*, este núcleo funciona como relevo de las señales al cerebelo, recibiendo sus aferentes principalmente de los ganglios basales y la médula espinal, y en menor grado de la corteza motora. Sus señales eferentes se dirigen al cerebelo contralateral a través del *pedúnculo cerebeloso inferior*, una columna de fibras nerviosas con proyección superior y posterior, que se extiende desde el bulbo hasta el cerebelo. Los *lemniscos mediales* bilaterales, conducen las señales sensitivas desde la médula espinal hasta el cerebelo. Las fibras de estos tractos se originan en grandes núcleos bilaterales en el bulbo posteroinferior, los núcleos grácil (delgado) y cuneiforme, que reciben señales de la médula espinal. Después de abandonar estos núcleos, las fibras cruzan hacia lado opuesto del bulbo, para formar la decusación del *lemnisco medial*, (Guyton, 1994).

El núcleo cuneiforme accesorio, lateral al núcleo cuneiforme en niveles ligeramente más rostrales, está compuesto por grandes células que reciben aferentes de los ganglios espinales; dan origen a proyecciones cerebelosas directas y retransmiten información de los husos musculares, órganos tendinosos de Golgi y aferentes cutáneos. Las fibras que terminan en el núcleo cuneiforme accesorio provienen de los mismos ganglios espinales que aquellas que se proyectan al núcleo cuneiforme. Las fibras ascendentes del fascículo cuneiforme terminan en forma somatotópica en el núcleo cuneiforme accesorio y sus fibras dan origen a fibras

cuneocerebelosas directas que ingresan al cerebelo a través del pedúnculo cerebeloso inferior (Carpenter, 1994).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente el RNAm que codifica para la subunidad p1 del receptor GABA_C puede localizarse de manera importante en el tallo cerebral (Wegelius et al, 1998; Milligan et al, 2004; López-Chávez et al, 2005); así mismo se ha mostrado su presencia proteica en los núcleos vagal dorsal y del tracto solitario de esta estructura en la rata (Milligan et al, 2004); en lo que respecta al estriado se conoce que dicho RNAm es relativamente bajo respecto lo reportado en la retina (Wegelius et al, 1998), pero específicamente en la cabeza del núcleo caudado puede presentar isoformas de este receptor y que dicho RNA se puede localizar en la protuberancia anular y el cuerpo calloso (López-Chávez et al, 2005).

Por lo tanto estudios que determinen la expresión del receptor GABA_C p1a nivel celular y permitan identificar los núcleos y neuronas involucradas, podrían contribuir a comprender de manera clara como es que está organizado el sistema GABAérgico y el posible papel que juega el receptor GABA_C en estas áreas.

PREGUNTAS A CONTESTAR

La expresión génica se puede regular en la vía que conduce del RNAm a las proteínas, este proceso se conoce como control de la actividad proteica en el cual se activan, inactivan, degradan o se ubican de modo selectivo las proteínas ya sintetizadas (Alberts et al, 2004), en base a esta consideración se han planteado las siguientes preguntas:

- 1) ¿Existe una traducción proteica detectable por técnicas de inmunohistoquímica indirecta a partir del RNAm que codifica al receptor GABA_C p1, el cual fue localizado en el cuerpo calloso, cabeza del núcleo caudado, puente de Varolio y bulbo raquídeo del cerebro bovino?
- 2) ¿Qué núcleos o regiones del cerebro bovino están involucradas la expresión de la subunidad p1 del receptor GABA_C?

HIPÓTESIS

El RNAm que codifica para la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C se encuentra presente en el cuerpo calloso, cabeza del núcleo caudado, puente de Varolio y bulbo raquídeo del cerebro bovino, esto sugiere que la traducción de dicho RNAm producirá la proteína que codifica ($\rho 1$), la cual puede localizarse por análisis inmunohistoquímico en las regiones mencionadas.

OBJETIVOS

General

Determinar la distribución celular de la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C en el cuerpo calloso, cabeza del núcleo caudado, puente de Varolio y bulbo raquídeo del cerebro bovino, donde previamente se identificó su RNAm.

Particulares

- Detectar por inmunohistoquímica indirecta la presencia de la subunidad $\rho 1$ en: 1) bulbo, 2) puente de Varolio, 3) cuerpo calloso y 4) cabeza del núcleo caudado del cerebro bovino.
- Identificar la expresión de $\rho 1$ por análisis de Western Blot en las áreas del cerebro bovino mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Disección y extracción de tejido

Se obtuvieron los cerebros de bovino (*Bos taurus*) del rastro municipal de Santiago de Querétaro, los tejidos fueron sumergidos en buffer de fosfatos (PBS) y transportados al laboratorio en hielo, una vez allí, se realizó la disección mediante la cual se extrajeron las regiones correspondientes al bulbo raquídeo (médula oblongada), puente de Varolio (protuberancia anular), cuerpo caloso y la cabeza del núcleo caudado (Fig. 9). Los tejidos fueron incluidos de manera inmediata en paraformaldehído al 4% diluido en PBS, a pH 7.4 por cuatro horas, posteriormente se prepararon para el congelamiento mediante el tratamiento con tres gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%) en PBS, finalmente se mantuvieron en medio de inclusión "tissue freezing" para su posterior corte (Adaptada de Enz et al., 1996).

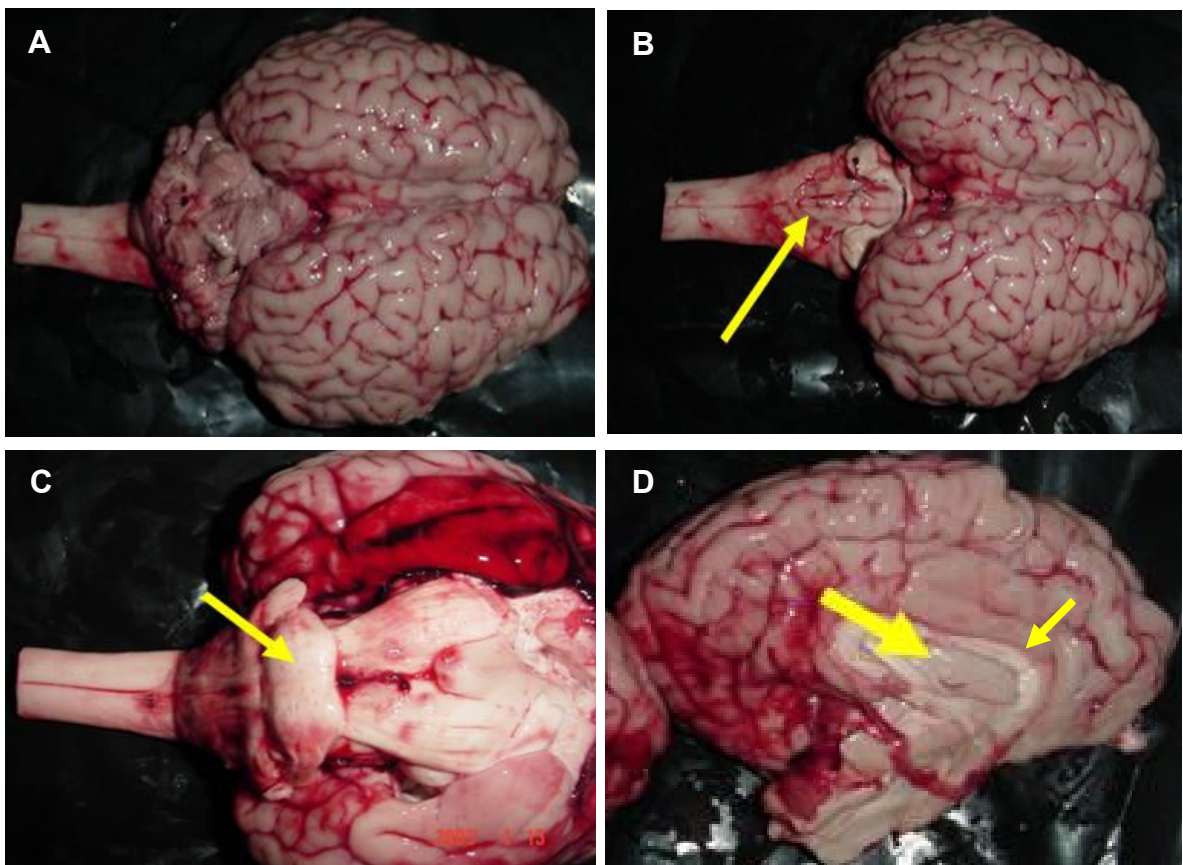


Fig. 9. Regiones disectadas del cerebro bovino. A. Cerebro bovino completo después del transporte del rastro al laboratorio. B. Vista dorsal del tallo cerebral sin cerebelo, la flecha muestra la región correspondiente al bulbo raquídeo. C. Vista ventral del tallo cerebral, la flecha muestra la protuberancia anular. D. Corte sagital, la flecha grande muestra la cabeza del núcleo caudado, la flecha menor el cuerpo caloso.

DISECCIÓN

Material:

Mango de bisturí No. 4

Hoja de bisturí No. 10

Pinzas de disección sin dientes

Pinzas de disección con dientes

Separador mini Roux 15 cm

Procedimiento

Después de lavar el tejido con PBS se disectaron las siguientes áreas:

Bulbo Raquídeo: Se realizó un corte horizontal de la región para su extracción total la cual se localiza por arriba del Obex y hasta la unión Ponto Bulbar.

Protuberancia Anular: Se realizó un corte horizontal de la región para su extracción total, comienza en la unión Ponto Bulbar y terminando al inicio de los pedúnculos cerebrales.

Cuerpo Calloso: Se realizó un corte de la región correspondiente a la rodilla del cuerpo calloso para su extracción total, la rodilla del cuerpo calloso se encuentran en la parte anterior de los ventrículos laterales.

Cabeza del Núcleo Caudado: Después de un corte sagital a través del surco interhemisférico, el cual separó ambos hemisferios, se expuso el tejido correspondiente por medio de un separador, para posteriormente realizar un corte vertical de la región para su extracción total, la cabeza del núcleo caudado se localiza en la parte posterior del lóbulo temporal dentro de los ventrículos laterales.

Obtención de cortes: Los tejidos fueron seccionados en un criostato Leica CM 1850, tanto a dimensiones de 14 μ m para la inmunofluorescencia y de 30 μ m para la inmunoperoxidasa. Los cortes se mantuvieron en portaobjetos, Superfrost® a 4° C.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación sobre muestras tisulares de determinados antígenos celulares, esto por medio de la aplicación de anticuerpos dirigidos. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite el reconocimiento específico de una molécula diana (o antígeno), estos antígenos marcados con colorantes fluorescentes o enzimas se pueden localizar de forma específica con un microscopio óptico (Alberts et al, 2004).

Procedimiento Inmunodetección:

Posterior a la obtención y montaje de los tejidos en portaobjetos Superfrost® se realizó el siguiente procedimiento:

- Tres lavados con PBS Tritón-X-100 de 10 min cada uno.
- Bloqueo de sitios inespecíficos con seroalbumina bovina al 1% en conjunto con peróxido de hidrógeno al 3% por 30 min.
- Incubación con el anticuerpo primario anti $\rho 1$ generado en cabra (Santa Cruz biotechnology, sc-21336), en dilución 1:200 en PBS durante toda la noche a 4° C y con PBS (omitiendo la colocación del anticuerpo primario) para los tejidos seriados utilizados como control.
- Tres lavados con PBS Tritón-X-100 de 10 min cada uno.
- Incubación con segundo anticuerpo anticabra IgG generado en conejo para detectar el sitio de fijación del primer anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz biotechnology, sc-2777), así como con un anticuerpo burro anticabra de IgG-peroxidasa de rabano (HRP) (Santa Cruz biotechnology, sc-2020), ambos en diluciones de 1:1000 en PBS durante 6 h a 4° C.
- Revelado de HRP con diaminobenzidina (DAB) en presencia de peróxido de hidrógeno.
- Inmersión en Alcohol al 70% y xileno durante 1 min.
- Montaje de muestras con Entellan™.

Observación y microfotografía:

Una vez montados los tejidos que fueron sometidos a inmunoperoxidasa fueron observados en el microscopio óptico Olympus BX60 equipado con cámara DP70, de igual manera las muestras fueron observadas en el microscopio Olympus SZX12 que

estaba equipado con el mismo tipo de cámara. Los tejidos que se incubaron con anticuerpo conjugado con fluoresceína se observaron en microscopio Olympus BX60 que contenía el filtro adecuado para FITC.

Paralelamente se han preparado tejidos en portaobjetos que sirven como blanco, en los cuales se omite la incubación con el primer anticuerpo. Las laminillas fueron observadas al microscopio óptico.

WESTERN BLOT

La preparación de la muestra así como la electroforesis se realizaron según el método descrito por Sambrook y cols en 1989; el Western blot es una técnica inmunológica que se utiliza para analizar antígenos proteicos. Las proteínas se separan mediante electroforesis y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incuba con anticuerpos, los que se detectan ulteriormente con anticuerpos marcados radioactivamente o acoplados a enzimas.

La técnica se ha propuesto como estrategia para apoyar los resultados positivos de la inmunorreacción, así como para probar la especificidad del anticuerpo.

Procedimiento:

- Se homogenizó alrededor de 0.6g de tejido en buffer de glicina (200mM glicina / 150 mM NaCl / 50mM EGTA / 50 mM EDTA / 300 mM sacarosa) en cantidad de 2mL / 0.5g de tejido más 20µl de inhibidor de proteasas a pH 9.
- Se centrifugó por 15 min a 9, 500 X g.
- Se almacenó el sobrenadante a -80° C.
- Las proteínas se mezclaron con buffer de muestra (62.5mM Tris, 2% duodecil sulfato de sodio (SDS), 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0.05% azul bromofenol).
- Posteriormente se colocaron en un gel poliacrilamida – bis al 10%, añadiendo un carril extra el cual contenía el marcador de proteínas (BenchMark Potein ladder Invitrogen) y se corrió a 95V por 3 h a 4° C.
- Se electrotransfirió a membrana de nitrocelulosa a 25mA por 35 minutos.
- Bloqueó con BSA al 5% por 1 h.
- Se aplicaron tres lavados de 10 min con TBS Tween (TBS-T) al 0.5%.
- Incubación del anticuerpo primario anti ρ1 generado en cabra (anti-GABA_C ρ1 IgG policlonal generado en cabra de Santa Cruz Technology en dilución de

1:2,500 mismo que se uso para la inmunohistoquímica), la incubación se mantuvo durante toda la noche a 4° C.

- Paralelamente se utilizaron membranas control en donde se omitió el anticuerpo primario.
- Tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T al 0.5%.
- Incubación con anticuerpo secundario anticabra IgG conjugado con AP (Santa Cruz biotechnology, sc-2949) (con dilución 1:2,500) que se dejo por 4h a temperatura ambiente.
- Lavados por 3 ocasiones por 10 min con TBS-T al 0.5%
- La inmunorreacción que obedece a la localización de la subunidad p1 fue detectada con una mezcla BCIP/NBT (Blue liquid substrate system for membranes of SIGMA), la reacción fue detenida con TBS-T.

TINCIÓN DE GOLGI RÁPIDO

La tinción de Golgi consiste básicamente en una inmersión prolongada del tejido nervioso, endurecido y fijado previamente con dicromato de potasio, en una solución de nitrato de plata de 0.5% a 1%. Esta técnica permite una “tinción” precisa y selectiva de la silueta de los elementos nerviosos de la sustancia gris (Cintra et al., 1997).

Procedimiento:

- Fijación con dicromato de potasio al 4.5% con ácido osmico al 1% (8 a 11 días).
- Diferenciación en solución de nitrato de plata al 0.75% durante 24 h.
- Deshidratación en alcoholes (OH) graduales desde 50% hasta etílico absoluto (OHEA) y en mezcla de OHET-éter (1:1), permaneciendo 30 min en cada uno de los cambios.
- Impregnación en nitrocelulosa de diferentes gradientes (2, 5, 10, 15 y 30%) cada uno de 24h.
- Inclusión en nitrocelulosa al 30% para su polimerización durante 12 h en desecador con vapores de cloroformo y conectado al vacío.
- Fijación en platina de metal colocado en el desecador durante 15 min.
- Colocar y seccionar el bloque incluido en nitrocelulosa en el microtomo de deslizamiento (Marca Leitz-1310) cada corte de 120 µm.

- Colecta de los cortes para su deshidratación en OH graduales (70, 80, 96%) hasta el OH isopropanol, cada uno por 15 min.
- Aclaración del tejido en terpineol (10-15min), seguido de dos cambios de xileno.
- Montaje en laminillas portaobjetos con entellan.
- Secado y observación al microscopio óptico.

RESULTADOS

Distribución de la subunidad $\rho 1$ en el bulbo raquídeo (médula oblongada)

En cortes de $30\mu\text{m}$ ($n=11$) de la región mesobulbar del tallo cerebral bovino se realizó la inmunodetección para la localización del receptor $\text{GABA}_C \rho 1$. Las imágenes de la figura 10A muestran los núcleos con inmunorreacción: cuneiforme, cuneiforme accesorio, olivar y reticular. B control; en C los núcleos cuneiforme y cuneiforme accesorio; las fotografías fueron tomadas en microscopía de luz y D muestra diferentes tipos neuronales que son positivos para la expresión del receptor $\text{GABA}_C \rho 1$.

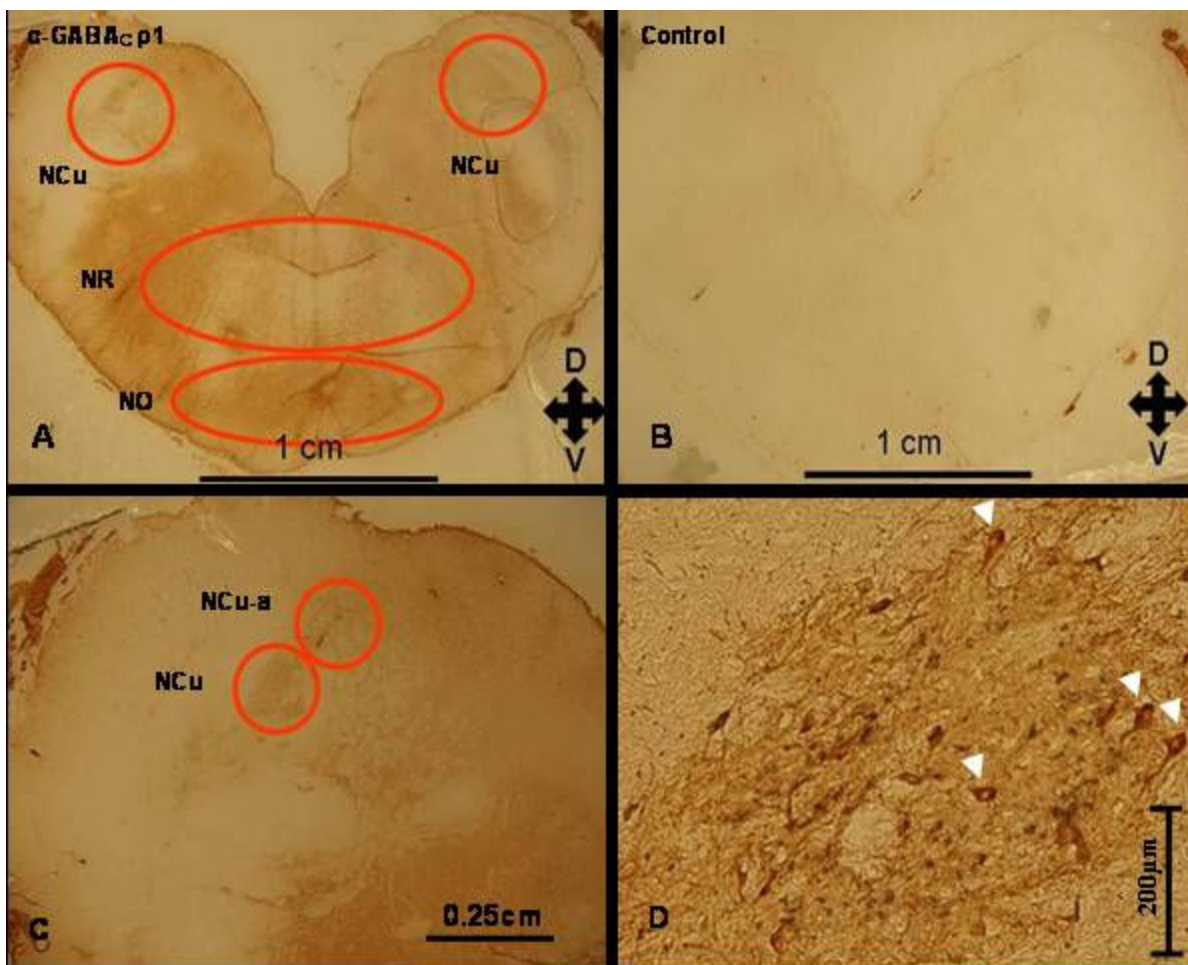


Fig 10. $\text{GABA}_C \rho 1$ en el área mesobulbar del cerebro bovino. **A.** Las áreas dentro de los círculos muestran la inmunorreacción en los núcleos olivar, reticular y cuneiforme. **B.** Control en el cual se omitió el anticuerpo primario ($\alpha\text{-GABA}_C \rho 1$). **C.** Las áreas dentro de los círculos muestran la inmunotinción en los núcleos cuneiforme y cuneiforme accesorio. **D.** Las cabezas de flecha muestran diferentes neuronas con inmunorreacción en el núcleo cuneiforme. **Abreviaciones** NCu núcleo cuneiforme; NO. núcleo olivar; NR; núcleo reticular, D dorsal y V ventral. **Aumentos:** A, B y C Fueron tomados en microscopía de luz D. 10X

En la figura 11 se muestra inmunorreacción correspondiente a la región del núcleo cuneiforme accesorio, dicho núcleo se localiza lateral al núcleo cuneiforme a niveles más rostrales. En la imagen B se pueden observar agrupaciones celulares con somas de tipo piramidal, triangular, oval y fusiforme.

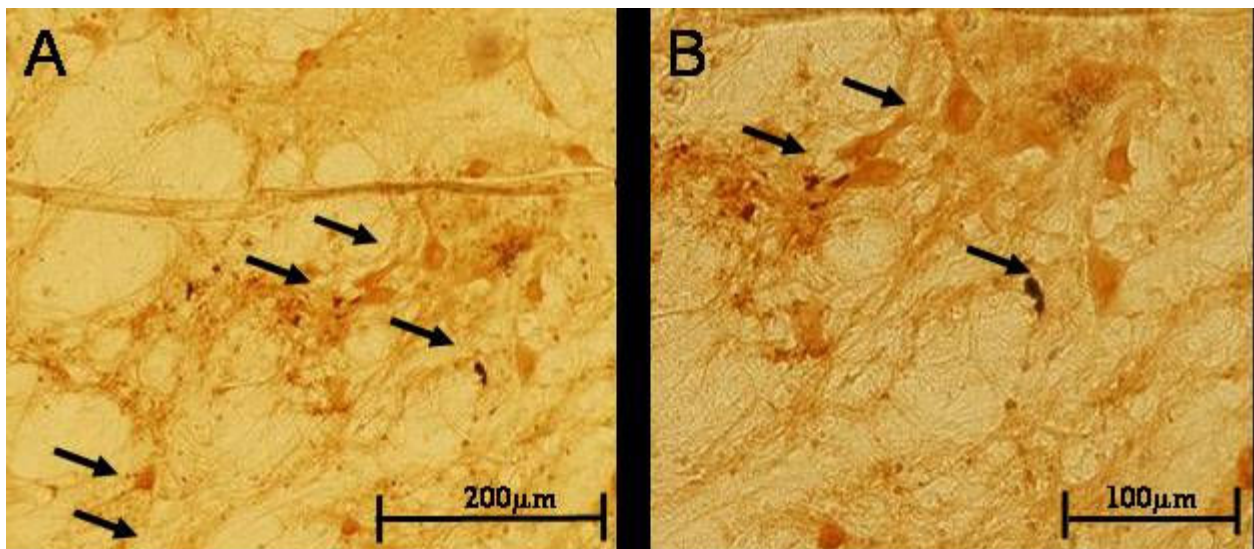


Fig. 11 Localización del receptor GABA_C p1 en el núcleo cuneiforme accesorio. A y B. Indican la inmunolocalización en varias neuronas de este núcleo. **Aumentos: A 10X, B 20X.**

En la figura 12 A y B se muestran varios somas que presentaron inmunorreacción al receptor GABA_C p1 en el núcleo cuneiforme accesorio, se encontraron somas ovales, piramidales y fusiformes. En C y D se muestran somas de tipo oval del mismo núcleo identificadas por inmunofluorescencia.

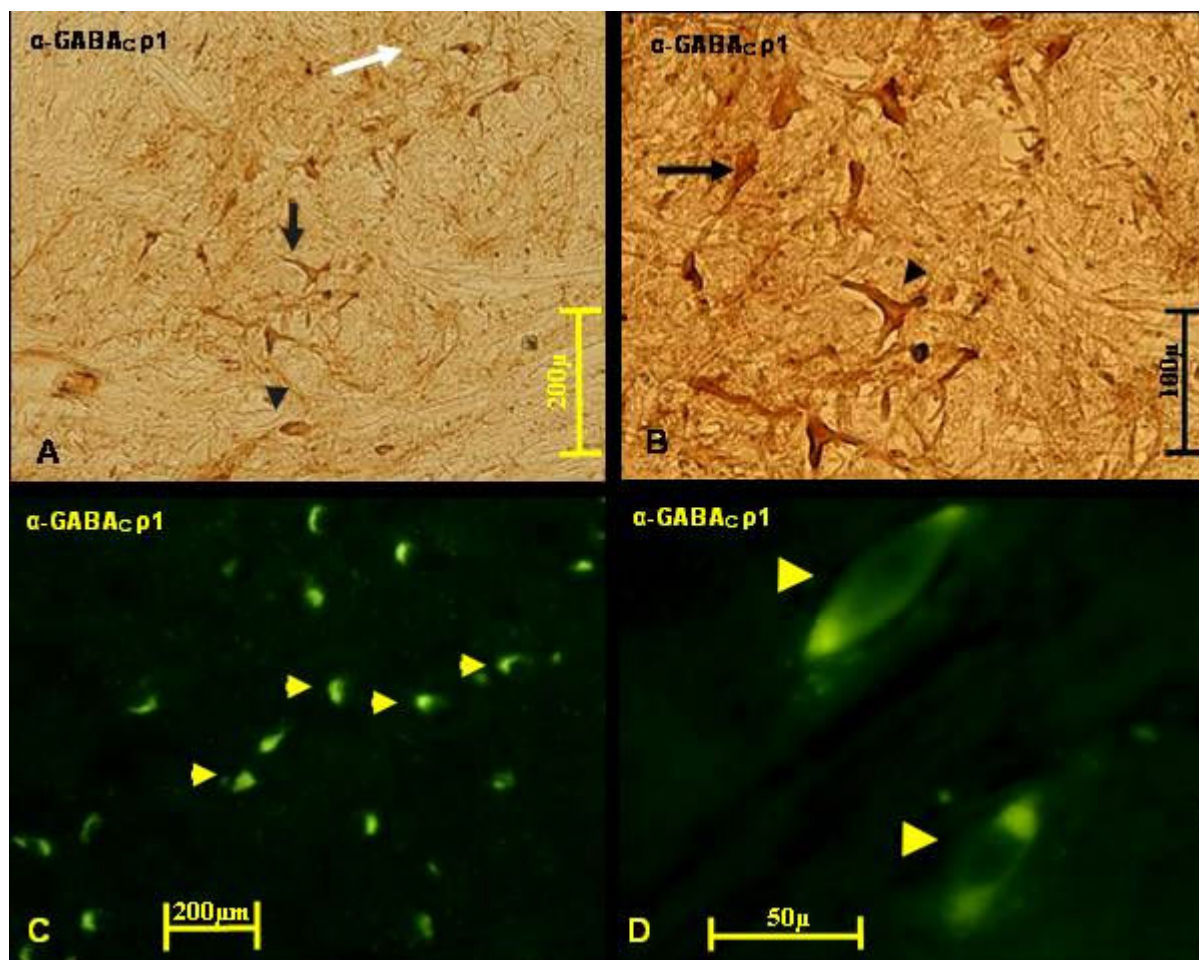


Fig 12. Inmunolocalización del receptor GABA_C p1 en la región bulbar del cerebro bovino. **A.** La cabeza de flecha muestra un soma oval, la flecha negra indica una célula piramidal, mientras la flecha blanca una célula fusiforme en el núcleo cuneiforme accesorio en aumento de 10X. **B.** La cabeza de flecha muestra una neurona piramidal, mientras la flecha una neurona de tipo fusiforme en el núcleo cuneiforme accesorio en aumento de 20X. **C y D.** Localización de p1 en el bulbo raquídeo en su proximidad con la médula espinal, las cabezas de flecha muestran neuronas ovales en un aumento de 10 y 40X respectivamente. Cortes: A y B 30 μm C y D 14 μm.

En la figura 13 se muestran los núcleos reticulares donde se observa que la población de neuronas que presentan el receptor GABA_C p1 son de tres tipos: piramidal, fusiforme y oval.

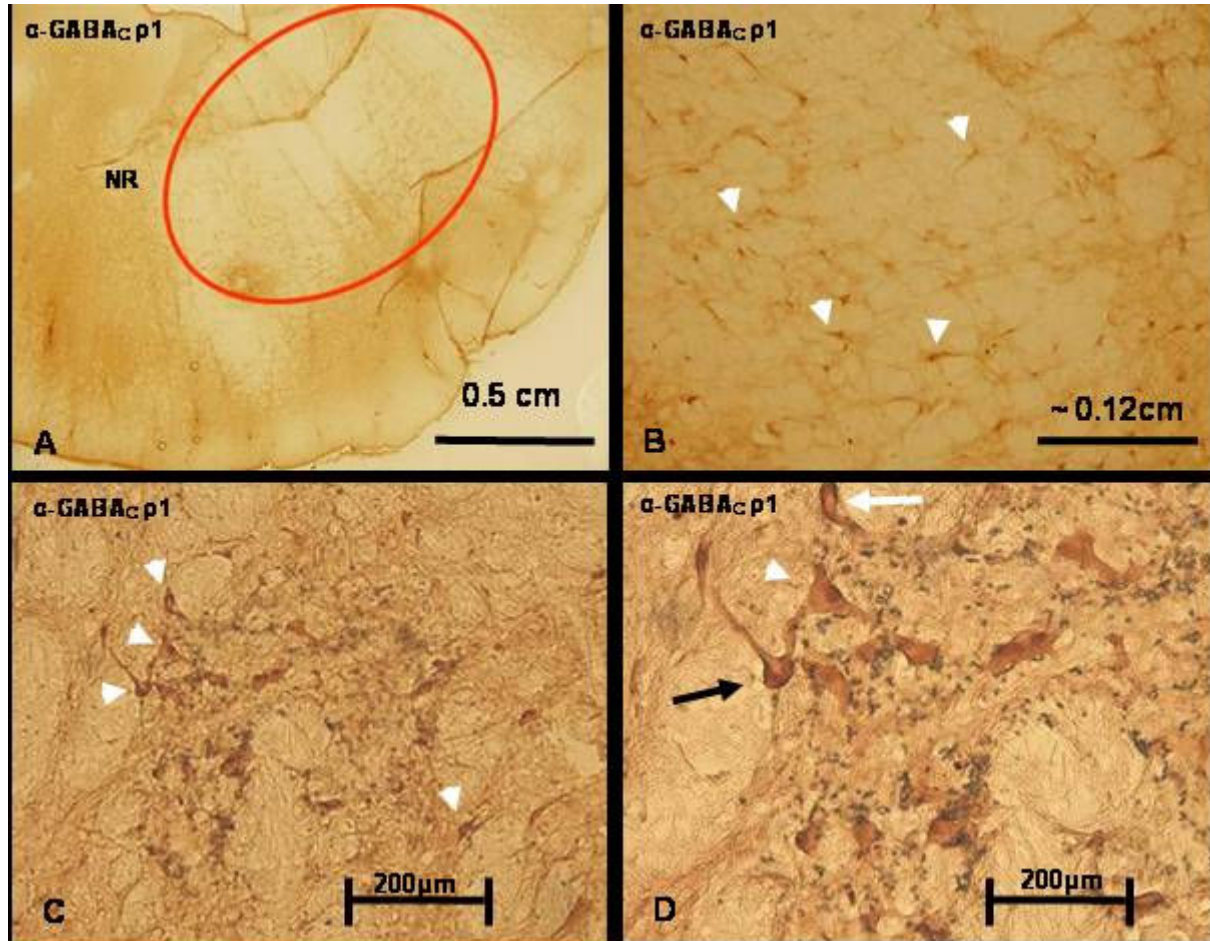


Fig 13. Localización del receptor GABA_C p1 en un corte horizontal de los núcleos reticulares. A. El área dentro del círculo muestra la región del núcleo reticular con inmunorreacción. **B y C.** Cabezas de flecha muestran las neuronas positivas. **D.** La cabeza de flecha muestra un soma de tipo piramidal, la flecha negra un soma oval y la flecha blanca un soma de tipo fusiforme. **Abreviaciones** NR. núcleo reticular; cortes a 30μm. **Aumentos: A y B.** Tomada en microscopía de luz. **C.** 10X. **D.** 20X.

La figura 14 A y B muestran la inmunorreacción en la región olivar en donde se encontraron somas de tipo oval, fusiforme y piramidal que expresan la subunidad $\rho 1$.

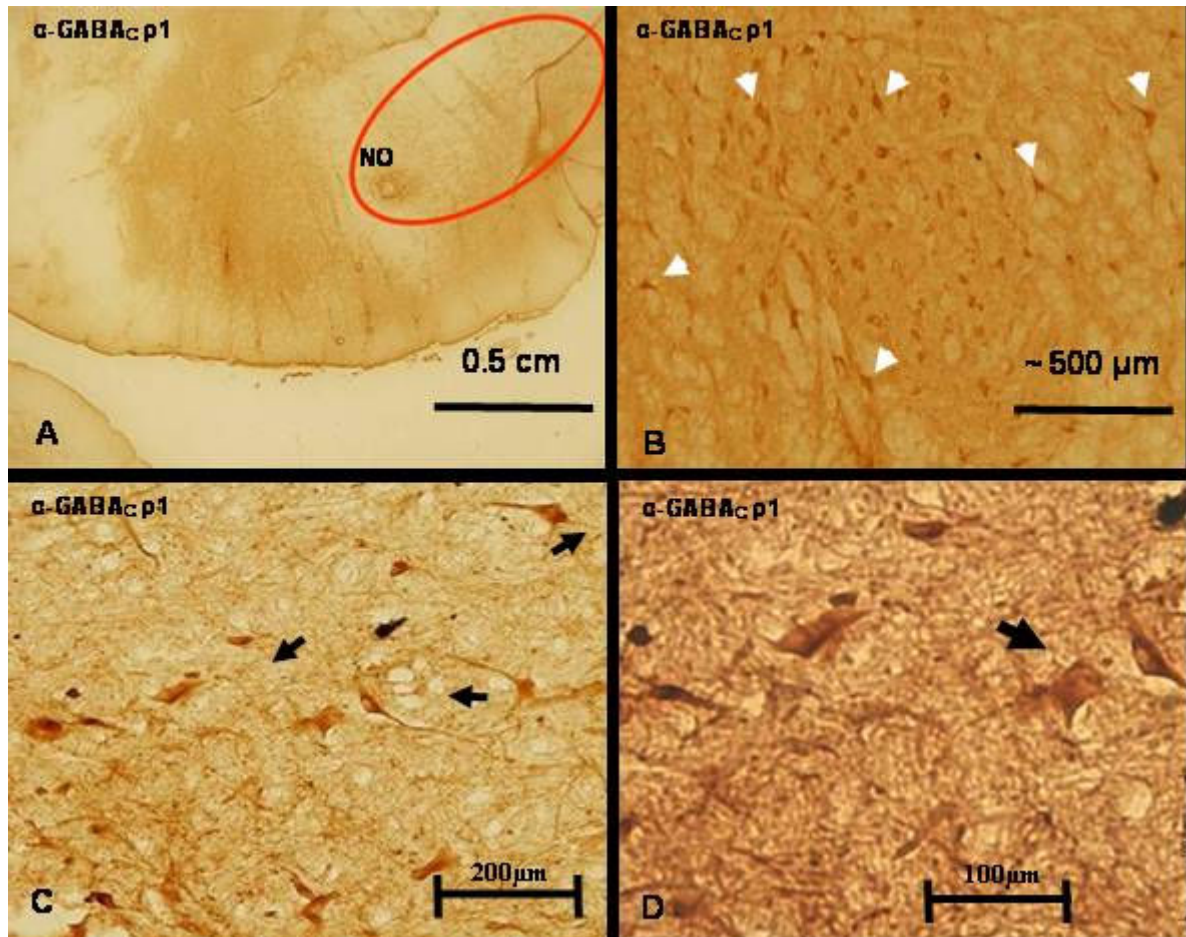


Fig 14. Inmunodetección GABA_C $\rho 1$ en el núcleo olivar. A. El área dentro del círculo muestra la inmunotinción en el núcleo olivar. B. Las cabezas de flecha muestran somas con localización del receptor GABA_C $\rho 1$. C. Las flechas muestran somas piramidales, fusiformes y ovals con inmunorreacción. D. La flecha muestra un soma de tipo fusiforme. Cortes a 30 μ m. **Aumentos:** A y B. Tomadas en microscopía de luz transmitida. C. en aumento de 10X D. en aumento de 20X.

La figura 15 muestra inmunolocalización del receptor GABA_C ρ 1 en el núcleo delgado por técnica de inmunofluorescencia. Se puede apreciar que existe una agrupación de somas predominantemente ovals.

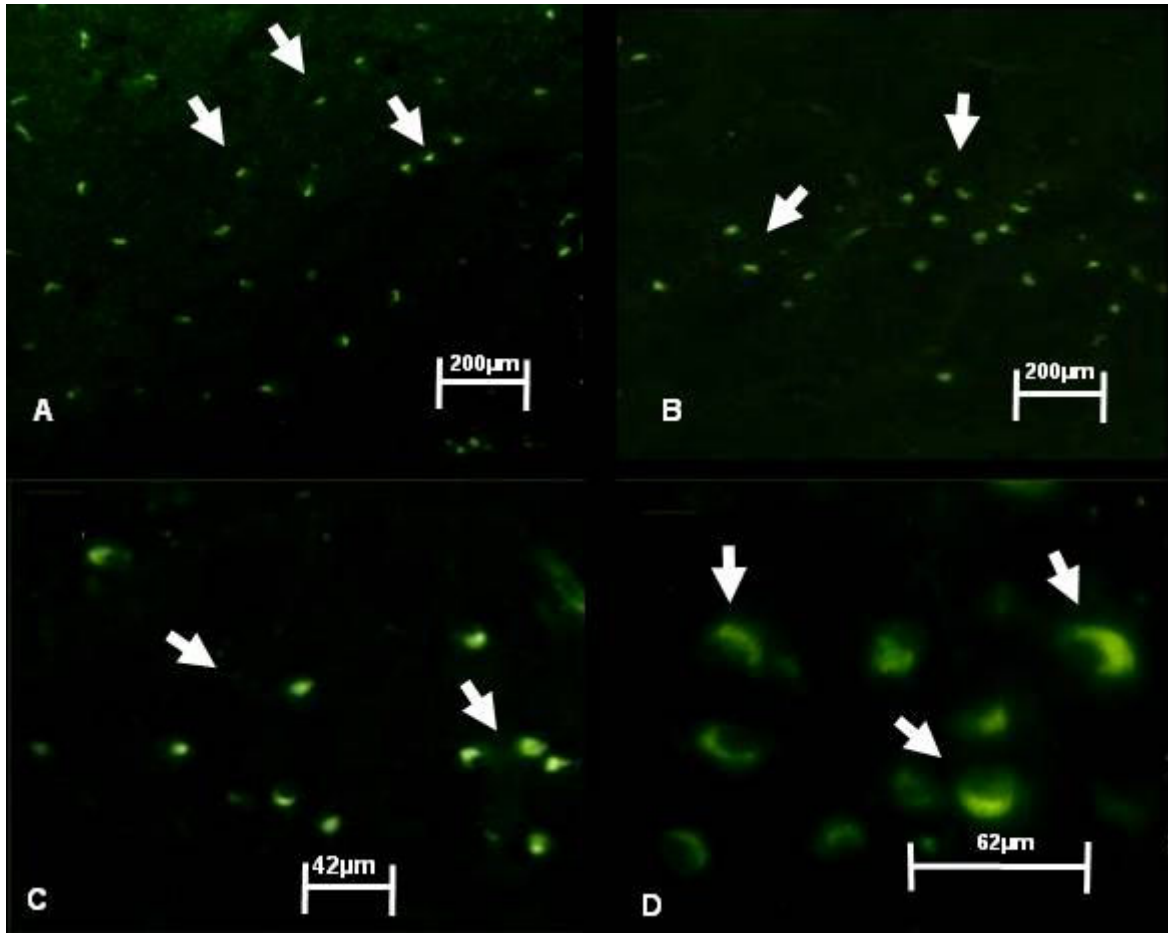


Fig. 15 Núcleo delgado con inmunorreacción anti ρ 1. A y B. Con aumento a 4X C. Aumento 10X. D Aumento a 20X.

Caracterización de los núcleos implicados en la localización del receptor GABA_c ρ1

Para determinar los núcleos mencionados de la región mesobulbar se realizó la tinción de hematoxilina eosina que se muestra en la figura 16A, los resultados obtenidos fueron comparados con el atlas electrónico “Atlas of the sheep brain”¹, que se muestra en la figura 16B.

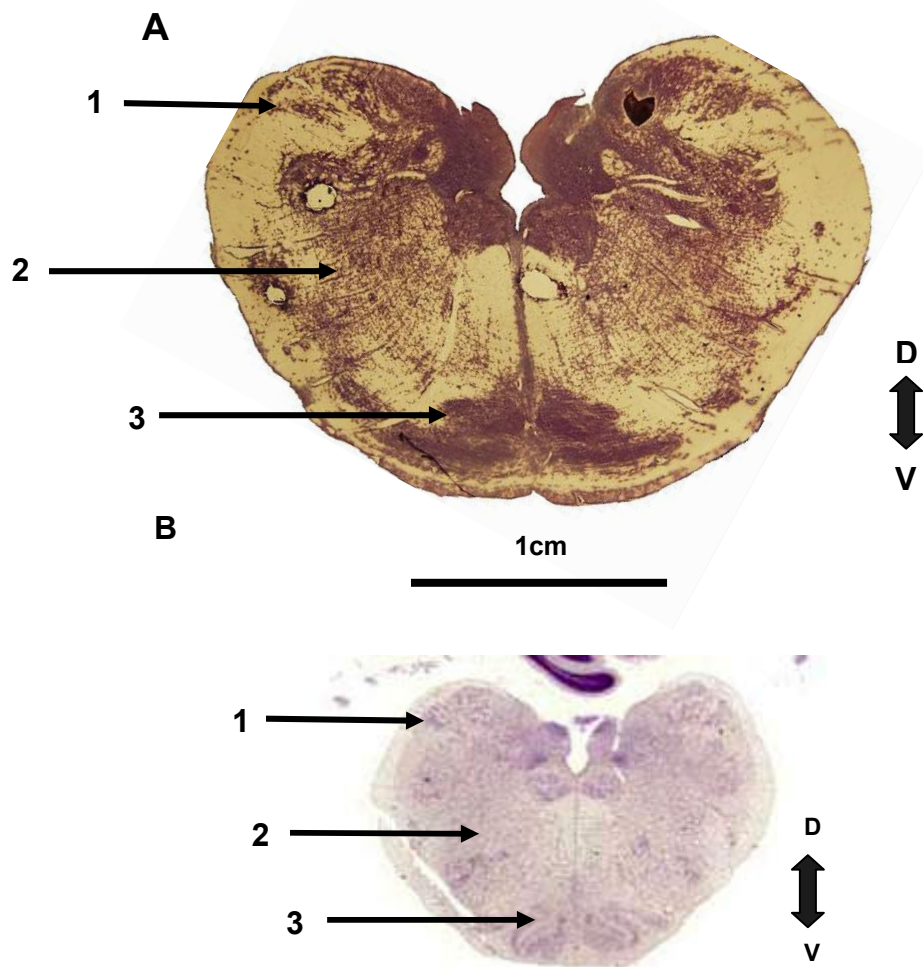


Fig 16. Núcleos cuneiforme (1), reticular (2) olivar inferior (3), identificados con tinción de hematoxilina eosina. A. Resultados de la tinción con hematoxilina eosina de la región mesobulbar B. Corte a nivel mesobulbar modificado de: “atlas of the sheep brain”. Abreviaciones D dorsal y V ventral.”,

¹ disponible en: <http://www.msu.edu/user/brain/sheepatlas/>

La técnica cromoargéntica de Golgi-rápido permitió determinar los tipos neuronales de las regiones estudiadas. Los resultados de la tinción en la región mesobulbar se muestran en la figura 17.

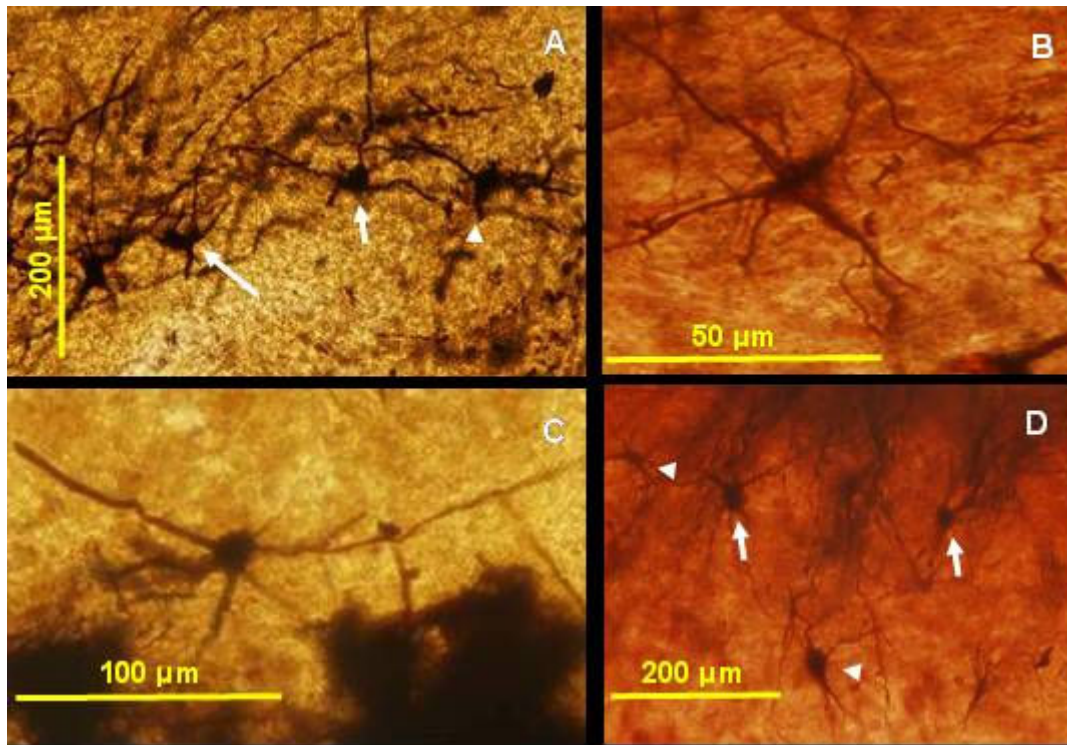


Fig 17. Tinción de Golgi rápido de la región mesobulbar. **A**, la flecha mayor muestra una neurona de tipo fusiforme, la menor una oval y la cabeza de flecha una de tipo piramidal, todas con árboles dendríticos no densos. En **B**, se muestra una neurona de tipo piramidal de axón corto. En **C**, una neurona no espinosa de tipo oval de axón largo y en **D**, las flechas señalan neuronas con árboles dendríticos densos con soma oval y las cabezas de flecha señalan neuronas con árboles dendríticos no densos de soma fusiforme.

Distribución de la subunidad $\rho 1$ en la cabeza del núcleo caudado

En cortes coronales de la cabeza del núcleo caudado ($n=7$) se localizaron algunos somas inmunoreactivos a anti- $\rho 1$. Estos se muestran en las figuras 18 y 19.

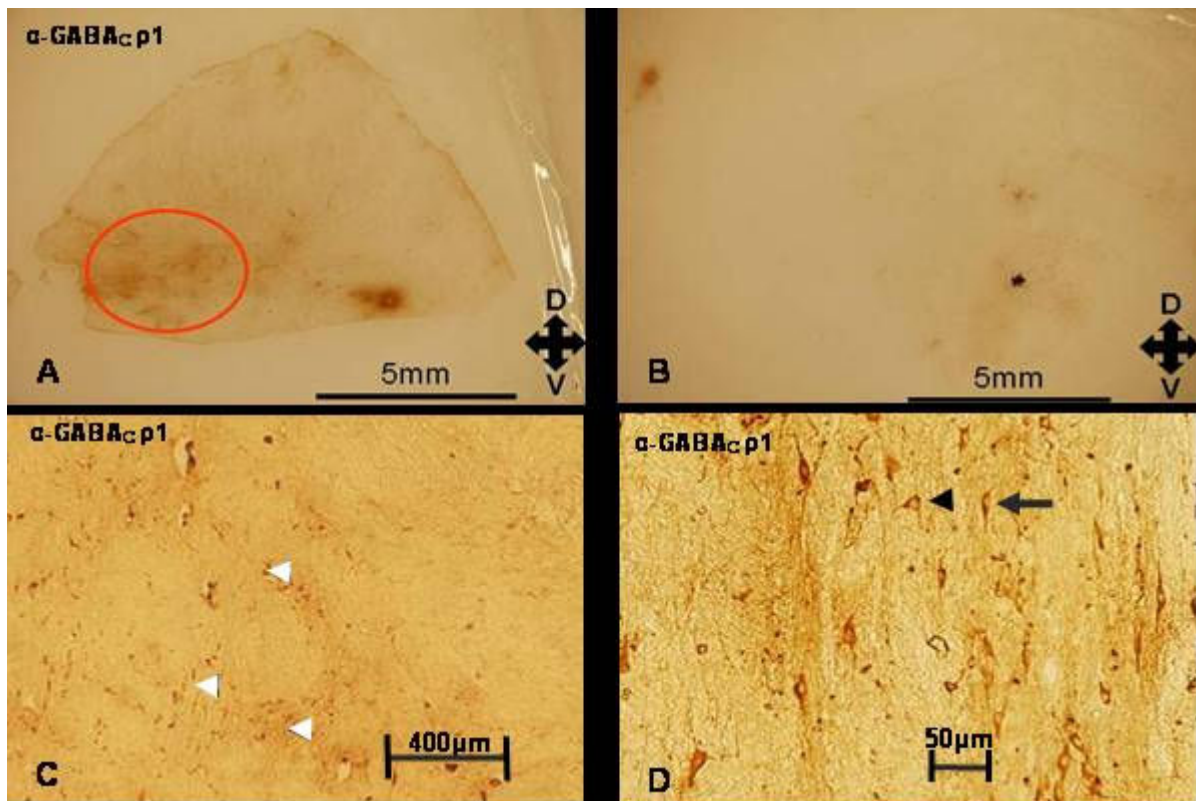


Fig 18. Localización de α -GABA_c $\rho 1$ en la cabeza del núcleo caudado. A. El área dentro del círculo muestra el área donde se localizó la expresión de $\rho 1$ B. Control donde se omitió el anticuerpo primario. C. Las cabezas de flecha muestran somas. D. La cabeza de flecha muestra un soma de tipo piramidal, la flecha muestra un soma de tipo fusiforme, ambos tipos con localización GABA_c $\rho 1$. **Abreviaciones** D, dorsal; V, ventral; cortes a 30 μ m. **Aumentos:** A y B. Tomadas en microscopía de luz transmitida. C. 4X. D. 10X.

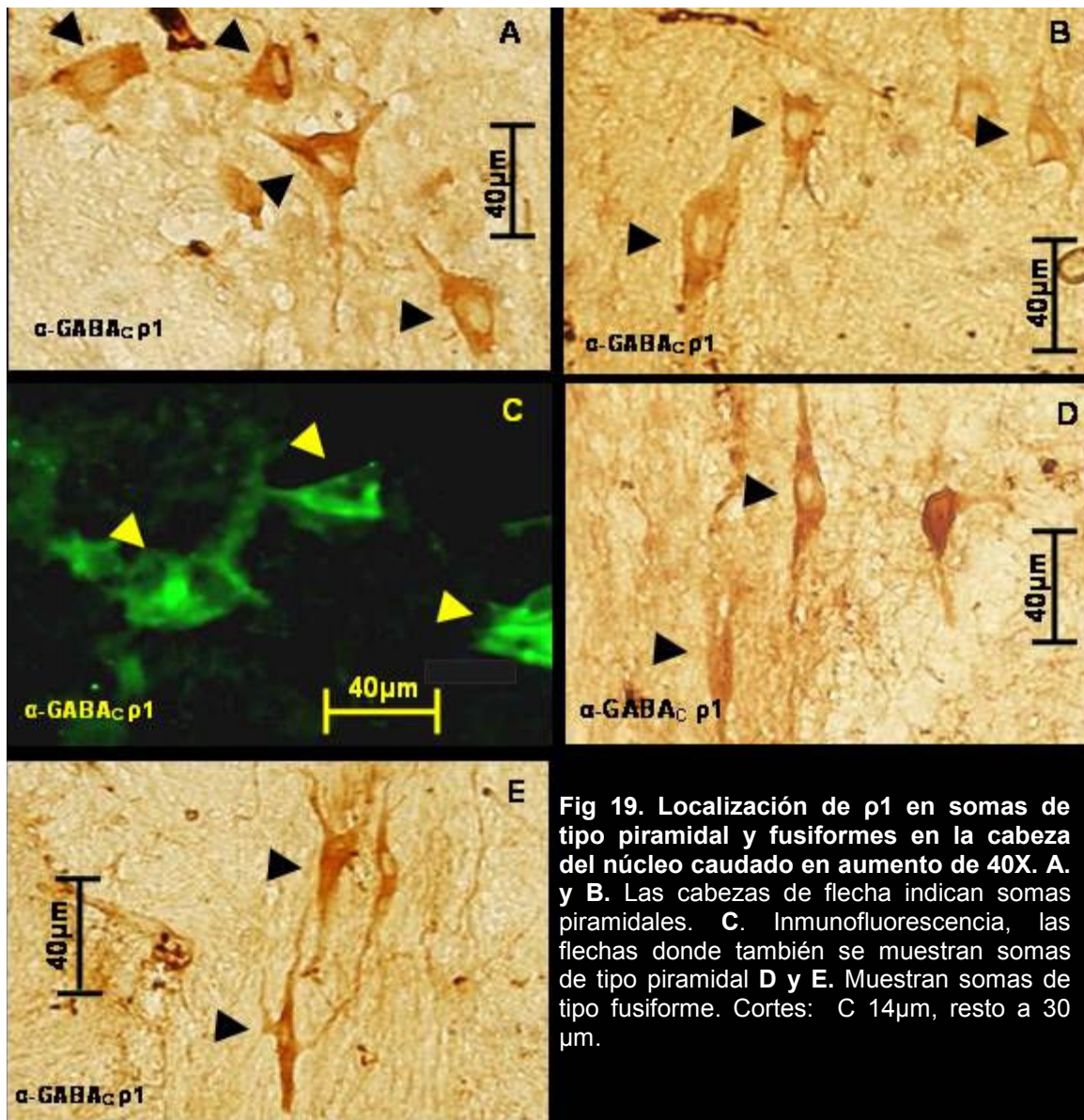


Fig 19. Localización de p1 en somas de tipo piramidal y fusiformes en la cabeza del núcleo caudado en aumento de 40X. A. y B. Las cabezas de flecha indican somas piramidales. C. Inmunofluorescencia, las flechas donde también se muestran somas de tipo piramidal D y E. Muestran somas de tipo fusiforme. Cortes: C 14 μ m, resto a 30 μ m.

Caracterización de la región implicada en la localización del receptor GABA_C p1 en la cabeza del núcleo caudado

Para determinar el área inmunorreactiva en la cabeza del núcleo caudado se realizó la tinción de hematoxilina eosina, los resultados se muestran en la figura 20A, la figura 20B muestra un aumento de la región reportado con la presencia del receptor GABA_C p1, ambas figuras son fotografías tomadas en microscopía de luz transmitida.

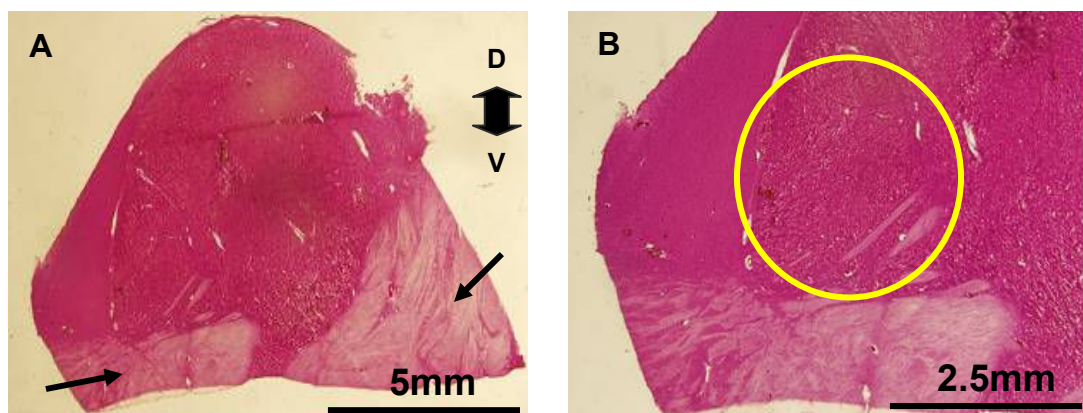


Fig 20. Sección frontal de la cabeza del núcleo caudado teñido con hematoxilina eosina. A. Tinción con hematoxilina eosina de la cabeza del núcleo caudado, las flechas indican regiones compuestas por fibras. **B.** La región dentro del círculo indica el área que fue detectada con inmunorreacción. **Abreviaciones:** D dorsal y V ventral.

Posteriormente se identificaron los tipos de neuronales involucrados en la inmunodetección, con apoyo de la tinción de Golgi rápido, los resultados se muestran en la figura 23.

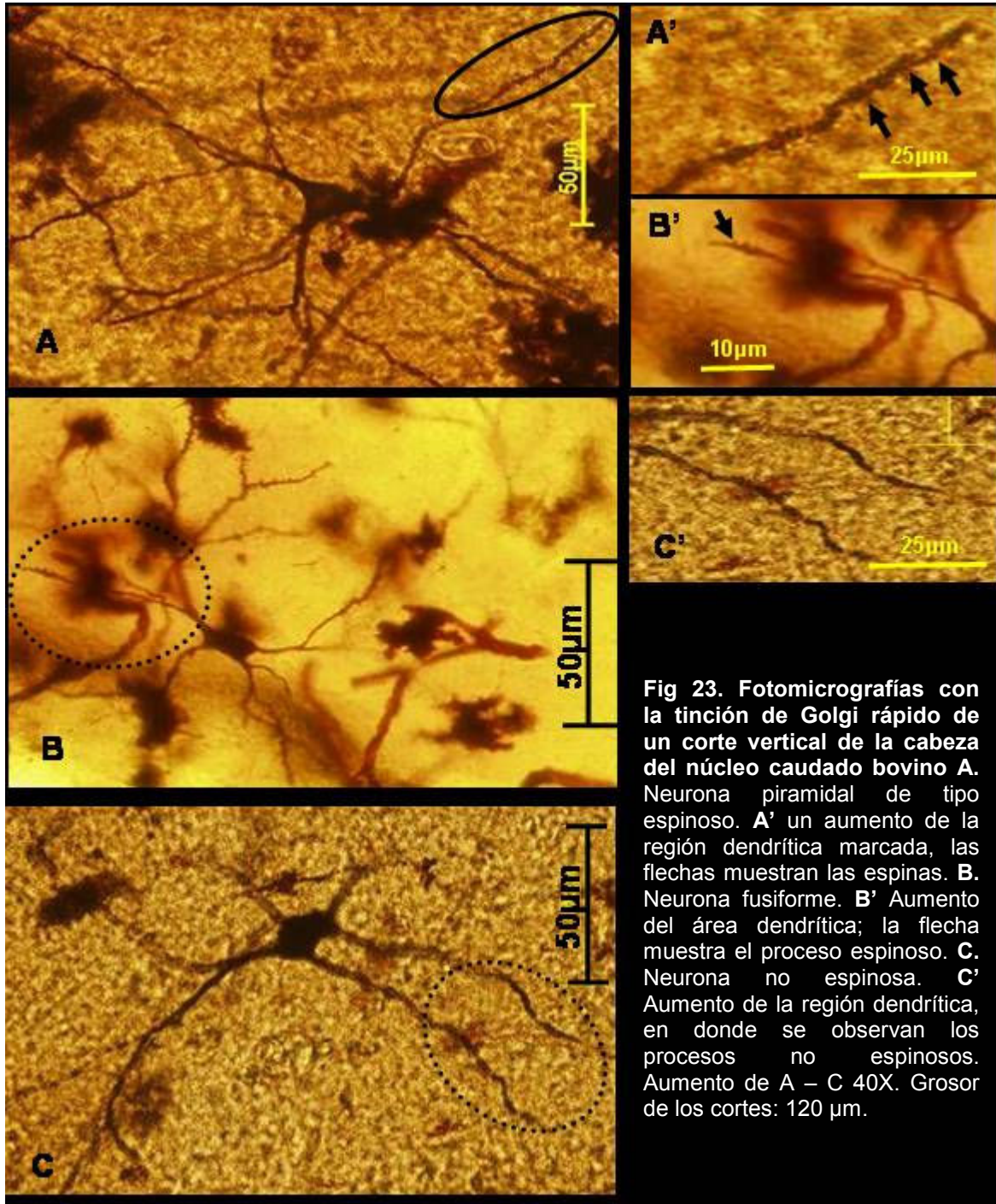


Fig 23. Fotomicrografías con la tinción de Golgi rápido de un corte vertical de la cabeza del núcleo caudado bovino **A.** Neurona piramidal de tipo espinoso. **A'** un aumento de la región dendrítica marcada, las flechas muestran las espinas. **B.** Neurona fusiforme. **B'** Aumento del área dendrítica; la flecha muestra el proceso espinoso. **C.** Neurona no espinosa. **C'** Aumento de la región dendrítica, en donde se observan los procesos no espinosos. Aumento de A – C 40X. Grosor de los cortes: 120 µm.

Western Blot

La figura 21 muestra los resultados obtenidos por el análisis de Western blot, donde se muestran los tejidos que contienen la subunidad $\rho 1$.

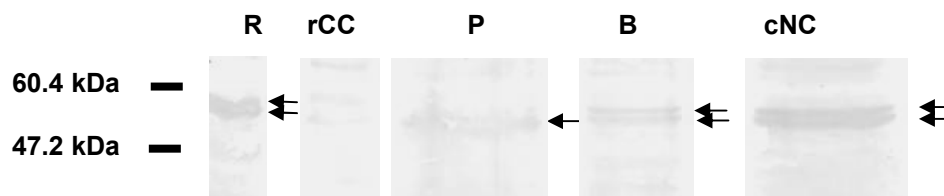


Fig 21. Western blot con uso de anticuerpo $GABA_C \rho 1$. Las flechas que se encuentran a lado derecho indica las bandas que se ubican con un peso aproximado a los 50kDa, las flechas dobles indican la presencia de posibles variantes alternativas. El peso molecular en kDa está indicado a la izquierda (Invitrogen). **Abreviaciones:** P, puente de Varolio; B, bulbo raquídeo; cNC, cabeza del núcleo caudado; rCC rodilla del cuerpo calloso y R, retina. El número total de cerebros fueron 5 y de experimentos realizados fue de 8 (N=5 y n=8).

La figura 22 es una fotografía del control del análisis de Western blot, donde se omitió la colocación del anticuerpo primario (anti- $GABA_C \rho 1$) pero no del anticuerpo secundario, como se observa no se encontró inmunorreacción a la altura de $\rho 1$.

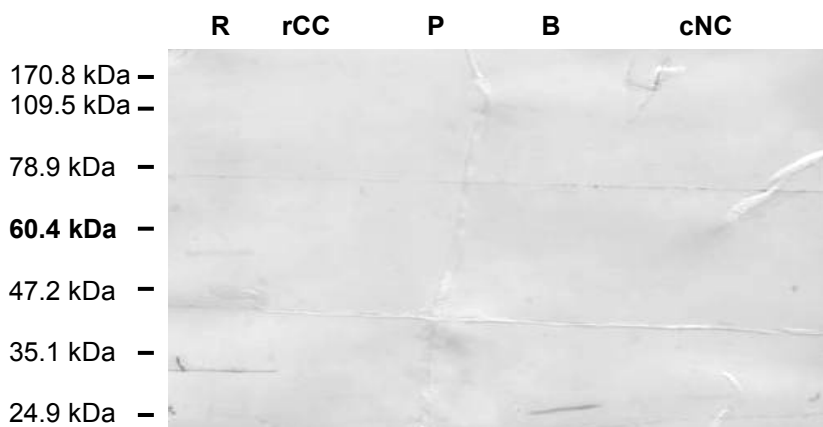


Fig 22. Fotografía de membrana de nitrocelulosa obtenida por análisis de Western blot donde se omitió el uso de anticuerpo $GABA_C \rho 1$. Se observa una clara ausencia de bandas que indiquen la presencia de $GABA_C \rho 1$ en comparación con lo obtenido cuando se coloca el anticuerpo dirigido a este receptor (Fig. 18). **Abreviaciones:** R, retina; rCC rodilla del cuerpo calloso; P, puente de Varolio; B, bulbo raquídeo y cNC cabeza del núcleo caudado.

En resumen la tabla No. 2 muestra la población utilizada por región y la eficiencia de la inmunorreacción anti-GABA_C p1.

Tabla No. 2.
Muestra la región utilizada y el número de ejemplares utilizados en la inmunorreacción anti-GABA_C p1. Donde N es igual al total de cerebros utilizados y n es igual a la cantidad de cortes.

Tejido utilizado	Población
Núcleo Caudado (región rostral)	N = 7; n = 55
Protuberancia Anular	N = 7 ; n = 140
Bulbo Raquídeo (Región proximal)	N = 11; n = 151
Bulbo Raquídeo (Región medial)	N = 11; n = 60
Bulbo Raquídeo (Región distal)	N = 11; n = 45
Cuerpo Calloso	N = 5; n = 50

DISCUSIÓN

Como se mencionó el GABA es el neurotransmisor inhibitorio más ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos adultos, donde se presenta como un recurso de inhibición tanto pre como postsinápticamente, dicha inhibición puede ser mediada por receptores GABA_C; el presente estudio apoya la hipótesis de que estos receptores se les puede localizar en diversas estructuras del SNC además de la retina.

Bulbo raquídeo

Los resultados del presente estudio por la técnica de inmunohistoquímica indirecta, indican que la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C se expresa en los núcleos cuneiforme, cuneiforme accesorio, olivar inferior, reticular y delgado de esta estructura en el cerebro bovino.

Con base a esta consideración existen diversos reportes que evidencian la participación del GABA en el tallo cerebral; por ejemplo Lue y cols en 1993 señalan que el GABA puede ser localizado mediante técnicas de inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos tanto a la GAD como al GABA en el núcleo **Cuneiforme** (específicamente en regiones del neuropilo) del tallo cerebral de rata; Strata y colaboradores en 2003 realizaron estudios de localización mediante técnicas de inmunohistoquímica e indican que este neurotransmisor se encuentra en los núcleos **cuneiforme y delgado**, dicha presencia puede ser encontrada diversas especies como la ratas, gatos y diferentes especies de primates.

Respecto a la expresión del receptor GABA_C en el tallo cerebral también existen evidencias que apoyan la presencia de este receptor en dicha estructura: Wegelius y cols., en 1998 indican que mediante técnicas de RT-PCR se puede localizar el RNAm que codifica a la subunidad $\rho 1$ en el tallo cerebral de ratas adultas, de manera interesante indican que la expresión es en menor proporción que lo reportado en retina; Milligan y cols en el 2004 determinaron la expresión de las tres subunidades ($\rho 1 - \rho 3$) de dicho receptor por técnicas de RT-PCR en el tallo cerebral de rata, en este mismo estudio, por análisis de hibridación *in situ* utilizando sondas selectivas para las tres subunidades muestran que sólo la subunidad $\rho 1$ está presente en esta estructura, específicamente en neuronas del núcleo vagal dorsal (NVD) y en el núcleo del tracto solitario (NTS). El hallazgo fue consistente cuando se detectó la proteína por métodos inmunohistoquímicos.

De manera especial estudios de RT-PCR realizados en nuestro laboratorio determinaron la expresión de la subunidad $\rho 1$ del receptor $GABA_C$, en el bulbo raquídeo bovino (López-Chávez et al, 2005).

Existen reportes que demuestran la participación funcional del receptor $GABA_C$ en el tallo cerebral: fue el mismo grupo de Milligan en 2004, quienes determinaron electrofisiológicamente por la técnica de fijación de corriente en rebanadas del tallo cerebral de rata, que neuronas inmunorreactivas a $GABA_C \rho 1$ del NTS y NVD, fueron despolarizadas por el agonista selectivo de este receptor (CACA); sin embargo, cuando colocaron el antagonista (TPMPA) aun a altas concentraciones sólo disminuyeron las respuestas producidas por CACA, de manera interesante cuando se colocó bicuculina (antagonista de receptores $GABA_A$) posterior a la recuperación por CACA, se observó que las respuestas también fueron disminuidas significativamente; posteriormente concentraciones bajas del GABA (selectivas de receptores $GABA_C$) produjeron potenciales postsinápticos inhibitorios, los cuales también a altas concentraciones de TPMPA no fueron eliminados por completo, cuando se perfundió bicuculina, estos fueron abolidos completamente, lo que sugirió la participación de los dos receptores al GABA de tipo ionotrópico: $GABA_C$ y $GABA_A$ en el NVD y NTS. Estos experimentos sugieren la presencia de receptores híbridos, es decir formados por una combinación de subunidades $GABA_C$ y $GABA_A$.

La hipótesis del receptor híbrido conformado por las subunidades $\rho 1$ de $GABA_C$, $\alpha 1$ y $\gamma 2$ de $GABA_A$, fue apoyada por inmunohistoquímica, ya que dichas subunidades co-expresan en una misma neurona. Finalmente mediante co-inmunoprecipitación se determinó que estas tres subunidades se asocian en estas neuronas muy posiblemente formando heterómeros funcionales (Milligan et al, 2004).

Respecto a los tipos neuronales caracterizados por la tinción de Golgi, Parent en 1996 indica que a nivel mesobulbar están presentes tres diferentes tipos neuronales, los cuales se caracterizan por ser de los tipos redondeado u oval, triangular o piramidal y fusiformes; de ellas se indica que aquellas que presentan árboles dendríticos largos y radiales son llamadas de tipo isodendrítico; mientras que aquellas que presentan axón corto son conocidas como Golgi tipo II, las cuales son más escasas en el tallo cerebral; en el presente estudio se confirmó la presencia de tres tipos neuronales respecto la morfología del soma y dos respecto a tanto la longitud del axón (corto y largo) y al tipo de árbol dendrítico (denso y no denso).

En cuanto a la función de los núcleos implicados se conoce que el núcleo olivar inferior reciben aferencias de ganglios espinales (cervicales y torácicos superiores), y proyectan al cerebelo (fibras cuneocerebelosas) por el pedúnculo cerebeloso inferior, retransmitiendo información de los husos musculares, órganos tendinosos de Golgi y aferentes cutáneos (Parent, 1996).

Respecto a las fibras ascendentes del fascículo cuneiforme, se sabe que terminan en forma somatotópica en el núcleo cuneiforme accesorio retransmitiendo información cutáneo-sensitiva de las extremidades superiores (Olszewski & Baxter, 1954); por otra parte los núcleos reticulares bulbares presentan agrupaciones de los tipos neuronales mencionados y se caracterizan por tener diferentes tamaños, recibiendo aferencias de la médula espinal, núcleo rojo y el núcleo fastigial, retransmitiendo la información hacia el cerebelo vía pedúnculo inferior. (Brodal, 1957). En esta vía se conocen funciones inhibitorias caracterizadas por potenciales postsinápticos inhibidores bisinápticos y multisinápticos en neuronas motoras (Olszewski & Baxter, 1954).

Considerando lo anterior y lo encontrado en el presente estudio tenemos lo siguiente:

1. Los resultados apoyan la hipótesis de que la subunidad $\rho 1$ del receptor GABA_C se expresa en el tallo cerebral de los mamíferos, considerando que el nivel estructural se encuentra relativamente conservado en estas especies.
2. GABA_C representa un recurso inhibitorio topográficamente preciso, que regula (por un mayor tiempo y con alta sensibilidad al GABA) la información sensorial y motora; además coensamblando con subunidades del receptor GABA_A.
3. El hecho de no localizar la expresión proteica en los núcleos vagal dorsal y del tracto solitario, como fue reportado en 2005 por Milligan y cols., no implica su ausencia en el tallo cerebral bovino, ya que puede deberse a que la expresión en estos núcleos sea mucho menor en esta especie.
4. Por tanto GABA $\rho 1$ podría jugar un papel en la regulación de la información tanto cutáneo-sensitiva proveniente de las columnas dorsales y que se dirige al talámo dorsal, como motora proveniente de los ganglios espinales con dirección al cerebelo.

Protuberancia.

En el presente estudio no se detectó la presencia de la subunidad p1; sin embargo se tiene conocimiento que las neuronas vestibulares cuentan con receptores GABAérgicos, que son mediados por los axones de las células de Purkinje desde el cerebelo (Carpenter, 1994). Datos inmunohistoquímicos revelan que células del locus ceruleus y subceruleus contienen GABA (Kuypers, 1958), así como neuronas del núcleo del rafe, conociéndose que el receptor predominante en el área es tipo GABA_A (Bormann, 1988).

Cabeza del núcleo caudado.

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio indican que la subunidad p1 del receptor GABA_C se encuentra en esta región en neuronas de tipo oval, piramidal y fusiforme.

Los reportes sobre la presencia y actividad del GABA en esta región esta bastante documentada; sin embargo los reportes que apoyan la hipótesis de la presencia del receptor GABA_C en el núcleo caudado son escasos.

Respecto a la primera aseveración Bernardi y cols., en 1975 realizaron registros electrofisiológicos en la cabeza del núcleo caudado de rata estimulando la corteza frontal y el globo pálido, obteniendo respuestas inhibitorias por la aplicación de GABA; Bernardi y cols., en 1978 y 1981 identificaron un componente GABA_A mediante el registro intracelular en la cabeza del núcleo caudado, región que estimularon con GABA e intentaron inhibir con bicuculina y picrotoxina; de manera interesante estos fármacos no bloquearon por completo la inhibición postsináptica, lo que podría apoyar la participación de un componente GABA_C. Ribak y cols., en 1979 identificaron por inmunodetección que las interneuronas del neostriado contienen descarboxilasa del ácido glutámico (GAD).

Fisher y cols en 1986 indican que GAD se encuentra abundantemente en las neuronas espinosas; mientras que Kawaguchi y cols en 1993 y 1995 identificaron a nivel funcional los tipos celulares que contienen receptores a GABA en el neostriado y mencionan que interneuronas de disparo rápido las células silentes de bajo disparo son inmunoreactivas a GAD y que el componente es antagonizado por bicuculina, por tanto concluyen que el receptor que está presente es GABA_A. Varias investigaciones han definido que el principal receptor a GABA en este circuito es de tipo GABA_A como lo reportado por Flores-Hernández en 1994. En 2004 Waldvogel y cols indican que las

subunidades R1 y R2 del receptor GABA_B y la subunidad α_1 del receptor GABA_A se pueden encontrar en interneuronas del neocórtex del cerebro humano.

Estudios realizados por Tepper y cols., en 2004 mencionan que las neuronas predominantes en el neocórtex son las espinosas de proyección, las cuales constituyen del 77 al 97% de la población neuronal del neocórtex. Al inyectar bicuculina *in vivo* se incrementa la actividad espontánea de las neuronas espinosas, de manera importante indican que las respuestas sinápticas inhibitorias están mediadas predominantemente o exclusivamente por el receptor GABA_A en las neuronas de tipo espinoso.

Las interneuronas en las cuales GABA_A y GAD se localizan poseen un soma de tipo fusiforme o poligonal que mide entre 10 y 30 μm de diámetro y tienen dendritas que ramifican, las cuales son lisas en regiones proximales pero muy espinosas en regiones distales (Oorschot y cols, 2002).

Es conocido que neuronas GABAérgicas regulan la actividad del GABA de otras neuronas, como lo propuesto por Boller y Schmidt en 2001, donde indican que la activación del receptor GABA_C, tiene una función desinhibitoria al inhibir interneuronas en el estrato grisáceo superficial del colículo superior. Recientemente en nuestro laboratorio se encontró que membranas celulares extraídas del núcleo caudado y microinyectadas en ovocitos de *Xenopus laevis* generan corrientes que corresponden a una mezcla de receptores GABA_A y GABA_C (Rosas-Arellano, en prensa). De manera importante estos resultados apoyan lo encontrado en el presente estudio, presumiéndose que el componente GABA_C que se encuentra en el núcleo caudado puede corresponder al receptor GABA_C ρ_1 .

Western blot

El análisis por Western blot confirmó la expresión de ρ_1 en el bulbo raquídeo, cabeza del núcleo caudado, aunque la rodilla del cuerpo calloso no muestran la presencia de inmunorreacción; esta técnica muestra la presencia de una banda que se ubica alrededor de los 56kDa en el puente. Se sabe que la movilidad relativa de las bandas positivas, alrededor de 56kDa se han encontrado en ovocitos de *X. laevis* microinyectados cuando se presume la presencia de esta subunidad.

CONCLUSIONES

- El bulbo raquídeo expresa la subunidad $\rho 1$, en los núcleos cuneiforme, cuneiforme accesorio, olivar, reticular y delgado; particularmente en los somas de tipo oval, piramidal y fusiforme.
- En la cabeza núcleo caudado la subunidad $\rho 1$ se encontró en somas fusiformes y piramidales.
- La técnica de western blot confirmó la presencia de $\rho 1$ tanto en el bulbo raquídeo como en la cabeza del núcleo caudado.
- No se detectó la expresión de la subunidad $\rho 1$ en el Punte de Varolio (N = 7) ni en la rodilla del cuerpo caloso (N=5) por inmunohistoquímica, sin embargo por western blot se observó la presencia de la proteína en el Puente (N=5).
- Esto sugiere que la expresión es muy reducida y que la detección por RT-PCR puede corresponder a su expresión en un pequeño grupo de somas o transcritos presentes en las prolongaciones axónicas.

Perspectivas

Las técnicas utilizadas para la localización de la subunidad $\rho 1$ indican que la proteína se encuentra en el bulbo y núcleo caudado, no así en la Protuberancia anular ni en el rostrum ni genu del cuerpo caloso. El hecho de haber encontrado la subunidad $\rho 1$ no implica su funcionalidad a nivel de membrana plasmática, por lo que estudios electrofisiológicos que prueben su función y técnicas de inmuno-oro que muestren su localización exacta pueden dar un apoyo para poder determinar en un futuro el papel que realiza el receptor GABA_C en estas regiones.

Literatura citada

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. 2004. *Biología molecular de la célula*. 4. ed., Omega. Barcelona.
2. Bailey, ME, Albrecht BE, Johnson KJ y Darlison MG. 1999. Genetic linkage and radiation hybrid mapping of the three human GABA_C receptor rho subunit genes: GABRR1, GABRR2 and GABRR3. *Bio. Biophys.* **2-3**, 307-12.
3. Bernardi G, Marciani MG, Morocutti C y Giacomini P. 1975. The action of GABA on rat caudate neurones recorded intracellularly. *Brain. Res.* **3**, 511-5.
4. Bernardi G, Marciani MG, Morocutti C y Giacomini P. 1978. The action of picrotoxin and bicuculline on rat caudate neurons inhibited by GABA. *Brain. Res.* **102**, 379-84.
5. Bernardi G, Marciani MG, Stanzione P, Cherubini E y Mercuri N. 1981. Evidence in favour of GABA as an inhibitory transmitter in the rat striatum. *Adv. Biochem. Psychophar.* **30**, 69-77.
6. Billups D, Hanley JG, Orme M., Attwell D y Moss SJ. 2000. GABA_C receptor affinity is modulated by interaction with MAP1B. *J. Neurosci.* **20**, 8643-8650.
7. Boller M y Schmidt M. 2001. GABA_C Receptor in the rat Superior Colliculus and Pretectum Participate in Synaptic Neurotransmission. *J. Neurophysiol.* **89**, 2035-2045.
8. Bormann J. 1988. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci.* **11**, 112-116.
9. Bormann J y Feingenspen A. 1995. GABA_C receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 515-519.
10. Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B y Grte M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat Brain. *J. Neurochem.* **70**, 899-907.
11. Brodal A. 1957. *The reticular formation of the brain stem. Anatomical Aspects and functional correlations*. Charles C Thomas, Springfield, IL.
12. Butler AB. 1996. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy*. Wiley-Liss. USA.
13. Byrne JH y Roberts JL. 2004. *From Molecules to Networks. An introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*. Elsevier. London UK.
14. Calvo DJ, Vazquez AE y Miledi R. 1994. Cationic modulation of rho 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12725-9.
15. Cardinalli PD. 1992. *Manual de Neurofisiología*. Díaz de Santos. Madrid, España.
16. Carpenter MB. 1994. *Neuroanatomía Fundamentos*. 4ta ed. Panamericana. Buenos Aires Argentina.

17. Charara A, Pare JF, Levey AI y Smith Y. 2005. Synaptic and extrasynaptic GABA-A and GABA-B receptors in the globus pallidus: an electron microscopic immunogold analysis in monkeys. *Neurosci.* **131**, 917-33.
18. Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galván A, Kemper T, Debassio W, Galler J, Morgan P, Durán P y Díaz-Cintra S. 1997. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hipp.* **7**, 192-203.
19. Croci C, Brandstätters JH y Enz R. 2003. ZIP3, a new splice variant of the PKC- ξ -interacting protein family binds to GABA C receptors, PKC- ξ , and Kv β 2. *J. of Biol. Chem.* **278**, 6128-6135.
20. Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada SS, Antonarakis E, Guggino WB, Uhl GR y Kazazian HHJ. 1991. "Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl. Acad. Sci.* **88**, 2673-2677.
21. Demuro A, Martínez-Torres A y Miledi R. 2000. Functional and pharmacological properties of GABA rho1 delta 51 receptors. *Neurosci Res* **36**, 141-6.
22. Doble AILM. 1992. Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Neurosci.* **13**, 76-81.
23. Dong CJ, Picaud SA y Werblin FS. 1994. GABA Transporters and GABA C like receptors on cat fish cone – but not rod- driven horizontal cells. *J. Neurosci.* **14**: 26-2658.
24. Drew CA y Johnston G. 1994. Bicuculline and baclofen insensitive gamma-aminobutyric acid binding to rat cerebellar membranes. *J. Neurochem.* **58**, 1087-1092.
25. Enz R, Brandstätter J, Hartveit E, Wässle H y Bormann J. 1995. Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur J. Neurosci.* **7**, 1495-1501.
26. Enz R, Brandstätter J, Wässle H y Bormann J. 1996. Immunocytochemical localization of the GABA C receptor rho subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* **16**, 4479-4490.
27. Enz R y Cutting GR. 1999. GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur. Neurosci.* **11**, 41-50.
28. Euler T, Schneider H y Wässle H. 1996. Glutamate responses bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.* **16**, 2934-2944.
29. Feingenspan A, Wässle H y Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl channels in rat retinal bipolar cells. *Nat.* **361**, 159-162.
30. Feingenspan A y Bormann J. 1994. Differential pharmacology of GABA A and GABA C receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol Pharmacol.* **288**, 97-104.

31. Filippova N, Dudley R y Weiss DS. 1999. Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human $\rho 1$ GABAC receptors. *J. Physiol.* **518**, 385-399.
32. Filippova N, Sedelnikova A, Zong Y, Fortinberry H y Weiss DS. 2000. Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **57**, 847-856.
33. Filippova N, Wotring EV y Weiss SD. 2004. Evidence that the TM1-TM2 loop contributes to the $\rho 1$ GABA receptor pore. *J. of Mol. Biol.* **3**, 1-19.
34. Fisher RS, Buchwald NA y Hull CD. 1986. The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. *Brain Res.* **398**, 148-56.
35. Fletcher EL, Koulen P y Wässle H. 1998. GABAA and GABAC receptors on mammalian rod bipolar cells. *Eur J. Neurosci.* **396**, 351-365.
36. Flores-Hernandez J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J. 1994. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol.* **5**:2246-56.
37. Guyton AC. 1994. *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso*. Panamericana. 2ed. Madrid España.
38. Hackman A, Wang TL, Guggino WB, y Cutting GR. 1997. The N-terminal domain of human GABA receptor $\rho 1$ subunits contains signal for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 13750-13757.
39. Hanley JG, Jones EM y Moss SJ. 2000. GABA receptor $\rho 1$ subunit interacts with a novel splice variant of the glycine transporter, GLYT-1. *J. Biol Chem.* **275**, 840-846.
40. Hill DR, Bowery NG, y Hudson AL. 1984. Inhibition of GABA_B receptor binding by guanyl nucleotides. *J. Neurochem.* **42**, 652-657.
41. Jones KA, Borowsky B y Tamm JA. 1998. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nat.* **396**, 674-679.
42. Kandel RE, Schwartz HJ y Jessell MT. 2001. *Principios de Neurociencia*. 4ed. Mc Graw Hill – Interamericana. Madrid España.
43. Kawaguchi Y. 1993. Physiological, Morphological, and Histochemical Characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. of Neurosci.* **13**, 4908-4922.
44. Kawaguchi Y, Wilson ChJ, Augood SJ y Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS.* **18**, 527-535.
45. Kolb B y Wishaw QI. 1990. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. W H Freeman & Co., Third edition. NY, USA.
46. Koulen P, Brandstätter H, Enz R, Bormann J y Wässle H. 1998. Synaptic clustering of GABA C receptor ρ subunits in the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 115-127.

47. Krnjevic K y Phillis JW. 1963. Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *Br J. Pharm. Chem.* **20**, 471-90.
48. Kuypers HGJM. 1958. *Corticobulbar connexions to the pons and lower brainstem in man. An anatomical study.* *Brain.* 81: 364-388.
49. Kusama T, Sakurai M, Kizawa Y, Uhl GR y Murakami H. 1995. GABA rho1 receptor: inhibition by protein kinase C activators. *Eur J. Pharmacol.* **291**, 431-434.
50. Kusama T, Hatama K, Saito K, Kizawa Y y Murakami H. 2000. Activation of protein kinase C induces internalization of the GABA(C) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **50**, 429-435.
51. López - Chávez A, Miledi R y Martínez-Torres A. 2005 Cloning and functional expresión of the bovine GABA-C $\rho 2$ subunit molecular evidence of the widespread distribution in the CNS. *Neurosci. Res.* **53**, 421-427.
52. López VHE y García CJ. 2003. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en transtornos del sistema nervioso central. *Sal. Men.* **26**, 66-72.
53. Lukasiewicz PD. 2005. Synaptic mechanisms that shape visual signaling at the inner retina. *Prog. Brain. Res.* **147**, 205-18. Review.
54. Lue JH, Shieh JY, Chen KN y Wen CY. 1993. Synaptic relationships between GABA-immunoreactive boutons and primary afferent terminals in the rat cuneate nucleus. *Neurosci.* **56**, 973-979.
55. Macdonald RL y RW Olsen. 1994. GABA A receptors channels. *Annu Rev. Neurosci.* **17**, 569-602.
56. Martínez-Torres A, Vázquez AE, Panicker MM y Miledi R. 1998. Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the rho1 gamma-aminobutyrate receptor. *Proc Natl. Acad. Sci.* **95**, 4019-22.
57. Martinez-Torres A y Miledi R. 2004. Expression of functional receptors by the human gamma-aminobutyric acid A gamma 2 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:3220-3.
58. Meixner A, Haverkamp S, Wässle H, Fuhrer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner RE, Lassmann H, Wiche G y Propst F. 2000. MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**, 1169-1178.
59. Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J y Deuchars SA. 2004. Evidence for Inhibition Mediated by Coassembly of GABA-A and GABA-C Receptor Subunits in Native Central Neurons. *The J. of Neurosci.* **24**, 7241-7250.
60. Mosental WT. 1995. A textbook of Neuroanatomy. Parthenon Publishing. UK.

61. Nayeem N, Green TP, Martin IL y Barnard EA. 1994. Quaternary structure of the native GABA-A receptor determined by electron microscopic image analysis. *J. Neurochem.* **62**, 815-818.
62. Nieto A, Nieto D, Cappello S. 1978. Comparative anatomy of the caudate nucleus in different mammals. *Bull Los Angeles Neurol Soc.* **43**, 91-4.
63. Nistri A y Silvilotti L. 1985. An unusual effect of gamma aminobutyric acid on synaptic transmission of frog tectal neurons in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **85**, 917-922.
64. Ogurusu T y Shingai R. 1996. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta.* **7**, 15-8.
65. Olivares R, Montiel J y Aboitiz F. 2001. Species differences and similarities in the fine structure of the mammalian corpus callosum. *Brain, Behav. Evol.* **57**, 98-105.
66. Olszewski J. y Baxter D. 1954. *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem.* J. B. Lippincott, Philadelphia.
67. Oorschot DE, Tunstall MJ y Wickens JR. 2002. Local Connectivity Between striatal spiny projection neurons: A re-evaluation. *The Basal Ganglia VII. Adv. in beh. biol.* **52**, 421-431.
68. Pan ZH y Lipton SA. 1995. Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J. Neurosci.* **15**, 2668-2679.
69. Parent A. *Carpenter's Human Neuroanatomy.* Ninth ed. Williams & Wilkins. USA.
70. Pasternack M, Boller M, Pau B y Schmidt M. 1999. GABAA and GABAC receptors have contrasting effects on excitability in superior colliculus. *J. Neurophysiol.* **82**, 2020-2023.
71. Pattnaik B, Jellali A, Sahel J, Dreyfus H y Picaud S. 2000. GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J. Neurosci.* **20**, 6789-6796.
72. Polenzani L, Woodward RM y Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 4318-4322.
73. Qian H y Dowling JE. 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nat.* **361**, 162-164.
74. Qian H y Dowling JE. 1995. GABA A and GABA C receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurophysiol.* **74**, 1920-1928.
75. Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE y Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **50**:1024-30.

76. Ribak CE, Vaughn JE y Roberts E. 1979. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* **15**, 261-83.
77. Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A y Tongiorgi E. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor 1 and 2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur. J. of Neurosci.* **15**, 1747.
78. Sambrook KJ, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2da ed. New York: Cold Spring Harbor Lab.
79. Sieghart W. 1992. GABAA receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Tren. Phar. Sci.* **13**, 446-450.
80. Silvilotti L y Nistri A. 1989. Pharmacology of a novel effect of gamma aminobutyric acid on the frog optic tectum in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **164**: 205-212.
81. Strata F y Cherubini E. 1994. Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurons during development. *J. Physiol.* **480**, 493-503.
82. Strata F, Coq JO y Kaas JH. 2003. The chemo- and somatotopic architecture of the Galago cuneate and gracile nuclei. *Neurosci.* **116**, 831-50.
83. Storustovu S y Ebert B. 2005. Pharmacological Characterisation of Agonists at {delta}-containing GABAA Receptors: Functional Selectivity for Extrasynaptic Receptors is Dependent on Absence of {gamma}2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **11**, 1-40.
84. Takahashi KI, Miyoshi S y Kaneko A. 1994. Two components of GABA – induced currents in catfish retinal horizontal cells. *J. Physiol.* **44**, 141-144.
85. Tepper, JM, Koós T y Wilson C. 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trns. in Neurosci.* **27**, 662-669
86. Trejo MF. 2005. *Co-expresión de las subunidades GABA-A γ 2 y GABA-C ρ 1: Estudio funcional de la mutación γ 2K289M asociada a epilepsia generalizada y convulsiones febriles plus (GEFS+)*. Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología) Instituto de Neurobiología UNAM – Juriquilla, Querétaro.
87. Trudell JR y Bertaccini E. 2004. Comparative modeling of a GABAA alpha1 receptor using three crystal structures as templates. *J. Mol. Graph. Model.* **23**, 39-49.
88. Waldvogel HJ, Billinton A, White JH, Emson PC y Faull RL. 2004. Comparative cellular distribution of GABAA and GABAB receptors in the human basal ganglia: immunohistochemical colocalization of the alpha 1 subunit of the GABAA receptor, and the GABABR1 and GABABR2 receptor subunits. *J. Comp. Neurol.* **15**, 339-56.
89. Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M y Reeben M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 350-357.

90. Wellis DP y Werblin FS. 1995. Dopamine modulates GABA C receptors mediating inhibition of calcium entry into and transmitter release from bipolar cell terminals in tiger salamander retina. *J. Neurosci.* **15**, 4748-4761.
91. Woodward RM, Polenzani L, y Miledi R. 1992. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive g-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes I. effects of Cl-channel inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **42**, 165-173.
92. Woodward RM, Polenzani L y Miledi R. 1993. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acid A and gamma-aminobutyric acid B receptor agonists and antagonists. *Mol. Pharmacol.* **43**, 609-25.
93. Zhang J y Slaughter 1995. Preferential suppression of the ON pathway by GABA C receptors in goldfish and chicken retinas. *J. Comp. Neurol.* **280**, 15-26.
94. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL y Squire LR. 1999. *Fundamental Neuroscience*. Acade. Press. US.

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience Research

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA rho1 receptor

Article Type: Research Report

Section/Category: Molecular Neuroscience

Keywords: Caudate nucleus, brain stem, GABAC receptor, plasma membranes microtransplant; *Xenopus laevis* oocyte, neurotransmitter.

Corresponding Author: Dr Ataúlfo Martínez-Torres, Dr

Corresponding Author's Institution: Instituto de Neurobiología Universidad Nacional Autónoma de México

First Author: Abraham Rosas-Arellano, M en C

Order of Authors: Abraham Rosas-Arellano, M en C; Lenin David Ochoa-de la Paz, Dr; Ricardo Miledi, Dr; Ataúlfo Martínez-Torres, Dr

Manuscript Region of Origin: MEXICO

Abstract: GABAC receptors were originally found in the mammalian retina and recent evidence shows that they are also expressed in several areas of the brain, including caudate nucleus, brain stem, pons and corpus callosum. In this study plasma membranes from the caudate nucleus were microinjected into *X. laevis* oocytes. This led the oocyte plasma membrane to incorporate functional bicuculline-resistant, Cl⁻-conducting bovine GABA receptors, similar to those of the retina. Immunolocalization of the GABA ρ 1 subunit revealed its expression in bovine neurons in the head of the caudate as well as in the olive, cuneiform and reticular nuclei of the brain stem. Interestingly, the same antibodies failed to show expression in the callosum and pons, where the GABA ρ 1 mRNA was previously detected.

The cloned GABA ρ 1 sequence predicts a protein with 478 amino acids and 90-95% similarity to other GABA ρ 1 subunits. Oocytes injected with the cDNA express a non-desensitizing, homomeric receptor with a GABA EC_{50} of 6.0 μ M and a Hill coefficient of 1.8.

The results confirm the presence of GABAC receptor mRNAs in several areas of the mammalian brain and show that some of these areas express functional GABA ρ 1 receptors that have the classic GABAC receptor characteristics.

1. Introduction

The GABA_C receptors were first described as a bicuculline-resistant, baclofen-insensitive and Cl⁻-conducting component of the currents generated by GABA acting on GABA receptors expressed by mRNA from the bovine retina (Polenzani et al, 1991). These receptors are highly expressed in the bipolar neurons, where they determine the time course and extent of inhibition which, in turn, modulates the excitatory transmission from bipolar to ganglion cells (Lukasiewicz et al, 2004). Recent evidence indicates that the receptor is expressed also in the brain, where some neurons of the cerebellum, hippocampus and vision-related areas express the mRNA of at least one of the three subunits (ρ 1- ρ 3) that compose the GABA_C receptor family (Alakuijala et al 2006, Boller & Schmitd 2003, Liu et al 2004, López-Chavez et al 2005, Rozzo et al 2002). Although GABA_A receptors play a central role in these areas, the expression of GABA_C subunits suggests they are probably also involved in GABAergic neurotransmission; acting alone or in combination with GABA_A subunits. Strong evidence for the heteromeric assembly of GABA_A and GABA_C subunits points to their potential to form receptors, with mixed pharmacological and electrophysiological properties, such as those found in the brainstem and lateral geniculate nucleus of the rat (Milligan et al 2004, Schlicker et al 2004). It is thus very important to precise the cellular distribution of the GABA_C subunits in the brain in order to understand their functional role in the GABAergic system.

We recently found mRNA transcripts of the ρ 1 and ρ 2 subunits in the bovine brain stem, caudate, pons, cerebellum, pituitary and corpus callosum (López-Chávez et al 2005). Considering that, in several animal species,

electrophysiological recordings from these areas are consistent with a GABA_A-like class of receptor, we questioned if the $\rho 1$ and $\rho 2$ mRNAs found, and/or the receptors they encoded, were functional. We have already reported the molecular cloning of the $\rho 2$ subunit from bovine cerebellum and showed that the encoded receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, generate GABA-currents with properties typical of GABA_C receptors (Lopez-Chavez et al 2005). In this work we found that oocytes injected with plasma membranes isolated from the bovine retina and caudate nucleus generate GABA_C-currents; and show also the cellular immunolocalization of the GABA $\rho 1$ subunit in the caudate nucleus and brain stem. We also cloned the $\rho 1$ receptor and provide evidence that its cDNA expresses fully functional receptors.

2. Material and Methods

Adult cow tissues were obtained from local slaughterhouses, either in Santa Ana, California or Querétaro, México and transported on ice. The retinas, brain stem and caudate nucleus were selected for RNA extraction, membrane preparation and immunostaining.

2.1 RNA extraction and PCR cloning. Total RNA from the retina was obtained by the standard phenol-guanidinium method of Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). A partial sequence of the $\rho 1$ subunit, previously obtained (López-Chávez et al 2005), was used as starting point to isolate the whole open reading frame by using consensus primers corresponding to the amino- and carboxi-terminus of other mammalian $\rho 1$ subunits. The amplified cDNA was cloned into pGEM-T-Easy (Promega), sequenced and then shuttled as a

BamH1-Xho1 fragment into pcDNA3 (Invitrogen). For expression, 18 nl of pcDNA3-bp1 (1 μ g/ μ l) was injected directly into the nucleus of *X. laevis* oocytes.

2.2 Preparation of plasma membranes. The tissue (0.5-1.0 g) was homogenized in a tefflon tissue grinder in cold dissociation-buffer plus proteinase inhibitors (Miledi et al 2002, 2004). The homogenate was centrifuged and the resulting supernatant ultracentrifugated at 100,000g for two hours. The pellet was resuspended in 5 mM glycine and ultrasonicated for 1 min before microinjection into frog oocytes.

2.3 Electrophysiological recordings. Handling of oocytes and injection of plasmids, RNA or plasma membranes have been previously reported (Miledi et al 2002, 2004). Membrane currents generated by oocytes exposed to GABA, or other neurotransmitters, were recorded using the standard two-microelectrode voltage-clamp technique (Miledi 1982). To obtain the equilibrium membrane potential for GABA receptor action, current-voltage relations were constructed by stepping the oocyte's membrane potential from -60mV to -120mV and to +40mV (in 0.2s steps) in the absence and in the presence of 1 μ M GABA.

2.4 Immunohistochemical localization of p1. This technique is based in different authors (Matute et al, 1993; Enz et al, 1996; Deuchars et al, 2001) Tissue blocks of about 1 cm were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer for 4 hours, cryoprotected by serial immersions in sucrose at 10, 20 and 30% for 3 days, and then frozen at -80°C in tissue freezing-TM (superfrost plus ®). Sections (30 μ) were obtained with a Leica

cryostat (CM 1850), washed 3 times in 1% Triton in PBS for 10 min and blocked with 1% bovine serum albumin and 1% hydrogen peroxide at 37°C for 30 minutes. The sections were incubated overnight in the primary antibody solution (1:200 dilution, goat anti-GABA ρ 1 IgG from Santa Cruz Technologies); washed three times for 30 min in 1% Triton in phosphate buffer, and then incubated with a secondary antibody (rabbit anti-goat labeled with either FITC or HRP) at a 1:1000 dilution. The reaction of HRP was developed with diaminobenzidine in the presence of hydrogen peroxide. Images were obtained in a microscope Olympus BX60 with a DP70 camera and a FITC filter.

2.5 Rapid Golgi staining. Modifications to the method (Cintra et al 1997) were adapted to process the head of caudate nucleus, that was cut in 1cm² blocks and fixed in 4.5% potassium dichromate, 1% osmium tetroxide and incubated in this solution for fourteen days on a linear shaker in the dark at room temperature. The blocks were washed for a few seconds in distilled water and placed in 0.75% silver nitrate for 24 h.

The tissue was dehydrated in alcohol gradient (50, 70, 80, 96, 100%, and a mix 1:1 ethanol–ether), embedded in nitrocellulose and sectioned (120 μ) on a microtome. Tissue sections were dehydrated in alcohol and embedded in terpineol and xylene, placed on microscope slides and fixed with Entellan® (Merck) for further observation in the light microscope.

3. Results

3.1 Injection of plasma membranes in frog oocytes. Incorporation of the plasma membranes isolated from retina and caudate nucleus lead to the

expression of several neurotransmitter receptors and ion channels, including glutamate, acetylcholine (not shown) and ionotropic GABA-receptors. The figure 1 contrasts the GABA-currents generated by oocytes injected with either retina or caudate nucleus. The fast-inward desensitizing-component is typical of a GABA_A receptor; however the GABA_C receptor is not quite obvious and was evidenced only after a high concentration of bicuculline (0.1 mM) inhibited the GABA_A receptor. Clearly, activation with smaller GABA-concentration (5 μM) in the presence of bicuculline (0.1 mM) revealed a non-desensitizing slow-inactivating component, corresponding to the GABA_C receptor. This GABA response was similar in two preparations of retina and one of caudate nucleus and the GABA_C currents were considerably smaller, yielding only about 10% of the total GABA-current generated.

We previously provided evidence for the expression of $\rho 1$ and $\rho 2$ mRNAs in the caudate nucleus (López-Chavez et al 2005). Considering that we identified the GABA_C subunit transcripts only by RT-PCR we decided to clone and express the cDNAs to probe their functional properties.

3.2 Cloning and expression of a bovine $\rho 1$ (bp1) cDNA. The bovine $\rho 1$ clone that we obtained shares between 90-95% aminoacidic sequence homology with other vertebrate $\rho 1$ genes. Analysis of the primary aminoacid sequence (Fig. 2) revealed the classic characteristic of the Cys-loop family, including a signal peptide, four hydrophobic domains corresponding to the transmembrane passes and the two cysteines that are presumed to form the neurotransmitter binding site. Fig. 2 compares the sequence of several

vertebrate $\rho 1$ receptors and highlights some of the common traits of this family. During the course of this investigation a cDNA sequence corresponding to the bp1 was uploaded to the genebank (id XP_549434). This cDNA sequence was derived by computer analysis (GNOMON) of the genomic sequence NW_978593. When compared to our cDNA, few nucleotide sequence differences were found and these did not alter the amino acid sequence: an open reading frame of 1467 bp predicting for 489 amino acid residues (Fig. 2).

Oocytes injected with bp1 cDNA generated currents typical of those elicited by GABA_C receptors: *ie* non-desensitizing slow-inactivating currents not blocked by bicuculline (Fig. 3A). The EC₅₀ for this receptor was 6 μ M and revealed a Hill coefficient of 1.8 ($n=6$ Fig. 3B). Current-voltage relations gave a reversal membrane potential around -20 mV (Kusano et al 1977) (Fig. 3C), indicating that Cl⁻ is the main ion transported through the channel opened by GABA (*cf.* Kusano et al 1977). Moreover, as for other $\rho 1$ receptor expressed (Polenzani et al 1991, Martínez-Torres et al 1998) the bp1 receptor did not rectify over the range of membrane-potentials explored (-120 to +40mV; $n=6$). An exhaustive characterization of the properties of the bp1 receptor is still necessary, for now suffice to say that glycine and β -alanine can efficiently gate the receptor-channel, similar to other $\rho 1$ receptors.

3.3 Immunolocalization of the receptor and rapid Golgi staining.

The vertebrate caudate nucleus is characterized by spiny and non-spiny GABAergic neurons. Since there is scant information on the cytoarchitecture of the bovine (*B. taurus*) caudate, we decided to determine if such neurons are

also the predominant classes in this animal. Fig. 4 shows neurons stained with the silver impregnation technique. In 7 different brains examined we found some pyramidal and fusiform neurons with or without spines.

Immunoreaction to the anti-GABA ρ 1 antibody was heavier in the most internal area of the head of the caudate. In all the preparations studied ($n=11$), the stained neurons belonged to the pyramidal and fusiform classes (Figure 5); and were distributed randomly without an apparent order. Such a distribution of neurons is typical of this brain area which is characterized by a non-layered cellular structure.

The brainstem was immunopositive to GABA ρ 1 in the olivar, reticular, cuneiform and accessory cuneiform nuclei and the labeled neurons belonged to the pyramidal, oval and fusiform classes (Fig 6).

4. Discussion

The molecular and functional properties of GABA $_C$ receptors are very interesting and considerably different from those of GABA $_A$ receptors. Because of their high GABA sensitivity and low rate of desensitization the GABA $_C$ receptors are bound to play important roles in the functions of the brain. Therefore, knowledge of the cellular distribution of GABA $_C$ receptors is necessary to understand their function. In this work we describe the distribution of the ρ 1 subunit in the bovine caudate nucleus and brain stem and provide evidence that the cloned ρ 1 subunit expresses functional, presumably homomeric, GABA $_C$ receptors when injected alone into *Xenopus* oocytes. We

show also that microtransplantation of caudate nucleus cell membranes to frog oocytes leads to the incorporation of functional GABA_A and GABA_C receptors which had been previously assembled in their native bovine cell membranes. Although small, the GABA_C component was clearly identified because of its resistance to block by bicuculline, similar to the GABA-currents generated here by oocyte injection of retina membranes or by injection of retina mRNA (Polenzani et al, 1991).

Since the GABA_C currents, elicited by oocytes injected with caudate nucleus cell membranes were quite small, it was possible that the bovine subunit was somehow incapable of generating large currents. To answer this question we cloned the $\rho 1$ subunit. Expression of this cDNA in *Xenopus* oocytes yielded $\rho 1$ -receptors that generated large currents; similar to the typical slow-desensitizing, bicuculline-resistant, non-rectifying Cl⁻ currents elicited by other GABA $\rho 1$ receptors (Calvo et al, 1994, Cutting et al 1991, Martínez-Torres et al, 1998, Polenzani et al 1991). In contrast, the current-voltage relation of $\rho 2$ -receptors shows some rectification around -100mV (López-Chávez et al 2005). The molecular bases of these properties are still unknown, although structural motifs playing a role in these characteristics may be deduced from experimental approaches involving chimeric GABA_C receptors. In this context, the residue K322 which occupies the same position in $\rho 1$ and $\rho 2$ has been held responsible for rectification of the GABA_A receptors that include the $\beta 3$ subunit (Fisher, 2002)

GABA plays a central role in the function of the mammalian brain, including the basal ganglia (Tisch et al, 2004). The caudate nucleus is divided in two main

regions: the striosome and the matrix compartment, with both areas possessing GABAergic neurons as well as GABA_A receptors; and many studies have established that the GABA_A receptors mediate the signaling from the cortex and to the globus pallidus (Chan et al, 2005, Flores-Hernández, 1994, Hitoshi et al, 2006, Tepper et al, 2004). Our work here shows that GABA_C receptors have to be taken also into account when dealing with neuronal circuits because the presence of GABA_C receptors in the brain, functioning either alone or in combination with GABA_A subunits, may confer synaptic properties not previously considered. For example, the high GABA-sensitivity and low desensitization of GABA_{ρ1} receptors may permit some pathways to be closed for long periods, and new pathways to open rapidly, without having to lay down new neuronal wiring. The possibility of having heteromeric GABA_A /GABA_C receptors, with new physiological and pharmacological properties, adds further complexity to the brain's circuitry.

Acknowledgments

We are indebted to Dr I. Martínez-Dávila for excellent technical assistance. We also thank to the INB-UNAM Molecular Biology Facility, Drs R. Arellano-Ostoa, A. Aguilar-Vázquez and S. Díaz-Miranda. This Work was supported by CONACyT 44943Q & PAPIIT IN228205, IN204806.

References

1. Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. 2006. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci.* 23, 514-20.

2. Boller M, Schmidt M. 2003. GABA_C receptors in the rat superior colliculus and pretectum participate in synaptic neurotransmission. *J Neurophysiol.* 89, 2035-45. 90, 1362.
3. Calvo DJ, Vazquez AE, Miledi R. 1994. Cationic modulation of p1-type γ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12725-12729.
4. Chan CS, Surmeier DJ, Yung WH. 2005. Striatal information signaling and integration in globus pallidus: timing matters. *Neurosignals.* 14, 281-9.
5. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single – step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-9.
6. Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galván A, Kemper T, Debassio W, Galler J, Morgan P, Durán P, Díaz-Cintra S. 1997. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus.* 7:192-203.
7. Cutting GR, Lu L, Zoghbi H, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizader C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino W, Uhl GR, Kazazian HH Jr. 1991. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) p1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2673-2677.
8. Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TFC, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. 2001. Neuronal P2X7 Receptors Are Targeted to Presynaptic Terminals in the Central and Peripheral Nervous Systems. *J. Neurosci.* 18: 7143 - 7152.

9. Enz R, Brandstätter JH, Wässle H, Bormann J. 1996. Immunocytochemical localization of the GABAC receptor rho subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16, 4479-4490.
10. Fisher JL. 2002. A lysine residue in the $\beta 3$ subunit contributes to the regulation of GABA_A receptor activity by voltage. *Mol Cell Neurosci.* 20:683-94.
11. Flores-Hernández J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J. 1994. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP” *J. Neurophysiology*, 72:2246-2256.
12. Hitoshi K, Satomi Ch, Yoshihisa T, Atsushi N. 2006. Origins of GABA_A and GABA_B Receptor-Mediated Responses of Globus Pallidus Induced after Stimulation of the Putamen in the Monkey. *J. Neurosci.* 26, 6554-6562.
13. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1977. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature.* 270, 739-41.
14. Liu B, Hattori N, Jiang B, Nakayama Y, Zhang NY, Wu B, Kitagawa K, Taketo M, Matsuda H, Inagaki C. 2004. Single cell RT-PCR demonstrates differential expression of GABA_C receptor ρ subunits in rat hippocampal pyramidal and granule cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 123, 1-6.
15. López-Chavez A, Miledi R, Martinez-Torres A. 2005. Cloning and functional expression of the bovine GABA_C $\rho 2$ subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res.* 53, 421-7.

16. Lukasiewicz PD, Eggers ED, Sagdullaev BT, McCall MA. 2004. GABA_C receptor-mediated inhibition in the retina. *Vision Res.* 44:3289-96.
17. Matute C, Nguyen Q-T, Miledi R. 1993. mRNAs coding for neurotransmitter receptors in rabbit and rat visual areas. *J. Neurosci Res.* 35: 652-663.
18. Martínez-Torres A, Vazquez AE, Panicker MM, Miledi R. 1998. Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the $\rho 1$ γ -aminobutyrate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4019-22.
19. Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 215:491–497.
20. R Miledi R, Eusebi F, Martínez-Torres A, Palma A, Trettel F. 2002. Expression of Functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection with human brain membranes. *PNAS* 99: 13238-13242.
21. Miledi R, Duenas Z, Martinez-Torres A, Kawas CH, Eusebi F. 2004. Micro-transplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *PNAS* 101: 1760-1763.
22. Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci.* 18 2004 pp. 7241-50.
23. Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:4318-22.
24. Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA_C receptor rho1 and

rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci.* 15, 1747-58.

25. Schlicker K, Boller M, Schmidt M. GABAC receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull.* 15 2004 Mar pp 91-7.
26. Tepper JM, Koos T, Wilson ChJ. 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends. Neurosci.* 27: 662-669.
27. Tisch S, Silberstein P, Limousin-Dowsey P, Jahanshahi M. 2004. The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am.* 27, 757-99.

Referees Suggestions

Eleonora Palma

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Istituto di Fisiologia Umana
3rd floor
P.le Aldo Moro, 5
I-00185 ROMA

- Tel 39 06-4991-0059
- Fax +39 06-4991-0059

- E-mail eleonora.palma@uniroma1.it

Daniel J. Calvo, Ph.D.

Instituto de Investigaciones en Ingenieria
Genetica y Biología Molecular
Obligado 2490
Buenos Aires 1428
Argentina

Tel: (54)(1) 786-8578
Fax: (54)(1) 784-5516
E-mail: dcalvo@dna.uba.ar

Nicholas C. Spitzer

University of California, San Diego
9500 Gilman Dr., La Jolla, CA 92093-0346
e-mail: nspitzer@ucsd.edu

Mitradas Panicker

National Centre for Biological Sciences
Bangalore, India
e-mail: panic@ncbs.res.in

Figure 1. Transplanting plasma membranes in *X. laevis* oocytes. GABA-currents generated by oocytes injected with plasma membranes from A) retina or B) caudate nucleus. The GABA_A component generated larger currents that desensitized rapidly and were antagonized by bicuculline (Bic). The GABA_C receptor was identified by its resistance to Bic and slow rate of desensitization.

Figure 2. Primary sequence of GABA ρ 1. Alignment of four mammalian (rat, human, mouse and bovine) and two fish (*Morone Americana* and *Fugu*) GABA ρ 1 subunits. Conserved regions such as the signal peptide (SP), the cys-loop and the four transmembrane domains (M1-4) are shaded. Three serine residues in the large intracellular loop are absent in the fish receptors.

Figure 3. Some properties of cloned bp1 receptors. A) GABA-dose / current response of (n=6) oocytes injected with bp1 cDNA. The inset shows sample currents recorded from one oocyte. B) current-voltage relation (n=6). The inset shows currents recorded previous and during application of 1 μ M GABA. Calibration bars= vertical: 100 nA, horizontal: 10s.

Figure 4. Pyramidal neurons of the bovine caudate nucleus. A and B) Spiny neuron (arrow). The arrowheads indicate the spines along the dendritic tree of this neuron. C and D) an aspiny neuron, the arrow indicating a dendritic arborization. The discontinuous rectangles indicate the amplified areas. Bar=50 μ for A and C; 3 μ for B and D.

Figure 5. Immunolocalization of GABA ρ 1 in the caudate nucleus. Positive signal of anti- ρ 1 antibody was identified in neurons (arrowheads) towards the internal region of the head of the caudate. A) Several pyramidal and fusiform neurons with immunoreaction. B) and C) Fusiform and D) Pyramidal neurons showed immunoreaction anti- ρ 1. E) Control. Bar=20 μ A. 10 μ B-E.

Figure 6. Immunolocalization of GABA ρ 1 in the brain stem. A) Horizontal cut showing the olive (ON), reticular (RN) and cuneiform (CuN) nuclei. B-F arrowheads indicating pyramidal, fusiforms and oval neurons. B, CuN; C, accessory to the CuN, D-F, RN. Bar= 30 μ C,D and H, E=50 μ G=20.

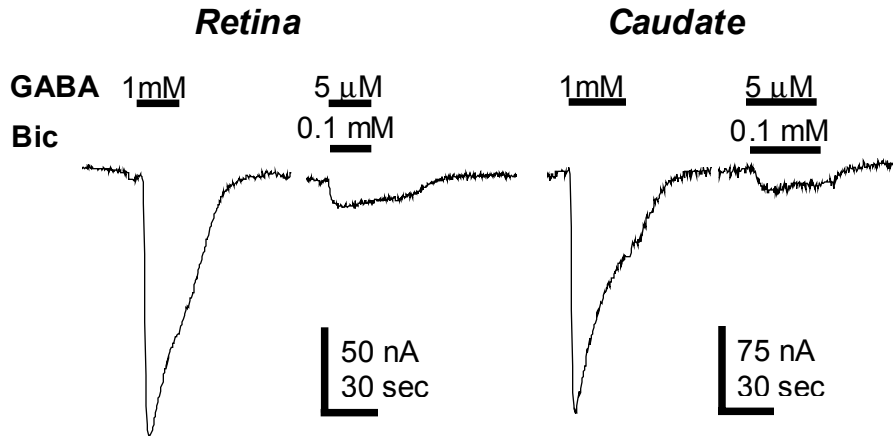


Figure 1

SP

Rat MKFG-IPLLUGWVLAAXSTVHWHPGREVHEPSEKRGSRPQRQRRGAHDDAHKQGSFILKRS 59
Mouse MKFG-IPLLUGWVLAAXSTAHWHPGREVHEPSEKRGSRPQRQRRGAHDDAHKQGSFILRRS 59
Hum MKFG-IPLLUGWVLAATSRMHWHPGREVHEPSEKRG-RPQRQRRLEHDDAHKQVSPILRRS 58
Bov MKVG-VFLLUWVWVLPTESRVHWHRKRD IQEESKRG-RLEARREEVHQFFHRQVSPVLKRS 58
Fugu HQVDPAVLVLCVWLAGAAARMAQSRGHNLETYTQSRFRREARMDGGGSHKPGR-PIYKRS 59
No zone HQVDPAVLVLCVWLAGVLEDDGPVEGSAAGDLQTEQVAKRDQ--MGGGWRSSQIRSPIYKQS 58

Rat SDITKSPITKSEQLLRIDDEDFSMRPGFGGPAIPVGVQVQVESLDSISEVDEDPIETLTYL 119
Mouse SDITKSPITKSEQLLRIDDEDFSMRPGFGGPAIPVGVQVQVESLDSISEVDEDPIETLTYL 119
Hum PDITKSPITKSEQLLRIDDEDFSMRPGFGGPAIPVGVQVQVESLDSISEVDEDPIETLTYL 118
Bov PDITKSPITKSEQLLRIDDEDFSMRPGFGGPAIPVGVQVQVESLDSISEVDEDPIETLTYL 118
Fugu PDETSLMTKSEQLLRIDDEDFTMRPAFGGPPIPVGVQVQVESLDTISEVDEDPIETLTYL 119
No zone PDETSLMTKSEQLLRIDDEDFTMRPAFGGPPIPVGVQVQVESLDTISEVDEDPIETLTYL 118

Rat RHYWRDERLSFPSTNNLSMTFDGRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVQPDG 179
Mouse RHYWRDERLSFPSSNNLSMTFDGRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVQPDG 179
Hum RHYWRDERLSFPSTNNLSMTFDGRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVQPDG 178
Bov RHYWRDERLSFPSTNNLSMTFDGRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVQPDG 178
Fugu RHYWRDERLSFQSTNNQSMTEFDSRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVYPDG 179
No zone RHYWRDERLSFPSTNNQSMTEFDSRLWKKIOWPDMFFVBSKRSFIHDTTTTDNYVILRVYPDG 178

cys-cys

Rat KVLVSLRVTVTANCMNDFSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLYUKKGNDSLKIDERIS 239
Mouse KVLVSLRVTVTANCMNDFSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLYUKKGNDSLKIDERIS 239
Hum KVLVSLRVTVTANCMNDFSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLYUKKGNDSLKIDERIS 238
Bov KVLVSLRVTVTANCMNDFSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLYUKKGNDSLKIDERIS 238
Fugu KVLVSLRVTVTANCMNDLSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLYUKKGNESLMTDDRIS 239
No zone KVLVSLRVTVTANCMNDLSRFPPLDTQDQGLEIESTAYTDDLMLSUKKGNESLMTDDRIS 238

M1

Rat LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 299
Mouse LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 299
Hum LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 298
Bov LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 298
Fugu LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 299
No zone LSQFLIQEFHTTTKLAFYSSICGVYRILYIMFTLRHHIFFPFLQTYFPATLSEVSLGWSFW 298

M2

M3

Rat IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 359
Mouse IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 359
Hum IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 358
Bov IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 358
Fugu IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 359
No zone IDRRAVPAPVPLGITTIVLHSTHITGWNASEPRVSYIKANDIYLWVSPVFPVLSVLEYAA 358

Rat VNYLITVQERKEREKLRREKISCTCGLPQPRGWILD---SSYSDGEVVDIGGY-EPENGEKP 415
Mouse VNYLITVQERKEREKLRREKISCTCGLPQPRGWILD---SSYSDGEVVDIGGY-LPENGEKP 415
Hum VNYLITVQERKEREKLRREKLPCTSGLPQPRGWILD---GNYSDGEVVDLDNY-EPENGEKP 414
Bov VNYLITVQERKEREKLRREKLPCTCGLPQPRAWILD---GSYSDGEVVDIGNY-TPENGDPE 414
Fugu VNYLSTVQERKEREKLRREKLPCTCGIGQPDDEMDIDPQITGVGSMIDINTGNYGEPENGGKQ 419
No zone VNYLSTVQERKEREKLRREKLPCTCGIGQPDDEMDIDPQITGVGSMIDINTGNYGEPENGGKQ 418

M4

Rat DREHWQLTLASERGSPQRKQKRGSYVSRINTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIFS 474
Mouse DREHWQLTLASERGSPQRKQKRGSYVSRINTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIFS 474
Hum DREHWQLTLASERSSPQRKQKRSYVSRIDTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIFS 473
Bov DREHWQLTLASERSSPQRKQKRSYVSRIDTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIFS 473
Fugu ERRLAQVALNDPQNASQMKPSRG-YVMIDIDTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIYL 477
No zone ERRLAQVALNDPQIAGQVKPSRG-YVMIDIDTHAIDKYSRIIFPAAVILFELIYUSIYS 476

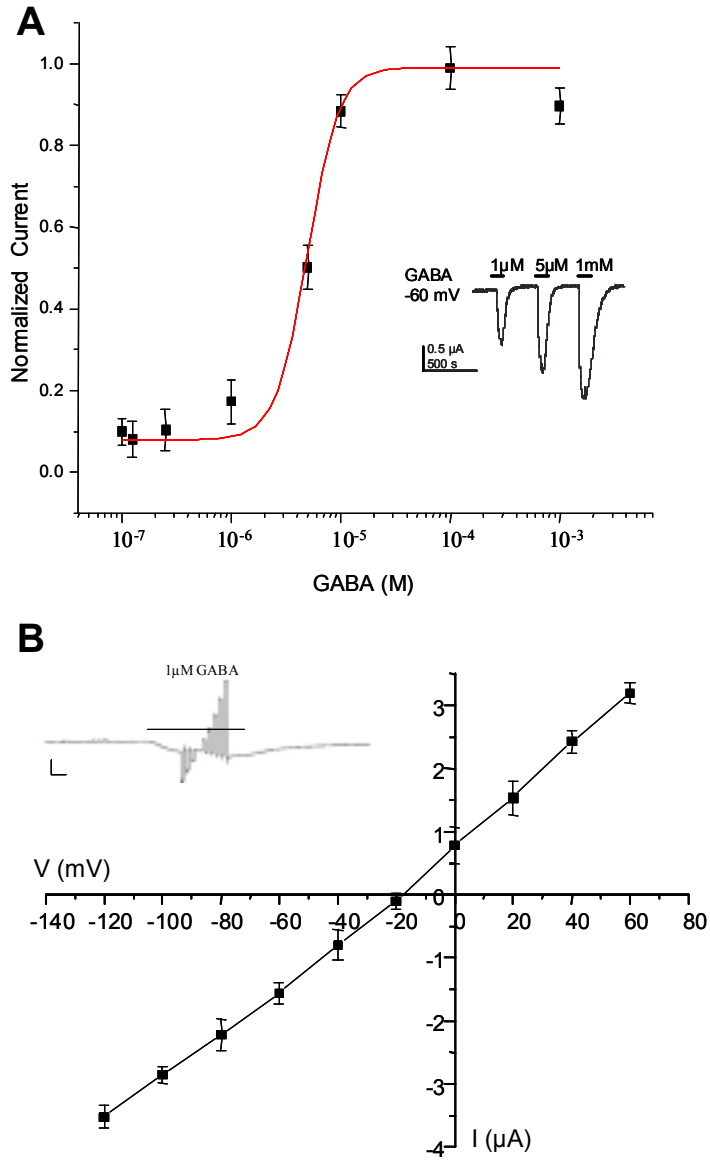


Figure 3

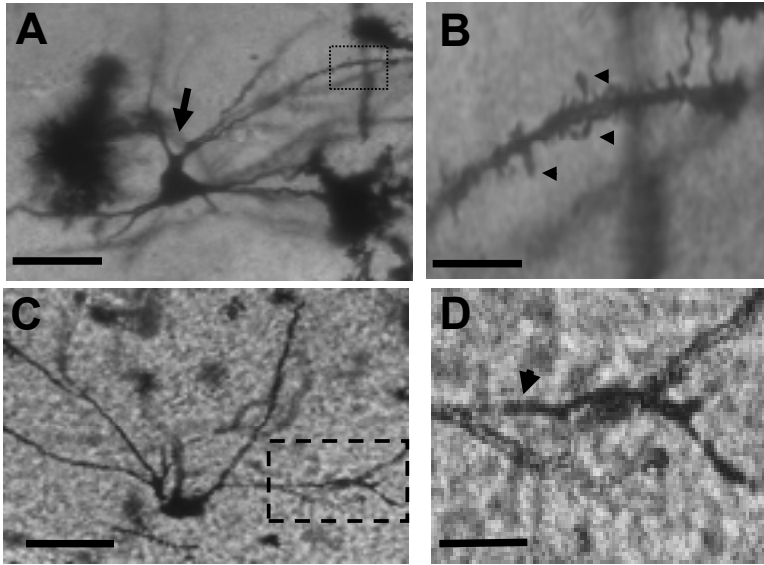


Figure 4

Figura 5

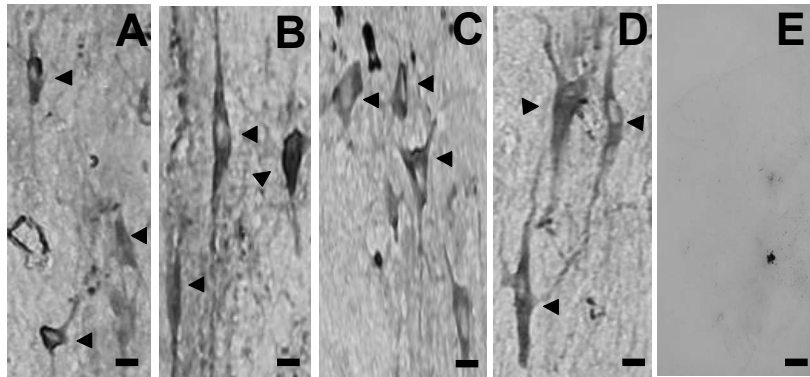


Figure 6

